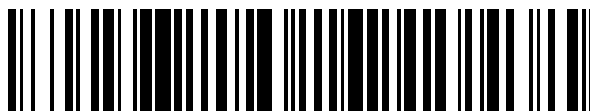


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 023**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2013 PCT/EP2013/066821**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14032953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2013 E 13748032 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2890364**

54 Título: **Formulación para el suministro de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes**

30 Prioridad:

30.08.2012 FR 1258115

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

05.04.2018

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D", 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**NAVARRO Y GARCIA, FABRICE;
BRUNIAUX, JONATHAN;
GIDROL, XAVIER;
SULPICE, ERIC y
TEXIER-NOGUES, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 662 023 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

Formulación para el suministro de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes

5

[0001] La presente invención se refiere a una formulación de tipo nanoemulsión útil para el suministro de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes.

[0002] El mecanismo de interferencia por ARN es un mecanismo de inhibición postranscripcional de la expresión de los genes y se basa en ARN interferentes pequeños de cadena doble que degradan específicamente un ARNm diana e inhiben muy selectiva y específicamente la expresión de una proteína. Este mecanismo se desarrolla en el citoplasma y pone en juego un complejo multiproteico llamado el complejo RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*).

[0003] Desde el descubrimiento de este mecanismo natural, se utilizan secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes en numerosos laboratorios académicos y/o farmacéuticos como herramienta de investigación en varias disciplinas de la biología. Por ejemplo, las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes se utilizan para revelar nuevas dianas terapéuticas en numerosas patologías. Inhibiendo de forma muy selectiva y específica la expresión de esta o aquella proteína, se puede poner de manifiesto de este modo el papel que juega en el proceso de desarrollo de la patología. No obstante, la introducción de material genético exógeno en la célula (transfección) requiere un método adaptado físico, químico o biológico, para permitir a estas secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN, que son generalmente moléculas grandes (>10 kDa) y están cargadas negativamente, atravesar la membrana plasmática cargada negativamente que constituye una auténtica barrera.

25

[0004] Entre los métodos físicos, se pueden mencionar la electroporación o la generación de poros en la membrana por ultrasonidos. Entre los métodos biológicos, se puede citar la intervención de sistemas especializados en el suministro de ácidos nucleicos tales como virus. Entre los métodos químicos, se puede citar la utilización:

- 30 - de lipoplejos (complejos formados entre ácidos nucleicos y lípidos catiónicos), por ejemplo lipofectamine® 2000,
- de poliplexos (complejos formados entre ácidos nucleicos y polímeros catiónicos, por ejemplo polietiliminina PEI),
- de complejos formados entre ácidos nucleicos y dendrímeros, por ejemplo dendrímeros a base de poli(amidoamina) PANAM,
- de lipopoliplexos (complejos formados entre ácidos nucleicos, liposomas y polímeros), por ejemplo SNALP («*stable nucleic acid-lipid particles*» en inglés), que corresponden a mezclas de lípidos catiónicos y auxiliares que forman liposomas, estabilizados mediante polímeros de tipo polietilenglicol (PEG),
- 35 - de complejos formados entre ácidos nucleicos y nanopartículas poliméricas a base de poli(DL-lactido-co-glicólido) PLGA.

[0005] A conocimiento de los inventores, solamente Park y col., (Molecular Pharmaceutics 5, 4, 622-631, 2008) describen la utilización de nanopartículas lipídicas para el suministro de ARNip. Las nanopartículas lipídicas comprenden colesterol, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y un derivado de ARNip y se utilizaron para la transfección y la extinción de la proteína GFP. Sin embargo, para evitar la fuga del ARNip fuera de las nanopartículas, estos se injertaron de manera covalente a éstas. Los ARNip se han unido, en efecto, de manera covalente a una cadena de poli(óxido de etileno) que se intercala en las nanopartículas y permite fijar los ARNip. Además, un marcador fluorescente (agente de imagenología) también se ha injertado de manera covalente a los ARNip para el seguimiento de la transfección. Ahora bien, cualquier modificación química del ARNip es susceptible de desnaturalizarlo. Además, la técnica de Park y col., necesita modificar químicamente cada ARNip utilizado, lo que es largo y costoso. Existe, por lo tanto, una necesidad de proporcionar un sistema de suministro de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN en el que estos no sean modificados químicamente.

50

[0006] Además, la solicitud de patente WO 2010/018223 describe la utilización de una formulación en forma de nanoemulsión, que comprende una fase acuosa continua y al menos una fase dispersada que comprende un lípido anfífilo, un lípido solubilizante, un agente terapéutico y un cotensioactivo que comprende al menos una cadena compuesta por motivos de óxido de alquileo, para el suministro de un agente terapéutico anfífilo o lipófilo. El agente terapéutico puede ser, concretamente, un ARNip. Sin embargo, al ser los ARNip compuestos hidrófilos, se situarían en la fase acuosa continua de la nanoemulsión, y no en la fase dispersada. La formulación descrita en esta solicitud no está, por lo tanto, adaptada para el suministro de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos

55

endógenos de ARN interferentes. Además, los inventores de la presente invención demostraron que todas las formulaciones descritas en el documento WO 2010/018223, y en particular las descritas en los ejemplos, incluso las que integran en ellas tensioactivos catiónicos, no están adaptadas para la presente aplicación, ya que el rendimiento de complejación es muy bajo, y la transfección no sería eficaz. En efecto, como se explica a continuación, solamente 5 formulaciones que comprenden proporciones específicas de componentes permiten el suministro de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes.

[0007] Por otro lado, se conocen sistemas de suministro de ácido desoxirribonucleico (ADN) a base de emulsión de aceite en agua o de gotitas lipídicas. En estos sistemas, las gotitas lipídicas comprenden tensioactivos 10 catiónicos, gracias a los cuales el ADN se une a las gotitas mediante interacciones electrostáticas.

[0008] Por ejemplo, Del Pozo-Rodríguez y col., (International Journal of Pharmaceutics, 385, 2010, 157-162) observaron una presencia de fluorescencia en el hígado y el bazo de ratones a los que se les administraron por vía intravenosa nanopartículas lipídicas que comprenden ADN plasmídico desnudo (ADNp) de la proteína fluorescente 15 EGFP, Precirol® ATO 5, Tween 80, cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano (DOTAP) (tensioactivo catiónico) para transfectar *in vitro* células HEK293 e *in vivo* después de la administración a ratones.

[0009] Tabatt y col., (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57, 2004, 155) describen la utilización de nanopartículas lipídicas sólidas que comprenden Compritol ATO 888 o cetilpalmitato, Tween 80, Span 20 85, un tensioactivo catiónico seleccionado entre cloruro de alquildimetilbencilamonio (BA), bromuro de tetradeciltrimetilamonio (CTAB), cloruro de hexadecilpiridinio (CPC), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), cloruro de N,N-di-(b-estearoiletil)-N,N-dimetil-amonio (Esterquat 1, EQ 1) y cloruro de 8,N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) para transfectar *in vitro* células COS-1.

[0010] En estos dos artículos, se utilizó Tween 80. Ahora bien, éste presenta cierta toxicidad frente a las 25 células. Además, Tween 80 comprende cadenas de poli(óxido de etileno) que comprenden 20 unidades de óxido de etileno. Como se explica a continuación, los inventores demostraron que un tensioactivo que tiene cadenas de poli(óxido de etileno) más largas (al menos 25 unidades de óxido de etileno) es más fácil de formular, y más estable, y permite proteger más eficazmente las secuencias nucleotídicas comprendidas en la formulación frente al medio 30 exterior.

[0011] Finalmente, las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN, en particular ARNip, son generalmente menos estables que el ADN. Además, las actividades biológicas de ADN y de ARNip son muy diferentes, lo que induce que los sistemas de suministro adaptados para el 35 ADN no son necesariamente los mismos que los adaptados para el suministro de ARNip. En particular, incluso si en los dos casos, un prerrequisito es un sistema de suministro que permita realizar transfecciones eficaces, esto no es suficiente para un sistema de suministro de ARNip que solamente será interesante si permite silenciar el gen.

[0012] El desarrollo de nuevas formulaciones que permite el suministro *in vivo* e *in vitro* de secuencias 40 nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN es, por lo tanto, necesario.

[Formulación]

[0013] A tal efecto, de acuerdo con un primer objeto, la presente invención proporciona una formulación en 45 forma de nanoemulsión, que comprende una fase acuosa continua y al menos una fase dispersada.

[0014] La invención proporciona una formulación que comprende una secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes que permite el suministro de dichas secuencias.

50 **[0015]** La invención proporciona, también, una formulación, llamada «premezcla», libre de secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN, que permite la preparación de una formulación que comprende una secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes por complejación de una secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN con esta formulación «premezcla». Esta formulación «premezcla» puede, por lo tanto, 55 ventajosamente complejarse con una secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN adaptada de acuerdo con la utilización deseada de la formulación final.

[Formulación de tipo premezcla]

[0016] De este modo, de acuerdo con un primer objeto, la presente invención proporciona una formulación en forma de nanoemulsión, que comprende una fase acuosa continua y al menos una fase dispersada, y que comprende:

- 5 - al menos un 5% molar de lípido anfífilo,
 - del 15 al 70% molar de al menos un tensioactivo catiónico que comprende:

- al menos un grupo lipófilo seleccionado entre:

- 10 - un grupo R o R-(C=O)-, donde R representa una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,
 - un éster o una amida de ácidos grasos que comprende de 12 a 24 átomos de carbono y fosfatidiletanolamina, y
 - un poli(óxido de propileno), y

- 15 - al menos un grupo hidrófilo que comprende al menos un grupo catiónico seleccionado entre:

- un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 12 átomos de carbono e interrumpido y/o sustituido por al menos un grupo catiónico, y

- 20 - un grupo polimérico hidrófilo que comprende al menos un grupo catiónico, y

- del 10% al 55% molar de un cotensioactivo que comprende al menos una cadena de poli(óxido de etileno) que comprende al menos 25 unidades de óxido de etileno,

- un lípido solubilizante que comprende al menos un glicérido de ácidos grasos,
 - opcionalmente un lípido fusógeno,

25

donde los porcentajes molares de lípido anfífilo, de tensioactivo catiónico y de cotensioactivo son con respecto al conjunto (lípido anfífilo/tensioactivo catiónico/cotensioactivo/lípido fusógeno opcional).

[0017] Como se explica a continuación, los: lípido anfífilo/tensioactivo catiónico/cotensioactivo/lípido fusógeno
 30 opcional son los principales componentes de la corona de las gotitas de la formulación «premezcla».

[0018] La emulsión es, por lo tanto, una emulsión de tipo aceite en agua. Puede ser sencilla o múltiple, concretamente constando, en la fase dispersada, de una segunda fase acuosa. Preferentemente, es sencilla.

- 35 **[0019]** La invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la formulación descrita anteriormente puede utilizarse como agente de transfección y/o para el suministro *in vitro* e *in vivo* de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN. La formulación presenta ventajosamente una buena biodisponibilidad y puede permitir limitar la degradación de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes generalmente observada con otros sistemas de suministro,
 40 concretamente la degradación por proteínas.

[0020] Además, la formulación es ventajosamente estable: puede almacenarse varias horas sin que se observe degradación alguna.

- 45 • Tensioactivo catiónico

[0021] La formulación de acuerdo con la invención comprende un tensioactivo catiónico que comprende:

- al menos un grupo lipófilo seleccionado entre:

50

- un grupo R que representa una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,
 - un éster o una amida de ácidos grasos que comprende de 12 a 24 átomos de carbono y fosfatidiletanolamina, tal como diestearyl fosfatidiletanolamina (DSPE), y
 - un poli(óxido de propileno), y

55

- al menos un grupo hidrófilo que comprende al menos un grupo catiónico seleccionado entre:

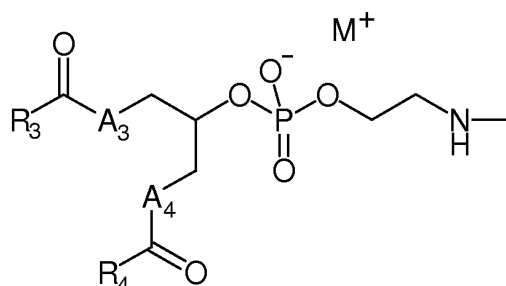
- un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 12 átomos de carbono e interrumpido y/o sustituido por al menos un grupo catiónico, y

- un grupo polimérico hidrófilo que comprende al menos un grupo catiónico, estando dicho grupo polimérico concretamente seleccionado entre:

- un poli(óxido de etileno) que comprende típicamente de 3 a 500 unidades de óxido de etileno, preferentemente de 20 a 200 unidades de óxido de etileno, y que comprende al menos un grupo catiónico.
- un polisacárido, tal como dextrano, celulosa o quitosana, que tiene concretamente masas moleculares comprendidas entre 0,5 y 20 kDa, por ejemplo entre 1 y 12 kDa,
- una poliamina, tal como una quitosana o una polilisina, que tiene concretamente masas moleculares comprendidas entre 0,5 y 20 kDa, por ejemplo entre 1 y 12 kDa.

10

[0022] Por «éster o amida de ácidos grasos que comprende de 12 a 24 átomos de carbono y fosfatidiletanolamina», se entiende un grupo de fórmula:



15

en la que

- R₃ y R₄ representan independientemente una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,
- 20 - A₃ y A₄ representan O o NH, et
- M representa H o un catión.

[0023] Los grupos catiónicos del tensioactivo catiónico son típicamente:

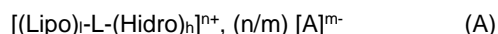
- 25 - onios seleccionados entre los grupos amonio, imidazolio, piridinio, pirrolidinio, piperidinio, fosfonio o sulfonio, o
- complejos metálicos entre un radical de un grupo orgánico quelante mono o multi-dentado, por ejemplo fenantrolina, piridina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), porfirinas, ftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas complejadas con un catión inorgánico, tal como Ca²⁺, Al³⁺, Ni⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ o Cu²⁺,
- 30 - grupos amonio, concretamente -⁺NMe₃, -⁺NHMe₂, -⁺NH₂Me et -⁺NH₃, siendo en particular -⁺NH₃, particularmente preferido.

[0024] Por supuesto, aniones están asociados al grupo o grupos catiónicos para que la formulación sea eléctricamente neutra. La naturaleza de los aniones no está limitada. A título ilustrativo, se pueden citar los halogenuros, concretamente cloruro o bromuro, o trifluoroacetato.

[0025] En el tensioactivo catiónico, la naturaleza del grupo de enlace que une el o los grupos lipófilos al o los grupos hidrófilos que comprenden al menos un grupo catiónico no está limitada. A continuación se proporcionan ejemplos de grupos de enlace (grupo L).

40

[0026] En una realización, el tensioactivo catiónico tiene la fórmula (A) siguiente:



45 en la que:

- l y h representan números enteros independientemente comprendidos entre 1 y 4,
- n es un número entero superior o igual a 1, generalmente comprendido entre 1 y 50,
- Lipo representa un grupo lipófilo tal como se ha definido anteriormente,
- 50 - Hidro representa un grupo hidrófilo tal como se ha definido anteriormente que comprende al menos un grupo

catiónico,

- L representa un grupo de enlace,
 - A representa un anión,
 - m es un número entero que representa la carga del anión,
- 5 - n es un número entero que representa la carga del catión [(Lipo)_l-L-(Hidro)_n].

[0027] En la fórmula (A) mencionada anteriormente, preferentemente L es tal que:

- cuando l y h representan 1, L es un grupo de enlace divalente seleccionado entre:
 - 10 - un enlace sencillo,
 - un grupo Z seleccionado entre -O-, -NH-, -O(OC)-, -(CO)O-, -(CO)NH-, -NH(CO)-, -O-(CO)-O-, -NH-(CO)-O-, -O-(CO)-NH- y -NH-(CO)-NH, -O-PO(OH)-O- o un radical divalente cíclico de 5 a 6 átomos,
 - un grupo Alk que es un alquileo que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y
- 15 - un grupo Z-Alk, Alk-Z, Alk-Z-Alk o Z-Alk-Z donde Alk y Z son tal como se han definido anteriormente y donde los dos grupos Z del grupo Z-Alk-Z son iguales o diferentes,
 - cuando uno de los grupos l o h representa 1, y el otro representa 2, L es un grupo trivalente seleccionado entre un grupo fosfato OP-(O)₃, un grupo derivado de glicerol de fórmula -O-CH₂-CH-(O)-CH₂-O- y un radical trivalente cíclico de 5 a 6 átomos,
 - 20 - para los otros valores de l y h, L es un radical multivalente cíclico de 5 a 6 átomos.

[0028] De manera particularmente preferida, L es tal que:

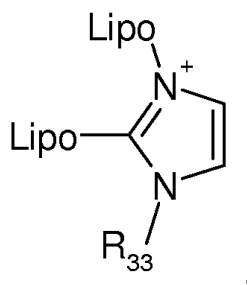
- 25 - cuando l y h representan 1, L es un grupo de enlace divalente seleccionado entre:
 - un enlace sencillo,
 - un grupo Z seleccionado entre -O-, -NH-, -O(OC)-, -(CO)O-, -(CO)NH-, -NH(CO)-, -O-(CO)-O-, -NH-(CO)-O-, -O-(CO)-NH- y -NH-(CO)-NH o -O-PO(OH)-O-,
- 30 - cuando uno de los grupos l o h representa 1, y el otro representa 2, L es un grupo trivalente seleccionado entre un grupo fosfato OP-(O)₃ y un grupo derivado de glicerol de fórmula -O-CH₂-CH-(O)-CH₂-O-.

[0029] En la fórmula (A) mencionada anteriormente, l y h representan de forma preferentemente independiente 1 ó 2.

[0030] De acuerdo con una primera alternativa, el grupo hidrófilo del tensioactivo catiónico es un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 12 átomos de carbono e interrumpido y/o sustituido por al menos un grupo catiónico. Como ejemplo de dichos tensioactivos catiónicos, se pueden citar:

40 1) (Lipo)-(CH₂)_{m1}-NR₃₀R₃₁R₃₂, donde Lipo es un grupo lipófilo tal como se ha definido anteriormente, m1 representa 1 o 2 y R₃₀, R₃₁ y R₃₂ representan independientemente H, Me o -CH₂-CH₂-OH,

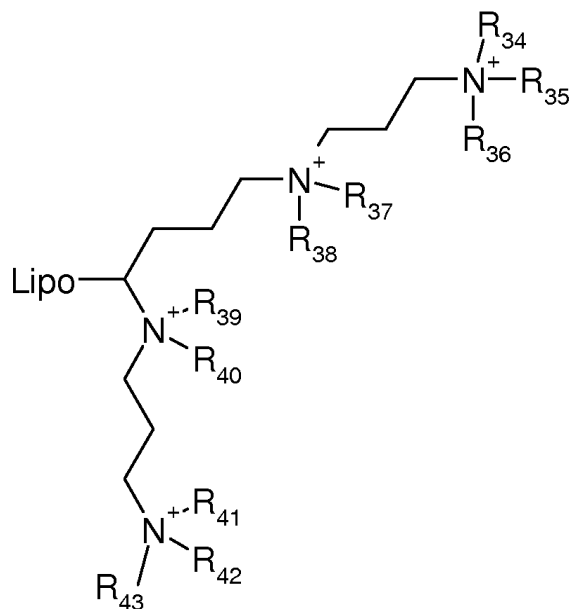
45 2)



donde cada Lipo es independientemente un grupo lipófilo tal como se ha definido anteriormente, y R33 representa H, Me o -CH₂-CH₂-OH,

50

3)



5 donde Lipo es un grupo lipófilo tal como se ha definido anteriormente, y R_{34} , R_{35} , R_{36} , R_{37} , R_{38} , R_{39} , R_{40} , R_{41} , R_{42} y R_{43} representan independientemente H, Me o $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$.

[0031] En una realización, el tensioactivo catiónico se selecciona entre:

- 10 - *N*[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamonio (DOTMA),
 - 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP),
 - *N*-(2-hidroxietyl)-*N,N*-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi-1-propananio) (DMRIE),
 - 1-[2-(oleoiloxi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxietyl)imidazolinio (DOTIM), y
 - dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS) (en forma protonada),

15 y es preferentemente 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).

[0032] De acuerdo con una segunda alternativa, el grupo hidrófilo del tensioactivo catiónico es un grupo polimérico hidrófilo que comprende al menos un grupo catiónico.

20 **[0033]** Cuando el grupo hidrófilo del tensioactivo catiónico es polimérico, el o los grupos catiónicos pueden ser un grupo o grupos terminales o colgantes. Por ejemplo:

- 25 - cuando el grupo polimérico hidrófilo es un poli(óxido de etileno), el o los grupos catiónicos están situados generalmente en un grupo terminal en el extremo de la cadena de poli(óxido de etileno).
 - cuando el grupo polimérico hidrófilo es dextrano o celulosa, el grupo o grupos catiónicos están situados generalmente en un grupo terminal en el extremo de la cadena polisacáridica.
 - cuando el grupo polimérico hidrófilo es quitosana, el grupo o grupos catiónicos son generalmente un grupo o grupos colgantes, en particular grupos $-\text{NH}_3^+$ presentes en medio ácido en la quitosana.

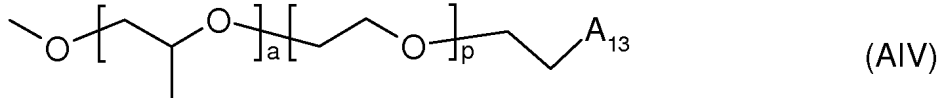
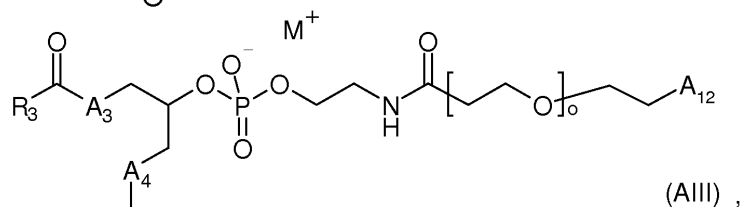
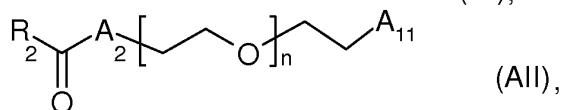
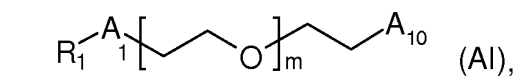
30 **[0034]** En una realización, el o los grupos catiónicos son un grupo o grupos terminales. En efecto, los grupos colgantes de tensioactivos aniónicos adyacentes en superficies de las gotitas de la fase dispersada que son repelidos por interacciones electrostáticas y, por consiguiente, las formulaciones que comprenden tensioactivos catiónicos cuyo grupo Hidro comprende grupos colgantes son generalmente menos estables.

35 **[0035]** En otra realización, el o los grupos catiónicos son un grupo o grupos colgantes. Es posible ventajosamente utilizar un tensioactivo catiónico cuyo grupo hidrófilo comprende varios grupos catiónicos colgantes,

y, por lo tanto, obtener una formulación más cargada positivamente, y que permitirá aún mejor la complejación de especies negativas como las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes.

5 **[0036]** El grupo polimérico hidrófilo preferido es un radical de un poli(óxido de etileno) que comprende típicamente de 3 a 500 unidades de óxido de etileno, preferentemente de 20 a 200 unidades de óxido de etileno, y que comprende al menos un grupo catiónico.

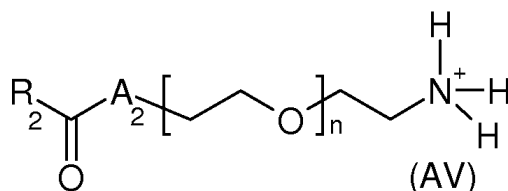
10 **[0037]** De este modo, en una realización, el tensioactivo catiónico tiene una de las fórmulas siguientes:



15 en las que:

- R₁, R₂, R₃ y R₄ representan independientemente una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,
- 20 - A₁, A₂, A₃ y A₄ representan O o NH,
- m, n, o y p representan independientemente números enteros de 3 a 500, preferentemente 20 a 200, y
- a representa un número entero de 20 a 120,
- M representa H o un catión,
- A₁₀, A₁₁, A₁₂ y A₁₃ representan independientemente un grupo -⁺NR₂₀R₂₁R₂₂, en el que R₂₀, R₂₁ y R₂₂ representan
- 25 independientemente H, Me o -CH₂-CH₂-OH.

[0038] En una realización, en la fórmula (AII), A₁₁ representa -⁺NH₃ y el tensioactivo catiónico tiene la fórmula siguiente:



30 en la que A₂, R₂ y n son tal como se han definido anteriormente. Preferentemente, en la fórmula (AII), R₂ representa C₁₇H₃₅.

35 **[0039]** Sin desear estar ligados a una teoría particular, la presencia del grupo polimérico hidrófilo permitiría:

- estabilizar la formulación, y
- proteger las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes

localizados en la superficie de las gotitas de las proteínas del medio en el que la formulación se administra/utiliza, y por lo tanto la degradación de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes por estas proteínas.

5 **[0040]** De acuerdo con una tercera alternativa, la formulación de acuerdo con la invención comprende al menos dos tensioactivos catiónicos, de los cuales:

- uno se selecciona entre:

- 10 - *N*[1-(2,3-dioleiloxi) propil]-*N,N,N*-trimetilamonio (DOTMA),
 - 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP),
 - *N*-(2-hidroxiethyl)-*N,N*-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi-1-propano) (DMRIE),
 - cloruro de 1-[2-(oleoiloxi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxiethyl)imidazolinio (DOTIM), y
 - dioctadecilamidoglicilispermina (DOGS),

15

y es preferentemente 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), y

- el otro es un tensioactivo catiónico que comprende:

20 - al menos un grupo lipófilo seleccionado entre:

- un grupo R o R-(C=O)-, donde R representa una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,

25 - un éster o una amida de ácidos grasos que comprende de 12 a 24 átomos de carbono y fosfatidiletanolamina, tal como diestearil fosfatidiletanolamina (DSPE), y

- un poli(óxido de propileno), y

- un grupo polimérico hidrófilo que comprende al menos un grupo catiónico, estando dicho grupo polimérico seleccionado entre:

30

- un poli(óxido de etileno) que comprende típicamente de 3 a 500 unidades de óxido de etileno, preferentemente de 20 a 200 unidades de óxido de etileno, y que comprende al menos un grupo catiónico,

- un polisacárido, tal como dextrano, celulosa o quitosana,

- una poliamina, tal como una quitosana o una polilisina,

35

y es preferentemente un poli(óxido de etileno) que comprende al menos un grupo catiónico.

[0041] En una realización, la formulación de acuerdo con la invención comprende, como tensioactivos catiónicos:

40

- 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano, y

- un tensioactivo catiónico que comprende:

- al menos un grupo lipófilo seleccionado entre:

45

- un grupo R o R-(C=O)-, donde R representa una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,

- un éster o una amida de ácidos grasos que comprende de 12 a 24 átomos de carbono y fosfatidiletanolamina, tal como diestearil fosfatidiletanolamina (DSPE), y

50

- un poli(óxido de etileno) que comprende típicamente de 3 a 500 unidades de óxido de etileno, preferentemente de 20 a 200 unidades de óxido de etileno, y que comprende al menos un grupo catiónico.

[0042] En una realización, la formulación de acuerdo con la invención comprende, como tensioactivos catiónicos:

55

- 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano, y

- un compuesto de fórmula (All) tal como se ha definido antes, concretamente de fórmula (AV).

[0043] El tensioactivo catiónico se sitúa en la corona de las gotitas de la formulación. Éste se une por interacciones electrostáticas a las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN y permite mantener los ARNip en la superficie de las gotitas.

5 **[0044]** La formulación comprende del 15 al 70% molar de al menos un tensioactivo catiónico con respecto al conjunto (lípido anfífilo/tensioactivo catiónico/cotensioactivo/lípido fusógeno opcional). Por debajo del 15%, la formulación no comprende bastantes cargas positivas y la complejación posterior de la formulación «premezcla» con las secuencias nucleotídicas (cargadas negativamente) es insuficiente. Más allá del 70%, las formulaciones no son estables, y no pueden generalmente ni siquiera ser formuladas (la formación de la nanoemulsión no es posible, ya
10 que las gotitas se fusionan para formar dos fases), y las gotitas se vuelven generalmente tóxicas para las células.

[0045] Estas proporciones son particularmente adecuadas para obtener una complejación eficaz de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes, y, por lo tanto, un buen suministro y/o transfección.

15

• Lípido fusógeno («helper lipid» en inglés)

[0046] En una realización, la formulación de acuerdo con la invención comprende un lípido fusógeno, que es susceptible de facilitar la liberación citosólica mediante desestabilización de la membrana endosómica, llamado
20 lípido «helper». Preferentemente, este lípido es dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE).

[0047] Este lípido permite favorecer el escape endosómico de las gotitas de la formulación de acuerdo con la invención, y, por lo tanto de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN que contienen, y mejora generalmente la eficacia de silenciamiento del gen de interés.

25

[0048] El lípido susceptible de facilitar la liberación citosólica por desestabilización de la membrana endosómica se sitúa en la corona de las gotitas de la formulación.

• lípido anfífilo

30

[0049] La formulación comprende al menos un lípido anfífilo, que se sitúa en la corona de las gotitas de la formulación.

[0050] Para formar una nanoemulsión estable, es necesario incluir en la composición al menos un lípido anfífilo como tensioactivo. La naturaleza anfífila del tensioactivo garantiza la estabilización de las gotitas de aceite dentro de la fase continua acuosa. Por debajo del 5% molar de lípido anfífilo con respecto al conjunto (lípido anfífilo/tensioactivo catiónico/cotensioactivo/lípido fusógeno opcional), las formulaciones no son estables, y generalmente no pueden ni siquiera ser formuladas (la formación de la nanoemulsión no es posible ya que las gotitas se fusionan para formar dos fases).

40

[0051] Generalmente, la formulación comprende del 5 al 85% molar, preferentemente del 5 al 75% molar, en particular del 5 al 50% molar y más particularmente del 8 al 30% molar de lípido anfífilo con respecto al conjunto (lípido anfífilo/tensioactivo catiónico/cotensioactivo/lípido fusógeno opcional).

45 **[0052]** La cantidad de lípido anfífilo contribuye ventajosamente a controlar el tamaño de la fase dispersada de la nanoemulsión.

[0053] Los lípidos anfífilos constan de una parte hidrófila y una parte lipófila. Se seleccionan generalmente entre los compuestos cuya parte lipófila comprende una cadena saturada o insaturada, lineal o ramificada, que tiene
50 de 8 a 30 átomos de carbono. Pueden seleccionarse entre fosfolípidos, colesterolos, lisolípidos, esfingomielinas, tocoferoles, glucolípidos, estearilaminas, cardiolipinas de origen natural o sintético; moléculas compuestas por un ácido graso acoplado a un grupo hidrófilo por una función éter o éster tales como ésteres de sorbitán como por ejemplo monooleato y monolaurato de sorbitán comercializados con las denominaciones Span® por la compañía Sigma; los lípidos polimerizados; los lípidos conjugados a cadenas cortas de óxido de polietileno (PEG) tales como
55 los tensioactivos no iónicos comercializados con las denominaciones comerciales Tween® por la compañía ICI Americas, Inc. y Triton® por la compañía Union Carbide Corp.; los ésteres de azúcar tales como mono y dilaurato, mono y dipalmitato, mono- y diestearato de sacarosa; pudiendo utilizarse dichos tensioactivos solos o en mezclas.

[0054] Los fosfolípidos son los lípidos anfífilos preferidos.

[0055] La lecitina es el lípido anfífilo particularmente preferido.

• lípido solubilizante

5

[0056] La formulación comprende, por otro lado, un lípido solubilizante que comprende al menos un glicérido de ácidos grasos, que se sitúa en la fase dispersada de la nanoemulsión, más exactamente en el núcleo de las gotitas. Este compuesto tiene como misión principal solubilizar el lípido anfífilo, poco soluble, en la fase dispersada de la nanoemulsión.

10

[0057] El lípido solubilizante es un lípido que presenta una afinidad con el lípido anfífilo suficiente para permitir su solubilización. Preferentemente, el lípido solubilizante es sólido a temperatura ambiente.

[0058] En el caso en el que el lípido anfífilo es un fosfolípido, puede tratarse concretamente:

15

- de ésteres de ácidos grasos y de alcohol graso, como cetilpalmitato, o
- de derivados de glicerol, y en particular de glicéridos obtenidos por esterificación de glicerol con ácidos grasos.

[0059] El lípido solubilizante utilizado se selecciona ventajosamente en función del lípido anfífilo utilizado. Presentará generalmente una estructura química cercana, para garantizar la solubilización buscada. Puede tratarse de un aceite o de una cera. Preferentemente, el lípido solubilizante es sólido a temperatura ambiente (20°C), pero líquido a la temperatura del cuerpo (37°C).

20

[0060] Los lípidos solubilizantes preferidos, en particular para los fosfolípidos, son los ésteres de ácidos grasos y de alcohol graso, como cetilpalmitato, o los glicéridos de ácidos grasos, concretamente de ácidos grasos saturados, y en particular de ácidos grasos saturados que constan de 8 a 18 átomos de carbono, más preferido de 12 a 18 átomos de carbono. Ventajosamente, se trata de una mezcla de diferentes glicéridos.

25

[0061] Preferentemente, se trata de glicéridos de ácidos grasos saturados que constan de al menos el 10% en peso de ácidos grasos de C12, al menos el 5% en peso de ácidos grasos de C14, al menos el 5% en peso de ácidos grasos de C16 y al menos el 5% en peso de ácidos grasos de C18.

30

[0062] Preferentemente, se trata de glicéridos de ácidos grasos saturados que constan del 0% al 20% en peso de ácidos grasos de C8, del 0% al 20% en peso de ácidos grasos de C10, del 10% al 70% en peso de ácidos grasos de C12, del 5% al 30% en peso de ácidos grasos de C14, del 5% al 30% en peso de ácidos grasos de C16 y del 5% al 30% en peso de ácidos grasos de C18.

35

[0063] Se prefieren particularmente las mezclas de glicéridos semisintéticos sólidos a temperatura ambiente comercializados con la denominación comercial Suppocire®NC por la compañía Gattefossé y aprobada para la inyección en ser humano. Los Suppocire® de tipo N se obtienen por esterificación directa de ácidos grasos y de glicerol. Se trata de glicéridos semisintéticos de ácidos grasos saturados de C8 a C18, cuya composición cualitativa-cuantitativa se indica en la tabla a continuación.

40

[0064] Los lípidos solubilizantes citados anteriormente permiten obtener una formulación en forma de nanoemulsión ventajosamente estable. Sin desear estar ligados a una teoría particular, se supone que los lípidos solubilizantes citados anteriormente permiten obtener gotitas en la nanoemulsión que presentan un núcleo amorfo. El núcleo obtenido de este modo presenta una viscosidad interna elevada sin presentar, no obstante, cristalinidad. Ahora bien, la cristalización es nefasta para la estabilidad de la nanoemulsión, ya que conduce generalmente a una agregación de las gotitas y/o a una expulsión de las moléculas encapsuladas al exterior de las gotitas. Estas propiedades físicas favorecen la estabilidad física de la nanoemulsión.

45

50

[0065] La cantidad de lípido solubilizante puede variar ampliamente en función de la naturaleza y de la cantidad de lípido anfífilo presente en la fase dispersada. Generalmente, el núcleo de las gotitas (que comprende el lípido solubilizante, el aceite opcional, el agente de imagenología opcional, el agente terapéutico opcional si es lipófilo) comprende del 1 al 100% en peso, preferentemente del 5 al 80% en peso y más particularmente del 40 al 75% en peso de lípido solubilizante.

55

Composición de ácidos grasos de Suppocire® NC de Gattefossé

Longitud de cadenas	[% en peso]
C8	0,1 a 0,9
C10	0,1 a 0,9
C12	25 a 50
C14	10 a 24,9
C16	10 a 24,9
C18	10 a 24,9

• aceite

5 **[0066]** La fase dispersada puede constar, por otro lado, de uno o varios otros aceites, que se sitúan en el núcleo de las gotitas.

[0067] Los aceites utilizados presentan, preferentemente, un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) inferior a 8 y aún más preferentemente comprendido entre 3 y 6. Ventajosamente, los aceites se utilizan sin modificación química o física previamente a la formación de la emulsión.

10

[0068] Los aceites se seleccionan generalmente entre los aceites biocompatibles, y en particular entre los aceites de origen natural (vegetal o animal) o sintético. Entre dichos aceites, se pueden citar concretamente los aceites de origen natural vegetal entre los cuales figuran concretamente aceites de soja, de lino, de palma, de cacahuete, de aceitunas, de semilla de uva y de girasol; los aceites sintéticos entre los que figuran concretamente triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos. Estos aceites pueden ser primeros prensados, refinados o interesterificados.

15

[0069] Los aceites preferidos son aceite de soja y aceite de lino.

20

[0070] Generalmente, si está presente, el aceite estará contenido en el núcleo de las gotitas (que comprende el lípido solubilizante, el aceite opcional, el agente de imagenología opcional, el agente terapéutico opcional si es lipófilo) en una proporción que va del 1 al 80% en peso, preferentemente entre el 5 y el 50% en peso y más particularmente del 10 al 30% en peso.

25

[0071] La fase dispersada puede contener además otros aditivos tales como colorantes, estabilizantes, conservantes u otros principios activos, en cantidad apropiada.

• Cotensioactivo

30

[0072] La formulación comprende un cotensioactivo, que permite estabilizar la nanoemulsión.

[0073] Los cotensioactivos utilizables en las formulaciones utilizadas en la invención son, generalmente, tensioactivos hidrosolubles. Estos comprenden al menos una cadena de poli(óxido de etileno) que comprende al menos 25, concretamente al menos 30, preferentemente al menos 35, unidades de óxido de etileno. El número de unidades de óxido de etileno es generalmente inferior a 500.

35

[0074] Formulaciones que comprenden un cotensioactivo que comprende una cadena de poli(óxido de etileno) que comprende menos de 25 unidades de óxido de etileno no son, en efecto, estables. Generalmente, ni siquiera es posible preparar la nanoemulsión.

40

[0075] Estos números de unidades son, en efecto, particularmente adecuados para evitar la fuga de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes fuera de las gotitas.

45

[0076] En efecto, los inventores han observado que una formulación que no comprende un cotensioactivo no es suficientemente estable.

[0077] Además, sin desear estar ligados a una teoría particular, la presencia de la cadena compuesta por motivos de óxido de etileno del cotensioactivo permitiría proteger las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes localizados en la superficie de las gotitas de las proteínas del medio en el que la formulación se administra/utiliza, y por lo tanto la degradación de dichas secuencias nucleotídicas por estas proteínas.

50

[0078] A modo de ejemplo de cotensioactivos, se pueden citar en particular los compuestos conjugados de polietilenglicol/fosfatidiletanolamina (PEG-PE), éteres de ácido graso y de polietilenglicol tales como los productos comercializados con las denominaciones comerciales Brij® (por ejemplo Brij® 35, 58, 78 ó 98) por la compañía ICI Americas Inc., ésteres de ácido graso y de polietilenglicol tales como los productos comercializados con las denominaciones comerciales Myrj® por la compañía ICI Americas Inc. (por ejemplo Myrj® 45, 52, 53 ó 59) y copolímeros de bloques de óxido de etileno y de óxido de propileno tales como los productos comercializados con las denominaciones comerciales Pluronic® por la compañía BASF AG (por ejemplo Pluronic® F68, F127, L64, L61, 10R4, 17R2, 17R4, 25R2 o 25R4) o los productos comercializados con la denominación comercial Synperonic® por la compañía Unichema Chemie BV (por ejemplo Synperonic® PE/F68, PE/L61 o PE/L64).

[0079] De este modo, el cotensioactivo se sitúa a la vez en la fase acuosa continua y en la fase dispersada. En efecto, la parte hidrófoba del cotensioactivo se introduce en las gotitas de la fase dispersada, mientras que las cadenas polialcoxiladas están en la fase acuosa continua. En la presente solicitud, los porcentajes máxicos de fase dispersada descritos se calculan considerando que el cotensioactivo pertenece a la fase dispersada.

[0080] La formulación comprende del 10% al 55% molar de cotensioactivo con respecto al conjunto (lípidos anfífilos/tensioactivo catiónico/cotensioactivo/lípido fusógeno opcional). Por debajo del 10%, las formulaciones no son estables, y generalmente ni siquiera pueden ser formuladas (la formación de la nanoemulsión no es posible, ya que las gotitas se fusionan para formar dos fases). Más allá del 55%, la complejación posterior de la formación «premezcla» con las secuencias nucleotídicas no tiene lugar, probablemente ya que las cargas positivas del tensioactivo catiónico son enmascaradas por las cadenas de poli(óxido de etileno) del cotensioactivo y, por lo tanto, son más accesibles para unirse mediante unión electrostática a las secuencias nucleotídicas.

[0081] El cotensioactivo puede presentar, por otro lado, otros efectos en la aplicación prevista de la nanoemulsión.

[0082] De acuerdo con una realización, la fase dispersada de la nanoemulsión está injertada en la superficie con moléculas de interés tales como ligandos biológicos, para aumentar el direccionamiento específico de un órgano. Dicho injerto permite un reconocimiento específico de ciertas células o de ciertos órganos favoreciendo la internalización de las gotitas de la formulación de acuerdo con la invención por las células diana que expresan el receptor en superficie. De este modo, es posible transfectar células que se sabe que son resistentes a los agentes de transfección de la técnica anterior. Preferentemente, el injerto en superficie se realiza por acoplamiento de las moléculas de interés o de sus precursores con un compuesto anfílico, concretamente con el cotensioactivo. La nanoemulsión comprende entonces un cotensioactivo injertado. En este caso, el cotensioactivo juega el papel de un espaciador que permite acomodar las moléculas de interés en superficie.

[0083] Las moléculas de interés pueden ser, por ejemplo:

- ligandos biológicos de direccionamiento tales como anticuerpos, péptidos, sacáridos, aptámeros, oligonucleótidos o compuestos como el ácido fólico;
- un agente de "invisibilidad": una entidad añadida para conferir a la nanoemulsión una "invisibilidad" frente al sistema inmunitario, aumentar su tiempo de circulación en el organismo, y ralentizar su eliminación.

[0084] Por ejemplo, cuando el ligando biológico es un péptido que comprende una o varias cisteínas, el injerto en la cadena de óxido de alquileo del tensioactivo puede garantizarse mediante acoplamiento de tiol maleimida.

• agente de imagenología

[0085] En una realización, la formulación comprende un agente de imagenología, que permite ventajosamente visualizar la distribución de las gotitas en las células o el cuerpo del paciente y, por lo tanto, la distribución de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN.

[0086] El agente de imagenología puede utilizarse concretamente en las imagenologías de tipo:

- tomografía de emisión de positrones (*Positron Emission Tomography* (PET) en inglés) (pudiendo ser el agente de imagenología un compuesto que comprende un radionúclido, tal como ¹⁸F, ¹¹C, un quelato de cationes metálicos ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu),

- tomografía de emisión monofotónica (TEMP) (*Single photon emission computed tomography* (SPECT) en inglés) (pudiendo ser el agente de imagenología un compuesto que comprende un radionúclido por ejemplo ^{123}I , o un quelato de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{111}In),

5 - imagenología por resonancia magnética (IRM) (pudiendo ser el agente de imagenología un quelato de gadolinio o un nanocrystal magnético tal como un nanocrystal de óxido de hierro, de óxido de manganeso o de hierro-platino FePt),

- imagenología óptica o imagenología por rayos X (pudiendo ser el agente de imagenología un fluoróforo lipófilo o un agente de contraste, por ejemplo una molécula yodada tal como iopamidol, amidotrizoato, o nanopartículas de oro).

10 **[0087]** Preferentemente, el agente de imagenología es un fluoróforo lipófilo que permite realizar la imagenología óptica.

[0088] La naturaleza del o de los fluoróforos lipófilos utilizables no es crítica a partir del momento en el que son compatibles con la imagenología *in vivo* (es decir que son biocompatibles y no tóxicos). Preferentemente, los
15 fluoróforos utilizados como agente de imagenología absorben y emiten en el visible o el infrarrojo cercano. Para la imagenología no invasiva en un tejido o un organismo vivo (animal, ser humano) los fluoróforos preferidos absorben y emiten en el infrarrojo cercano. En efecto, para que la luz de excitación y la luz emitida por el fluoróforo puedan atravesar mejor los tejidos, es conveniente utilizar fluoróforos que absorben y emiten en el infrarrojo cercano, es decir a una longitud de onda comprendida entre 640 y 900 nm.

20 **[0089]** A modo de fluoróforo lipófilo se pueden citar, por ejemplo, los compuestos descritos en el capítulo 13 ("*Probes for Lipids and Membranes*") del catálogo de Invitrogen. De forma más precisa, se pueden citar concretamente, a modo de fluoróforo, el verde de indocianina (ICG), los análogos de ácidos grasos y los fosfolípidos funcionalizados por un grupo fluorescente tal como los productos fluorescentes comercializados con las
25 denominaciones comerciales Bodipy (R) tales como Bodipy (R) 665/676 (Ex/Em.); los derivados lipófilos de carbocianinas tales como perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiD), por ejemplo comercializado con la referencia D-307, perclorato de 3,3'-dihexadeciloxacarbocianina (DiO), por ejemplo comercializado con la referencia D1125, perclorato de 1,1'-dihexadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiI), por ejemplo comercializado con la referencia D384; las sondas fluorescentes derivadas de esfingolípidos, de esteroides
30 o de lipopolisacáridos tales como los productos comercializados con las denominaciones comerciales BODIPY® TR ceramidas, BODIPY® FL C5-lactosilceramida, BODIPY® FL C5-gangliósido, BODIPY® FL cerebrósidos; los derivados anfífilos de cianinas, de rodaminas, de fluoresceínas o de cumarinas tales como octadecil rodamina B, octadecil éster de fluoresceína y 4-heptadecil-7-hidroxicumarina; y difenilhexatrieno (DPH) y sus derivados; siendo el conjunto de estos productos comercializados por la compañía Invitrogen.

35 **[0090]** De acuerdo con una realización preferida de la invención, el fluoróforo es verde de indocianina, perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina, perclorato de 3,3'-dihexadeciloxacarbocianina, o perclorato de 1,1'-dihexadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina.

40 • agente terapéutico

[0091] La formulación de acuerdo con la invención puede constar de un agente terapéutico.

[0092] Los agentes terapéuticos susceptibles de estar encapsulados en la nanoemulsión de acuerdo con la
45 invención comprenden, en particular, los principios activos que actúan por vía química, biológica o física. De este modo, puede tratarse de principios activos farmacéuticos o de agentes biológicos tales como ADN, proteínas, péptidos o anticuerpos o incluso agentes útiles para terapias físicas tales como compuestos útiles para termoterapia, los compuestos que liberan oxígeno singlete cuando son excitados por una luz útil para fototerapia y agentes radiactivos. Preferentemente, se trata de principios activos administrados de forma parenteral.

50 **[0093]** De acuerdo con su afinidad lipófila o anfífila, el agente terapéutico será encapsulado por la fase dispersada o se situará en la interfase de las dos fases.

[0094] La naturaleza de los agentes terapéuticos encapsulados en la nanoemulsión no está particularmente
55 limitada. No obstante, la nanoemulsión es particularmente interesante para compuestos poco solubles, que son difíciles de formular en los sistemas de administración convencionales y para los principios activos útiles para fototerapia, cuyo rendimiento cuántico puede preservarse.

[0095] Debido a condiciones suaves del procedimiento de preparación, la formulación descrita es

particularmente interesante para la encapsulación de agentes terapéuticos que se degradan a temperatura elevada.

[0096] Entre los principios activos farmacéuticos interesantes como agentes terapéuticos, se pueden citar en particular agentes utilizados en el tratamiento del SIDA, agentes utilizados en el tratamiento de enfermedades 5 cardíacas, analgésicos, anestésicos, anoréxicos, antihelmínticos, antialérgicos, antianginosos, antiarrítmicos, anticolinérgicos, anticoagulantes, antidepresivos, antidiabéticos, antidiuréticos, antieméticos, anticonvulsivos, antifúngicos, antihistamínicos, antihipertensivos, antiinflamatorios, antimigraña, antimuscarínicos, antimicobacterianos, anticancerígenos incluyendo anti-Parkinson, antitiroideos, antivirales, astringentes, agentes bloqueantes, productos sanguíneos, sustitutos sanguíneos, agentes inotrópicos cardíacos, agentes 10 cardiovasculares, agentes del sistema nervioso central, agentes quelantes, agentes de quimioterapia, factores de crecimiento hematopoyéticos, corticosteroides, antitusivos, agentes dermatológicos, diuréticos, dopaminérgicos, inhibidores de la elastasa, agentes endocrinos, alcaloides del cornezuelo, expectorantes, agentes gastrointestinales, agentes genitourinarios, factor desencadenante de hormona de crecimiento, hormonas de crecimiento, agentes hematológicos, agentes hematopoyéticos, hemostáticos, hormonas, inmunosupresores, interleucinas, análogos de 15 interleucina, agentes de regulación de los lípidos, gonadolibarina, relajantes musculares, antagonistas narcóticos, nutrientes, agentes nutritivos, terapias oncológicas, nitratos orgánicos, vagomiméticos, prostaglandinas, antibióticos, agentes renales, agentes respiratorios, sedantes, hormonas sexuales, estimulantes, simpaticomiméticos, antiinfecciosos sistémicos, tacrolimus, agentes trombolíticos, agentes tiroideos, tratamientos para trastornos de la atención, vasodilatadores, xantinas y agentes que reducen el colesterol. Particularmente específicos son los 20 anticancerosos tales como taxol (paclitaxel), doxorubicina y cisplatino.

[0097] Entre los agentes físicos o químicos, se pueden citar concretamente isótopos radiactivos y fotosensibilizantes.

25 **[0098]** Entre los foto-sensibilizantes, se pueden citar concretamente los que pertenecen a la clase de los tetrapirroles como porfirinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, clorinas, purpurinas, porfirocenas, feoforbidas, o también los que pertenecen a la clase de las texafirinas o de las hipericinas. Entre los foto-sensibilizantes de primera generación, pueden mencionarse la hemato-porfirina y una mezcla de derivados de hemato-porfirina (HpD) (comercializado con la marca comercial Photofrin® por Axcan Pharma). Entre los foto-sensibilizantes de segunda 30 generación, pueden mencionarse meta-tetra-hidroxifenilclorina (mTHPC; nombre comercial Foscan®, Biolitec AG) y el derivado monoácido del ciclo A de la benzoporfirina (BPD-MA comercializado con la marca comercial Visudyne® por QLT y Novartis Ophthalmics). Las formulaciones de los foto-sensibilizantes de segunda generación que asocian a estos foto-sensibilizantes una molécula (lípidos, péptidos, azúcar etc.) cualificado como transportador que permite su guiado selectivo a nivel del tejido tumoral se denominan foto-sensibilizantes de tercera generación.

35 **[0099]** Entre los agentes biológicos, pueden mencionarse oligonucleótidos, ADN, ARN, ARNip, péptidos y proteínas y sacáridos.

[0100] Por supuesto, el agente terapéutico puede formularse directamente en su forma activa o en forma de un profármaco. Por otro lado, está previsto que varios agentes terapéuticos puedan formularse en asociación en la nanoemulsión.

[0101] La cantidad de agente terapéutico depende de la aplicación prevista, así como de la naturaleza del agente. Sin embargo, se intentará generalmente formular la nanoemulsión con una concentración máxima de agente 45 terapéutico, concretamente cuando se trata de agentes terapéuticos poco solubles, para limitar el volumen y/o el periodo de administración al paciente.

[0102] Ahora bien, se ha constatado que la presencia del lípido solubilizante en la fase dispersada permite incorporar una cantidad importante de compuestos incluso hidrófobos o anfífilos.

50

• Proporción de núcleo en las gotitas

[0103] Generalmente, la proporción molar de los componentes del núcleo de las gotitas con respecto a los componentes de las gotitas es del 10 al 80%, concretamente del 25 al 75%, preferentemente del 33,35 al 73,99%. 55 Dicho de otro modo, la proporción molar (mol/mol) del conjunto (lípido solubilizante/aceite opcional/agente de imagenología opcional/agente terapéutico lipófilo opcional) con respecto a la fase dispersada (es decir a todos los componentes de la fase dispersada) es generalmente del 10 al 80%, concretamente del 25 al 75%, preferentemente del 33,35 al 73,99%.

[0104] Generalmente, la proporción másica (p/p) de los componentes del núcleo de las gotitas con respecto a los componentes de las gotitas es del 10 al 60%, concretamente del 20 al 60%, preferentemente del 23,53 al 59,51%. Dicho de otro modo, la proporción másica del conjunto (lípido solubilizante/aceite opcional/agente de imagenología opcional/agente terapéutico lipófilo opcional) con respecto a la fase dispersada (es decir a todos los componentes de la fase dispersada) es generalmente del 10 al 60%, concretamente del 20 al 60%, preferentemente del 23,53 al 59,51%.

[0105] Estas proporciones molares y/o másicas son particularmente adecuadas para que la formulación «premezcla» sea estable en almacenamiento, concretamente que sea estable al ser almacenada más de 28 días a 40°C, incluso más de 300 días a 40°C. La estabilidad puede medirse concretamente siguiendo el tamaño de las gotitas, su índice de polidispersidad y/o su potencial zeta (por ejemplo por difusión cuasielástica de la luz mediante un aparato de tipo ZetaSizer, Malvern). Esta estabilidad de la formulación «premezcla» es importante para las aplicaciones previstas. En efecto, como se detalla más adelante, la formulación «premezcla» se utiliza para preparar la formulación «final» que comprende una secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN. Es particularmente interesante poder almacenar la formulación «premezcla» y efectuar la complejación con dicha secuencia justo antes de la utilización de la formulación «final».

• Fase acuosa

[0106] La fase acuosa de la nanoemulsión utilizada en la invención está constituida, preferentemente, por agua y/o por un tampón tal como un tampón fosfato como por ejemplo PBS ("*Phosphate Buffer Saline*") o por una solución salina, concretamente cloruro de sodio.

[0107] De acuerdo con una realización, la fase acuosa continua consta también de un agente espesante tal como glicerol, un sacárido, oligosacárido o polisacárido, una goma o también una proteína, preferentemente glicerol. En efecto, la utilización de una fase continua de viscosidad más elevada facilita la emulsificación y permite, debido a esto, reducir el tiempo de sonicación.

[0108] La fase acuosa consta ventajosamente del 0 al 50% en peso, preferentemente del 1 al 30% en peso y más particularmente del 5 al 20% en peso de agente espesante.

[0109] Por supuesto, la fase acuosa puede contener además otros aditivos tales como colorantes, estabilizantes y conservantes en cantidad apropiada.

[0110] La proporción de fase dispersada y de fase acuosa es muy variable. No obstante, generalmente, las nanoemulsiones se prepararán con del 1 al 50%, preferentemente del 5 al 40% y más particularmente del 10 al 30% en peso de fase dispersada y del 50 al 99%, preferentemente del 60 al 95% y más particularmente del 70 al 90% en peso de fase acuosa.

• Nanoemulsión en forma de gel

[0111] En una realización, la viscosidad de la formulación es superior a 1 poise (0,1 Pa.s) a 25°C.

[0112] En esta realización, la nanoemulsión utilizada se presenta en forma de «gel». Se entiende por el término «gel» habitualmente un sistema bifásico sólido-líquido termodinámicamente estable, constituido por una doble red interpenetrada continua tridimensional, uno sólido y el segundo líquido. Dicho gel es un sistema bifásico líquido-sólido cuya red sólida retiene una fase líquida. Aunque los geles puedan ser considerados sólidos, presentan propiedades apropiadas tanto para los sólidos (rigidez estructural, elasticidad a la deformación) como para los líquidos (presión de vapor, compresibilidad y conductividad eléctrica).

[0113] En el caso de una nanoemulsión en forma de gel, la red tridimensional está formada por las gotitas, estando los intersticios entre gotitas llenos de fase continua. Las uniones entre las unidades de la red, a saber las gotitas, se basan principalmente en interacciones electrostáticas (pares de iones). Estas interacciones electrostáticas existen principalmente entre las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN y los tensioactivos catiónicos de gotitas adyacentes.

[0114] Una nanoemulsión en forma de gel muestra, por lo tanto, una resistencia a la presión y es capaz de mantener una forma definida, lo que puede ser ventajoso de acuerdo con la forma y/o la vía de administración deseada.

[0115] Para demostrar que la nanoemulsión está en forma de gel, pueden realizarse estudios reológicos que permiten evaluar las propiedades viscoelásticas, y/o estudios más estructurales que muestran las uniones entre las gotitas que forman la red tridimensional (difracción de rayos X, neutrones...). En efecto, una nanoemulsión en forma de gel posee una viscosidad y un coeficiente de elasticidad mayor que una nanoemulsión líquida. La nanoemulsión en forma de gel puede, en función de la concentración de gotitas y, por lo tanto, de la fracción másica en fase dispersada, encontrarse en estado de líquido viscoso, de sólido viscoelástico o de sólido elástico. Con respecto a la fase dispersante acuosa, cuya viscosidad es cercana a la del agua (1 mPa.s a 25°C), la nanoemulsión se considera un líquido viscoso cuando su viscosidad es 10 veces más elevada que la del agua, es decir > 10 mPa.s a 25°C. Por otro lado, cuando se procede a la medida reológica de los módulos de G' (módulo de conservación en cizallamiento) y G'' (módulo de pérdida en cizallamiento), se considera que la nanoemulsión está en forma de un líquido viscoso cuando $G'' > G'$. Cuando G' se vuelve cercano a G'' , la nanoemulsión está en estado de sólido viscoelástico. Cuando $G'' < G'$, nos encontramos en estado de sólido elástico. En esta realización, la nanoemulsión se presenta preferentemente en estado de líquido viscoso o de sólido viscoelástico, ya que la viscosidad es suficientemente moderada en estos estados para permitir aplicaciones que implican una administración por inyección. La viscosidad y el coeficiente de elasticidad pueden medirse mediante un reómetro de cono-plano o mediante un reómetro de Couette. La viscosidad de una nanoemulsión líquida es generalmente inferior a 1 poise, incluso a menudo inferior a 0,01 poise. La nanoemulsión utilizada en esta realización de la invención tiene generalmente una viscosidad superior a 1 poise, y podrá tener una viscosidad que va hasta la de un sólido (más de 1000 poises). La nanoemulsión de la presente invención tiene, generalmente, una viscosidad de 1 a 1000 poises, preferentemente de 1 a 500 poises y aún más preferentemente entre 1 y 200, estando estos valores dados a 25°C. Una viscosidad superior a 1 poise es, en efecto, adecuada para que las gotitas de la fase dispersada formen una red tridimensional en el interior de la fase continua. En efecto, se ha constatado que, por debajo de 1 poise, las gotitas no están generalmente bastante cercanas entre sí. Por encima de 1000 poises, se obtiene un sistema cuasisólido. La nanoemulsión es, entonces, demasiado viscosa lo que hace difícil su utilización. Del mismo modo, mientras que el coeficiente de elasticidad es generalmente inferior a 10 en el caso de una nanoemulsión líquida, el coeficiente de elasticidad de una nanoemulsión en forma de gel es generalmente superior a 10. Los estudios estructurales, concretamente las difracciones de rayos X o de neutrones, permiten también diferenciar la organización de una nanoemulsión líquida, de la organización de una nanoemulsión en forma de gel. En efecto, los picos del difractograma obtenido para una nanoemulsión líquida son característicos de la estructura de las gotitas de fase dispersada (grandes ángulos de difracción característicos de distancias cortas), mientras que los picos del difractograma de una nanoemulsión en forma de gel son característicos no solamente de la estructura de las gotitas (grandes ángulos de difracción característicos de distancias cortas) sino también de la organización de estas gotitas en red tridimensional (ángulos de difracción pequeños característicos de distancias más grandes).

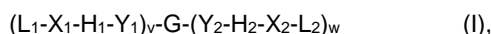
[0116] La nanoemulsión utilizada en esta realización de la invención está, ventajosamente, en forma de gel dispersable, es decir que las gotitas que forman la red tridimensional pueden ser liberadas a la fase continua en ciertas condiciones por «desgelificación» del sistema de gel, también denominada «desagregación» en la presente solicitud. La desagregación se observa mediante adición de fase continua al gel, mediante puesta en contacto con los fluidos fisiológicos durante la administración de la nanoemulsión o mediante aumento de la temperatura. En efecto, añadir la fase continua conlleva una diferencia de presión osmótica entre el interior del gel y la fase continua. El sistema tenderá, por lo tanto, a disminuir, hasta anular, esta diferencia de presión osmótica liberando las gotitas en el exceso de fase continua, hasta obtener una concentración de gotitas homogénea en el conjunto del volumen de fase continua. Del mismo modo, aumentar suficientemente la temperatura del sistema vuelve a dar a las diferentes gotitas una energía térmica superior a las energías puestas en juego en los enlaces, por ejemplo los enlaces de hidrógeno, y romper de este modo estos enlaces y liberar las gotitas de la red tridimensional. Estas temperaturas dependen de la composición del gel y, más particularmente, del tamaño de las gotitas y de la longitud de las cadenas polialcoxiladas del cotensioactivo. La desagregación de la nanoemulsión en forma de gel puede estar seguida por difracción de rayos X, por calorimetría diferencial de barrido (DSC) o por resonancia magnética nuclear (RMN). Siguiendo por difracción de rayos X la desagregación de la nanoemulsión en forma de gel, se observa una evolución del espectrograma, es decir una disminución de la intensidad de los ángulos pequeños (característicos de la organización de las gotitas en red tridimensional) (como se describe en el documento Matija Tomsic, Florian Prossnigg, Otto Glatter 'Journal of Colloid and Interface Science' Volumen 322, Número 1, 1 de junio de 2008, páginas 41-50). La desagregación también puede estar seguida por DSC. Aparece en pico en el termograma durante de la transición de nanoemulsión en forma de gel/nanoemulsión líquida en ascenso de temperatura. Finalmente, un estudio de RMN también puede permitir seguir la desagregación mediante medida del coeficiente de difusión asociado a cada gotita distinguiendo una nanoemulsión líquida de una nanoemulsión en forma de gel. En efecto, el coeficiente de difusión está disminuido muy significativamente en el caso de una nanoemulsión en forma de gel (entonces, es generalmente inferior a 0,01 $\mu\text{m}^2/\text{s}$), donde el sistema está bloqueado.

(WESTRIN B. A.; AXELSSON A.; ZACCHI G. 'Diffusion measurement in gels', Journal of controlled release 1994, vol. 30, n°3, págs. 189-199).

• Emulsión en la que las gotitas están unidas entre sí de forma covalente

5

[0117] En una realización, la formulación comprende un tensioactivo de fórmula (I) siguiente:



10 en la que:

- L₁ y L₂ representan independientemente grupos lipófilos,
- X₁, X₂, Y₁, Y₂ y G representan independientemente un grupo de enlace,
- H₁ y H₂ representan independientemente grupos hidrófilos que comprenden una cadena polialcoxilada,

15 - v y w son independientemente un número entero de 1 a 8,

y las gotitas de la fase dispersada están unidas entre sí de forma covalente por el tensioactivo de fórmula (I).

[0118] El tensioactivo de fórmula (I) se sitúa parcialmente en la fase acuosa continua y parcialmente en la fase dispersada. En efecto, el tensioactivo de fórmula (I) comprende dos grupos lipófilos (L₁ y L₂) y dos grupos hidrófilos (H₁ y H₂). Los grupos hidrófilos se sitúan mayoritariamente en la superficie de las gotitas, en la fase acuosa continua mientras que los grupos lipófilos se sitúan en las gotitas de la formulación.

[0119] Más exactamente, el grupo lipófilo L₁ se sitúa en ciertas gotitas, y el grupo L₂ en gotitas adyacentes. Las gotitas están, por lo tanto, unidas de forma covalente entre sí por el grupo $-(X_1-H_1-Y_1)_v-G-(Y_2-H_2-X_2)_w-$ del tensioactivo de fórmula (I).

[0120] Los grupos X₁ y X₂ son grupos de enlace que unen los grupos lipófilos e hidrófilos. El grupo G es un grupo de enlace entre las dos partes [lipófila-hidrófila] del tensioactivo de fórmula (I). Los grupos Y₁ y Y₂ son grupos de enlace que unen el grupo G a estas dos partes [lipófila-hidrófila].

[0121] La formulación de esta realización puede conformarse ventajosamente (por ejemplo en colocándola en un molde o un recipiente que tenga una forma dada), y permanecer en la forma deseada de acuerdo con la aplicación deseada. Esta realización de la invención es, por lo tanto, particularmente adecuada cuando la formulación se utiliza en forma de cápsula, de gel, de óvulo o de parche.

[0122] Por otro lado, resiste a la dilución en una fase acuosa. Más exactamente, cuando se añade una fase acuosa a esta formulación, ésta mantiene su forma y no se diluye. En el medio, se observa por un lado la formulación que comprende las gotitas y, por otro lado, una fase acuosa esencialmente libre de gotitas.

[0123] Sin desear estar ligados a una teoría particular, parece que estas propiedades de esta formulación pueden explicarse por la presencia de enlaces covalentes entre las gotitas, que confieren una cohesión muy fuerte entre ellas.

[0124] En una realización, en la fórmula (I) mencionada anteriormente:

- L₁ y L₂ se seleccionan independientemente entre:

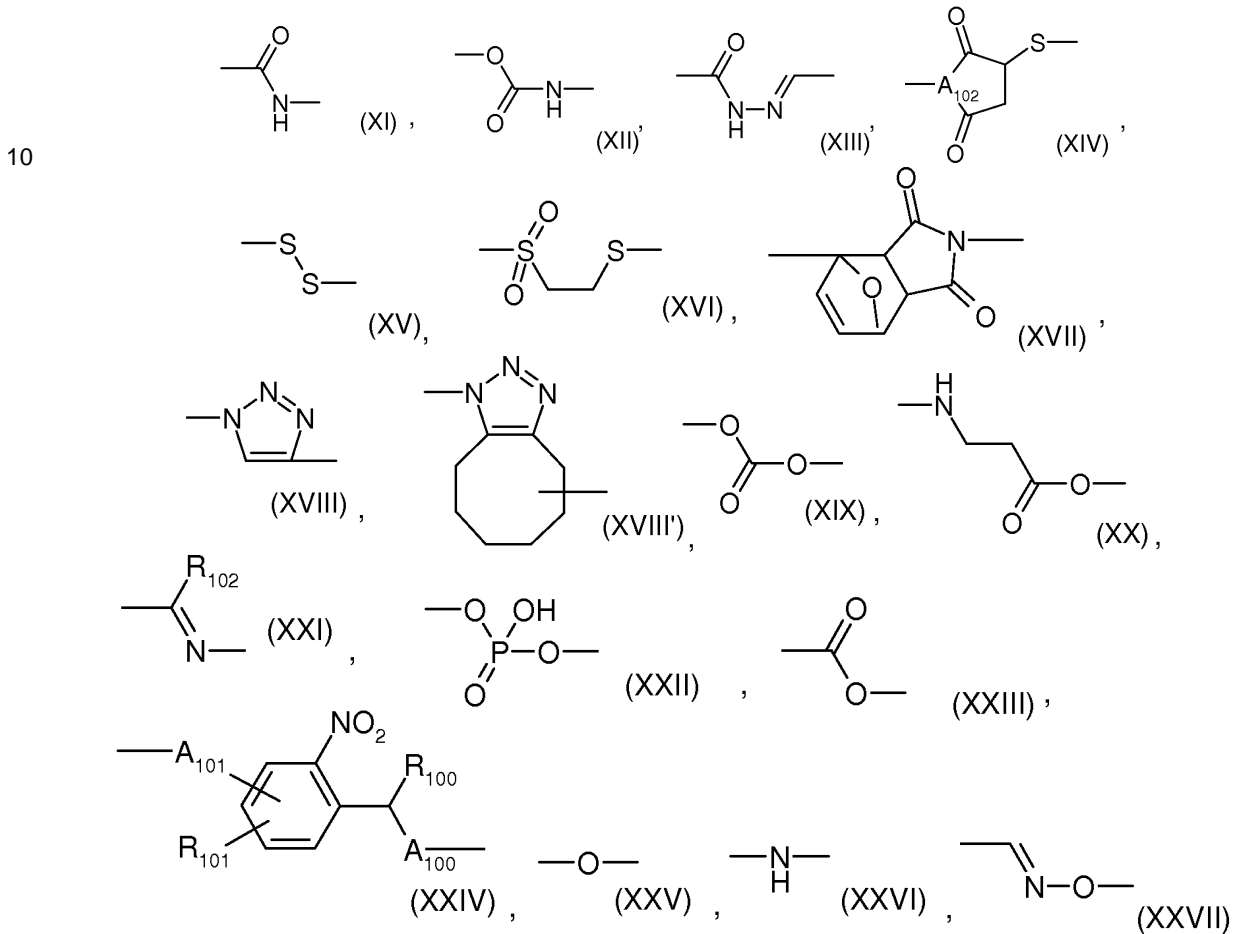
- un grupo R o R-(C=O)-, donde R representa una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,
- un éster o una amida de ácidos grasos que comprende de 12 a 24 átomos de carbono y de fosfatidiletanolamina, tal como diesteiril fosfatidiletanolamina (DSPE), y
- un poli(óxido de propileno), y/o

- X₁, X₂, Y₁ e Y₂ se seleccionan independientemente entre:

- un enlace sencillo,
- un grupo Z seleccionado entre -O-, -NH-, -O(OC)-, -(CO)O-, -(CO)NH-, -NH(CO)-, -O-(CO)-O-, -NH-(CO)-O-, -O-(CO)-NH- y -NH-(CO)-NH,

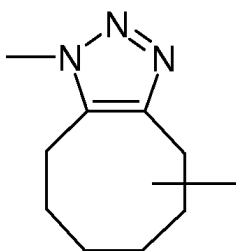
- un grupo Alk que es un alqueno que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y
 - un grupo Z-Alk, Alk-Z, Alk-Z-Alk o Z-Alk-Z donde Alk y Z son tal como se han definido anteriormente y donde los dos grupos Z del grupo Z-Alk-Z son iguales o diferentes, y/o

5 - H₁ y H₂ se seleccionan independientemente entre un poli(óxido de etileno) que comprende típicamente de 3 a 500 unidades de óxido de etileno, preferentemente de 20 a 200 unidades de óxido de etileno, y/o
 - G comprende al menos un grupo G' que tiene una de las fórmulas siguientes (estando los grupos Y₁ e Y₂ unidos a la izquierda y a la derecha de las fórmulas descritas a continuación):

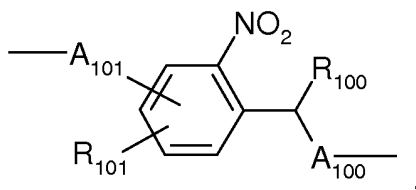


15 donde A₁₀₂ representa CH o N, R₁₀₂ representa H o una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, A₁₀₁ representa -O-, -NH-(CO)- o -O-(CO)-, R₁₀₀ representa H o un metilo, A₁₀₀ representa -O- o -NH- y R₁₀₁ representa H, Me o -OMe.

20 Por la fórmula



se entiende que el grupo Y_2 puede estar unido a cualquiera de los seis átomos del ciclooctilo y por la fórmula



5

se entiende que los grupos A_{101} y R_{101} pueden estar unidos a cualquiera de los cuatro átomos del fenilo.

[0125] Concretamente, v y w representan independientemente 1 ó 2. v y w representan preferentemente 1.

10

[0126] El grupo G puede comprender uno o varios de los grupos G' definidos anteriormente.

[0127] De este modo, en una primera realización, el grupo G está constituido por un grupo G' . En esta realización, en la fórmula (I), v y w representan 1.

15

[0128] En una segunda realización, el grupo G responde a la fórmula $-G'-Y_3-G'$, en la que:

- Y_3 representa un grupo de enlace, concretamente seleccionado entre:

20

- un enlace sencillo,

- un grupo Z seleccionado entre $-O-$, $-NH-$, $-O(OC)-$, $-(CO)O-$, $-(CO)NH-$, $-NH(CO)-$, $-O-(CO)-O-$, $-NH-(CO)-O-$, $-O-(CO)-NH-$ y $-NH-(CO)-NH$,

- un grupo Alk que es un alqueno que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, y

- un grupo $Z-Alk$, $Alk-Z$, $Alk-Z-Alk$ o $Z-Alk-Z$ donde Alk y Z son tal como se han definido anteriormente y donde los dos grupos Z del grupo $Z-Alk-Z$ son iguales o diferentes

25

- cada uno de los G' representa independientemente un grupo de fórmula (XI) a (XXVI) mencionadas anteriormente, y preferentemente, los dos grupos G' de la fórmula $-G'-Y_3-G'$ son idénticos.

30

En esta realización, en la fórmula (I), v y w representan 1.

Esta realización es particularmente interesante cuando los dos grupos G' son iguales y comprenden una función escindible. En efecto, basta entonces con escindir una sola de las dos funciones para romper los enlaces covalentes entre las gotitas de la formulación.

35

[0129] En una tercera realización, el grupo G es un dendrímero que comprende $(v+w)$ grupos G' . El grupo G puede ser concretamente un dendrímero que comprende varios grupos G' , tal como un dendrímero que comprende un grupo poliamidoamina (PAMAM). Por ejemplo, el grupo G puede tener una de las fórmulas (XXX) a (XXXIII) siguientes, que comprenden:

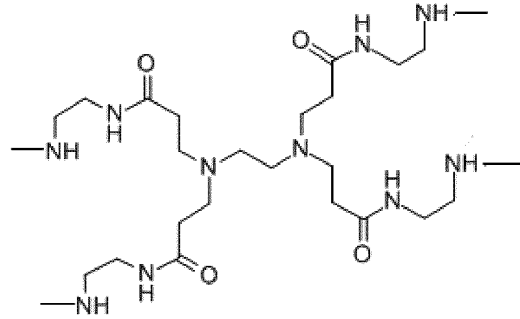
40

- 4 grupos G' de fórmula (XXVI). v y w representan 2.

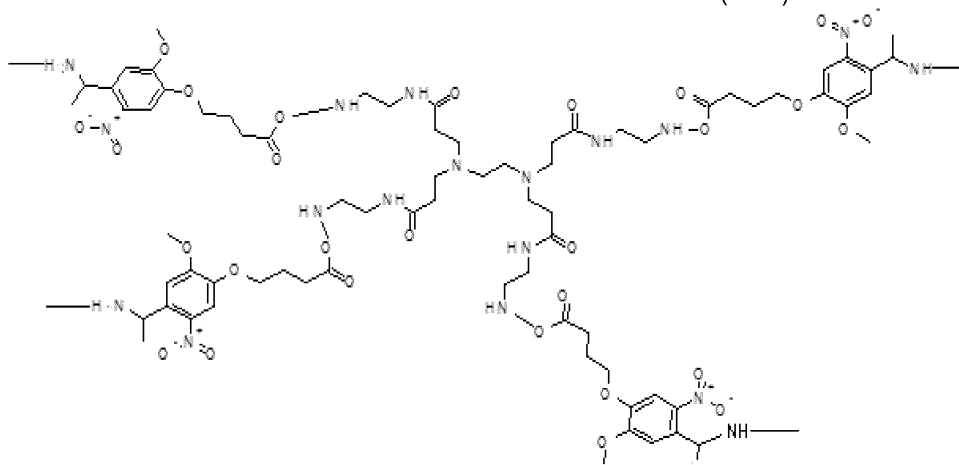
- 4 grupos G' de fórmula (XXIV) donde R_{101} representa $-O-Me$, A_{101} representa $-NH-$, R_{100} representa un metilo y A_{100} representa $-NH-$. v y w representan 2.

- 4 grupos G' de fórmula (XIV). v y w representan 2.

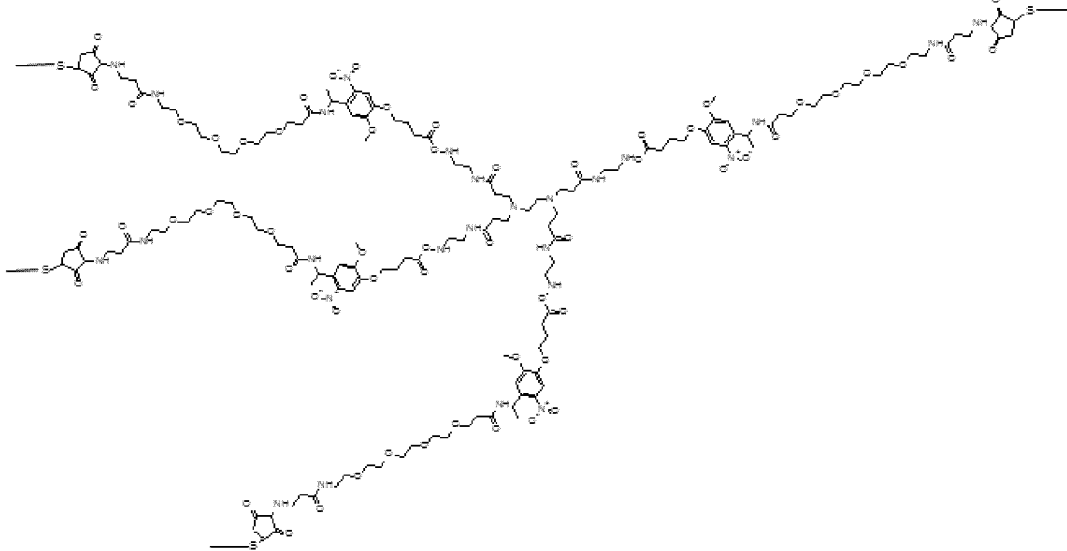
- 16 grupos G' de fórmula (XXVI). v y w representan 8.



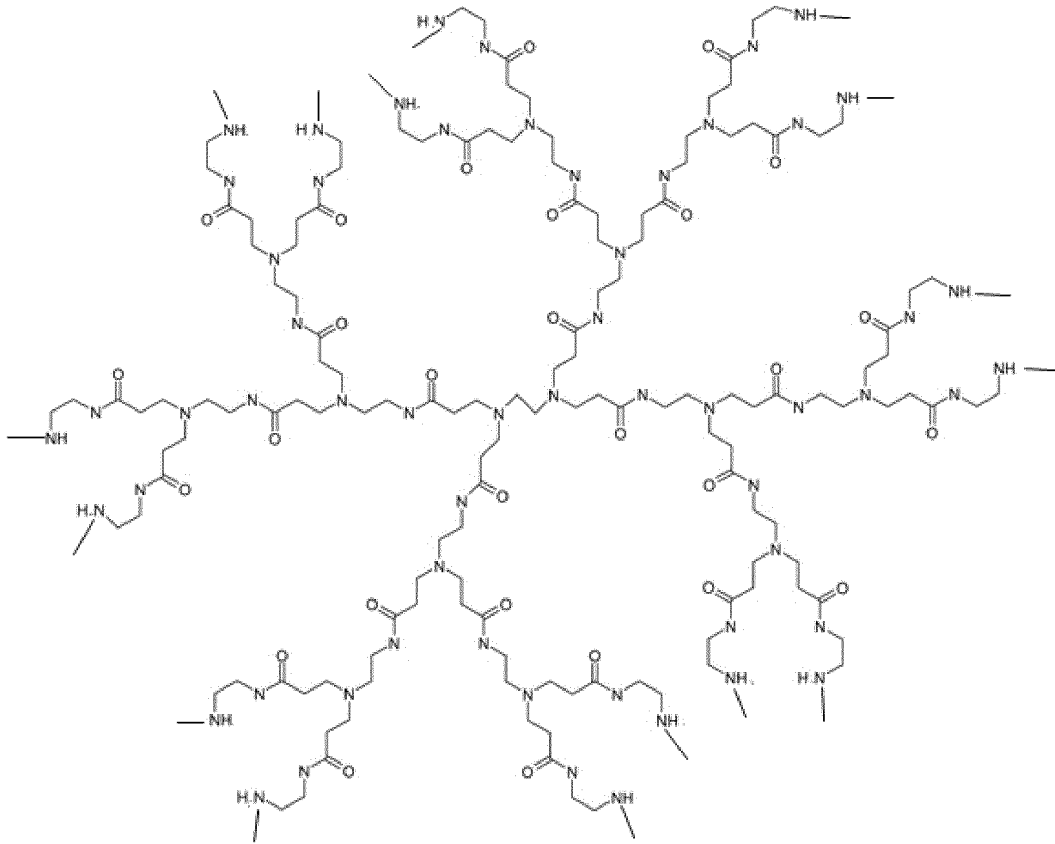
(XXX)



(XXXI)



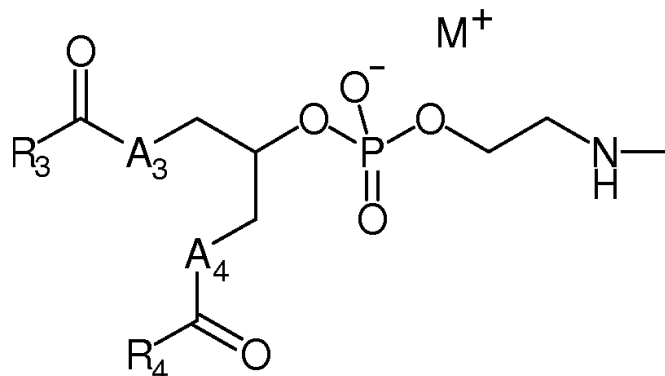
(XXXII)



(XXXIII)

[0130] Cuando L₁ y/o L₂ representan un grupo R-(C=O)-, donde R representa una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono, L₁ y/o L₂ representan grupos derivados de ácido graso que 5 comprenden de 12 a 24 átomos de carbono.

[0131] Por «L₁ y L₂ representan un éster o una amida de ácidos grasos que comprende de 12 a 24 átomos de carbono et de fosfatidiletanolamina», se entiende que representan un grupo de fórmula:



10

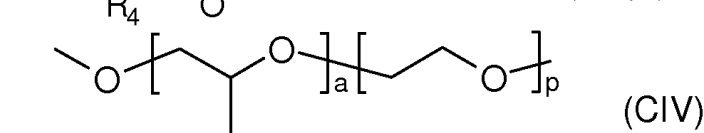
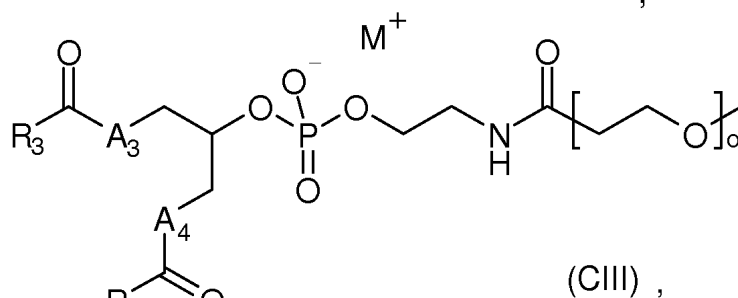
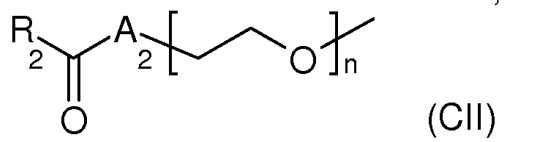
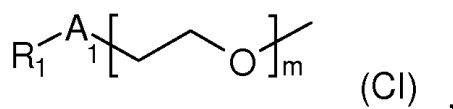
en la que

- R₃ y R₄ representan independientemente una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de 15 carbono,

- A₃ y A₄ representan O o NH, y
- M representa H o un catión.

[0132] Preferentemente, L₁ y L₂ son iguales y/o X₁ y X₂ son iguales y/o H₁ y H₂ son iguales. Tensioactivos de fórmula (I) particularmente preferidos son aquellos en los que L₁ y L₂ son iguales, X₁ y X₂ son iguales y H₁ y H₂ son iguales. Estos tensioactivos son, en efecto, compuestos simétricos y son, por lo tanto, generalmente más fáciles de sintetizar y, por lo tanto, menos costosos.

[0133] En una realización, en la fórmula (I) mencionada anteriormente, los radicales L₁-X₁-H₁- y/o L₂-X₂-H₂- consisten en uno de los grupos de las siguientes fórmulas (estando el grupo Y₁ o Y₂ unido a la derecha de las fórmulas descritas a continuación):



15

en las que:

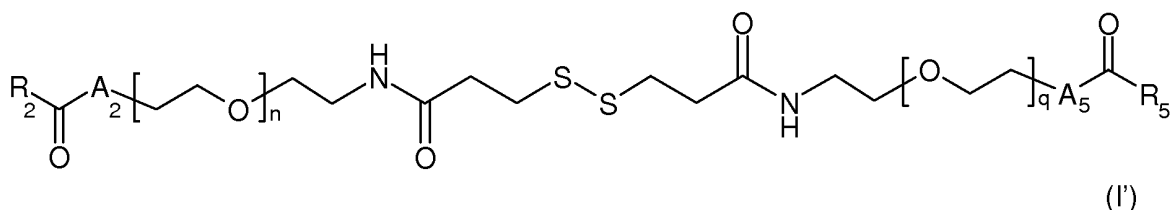
- 20 - R₁, R₂, R₃ y R₄ representan independientemente una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,
- A₁, A₂, A₃ y A₄ representan O o NH,
- m, n, o y p representan independientemente números enteros de 3 a 500, preferentemente 20 a 200, y
- a representa un número entero de 20 a 120,
- 25 - M representa H o un catión.

[0134] Se prefieren los radicales L₁-X₁-H₁-y/o L₂-X₂-H₂- de fórmula (CII). En efecto, son fáciles de preparar (concretamente mediante formación de un éster o de una amida entre un ácido graso y un derivado de poli(etilenglicol). Además, una formulación que comprende un tensioactivo que comprende un radical L₁-X₁-H₁-y/o L₂-X₂-H₂- de fórmula (CII) puede prepararse generalmente con una cantidad mayor de este tensioactivo que una formulación que comprende un tensioactivo que comprende un radical L₁-X₁-H₁-y/o L₂-X₂-H₂- de fórmula (CIII). Ahora bien, cuanto más elevada es la proporción de tensioactivo de fórmula (I) en la formulación, mayor es la cohesión entre las gotitas, y mejor conserva la forma la formulación y resiste a la dilución. De este modo, estas dos propiedades pueden ser exacerbadas aún más para una formulación que comprende un tensioactivo que comprende un radical L₁-X₁-H₁-y/o L₂-X₂-H₂- de fórmula (CII).

[0135] Los radicales L₁-X₁-H₁-y/o L₂-X₂-H₂- de fórmula (CII) con A₂ que representa NH son particularmente preferidos, ya que los tensioactivos que comprenden dichos radicales permiten evitar la fuga de los agentes de

interés lipófilos opcionalmente presentes, fuera de las gotitas de la formulación, más eficazmente que tensioactivos que comprenden radicales $L_1-X_1-H_1$ -y/o $L_2-X_2-H_2$ - de fórmula (CII) con A_2 que representa O.

- [0136]** En una realización, en la fórmula (I), v y w representan 1, L_1 y L_2 son independientemente $R-(C=O)-$,
 5 donde R representa una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono, H_1 y H_2 son independientemente poli(óxido de etileno) que comprenden de 3 a 500 unidades de óxido de etileno, X_1 y X_2 representan -O- o -NH-, G está constituido por un grupo G' que representa -S-S- (grupo de fórmula (XV) anteriormente) e Y_1 e Y_2 representan $-CH_2-CH_2-NH-CO-CH_2-CH_2-$ (grupo Alk-Z-Alk anteriormente con Alk que representa $-CH_2-CH_2-$ y Z representa $-NH-(CO)-$) y el tensioactivo de la formulación tiene entonces la fórmula (I)
 10 siguiente:



en la que:

- 15 - R_2 y R_5 representan independientemente una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono, preferentemente 17,
 - A_2 y A_5 representan O o NH, preferentemente NH, y
 - n y q representan independientemente números enteros de 3 a 500, preferentemente de 20 a 200.
- 20 **[0137]** En una realización, los grupos H_1 y H_2 se seleccionan independientemente entre un poli(óxido de etileno) que comprenden más de 3 unidades de poli(óxido de etileno), incluso más de 20 unidades, concretamente más de 50 (en las fórmulas mencionadas anteriormente, m, n, o, p y/o q son preferentemente superiores a 3, incluso 20, concretamente más de 50).
- 25 **[0138]** En una realización, el grupo G del tensioactivo de fórmula (I) de la formulación comprende una función escindible, concretamente a ciertos pH (pH básico o ácido), por enzimas, por la luz (luz visible, ultravioleta o infrarroja) y/o más allá de ciertas temperaturas. Generalmente, el grupo G comprende entonces un grupo G' que comprende una función escindible.
- 30 **[0139]** Por ejemplo:
- la función β -cetoaminoéster del grupo G de fórmula (XX) es escindible a pH ácido (típicamente alrededor de 5),
 - la función disulfuro del grupo G de fórmula (XV) es escindible a ultravioleta o por enzimas tales como tiorreductasas,
 - 35 - la función amida del grupo G de fórmula (XI) es escindible por enzimas tales como proteasas,
 - la función fosfato del grupo G de fórmula (XXII) es escindible por enzimas tales como fosfatasas,
 - la función imina de los grupos G de fórmulas (XXI) e (XIII) son escindibles a pH ácido o más allá de ciertas temperaturas,
 - el ciclo ciclohexeno del grupo G de fórmula (XVII) es escindible más allá de ciertas temperaturas (por retro Diels-
 - 40 Alder),
 - la función carbonato del grupo G de fórmula (XIX) y la función carbamato del grupo G de fórmula (XII) son escindibles a pH ácido.
- [0140]** El experto en la materia, en vista de sus conocimientos generales, sabe qué funciones son escindibles
 45 y en qué condiciones. Él tiene concretamente capacidad de elegir la función del grupo G' del tensioactivo de fórmula (I) para que sea escindible en las condiciones que se encuentran durante la administración de la formulación de acuerdo con la invención.
- [0141]** Preferentemente, la relación de la masa de tensioactivo de fórmula (I) respecto a la masa del conjunto
 50 (tensioactivo de fórmula (I)/cotensioactivo) es superior o igual al 15%. Se ha observado, en efecto, que dichas formulaciones son más fáciles de preparar.

• Tamaño de las gotitas de la formulación «premezcla»

5 [0142] Las gotitas de la formulación «premezcla» definida anteriormente tienen, generalmente, un diámetro comprendido entre 20 y 200 nm. Este diámetro puede medirse concretamente mediante difusión cuasielástica de la luz en un aparato ZetaSizer, Malvern.

[0143] Es posible obtener gotitas de tamaño más específico adaptando los porcentajes de los componentes de la nanoemulsión.

10 [0144] Para una formulación que comprende gotitas de tamaño comprendido entre 20 y 40 nm, se preferirá utilizar una formulación que comprende al menos un 5% molar de lípido anfífilo y:

- del 25 al 45% molar de cotensioactivo (por debajo del 25% molar, la formulación puede presentar problemas de estabilidad), y/o

15 - del 15 al 50% molar de tensioactivo catiónico.

[0145] Para una formulación que comprende gotitas de tamaño comprendido entre 40 y 100 nm, se preferirá utilizar una formulación que comprende al menos un 5% molar de lípido anfífilo y:

20 - del 45 al 50% molar de cotensioactivo (por debajo del 45% molar, la formulación puede presentar problemas de estabilidad. Más allá del 50%, la eficacia en transfección de la formulación «final» después de la complejación con las secuencias nucleotídicas es menor), y/o

25 - del 30 al 40% molar de tensioactivo catiónico. (por debajo del 30% molar, la eficacia en transfección de la formulación «final» después de la complejación con las secuencias nucleotídicas es menor. Más allá del 40%, la formulación puede presentar problemas de estabilidad).

[0146] Para una formulación que comprende gotitas de tamaño comprendido entre 130 y 175 nm, se preferirá utilizar una formulación que comprende al menos un 5% molar de lípido anfífilo y del 15 al 70% molar de al menos un tensioactivo catiónico y:

30 - del 10 al 25% molar, concretamente del 10 al 15% de cotensioactivo.

[0147] Los porcentajes molares de lípido anfífilo, de tensioactivo catiónico y de cotensioactivo son con respecto al conjunto (lípido anfífilo/tensioactivo catiónico/cotensioactivo/lípido fusógeno opcional).

35 **[Formulación que comprende una secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes]** (llamada también «formulación «final»)

• secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes

40 [0148] Complejando la formulación «premezcla» definida anteriormente con una secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN, se obtiene la formulación «final» útil para el suministro de dichas secuencias.

45 [0149] De este modo, la formulación puede comprender, además, una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o doble, que comprende menos de 200 bases para una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o menos de 200 pares de bases para una secuencia nucleotídica de cadena doble, y susceptible de modular mecanismos endógenos de ARN (ácidos ribonucleicos) interferentes, tal como:

50 - un ARN interferente pequeño (ARNip) («*short-interfering RNA*» o «*small interfering RNA*» siRNA en inglés)
 - un ácido nucleico bloqueado («*Locked Nucleic Acid*» LNA en inglés):
 - un microARN sintético, llamado *Mimic* («MicroRNA» o «miRNA» en inglés).

[0150] En una realización, dicha secuencia nucleotídica es un ARNip.

55 [0151] Un ARNip es una secuencia nucleotídica de ARN de cadena doble. Es una secuencia nucleotídica natural o sintética.

[0152] Un ARNip es susceptible de dirigir un transcrito de interés, es decir que la secuencia nucleotídica de

una de las cadenas del ARNip es complementaria de la secuencia nucleotídica del transcrito de interés. El tamaño de cada cadena de la cadena doble del ARNip varía generalmente de 15 a 30 nucleótidos, preferentemente de 19 a 25 nucleótidos, en particular de 19 a 21 nucleótidos. Generalmente se añaden dos desoxitimidinas en la parte 3' de cada una de sus cadenas para aumentar su estabilidad. De este modo, un ARNip al que se le ha injertado 5 desoxitimidina en sus partes 3' no salen de la definición de un ARNip de acuerdo con la presente solicitud. Un ARNip permite disminuir la expresión de una proteína diana por interferencia con el ARN mensajero que codifica esta proteína.

- [0153]** En una realización, dicha secuencia nucleotídica es un ácido nucleico bloqueado.
- 10 **[0154]** Un ácido nucleico bloqueado es una secuencia nucleotídica de ARN y/o de ADN de cadena sencilla de la que al menos uno de los ácidos nucleicos contiene un puente de metileno entre el hidroxilo en posición 2 y el átomo de carbono 4 de la ribosa. Ésta es una secuencia nucleotídica sintética.
- 15 **[0155]** Un ácido nucleico bloqueado es un inhibidor de microARN y permite regular la expresión de una o varias proteínas diana cuyos ARNm estaban en interferencia con las secuencias de ARN derivadas de dicho microARN. La regulación es generalmente un levantamiento de inhibición de la expresión de las proteínas.
- [0156]** En una realización, dicha secuencia nucleotídica es un microARN.
- 20 **[0157]** Un microARN es una secuencia nucleotídica de ARN de cadena sencilla (del orden de la centena de bases). Ésta es una secuencia nucleotídica sintética.
- [0158]** Un microARN permite regular la expresión de una o varias proteínas diana por interferencia con uno o 25 varios ARNm que codifican respectivamente estas proteínas. La regulación es generalmente una inhibición de la expresión de las proteínas.
- [0159]** Dichas secuencias nucleotídicas se mantienen en la superficie de las gotitas de la fase dispersada de la formulación gracias a las interacciones electrostáticas con el tensioactivo catiónico. Éstas están, por lo tanto, 30 localizadas en la superficie de las gotitas, a nivel de la corona de las gotitas, en el lado hidrófilo de la corona.
- [0160]** Además de la unión opcional de los ARNip a desoxitimidinas mencionadas anteriormente, dichas secuencias nucleotídicas no se modifican químicamente y no se desnaturalizan. En particular, dichas secuencias nucleotídicas no se unen de forma covalente a los otros componentes de las gotitas. Concretamente, dichas 35 secuencias nucleotídicas no se unen de forma covalente ni al cotensioactivo, ni al lípido anfífilo, ni al agente de imagenología opcional. En efecto, dichas secuencias nucleotídicas se unen únicamente a las gotitas de la nanoemulsión por interacciones electrostáticas con los tensioactivos catiónicos. Esto es muy ventajoso ya que dichas secuencias nucleotídicas, una vez liberadas en su sitio de acción, no se desnaturalizan y pueden jugar el papel esperado. Además, no es necesario preparar los derivados de secuencias nucleotídicas, lo que es costoso. 40 Las secuencias nucleotídicas disponibles en el mercado pueden complejarse, por lo tanto, a las gotitas sin modificación previa.
- [0161]** Las gotitas de la formulación «final» tienen generalmente un diámetro comprendido entre 20 y 250 nm, típicamente entre 40 y 200 nm. Este diámetro puede medirse concretamente por difusión cuasielástica de la luz en 45 un aparato ZetaSizer, Malvern.

• Localización de los componentes de las gotitas

[0162] Como se ilustra en la figura 1, las gotitas de la formulación de acuerdo con la invención se organizan 50 en forma de núcleo - corona, donde:

- el núcleo comprende:
- el lípido solubilizante,
- 55 - el aceite opcional,
- el agente de imagenología opcional,
- el agente terapéutico opcional si es lipófilo,
- la corona comprende:

- el lípido anfífilo,
 - el tensioactivo catiónico,
 - el cotensioactivo (opcionalmente injertado con una molécula de interés),
- 5 - la secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN,
- el lípido fusógeno opcional,
 - el agente terapéutico opcional si es anfífilo,
 - el tensioactivo opcional de fórmula (I).
- 10 **[0163]** Esta organización es la misma en la formulación «premezcla», excepto que en este caso, la corona está libre de secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN.

[Kit]

- 15 **[0164]** De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende la formulación «premezcla» tal como se ha definido anteriormente y, por separado, al menos una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o doble, que comprende menos de 200 bases para una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o menos de 200 pares de bases para una secuencia nucleotídica de cadena doble, y susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN (ácido ribonucleico).
- 20 **[0165]** En el kit, la formulación «premezcla» se separa físicamente de al menos una secuencia nucleotídica. Puede utilizarse, por ejemplo, un kit que comprende al menos dos recipientes, uno para la formulación «premezcla», y al menos uno para una secuencia nucleotídica, preferentemente varios que contienen, cada uno, secuencias nucleotídicas de diferente naturaleza.
- 25 **[0166]** Como se ha explicado anteriormente, la formulación «premezcla», concretamente gracias a:
- la proporción molar de tensioactivo catiónico en la corona de las gotitas,
 - la proporción molar de lípido anfífilo en la corona de las gotitas,
- 30 - la proporción molar de cotensioactivo en la corona de las gotitas,
- el hecho de que el cotensioactivo comprenda una cadena de poli(óxido de etileno) que comprende al menos 25 unidades de óxido de etileno,
 - la presencia de lípido solubilizante en el núcleo de las gotitas, y/o
 - la proporción molar y/o másica de núcleo en las gotitas,
- 35 es ventajosamente estable. Esta estabilidad de la formulación «premezcla» permite almacenar a largo plazo la formulación «premezcla», lo que es un prerrequisito para poder almacenar y comercializar el kit definido anteriormente.
- 40 **[0167]** De este modo, es posible ventajosamente preparar la formulación «final» a partir de la formulación «premezcla» y de la secuencia justo antes de la utilización de la formulación «final». La formulación «premezcla» puede almacenarse. De este modo, no es necesario preparar la emulsión «premezcla» cada vez que se desea utilizar la formulación «final», lo que es una ventaja en términos de ahorro de tiempo y de coste.

45 **[Procedimiento de preparación]**

- [0168]** De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere al procedimiento de preparación de la formulación definida anteriormente.
- 50 **[0169]** Típicamente, se mezcla en primer lugar los diferentes constituyentes oleosos para preparar una premezcla oleosa para la fase dispersada de la emulsión, a continuación se dispersa en una fase acuosa bajo el efecto de un cizallamiento.
- [0170]** El procedimiento de preparación comprende típicamente las siguientes etapas:
- 55 (i) preparar una fase oleosa que comprende un lípido solubilizante, un lípido anfífilo, el tensioactivo catiónico;
- (ii) preparar una fase acuosa que comprende opcionalmente el cotensioactivo;
- (iii) dispersar la fase oleosa en la fase acuosa bajo la acción de un cizallamiento suficiente para formar una formulación «premezcla»; a continuación

- (iv) añadir secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN a la formulación «premezcla» formada, a continuación
- (v) recuperar la formulación formada de este modo.

5 • Etapa (i)

[0171] Generalmente, la preparación de la fase oleosa comprende la mezcla de los componentes oleosos de la formulación (lípidos solubilizantes/lípidos anfífilos/tensioactivos catiónicos). Cuando la formulación comprende un lípido susceptible de facilitar la liberación citosólica por desestabilización de la membrana endosómica y/o un aceite, y/o un agente de imagenología y/o un agente terapéutico, estos se introducen generalmente en la fase oleosa durante la etapa (i).

[0172] La mezcla puede facilitarse opcionalmente mediante disolución de uno de los constituyentes o de la mezcla completa en un disolvente orgánico apropiado. El disolvente orgánico se evapora a continuación, para obtener una pre-mezcla oleosa homogénea para la fase dispersada.

[0173] Por otro lado, se prefiere realizar la pre-mezcla (etapa (i)) a una temperatura a la cual el conjunto de los ingredientes es líquido.

20 • Etapa (iii)

[0174] Ventajosamente, la fase oleosa se dispersa en la fase acuosa en estado líquido. Si una de las fases se solidifica a temperatura ambiente, es preferible realizar la mezcla con una o preferentemente las dos fases calentadas a una temperatura superior o igual a la temperatura de fusión.

[0175] La emulsificación bajo el efecto de cizallamiento se realiza preferentemente con ayuda de un sonicador o de un microfluidizador. Preferentemente, la fase acuosa y a continuación la fase oleosa se introducen en las proporciones deseadas en un recipiente cilíndrico apropiado y a continuación el sonicador se sumerge en el medio y se pone en marcha durante un periodo suficiente para obtener una nanoemulsión, generalmente varios minutos.

[0176] A final de la etapa (iii), se obtiene generalmente una nanoemulsión homogénea en la que:

- el diámetro medio de las gotitas de aceite es generalmente superior a 10 nm e inferior a 200 nm, preferentemente entre 30 y 190 nm, y
- el potencial zeta es superior a 20 mV, generalmente comprendido entre 25 mV y 60 mV, preferentemente entre 40 y 55 mV, preferentemente cuando la fase acuosa de la formulación es una solución acuosa de NaCl 0,15 mM.

[0177] La nanoemulsión obtenida al final de la etapa (iii) corresponde a la formulación «premezcla» definida anteriormente.

• Etapa (iv)

[0178] La etapa (iv) permite entonces preparar la formulación útil para el suministro de dichas secuencias nucleotídicas por complejación de dichas secuencias nucleotídicas en la formulación «premezcla» obtenida al final de la etapa (iii).

[0179] Generalmente, las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN se añaden a la nanoemulsión formada y la mezcla obtenida se mezcla a temperatura ambiente, por ejemplo 30 minutos.

[0180] Durante la etapa (iv), las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN, portadoras de grupos fosfato cargados negativamente, se unen mediante uniones electrostáticas a las gotitas cuya superficie está cargada positivamente gracias a los grupos catiónicos de los tensioactivos catiónicos. De este modo, se forman complejos entre las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN y las gotitas de la nanoemulsión. Las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN se añaden generalmente en solución acuosa, por ejemplo agua libre de nucleasas, medios de cultivo celular, medios de cultivo optimizados para la transfección, concretamente medio Opti-MEM o soluciones tampón, concretamente ácido 4-(2-hidroxietil)-1-

piperazinaetanosulfóno (HEPES). La etapa (iv) se realiza típicamente a temperatura ambiente (25°C), después de la simple homogeneización o en agitación (por ejemplo entre 100 y 1000 revoluciones por minuto), durante un periodo comprendido entre 5 minutos y 2 horas, por ejemplo del orden de 30 minutos.

5 **[0181]** Preferentemente, durante la etapa (iv), la cantidad de secuencias nucleotídicas introducida es tal que la relación entre la cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de cargas negativas aportadas por las secuencias nucleotídicas introducidas en el medio es superior a 8/1. El experto en la materia está capacitado para calcular la cantidad de cargas negativas aportadas por las secuencias nucleotídicas introducidas en el medio, y la cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo
10 catiónico en la formulación «premezcla». Dicha relación permite obtener una complejación cuantitativa, es decir que ya no quedan más secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes libres en el medio.

[0182] La etapa (iv) puede venir seguida por diversos métodos, por ejemplo por:

15

- electroforesis en gel de agarosa, que permite observar la migración de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN. Si hay una buena complejación, entonces las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN complejadas a las gotitas son más pesadas y se visualizan en los pocillos. Si la complejación es menor, las secuencias
20 nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN libres migrarán a otra posición.

- difusión dinámica de la luz (DLS), observando el impacto de la complejación sobre el diámetro hidrodinámico. Cuando más eficaz es la complejación, más se orienta el perfil hacia una distribución monomodal.

25 **[0183]** Al final de la etapa (iv), se obtiene generalmente una nanoemulsión homogénea en la que el diámetro medio de las gotitas de aceite es generalmente superior a 10 nm e inferior a 200 nm, preferentemente entre 60 y 200 nm.

[0184] Ventajosamente, el procedimiento de preparación de la formulación no necesita modificar
30 químicamente las secuencias nucleotídicas, y no necesita en particular inyectarlas de forma covalente en otro componente de la formulación. Por lo tanto, es muy fácil preparar en paralelo numerosas formulaciones de acuerdo con la invención que comprenden secuencias nucleotídicas.

• Etapas posteriores opcionales

35

[0185] La formulación puede purificarse, por ejemplo mediante purificación en columna o por diálisis.

[0186] Antes del envasado, la emulsión puede diluirse y/o esterilizarse, por ejemplo por filtración o diálisis. Esta etapa permite eliminar los eventuales agregados que podrían formarse en el transcurso de la preparación de la
40 emulsión.

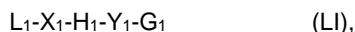
[0187] La emulsión obtenida de este modo está lista para el empleo, llegado el caso, después de la dilución.

• Preparación de una formulación que comprende un tensioactivo de fórmula (I)

45

[0188] En la realización en la que la formulación comprende un tensioactivo de fórmula (I), la nanoemulsión utilizada para la complejación con las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN puede prepararse mediante un procedimiento que comprende la puesta en contacto:

50 - de una emulsión 1 que comprende una fase acuosa continua y una fase dispersada en forma de gotitas que comprende un lípido anfífilo y un tensioactivo de fórmula (LI) siguiente:



55 - con una emulsión 2 que comprende una fase acuosa continua y una fase dispersada en forma de gotitas que comprende un lípido anfífilo y un tensioactivo de fórmula (LII) siguiente:



donde L_1 , X_1 , H_1 , Y_1 , L_2 , X_2 , H_2 e Y_2 son tal como se han definido anteriormente, y G_1 y G_2 son grupos susceptibles de reaccionar para formar el grupo G tal como se ha definido anteriormente, en condiciones que permiten la reacción de los tensioactivos de fórmulas (LI) y (LII) para formar el tensioactivo de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, mediante lo cual se forman enlaces covalentes entre las gotitas de la fase dispersada.

[0189] Las fases acuosas continuas de las emulsiones 1 y 2 comprenden un cotensioactivo tal como se ha definido anteriormente. Las fases dispersadas de las emulsiones 1 y 2 comprenden un lípido solubilizante tal como se ha definido anteriormente. La fase dispersada de la emulsión 1 y/o la fase dispersada de la emulsión 2 comprenden un tensioactivo catiónico tal como se ha definido anteriormente.

[0190] Cuando el grupo G comprende un solo grupo G' , los grupos G_1 y G_2 son típicamente grupos susceptibles de reaccionar uno con otro para formar el grupo G .

[0191] Cuando el grupo G comprende varios grupos G' , se ponen generalmente las emulsiones 1 y 2 en contacto con un compuesto susceptible de reaccionar con los tensioactivos de fórmulas (LI) y (LII) para formar el grupo G . Este compuesto comprende típicamente al menos v funciones G'_1 susceptibles de reaccionar con el grupo G_1 y w funciones G'_2 susceptibles de reaccionar con el grupo G_2 .

[0192] De este modo, en la realización en el que el grupo G responde a la fórmula $-G'-Y_3-G'$ definida anteriormente, el procedimiento de preparación de la formulación comprende típicamente la puesta en contacto:

- de una emulsión 1 tal como se ha definido anteriormente,
- y de una emulsión 2 tal como se ha definido anteriormente,

[0192] - con un compuesto de fórmula $G'_1-Y_3-G'_2$ en la que Y_3 es tal como se ha definido anteriormente, G'_1 es un grupo susceptible de reaccionar con G_1 para formar el primer grupo G' tal como se ha definido anteriormente y G'_2 es un grupo susceptible de reaccionar con G_2 para formar el segundo grupo G' tal como se ha definido anteriormente (de naturaleza idéntica o diferente del primer grupo G'),

en condiciones que permiten la reacción de los tensioactivos de fórmulas (LI) y (LII) y del compuesto de fórmula $G'_1-Y_3-G'_2$ para formar el tensioactivo de fórmula (I) en el que el grupo G responde a la fórmula $-G'-Y_3-G'$ definida anteriormente, mediante lo cual se forman enlaces covalentes entre las gotitas de la fase dispersada.

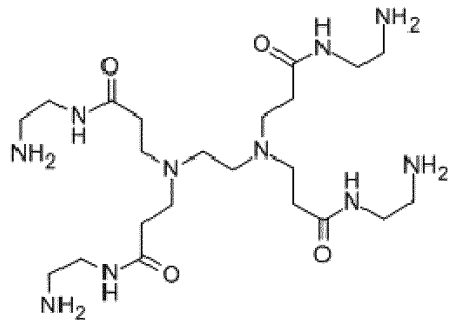
[0193] Del mismo modo, en la realización definida anteriormente en la que el grupo G es un dendrímero que comprende $(v+w)$ grupos G' , el procedimiento de preparación de la formulación comprende típicamente la puesta en contacto:

- de una emulsión 1 tal como se ha definido anteriormente,
- y de una emulsión 2 tal como se ha definido anteriormente,

[0193] - con un dendrímero de fórmula $(G'_1)_v-Y_4-(G'_2)_w$ en la que v y w son tal como se han definido anteriormente, G'_1 es independientemente un grupo susceptible de reaccionar con G_1 para formar un grupo G' tal como se ha definido anteriormente y G'_2 es independientemente un grupo susceptible de reaccionar con G_2 para formar un grupo G' tal como se ha definido anteriormente (siendo cada G' de naturaleza igual o diferente a los otros grupos G') e Y_4 es el esqueleto de un dendrímero,

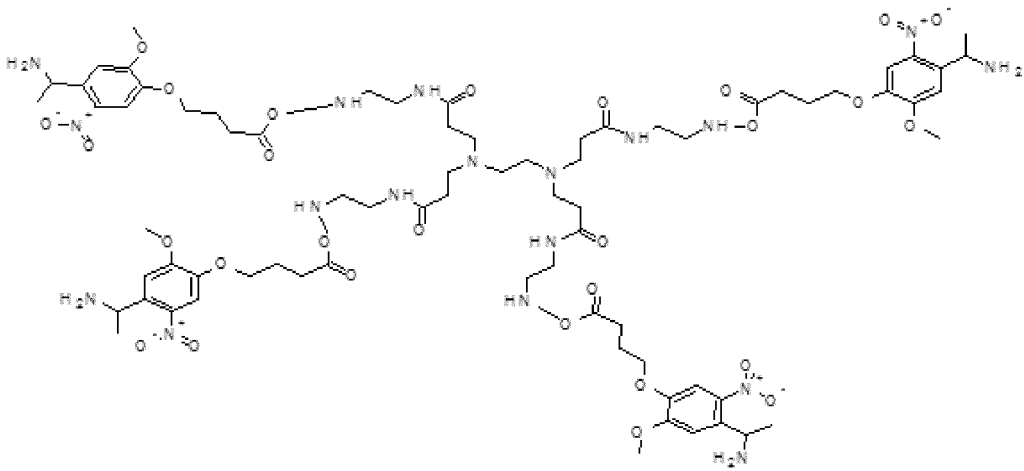
en condiciones que permitan la reacción de los tensioactivos de fórmulas (LI) y (LII) y del dendrímero de fórmula $(G'_1)_v-Y_4-(G'_2)_w$ para formar el tensioactivo de fórmula (I) en el que el grupo G es un dendrímero que comprende $(v+w)$ grupos G' , mediante lo cual se forman enlaces covalentes entre las gotitas de la fase dispersada.

Por ejemplo, para formar un grupo G que tiene la fórmula (XXX), (XXXI), (XXXII) y (XXXIII), el compuesto de fórmula $(G'_1)_v-Y_4-(G'_2)_w$ puede tener, respectivamente, una de las fórmulas (XXX'), (XXXI'), (XXXII') y (XXXIII') siguientes:



(XXX')

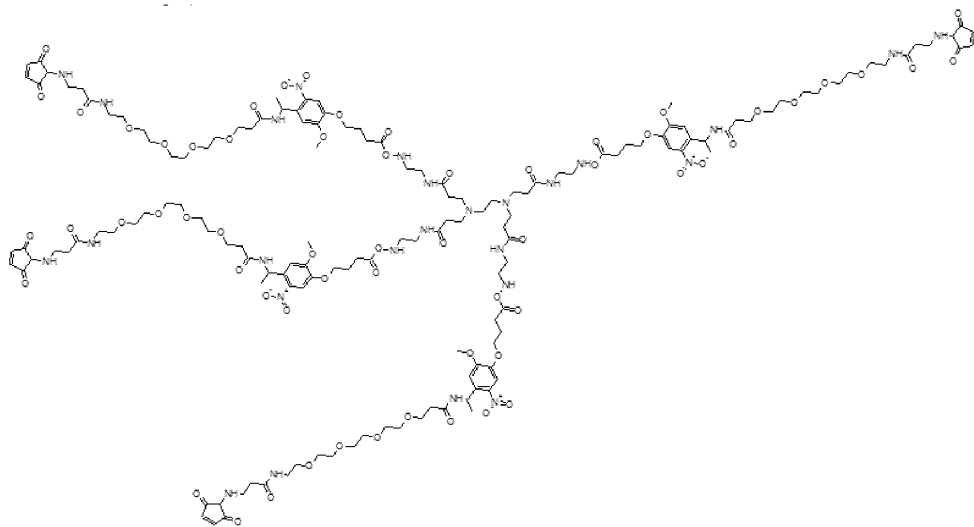
(en la que G₁ y G₂ -representan NH₂ y v y w representan 2),



5

(XXXI')

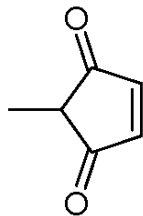
(en la que G₁ y G₂ -representan NH₂ y v y w representan 2),



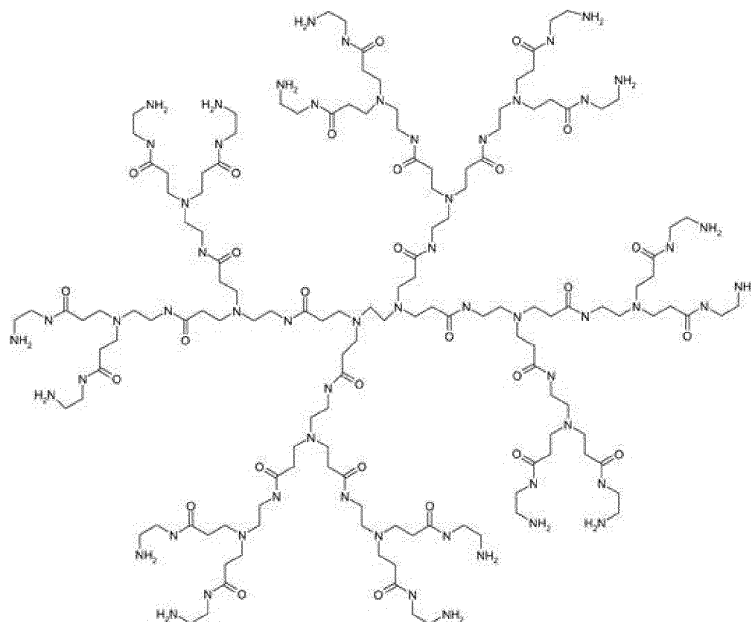
(XXXII')

10

(en la que G₁ y G₂ -representan



5 y v y w representan 2),



(XXXIII)

(en la que G¹ y G² -representan NH₂ y v y w representan 8).

- 10 **[0194]** En vista de sus conocimientos generales de química, el experto en la materia está capacitado para elegir la naturaleza de los grupos G¹, G², Y₃, Y₄, G₁ y G₂ a utilizar para formar el grupo G y las condiciones que permiten la reacción. Las reacciones de química orgánica habituales pueden usarse, concretamente las descritas en el documento «Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations» de Richard C. Larock editado por John Wiley & Sons Inc, y las referencias que se mencionan en él. De este modo, los ejemplos de 15 grupos G₁ y G₂ a continuación se citan a título ilustrativo y no limitante.

[0195] Típicamente, cuando el grupo G está constituido por un grupo G', los grupos G₁ y G₂ de los compuestos de fórmulas (LI) y (LII) pueden seleccionarse, por ejemplo, de la siguiente manera:

20 - G₁ representa un tiol (-SH) y G₂ representa:

- bien una maleimida, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XIV) donde A₁₀₂ representa N,
- bien una vinilsulfona, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que

25 representa un grupo de fórmula (XVI),

- o bien un grupo -S-S-piridinilo o -SH, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XV),

- G₁ representa un hidroxilo y G₂ representa -COOH o un éster activado, formándose entonces un tensioactivo de

fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXIII),

- G₁ representa una amina -NH₂ y G₂ representa -COOH o un éster activado, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XI),

5

- G₁ representa un hidroxilo y G₂ representa un carbonato activado, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XIX),

- G₁ representa una amina -NH₂ y G₂ representa un carbonato activado, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XII),

10

- G₁ representa una amina -NH₂ y G₂ representa un aldehído -CHO, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXI),

15 - G₁ representa una hidrazida de fórmula -(C=O)-NH-NH₂ y G₂ representa un grupo -(C=O)-R₁₀₂, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XIII),

- G₁ representa un alquino y G₂ representa una azida, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XVIII),

20

G₁ representa una ciclooctina y G₂ representa una azida, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XVIII'),

25 G₁ representa un furano y G₂ representa una maleimida, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XVII),

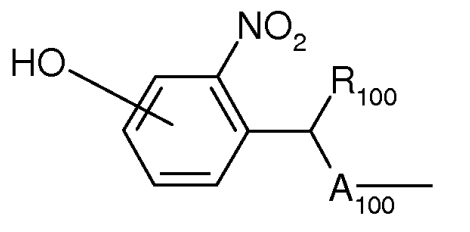
G₁ representa un aldehído y G₂ representa una amina, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXI),

30

G₁ representa un fosfato de fórmula -O-P(=O)(OH)₂ y G₂ representa un hidroxilo, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXII),

G₁ representa un buen grupo saliente LG et G₂ representa un grupo de fórmula siguiente

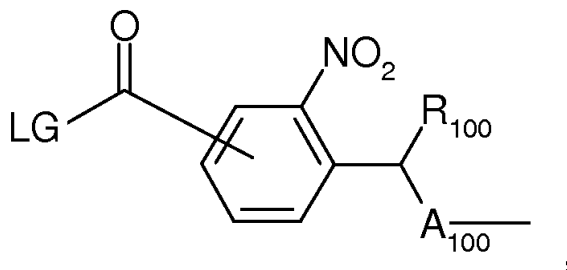
35



formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXIV) en la que A₁₀₁ representa O,

40

- G₁ representa un hidroxilo o una amina -NH₂ y G₂ representa un grupo de fórmula siguiente



formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXIV) en la que A₁₀₁ representa respectivamente -O-(CO)- o -NH-(CO),

5 - G₁ representa un buen grupo saliente LG y G₂ representa un hidroxilo, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXV),

- G₁ representa un buen grupo saliente LG y G₂ representa una amina -NH₂, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXVI),

10

- G₁ representa una oxiamina -O-NH₂ y G₂ representa un aldehído, formándose entonces un tensioactivo de fórmula (I) en el que G comprende un grupo G' que representa un grupo de fórmula (XXVII).

[0196] Cuando el grupo G comprende varios grupos G', la elección de los grupos que reaccionan entre sí: G'₁ y G'₂ por un lado y G'₃ y G'₄ por otro lado, puede efectuarse de la misma forma, sustituyendo los grupos G'₁ o G'₂ en los ejemplos mencionados anteriormente por G'₃ o G'₄.

[0197] Las emulsiones 1 y 2 empleadas en el procedimiento pueden prepararse mediante el primer procedimiento mencionado anteriormente que comprende las etapas (i), (ii), (iii) y (v) (sin efectuar la etapa (iv) de adición de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN).

[Utilización]

[0198] La formulación es ventajosamente estable y poco tóxica. Puede utilizarse como agente de transfección y/o como sistema de suministro de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN.

[0199] Cuando la formulación comprende un agente de imagenología, es posible ventajosamente seguir el suministro de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN y/o la transfección de las células, por ejemplo mediante seguimiento de la fluorescencia cuando el agente de imagenología es un fluoróforo lipófilo.

• Como agente de transfección

[0200] De acuerdo con un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método de introducción de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN en una célula eucariota, que comprende la puesta en contacto de la célula eucariota con la formulación de acuerdo con la invención. Este método es un método de transfección.

[0201] El método de introducción puede realizarse *in vitro*. En este caso, generalmente, la puesta en contacto de la célula eucariota con la formulación de acuerdo con la invención tiene lugar en una solución tampón, por ejemplo un medio OptiMEM®. La puesta en contacto dura generalmente entre 8 y 96 horas, típicamente del orden de 72 horas, a una temperatura del orden de 37°C.

[0202] Generalmente, después de la etapa de puesta en contacto, las células se recuperan.

[0203] No solamente las gotitas de la formulación de acuerdo con la invención permiten transfectar eficazmente las células, sino que, además, éstas son funcionalmente activas y permiten silenciar la expresión del gen de interés.

50

[0204] Sin desear estar ligados a una teoría particular, una vez que las gotitas de la nanoemulsión de acuerdo con la invención han transfectado la célula, el escape endosómico liberaría las gotitas y las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN en el citoplasma, por lo tanto en el sitio de acción de las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN, lo que evitaría la degradación de estas secuencias nucleotídicas en el lisosoma, permitiéndoles interferir con el ARNm diana y por lo tanto, silenciar de este modo la expresión del gen de interés.

[0205] En una realización, la formulación comprende un cotensioactivo injertado por un ligando biológico de direccionamiento. Esta realización permite ventajosamente la introducción de secuencias nucleotídicas susceptibles

de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN en células eucariotas habitualmente resistentes a la transfección, es decir conocidas por ser difíciles de transfectar, concretamente células madre, células primarias (por ejemplo fibroblastos humanos o células endoteliales humanas) o líneas celulares linfocíticas (por ejemplo de tipo Jurkat) o de neuroblastomas (por ejemplo de tipo SK-N-SH). El ligando biológico de direccionamiento permite, en efecto, facilitar la transfección de células habitualmente resistentes a la transfección por la formulación.

• para el suministro de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN

10 **[0206]** La formulación de acuerdo con la invención es un sistema de suministro *in vitro* o *in vivo* de secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN.

[0207] De este modo, de acuerdo con un quinto aspecto, la invención se refiere a la formulación definida anteriormente para su utilización para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad.

15

[0208] La enfermedad es típicamente una enfermedad para la cual se busca un silenciamiento de uno o varios genes, tal como:

- enfermedades oculares, concretamente la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), glaucoma o
20 Pachyonychia congénita.

- cáncer, tumores sólidos, metástasis pero también leucemias mieloides crónicas.

- trastornos renales, concretamente después de trasplanta o insuficiencia renal aguda.

- hipercolesterolemia.

- enfermedades víricas asociadas concretamente a una infección, por el virus de la hepatitis C (VHC), por el virus de
25 la inmunodeficiencia humana (VIH) y por el virus respiratorio sincitial (VRS).

[0209] Ventajosamente, como se ha explicado anteriormente, la formulación de acuerdo con la invención protege las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN del cuerpo del paciente (y de estas proteínas) al que se le administra la formulación (concretamente evitando su
30 metabolismo prematuro).

[0210] La formulación puede comprender un agente terapéutico que permite tratar la enfermedad, lo que permite beneficiarse de un doble efecto terapéutico: el inducido por las secuencias nucleotídicas susceptibles de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN y el inducido por el agente terapéutico.
35

[0211] Debido a que puede prepararse exclusivamente a partir de constituyentes aprobados por el ser humano, es interesante para una administración por vía parenteral. No obstante, también es posible prever una administración por otras vías, concretamente por vía oral, por vía tópica o por vía oftalmológica.

40 **[0212]** Un método de prevención y/o de tratamiento de una enfermedad que comprende la administración a un mamífero, preferentemente un ser humano, que lo necesita de una cantidad eficaz de la formulación tal como se ha definido anteriormente es también uno de los objetos de la presente invención.

[Definiciones]

45

[0213] En el marco de la presente solicitud, se entiende por el término «nanoemulsión» una composición que presenta al menos dos fases, generalmente una fase oleosa y una fase acuosa, en la que el tamaño medio de la fase dispersada es inferior a 1 micrómetro, preferentemente de 10 a 500 nm y en particular de 20 a 200 nm, y más preferentemente de 50 a 200 nm (véase el artículo de C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar y M. J. Garcia-Celma, Curr Opin Colloid In, 2005, 10, 102-110).
50

[0214] En el sentido de la presente solicitud, la expresión «fase dispersada» significa las gotitas que comprende el aceite opcional/el tensioactivo o tensioactivos catiónicos/el lípido solubilizante/el lípido anfífilo/el cotensioactivo/el tensioactivo de fórmula (I) opcional/el lípido fusógeno opcional/el agente de imagenología
55 opcional/el agente terapéutico opcional/las secuencias nucleotídicas opcionales susceptibles de modular mecanismos endógenos de ARN interferentes. La fase dispersada está generalmente libre de fase acuosa.

[0215] El término «gotita» engloba a la vez las gotitas de aceite líquido propiamente dichas así como las partículas sólidas provenientes de emulsiones de tipo aceite en agua en las que la fase dispersada es sólida. En

este último caso, se habla a menudo también de emulsión sólida.

[0216] El término «lípidos» designa en el marco de esta exposición el conjunto de los cuerpos grasos o de las sustancias que contienen ácidos grasos presentes en las grasas de origen animal y en los aceites vegetales. Estos son moléculas hidrófobas o anfífilas principalmente constituidas por carbono, hidrógeno y oxígeno y que tienen una densidad inferior a la del agua. Los lípidos pueden estar en estado sólido a temperatura ambiente (25°C), como en las ceras, o líquido, como en los aceites.

[0217] El término «fosfolípido» se refiere a lípidos que poseen un grupo fosfato, concretamente fosfoglicéridos. Generalmente, los fosfolípidos constan de un extremo hidrófilo formado por el grupo fosfato opcionalmente sustituido y dos extremos hidrófobos formados por cadenas de ácidos grasos. Entre los fosfolípidos, se citarán en particular la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y esfingomielina.

[0218] El término «lecitina» designa la fosfatidilcolina, es decir un lípido formado a partir de una colina, de un fosfato, de un glicerol y de dos ácidos grasos. Abarca de manera más amplia los fosfolípidos extraídos de un ser vivo, de origen vegetal o animal, en la medida en que están mayoritariamente constituidos por fosfatidilcolina. Estas lecitinas constituyen, generalmente, mezclas de lecitinas que portan diferentes ácidos grasos.

[0219] Se entiende por el término «ácido graso» designar ácidos carboxílicos alifáticos que presentan una cadena carbonada de al menos 4 átomos de carbono. Los ácidos grasos naturales que poseen una cadena carbonada de 4 a 28 átomos de carbono (generalmente un número par). Se habla de ácido graso de cadena larga para una longitud de 14 a 22 carbonos y de cadena muy larga si hay más de 22 carbonos.

[0220] Se entiende por el término «tensioactivo» compuestos de estructura anfífila que les confiere una afinidad particular por las interfases de tipo aceite/agua y agua/aceite, lo que le da la capacidad de rebajar la energía libre de estas interfases y estabilizar sistemas dispersados.

[0221] Se entiende por el término «cotensioactivo» un tensioactivo que actúa además de cómo tensioactivo para rebajar más la energía de la interfase.

[0222] Se entiende por el término «cadena hidrocarbonada» designar una cadena compuesta por átomos de carbono y de hidrógeno, saturada o insaturada (enlace doble o triple). Las cadenas hidrocarbonadas preferidas son alquilo o alquenilo.

[0223] Se entiende por el término «alquileo» designar un grupo divalente alifático hidrocarbonado, saturado, lineal o ramificado, preferentemente lineal.

[0224] Se entiende por «radical cíclico» un radical derivado de un ciclo. Por ejemplo, un radical fenilo es un radical divalente derivado de un grupo benceno. Por «ciclo», se entiende un carbociclo o un heterociclo, saturado, insaturado o aromático (arilo o heteroarilo),

- un carbociclo: un ciclo compuesto por átomos de carbono, saturado (siendo los carbociclos saturados preferidos concretamente un cicloalquilo, tal como un ciclopentilo o un ciclohexilo), insaturado (por ejemplo un ciclohexeno) o aromático (es decir un fenilo),

- un heterociclo: un grupo cíclico que comprende, a menos que se indique lo contrario, de 5 a 6 átomos, y que comprende uno o varios heteroátomos seleccionados entre O, N y/o S. Dicho heterociclo puede estar saturado o parcialmente insaturado y comprender uno o varios dobles enlaces. Se habla entonces de grupo heterocicloalquilo. También puede ser aromático, que comprende, a menos que se indique lo contrario, de 5 a 6 átomos y representar entonces un grupo heteroarilo.

- a modo de heterociclo o heterocicloalquilo no aromático, se pueden citar pirazolidinilo, imidazolidinilo, tetrahidrotiofenilo, ditiolanilo, tiazolidinilo, tetrahidropiranilo, dioxanilo, morfolinilo, piperidilo, piperazinilo, tetrahidropirranilo, tiomorfolinilo, dihidrofuranilo, 2-imidazolinilo, 2,3-pirrolinilo, pirazolinilo, dihidrotiofenilo, dihidropiranilo, piranilo, tetrahidropiridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridinilo, dihidrotiopiranilo, isoxazolidinilo,

- a modo de heteroarilo, se pueden citar concretamente los siguientes grupos representativos: furilo, imidazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, pirazinilo, piridazinilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, 1,2,3-triazolilo y 1,2,4-triazolilo.

[0225] Por «éster activado», se entiende un grupo de fórmula -CO-LG, y por «carbonato activado», se

entiende un grupo de fórmula -O-CO-LG donde LG es un buen grupo saliente concretamente seleccionado entre un cloro, un imidazolilo, un pentafluorofenolato, un pentaclorofenolato, un 2,4,5-triclorofenolato, 2,4,6-triclorofenolato, un grupo -O-succinimidilo, -O-benzotriazolilo, -O-(7-aza-benzotriazolilo) y -O-(4-nitrofenilo).

- 5 **[0226]** La invención se describirá con más detalle por medio de la figura adjunta y de los ejemplos siguientes.

FIGURAS

[0227]

10

La figura 1 representa un esquema que ilustra la estructura núcleo/corona de una gotita de una formulación de acuerdo con la invención (formulación «final» con una secuencia nucleotídica susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN). 1 representa la fase acuosa continua, 2 la corona (en parte) de la gotita y 3 el núcleo (en parte) de la gotita. En la corona 2, se ilustran: el lípido anfífilo (por ejemplo fosfolípido neutro tal como

15

lecitina), el tensioactivo catiónico (fosfolípido catiónico DOTAP, por ejemplo), el cotensioactivo cuya cadena de poli(óxido de etileno) que se repliega está representada en la fase acuosa y la secuencia nucleotídica de cadena doble, y susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN (ARNip por ejemplo).

20

La figura 2 representa un gel de electroforesis revelado con UV realizado después de la complejación de ARNip con la formulación B10 con concentraciones precisadas en la tabla 8. La escala y los ARNip (control) están a la izquierda.

25

La figura 3 da los resultados de cantidad de ARNip (ng) obtenidos mediante procesamiento de los datos de la electroforesis en el software ImageJ del gel de electroforesis revelado con UV de la figura 2.

30

La figura 4 representa la intensidad obtenida en un aparato ZetaSizer Malvern en función del diámetro hidrodinámico en nm para el ARNip libre (comparación) y para tres formulaciones de acuerdo con la invención obtenidas mediante complejación con una relación N/P: cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» (debidas al nitrógeno cargado, de ahí la N de N/P), respecto a la cantidad de cargas negativas aportada por los ARNip (debidas al fósforo del ARNip, de ahí la P de N/P) de 4/1, de 8/1 o de 16/1.

35

La figura 5 representa un gel de electroforesis revelado con UV con, de izquierda a derecha:

40

- la escala,
- el ARNip libre (control)

a continuación migraciones obtenidas por complejación de ARNip:

45

- con la formulación B1 (ejemplo comparativo) (sin complejación, los ARNip son libres),
- con la formulación B6 con una relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 8/1 (complejación cuantitativa),

50

- con la formulación B6 con una relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 8/1 (complejación cuantitativa),

55

- con la formulación B10 con una relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 8/1 (complejación cuantitativa),

60

- con lipofectamina (ejemplo comparativo) (complejación incompleta).

La figura 6 representa un gel de electroforesis revelado con UV de un complejo de ARNip/formulación B10 justo después de la complejación (T0) y a continuación 15 min, 45 min, 1 h 30, 3 h y 6 h después de la complejación. La escala y los ARNip (control) están a la izquierda.

65

La figura 7 representa la disminución de la intensidad de fluorescencia FITC en % transfectando las líneas celulares con:

70

- Lipofectamine RNAimax (agente comercial),

75

- el complejo ARNip/formulación B1,

- con el complejo ARNip/formulación B6, habiéndose conservado la formulación 7 meses a temperatura ambiente previamente a la complejación,

- con el complejo ARNip/formulación B6, habiéndose conservado la formulación 12 meses a temperatura ambiente previamente a la complejación,

- con el complejo ARNip/formulación B10, habiéndose conservado la formulación 12 meses a temperatura ambiente

previamente a la complejación,

- con un complejo ARNip/formulación de liposomas catiónicos que comprende DOTAP (58% en peso), DOPE (18% en peso), colesterol (2% en peso) y DSPE-PEG3000 (22% en peso)) (comparativo).

- 5 La figura 8 representa la intensidad de fluorescencia (FITC) para 3 líneas celulares que sobreexpresan experimentalmente la proteína fluorescente GFP (por *green fluorescent protein*): U2OS, PC3 y Hela para el complejo ARNip/formulación B10, estando el ARNip llamado siGFP dirigido contra el ARNm que codifica la proteína GFP, y para el control negativo (células incubadas con una formulación B10 complejada con ARNip control negativo, es decir «inerte» sin efecto sobre el transcriptoma de la célula llamado *siAllStar*).
- 10 La figura 9 representa un gel de electroforesis revelado con UV realizado después de la complejación de microARN sintético de tipo *mimic* con la formulación A3 con concentraciones precisadas en la tabla 9. La escala y los microARN *Mimic* (control) y la formulación premezcla A3 no complejada están a la izquierda. Las formulaciones finales derivadas de la complejación de la formulación premezcla A3 y de los *Mimic* a cinco relaciones N/P diferentes están a la derecha.

15

EJEMPLOS

- Preparación y composición de formulaciones «premezcla» antes de la complejación a los ARNip

20 [0228] La fase acuosa utilizada es una solución tampón PBS 1X.

[0229] Los proveedores de los compuestos son los siguientes:

Lipoid S75-3: Lipoid

25 Lipoid S75: Lipoid

Lipoid S100-3: Lipoid

DOTAP: Avanti Polar

DOPE: Avanti Polar

MyrjS40: Croda

30 Suppocire NB: Gattefossé

Aceite de soja: Croda

[0230] El diámetro hidrodinámico de las gotitas de las formulaciones así como su potencial zeta se midieron por difusión cuasielástica de la luz mediante un aparato de tipo ZetaSizer, Malvern. El diámetro hidrodinámico de las gotitas se midió en una solución de PBS 0,1X, el potencial zeta en una solución acuosa de NaCl 0,15 mM.

35

[0231] Se realizaron dieciséis formulaciones diferentes, cuyas composiciones se indican en las tablas 1 a 5.

Tabla 1

	A1 (comp.)	A2	A3
CORONA	Lípido anfífilo: Lipoid	S75-3	S75-3
	% en peso de Lipoid / gotita	35,29	8,83
	% en peso de Lipoid / corona sin PEG	100	25
	% en peso de Lipoid / corona	46,15	11,54
	% molar de Lipoid / corona	70,02	16,86
	Tensioactivo catiónico DOTAP	X	DOTAP
	% en peso de DOTAP / gotita	0	26,47
	% en peso de DOTAP / corona sin PEG	0	75
	% en peso de DOTAP / corona	0	34,61
	% molar de DOTAP / corona	0	54,28
	Cotensioactivo	Myrj S40	Myrj S40
	% en peso de cotensioactivo / gotita	41,17	41,17
	% en peso de (cotensioactivo) / corona	53,85	53,85
	% molar de (cotensioactivo) / corona	29,98	28,86
	Lípido fusógeno DOPE	X	DOPE
	% en peso de DOPE / gotita	0	0
	% en peso de DOPE / corona sin PEG	0	0
	% en peso de DOPE / corona	0	15
	% en peso de DOPE corona	0	6,92

	% molar de DOPE / corona	0	0	10,18
NÚCLEO	Lípido solubilizante	Suppocire NB	Suppocire NB	Suppocire NB
	% en peso de lípido solubilizante/núcleo	75	75	75
	% en peso de lípido solubilizante/gotita	17,65	17,65	17,65
	Aceite	Aceite de soja	Aceite de soja	Aceite de soja
	% en peso de aceite / núcleo	25	25	25
	% en peso de aceite / gotita	5,88	5,88	5,88
	% en peso de núcleo / gotita		23,53	23,53
	% molar de núcleo / gotita		33,35	33,35
	Formulación (número de repetición)	3	4	3
RESULTADO	Diámetro hidrodinámico (nm) - promedio	124,9	49,1	44,48
	ZP (mV) en NaCl 0,15 mM	-26	25,38	30,87
	Estabilidad	ok	ok	ok
	Complejación (%)	0	100	100
	Eficacia de silenciamiento (%)	0	72,88	75,06

Tabla 2

		B1 (comp.)	B2	B3
CORONA	Lípido anfífilo: Lipoid	S75-3	S75	S100-3
	% en peso de Lipoid / gotita	8,75	4,25	4,25
	% en peso de Lipoid / corona sin PEG	100	50	50
	% en peso de Lipoid / corona	15,98	7,99	7,99
	% molar de Lipoid / corona	34,14	17,89	17,89
	Tensioactivo catiónico DOTAP	X	DOTAP	DOTAP
	% en peso de DOTAP / gotita	0	4,25	4,25
	% en peso de DOTAP / corona sin PEG	0	50	50
	% en peso de DOTAP / corona	0	7,99	7,99
	% molar de DOTAP / corona	0	17,85	17,85
	Cotensioactivo	Myrj S40	Myrj S40	Myrj S40
	% en peso de cotensioactivo / gotita	46	46	46
	% en peso de (cotensioactivo) / corona	84,02	84,02	84,02
	% molar de (cotensioactivo) / corona	65,86	64,27	64,27
	Lípido fusógeno DOPE	X	X	X
	% en peso de DOPE / gotita	0	0	0
	% en peso de DOPE / corona sin PEG	0	0	0
% en peso de DOPE / corona	0	0	0	
% molar de DOPE / corona	0	0	0	
NÚCLEO	Lípido solubilizante	Suppocire NB	Suppocire NB	Suppocire NB
	% en peso de lípido solubilizante / núcleo	75	75	75
	% en peso de lípido solubilizante / gotita	33,94	33,94	33,94
	Aceite	Aceite de soja	Aceite de soja	Aceite de soja
	% en peso de aceite / núcleo	25	25	25
	% en peso de aceite / gotita	11,31	11,31	11,31
	% en peso de núcleo / gotita		45,25	45,25
	% molar de núcleo / gotita			
	Formulación (número de repetición)	6	2	2
RESULTADO	Diámetro hidrodinámico (nm) - promedio	59,51	42,11	61,43
	ZP (mV) en NaCl 0,15 mM	-21,8	21,4	6,72
	Estabilidad	ok	ok	ok
	Complejación (%)	0	ND	ND
	Eficacia de silenciamiento (%)	0	0	0

Tabla 3

		B4 (comp.)	B5	B6
CORONA	Lípido anfífilo: Lipoid	S75-3	S75-3	S75-3
	% en peso de Lipoid / gotita	6,58	2,19	2,84

	% en peso de Lipoid / corona sin PEG	100	25	25
	% en peso de Lipoid / corona	14,29	4	6,9
	% molar de Lipoid / corona	31,24	8,39	12,39
	Tensioactivo catiónico DOTAP	X	DOTAP	DOTAP
	% en peso de DOTAP / gotita	0	6,56	8,52
	% en peso de DOTAP / corona sin PEG	0	75	75
	% en peso de DOTAP / corona	0	11,99	20,67
	% molar de DOTAP / corona	0	26,99	39,87
	Cotensioactivo	Myrj S40	Myrj S40	Myrj S40
	% en peso de cotensioactivo / gotita	39,48	46	29,87
	% en peso de (cotensioactivo) / corona	85,71	84,02	72,43
	% molar de (cotensioactivo) / corona	68,76	64,63	47,74
	Lípido fusógeno DOPE	X	X	X
	% en peso de DOPE / gotita	0	0	0
	% en peso de DOPE / corona sin PEG	0	0	0
	% en peso de DOPE / corona	0	0	0
	% molar de DOPE / corona	0	0	0
NÚCLEO	Lípido solubilizante	Suppocire NB	Suppocire NB	Suppocire NB
	% en peso de lípido solubilizante / núcleo	75	75	75
	% en peso de lípido solubilizante / gotita	40,46	33,94	44,07
	Aceite	Aceite de soja	Aceite de soja	Aceite de soja
	% en peso de aceite / núcleo	25	25	25
	% en peso de aceite / gotitas	13,49	11,31	14,69
	% en peso de núcleo / gotita		45,25	58,76
	% molar de núcleo / gotita			73,99
	Formulación (número de repetición)	3	4	6
RESULTADO	Diámetro hidrodinámico (nm) - promedio	84,88	56,68	86,77
	ZP (mV) en NaCl 0,15 mM	-18,89	26,51	36,38
	Estabilidad	ok	ok	ok
	Complejación (%)	0	100	100
	Eficacia de silenciamiento (%)	0	0	42,81

Tabla 4

		B9 (Comp.)	B10
CORONA	Lípido anfífilo: Lipoid	S75-3	S75-3
	% en peso de Lipoid / gotita	0	1,71
	% en peso de Lipoid / corona sin PEG	0	15
	% en peso de Lipoid / corona	0	4,14
	% molar de Lipoid / corona	0	7,43
	Tensioactivo catiónico DOTAP	DOTAP	DOTAP
	% en peso de DOTAP / gotita	8,25	8,25
	% en peso de DOTAP / corona sin PEG	75	75
	% en peso de DOTAP / corona	20,67	20,67
	% molar de DOTAP / corona	39,87	39,87
	Cotensioactivo	Myrj S40	Myrj S40
	% en peso de cotensioactivo / gotita	29,87	29,87
	% en peso de (cotensioactivo) / corona	72,43	72,43
	% molar de (cotensioactivo) / corona	47,74	47,74
	Lípido fusógeno DOPE	DOPE	DOPE
	% en peso de DOPE / gotita	2,84	1,71
% en peso de DOPE / corona sin PEG	25	10	
% en peso de DOPE / corona	6,9	2,76	
% molar de DOPE / corona	10,18	4,99	
NÚCLEO	Lípido solubilizante	Suppocire NB	Suppocire NB
	% en peso de lípido solubilizante / núcleo	75	75
	% en peso de lípido solubilizante / gotita	44,07	44,07

	Aceite	Aceite de soja	Aceite de soja
	<i>% en peso de aceite / núcleo</i>	25	25
	% en peso de aceite / gotitas	14,69	14,69
	<i>% en peso de núcleo / gotita</i>		58,76
	<i>% molar de núcleo / gotita</i>		73,74
	Formulación (número de repetición)	1 mala formulación	5
RESULTADO	Diámetro hidrodinámico (nm) - promedio	ND	88,64
	ZP (mV)_ en NaCl 0,15 mM	ND	36,9
	Estabilidad	ND	Ok
	Complejación (%)	ND	100
	Eficacia de silenciamiento (%)	ND	49,34

Tabla 5

		C1(comp.)	C2	C3
CORONA	Lípido anfílico: Lipoid	S75-3	S75-3	S75-3
	% en peso de Lipoid / gotita	28,44	7,11	4,27
	<i>% en peso de Lipoid / corona sin PEG</i>	100	25	15
	<i>% en peso de Lipoid / corona</i>	70,24	17,56	10,54
	<i>% molar de Lipoid / corona</i>	86,55	20,65	12,38
	Tensioactivo catiónico DOTAP	X	DOTAP	DOTAP
	% en peso de DOTAP / gotita	0	21,33	21,33
	<i>% en peso de DOTAP / corona sin PEG</i>	0	75	75
	<i>% en peso de DOTAP / corona</i>	0	52,68	52,68
	% molar de DOTAP / corona	0	66,51	66,47
	Cotensioactivo	Myrj S40	Myrj S40	Myrj S40
	% en peso de cotensioactivo / gotita	12,05	12,05	12,05
	<i>% en peso de (cotensioactivo) / corona</i>	29,76	29,76	29,76
	% molar de (cotensioactivo) / corona	13,45	12,84	12,83
	Lípido fusógeno DOPE	X	X	DOPE
	<i>% en peso de DOPE / gotita</i>	0	0	2,84
<i>% en peso de DOPE / corona sin PEG</i>	0	0	10	
<i>% en peso de DOPE / corona</i>	0	0	7,02	
<i>% molar de DOPE / corona</i>	0	0	8,32	
NÚCLEO	Lípido solubilizante	Suppocire NB	Suppocire NB	Suppocire NB
	<i>% en peso de lípido solubilizante / núcleo</i>	75	75	75
	% en peso de lípido solubilizante / gotita	44,63	44,63	44,63
	Aceite	Aceite de soja	Aceite de soja	Aceite de soja
	<i>% en peso de aceite / núcleo</i>	25	25	25
	% en peso de aceite / gotita	14,88	14,88	14,88
	% en peso de núcleo / gotita		59,51	59,51
	% molar de núcleo / gotita		65,85	
	Formulación (número de repetición)	4	4	3
RESULTADO	Diámetro hidrodinámico (nm) - promedio	153,03	162,2	168,9
	ZP (mV)_ en NaCl 0,15 mM	-37,71	53,7	51,83
	Estabilidad	ok	ok	ok
	Complejación (%)	0	100	100
	Eficacia de silenciamiento (%)	0	80,51	81,72

[0232] En las tablas 1 a 5:

5

% en peso corresponde a un porcentaje másico.

% molar corresponde a un porcentaje molar.

ND (no determinado) significa que el experimento no se ha realizado

Los porcentajes «/gotita» representan porcentajes con respecto al conjunto (Lipoid/DOTAP/Myrj S40/DOPE opcional/Suppocire NB/Aceite de soja).

Los porcentajes «/corona» representan porcentajes con respecto al conjunto (Lipoid/DOTAP/Myrj S40/DOPE opcional).

Los porcentajes «/corona sin PEG» representan porcentajes con respecto al conjunto (Lipoid/DOTAP/DOPE opcional).

Los porcentajes «/núcleo» representan porcentajes con respecto al conjunto (Suppocire NB/Aceite de soja).

5 El Lipoid S75-3 comprende el 65-75% de fosfatidilcolina. Las cadenas alifáticas de los fosfolípidos están mayoritariamente saturadas (composición media: 12-16% de C16:0, 80-85% de C18:0, < 5% de C18:1, < 2% de C18:2).

El Lipoid S75 comprende el 65-75% de fosfatidilcolina. Las cadenas alifáticas de los fosfolípidos están mayoritariamente insaturadas (composición media: 17-20% de C16:0, 2-5% de C18:0, 8-12% de C18:1, 58-65% de C18:2, 4-6% de C18:3).

10 El Lipoid S100-3 comprende >94% de fosfatidilcolina. Las cadenas alifáticas de los fosfolípidos están mayoritariamente saturadas (composición media: 12-16% de C16:0, 85-88% de C18:0, < 2% de C18:1, < 1% de C18:2).

15 **[0233]** Las formulaciones A1, B1, B4 y C1 son ejemplos comparativos, ya que no comprenden ningún cotensioactivo catiónico.

Sus potenciales zeta son negativos.

La complejación de ARNip no tiene lugar en la superficie de las gotitas, de acuerdo con lo que se esperaba.

20 **[0234]** La formulación B9 es un ejemplo comparativo, ya que no comprende lípido anfílico. La emulsión no se ha podido preparar.

[0235] Se siguió el procedimiento de preparación siguiente:

(i) Preparación de la fase oleosa:

25

[0236] Se pesaron aceite de soja, suppocire NC, lípido anfílico, DOTAP, DOPE opcional, y a continuación se mezclaron con diclorometano antes de calentarlos a 60°C para obtener una solución viscosa homogénea. El diclorometano permite favorecer la solubilización. Los disolventes se evaporaron a continuación al vacío.

30 (ii) Preparación de la fase acuosa:

[0237] Durante la fase de evaporación del etanol, se preparó la fase acuosa. En un eppendorf de 5 ml, se mezclaron cotensioactivo, glicerol y la solución acuosa de PBS (NaCl 154 mM, pH 7,4) y a continuación se disolvieron en un baño a 75°C.

35

(iii) Mezcla de las dos fases:

[0238] La fase oleosa estaba a aproximadamente 40°C (en forma viscosa) y la fase acuosa a aproximadamente 70°C (a la salida del baño). La fase acuosa se vertió en la fase oleosa.

40

(iv) Emulsificación:

[0239] El matraz que contenía las dos fases se fijó en el recinto de sonicación de un sonicador AV505® (Sonics, Newton, USA). El protocolo consistía en la realización de ciclos de sonicación (10 segundos de actividad cada 30 segundos) a una potencia de 100 W durante un periodo de 40 minutos.

45

(v) Purificación:

[0240] Las gotitas producidas de este modo se purificaron a continuación por diálisis (umbral de corte: 12 kDa, contra NaCl 154 mM, durante una noche) para eliminar los componentes lipídicos no integrados en los LNP. Finalmente, la formulación se esterilizó por filtración en membrana de celulosa.

50

• Tamaño de las gotitas de las formulaciones y potencial zeta

55 - Influencia de la composición de la formulación

[0241] Los resultados de las tablas 1 a 5 muestran que una disminución de la proporción de cotensioactivo (Myrj S40) conduce a un aumento del diámetro de las gotitas.

- Evolución en el tiempo

[0242] La evolución del tamaño de las gotitas (tabla 6) y del potencial zeta (tabla 7) de las formulaciones se midieron a 40°C (estabilidad acelerada). Las formulaciones estaban conservadas a 40°C entre dos medidas.

5

Tabla 6: evolución del tamaño de las gotitas e índice de polidispersidad (PDI) medidos por difusión cuasi-elástica de la luz en función del tiempo

Días	B1	B4	B5	B6	B10	C1	C2
0	58,27	98,87	60,03	87,93	91,53	157,43	171,4
7	60,52	97,12	58,96	87,1	90,51	156,17	172,63
14	62,59	98,36	58,28	86,25	89,87	156,46	170,15
21	59,41	97,81	59,23	85,78	90,3	153,03	162,2
28	61	97,15	60,36	87,61	90,96	153,9	161,47

Tabla 7: evolución del potencial zeta de las formulaciones en función del tiempo

Días	B1	B4	B5	B6	B10	C1	C2
0	-21,3	-21,16	24,03	34,13	34,97	-40,27	57,33
7	-25,6	-21,17	28,23	31,77	34,73	-43,13	56,77
14	-24,73	-21,03	29,45	28,4	33,47	-42,33	55,33
21	-21,8	-20,47	28,63	34,3	33,07	-38,1	53,9
28	-18,93	-19,83	27,5	33	31,23	-39,03	51,6

10

[0243] Se ha observado que el tamaño de las gotitas y el potencial zeta de formulaciones de acuerdo con la invención conservadas a 40°C durante 300 días no evolucionan.

[0244] Estos resultados muestran que las formulaciones de acuerdo con la invención son estables en el tiempo.

15

• Complejación con ARNip: Preparación de formulaciones «finales» que comprenden secuencias nucleotídicas de ARNip.

20 **[0245]** Se siguió el procedimiento general siguiente:

[0246] La complejación consiste en una simple mezcla de las formulaciones preparadas anteriormente y de una solución de ARNip, todo en un tampón. La elección del tampón está en función de la aplicación prevista: para un estudio *in vitro*, se utilizó el medio de cultivo optimizado para las etapas de transfección, OptiMEM. Para un estudio de complejación, se utilizó tampón Hepes 5 mM.

25

[0247] Se utilizó una cantidad de 0,5 µg de ARNip (GFP-22 siRNA rhodamine (nº de catálogo 1022176) (Qiagen) o siGFP (Sigma)) (25 µg/ml en 20 µl).

30 **[0248]** La mezcla se agitó durante 30 minutos a 600 rpm, esto a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

[0249] La complejación se visualizó a través de dos herramientas:

35 - La electroforesis en gel de agarosa que permite observar la migración de los ARNip. Si hay una buena complejación, entonces las gotitas que comprenden los ARNip complejados serán más pesadas que los ARNip libres y se visualizarán en los pocillos. Si la complejación es menor, ARNip libres migran a otra posición.

- En DLS observando el impacto de la complejación sobre el diámetro hidrodinámico. Cuanto más eficaz es la complejación, más se orienta el perfil hacia una distribución monomodal.

40

[0250] La cantidad de formulación necesaria para tener un rendimiento de complejación cuantitativo de los ARNip se optimizó.

[0251] En la práctica, las cargas negativas aportadas por los ARNip son compensadas por las cargas positivas de la formulación (es decir las cargas positivas del tensioactivo catiónico DOTAP).

45

[0252] Típicamente, cuando el único tensioactivo catiónico de la formulación es DOTAP (que solamente comprende una única carga positiva), se obtiene un rendimiento cuantitativo de complejación cuando la relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip es superior a 8/1, como se ilustra en las figuras 2 y 3.

5

[0253] La figura 2 representa un gel de electroforesis revelado con UV realizado después de la complejación de ARNip con la formulación B10 con concentraciones precisadas en la tabla 8, mezclando una solución de ARNip y la formulación en un tampón Hepes 5 mM. Antes del depósito sobre gel de agarosa al 1,5%, se añadieron 2 µl de tampón de carga a los ensayos. Después de 1h 30 de electroforesis a 100 V, el gel se sumergió en GelRed 3X.

10 Finalmente, se realizó una revelación con UV.

Tabla 8

	relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip	1/1	2/1	4/1	6/1	8/1	10/1	12/1	16/1
Concentración de ARNip (µg/ml)		25							
Concentración de DOTAP (µg/ml)	0	25	50	100	150	200	250	300	400

[0254] La figura 3 da los resultados obtenidos mediante procesamiento de los datos de la electroforesis en el software ImageJ de los mismos experimentos.

[0255] Las figuras 2 y 3 muestran que, para un relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip superior a 8/1, ya no hay ARNip libre en el medio y que el ARNip se ha complejado completamente.

20

[0256] La figura 4 representa la intensidad obtenida en un aparato ZetaSizer Malvern en función del diámetro hidrodinámico en nm para el ARNip libre (comparación) y para tres formulaciones de acuerdo con la invención obtenidas mediante complejación con un relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 4/1, de 8/1 o de 16/1.

25

[0257] El diámetro es mayor para el ARNip libre (comparación).

[0258] Con una relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 4/1, se observaron 2 poblaciones: un complejo ARNip/gotita alrededor de 100 nm y una población de tamaño superior que representa los ARNip en forma libre (flecha).

30

[0259] Con las relaciones cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 8/1 y 16/1, se observó una sola población que representa el complejo ARNip/gotita.

35

[0260] Estos resultados muestran también que está permitida una complejación cuantitativa (100%) de los ARNip sobre las gotitas.

40

[0261] La etapa de complejación se realizó con diversas formulaciones.

[0262] A título comparativo, se realizó un ensayo de complejación con una formulación libre de tensioactivo catiónico: la formulación B1 descrita anteriormente. Como se esperaba, la complejación del ARNip no tuvo lugar y el ARNip permanece en forma libre.

45

[0263] La figura 5 representa un gel de electroforesis revelado con UV con, de izquierda a derecha:

- la escala,

- el ARNip libre (control)

a continuación migraciones obtenidas por complejación de ARNip:

- 5 - con la formulación B1 (ejemplo comparativo) (sin complejación, los ARNip son libres),
- con la formulación B6 (premezcla formulada 6 meses antes) con una relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 8/1 (complejación cuantitativa),
- con la formulación B6 (premezcla formulada 12 meses antes) con una relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 8/1, habiéndose conservado la formulación 7 meses a temperatura ambiente previamente a la complejación (complejación cuantitativa),
- 10 - con la formulación B10 con una relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los ARNip de 8/1 (complejación cuantitativa),
- 15 - con lipofectamina (ejemplo comparativo) (complejación incompleta).

[0264] La complejación de ARNip es cuantitativa cuando se utilizaron la formulación B6 o la B10. El almacenamiento de la formulación a temperatura ambiente antes de su complejación con el ARNip no tuvo influencia sobre el rendimiento de complejación, que sigue siendo cuantitativo, lo que muestra la estabilidad de las formulaciones utilizadas.

[0265] El rendimiento es cuantitativo ya comprenda la formulación utilizada o no DOPE.

25 **[0266]** Con el agente de transfección comercial Lipofectamine RNAimax, más del 60% de los ARNip se encontraron en forma libre. Esto implica que las formulaciones de nanoemulsiones utilizadas en la invención ofrecen un mejor rendimiento de complejación que la Lipofectamine.

30 **[0267]** Finalmente, se efectuó una cinética de liberación de los ARNip del complejo ARNip/formulación B10 preparado anteriormente para observar la evolución de la complejación a lo largo del tiempo y se ilustra en la figura 6. Hasta 3 horas después de la complejación, los ARNip no se encuentran en forma libre. A las 6 horas, los ARNip comienzan a ser liberados. El complejo es, por lo tanto, estable al menos tres horas.

• Transfección in vitro

35 **[0268]** Se efectuaron ensayos de transfección en diferentes líneas celulares que sobreexpresan la *Green Fluorescent Protein* (GFP, Proteína verde fluorescente) aportando un ARNip que inhibe específicamente una secuencia del ARN mensajero de esta proteína (GFP-22 siRNA rhodamine (n° de catálogo 1022176) (Qiagen)).

40 **[0269]** La transfección se realizó con una concentración final de ARNip de 100 nM. De este modo, se sembraron células que expresan la GFP en placas de 12 pocillos (25000 células/pocillo) tratados con los complejos ARNip/formulaciones (B1, B6, B6 7 meses después de su preparación o B10) obtenidos anteriormente. Las células se incuban a continuación 72 horas a 37°C, a continuación se recuperaron para el análisis de la intensidad de fluorescencia con citómetro de flujo para determinar la eficacia de la formulación como agente de transfección. El suministro activo de ARNip que inhibe específicamente la expresión de la proteína GFP induce una disminución de la fluorescencia aportada por esta proteína.

[0270] El agente de transfección comercial, Lipofectamine RNAimax se utilizó para comparación.

50 **[0271]** La figura 7 representa la disminución de la intensidad de fluorescencia FITC en % transfectando las líneas celulares con:

- Lipofectamine RNAimax,
- el complejo ARNip/formulación B1,
- 55 - con el complejo ARNip/formulación B6, habiéndose conservado la formulación 7 meses a temperatura ambiente previamente a la complejación,
- con el complejo ARNip/formulación B6, habiéndose conservado la formulación 12 meses a temperatura ambiente previamente a la complejación,
- con el complejo ARNip/formulación B10,

- con un complejo ARNip/formulación de liposomas catiónicos que comprende DOTAP (58% en peso), DOPE (18% en peso), colesterol (2% en peso) y DSPE-PEG3000 (22% en peso)) (comparativo).

5 **[0272]** De este modo, se observa una disminución de la fluorescencia del 33 al 50% con las formulaciones de acuerdo con la invención ensayadas. Las formulaciones de acuerdo con la invención permiten, por lo tanto, un suministro activo de ARNip que induce un silenciamiento relativo de la expresión del gen de la GFP.

[0273] Además, incorporando DOPE en las formulaciones, una mayor extinción de fluorescencia es visible, favoreciendo DOPE el escape endosómico.

10 **[0274]** No se observó ninguna disminución de la fluorescencia con el complejo ARNip/formulación de liposomas catiónicos, lo que podría explicarse, por ejemplo, por una mala estabilidad de los liposomas en el medio de cultivo, un mal rendimiento de complejación y/o una mala retención de los ARNip por los liposomas después de la complejación.

15 **[0275]** Finalmente, dichos resultados en el suministro activo de ARNip mediado por las formulaciones de acuerdo con la invención se han reproducido en 3 líneas celulares que expresan GFP: U2OS, PC3 y Hela, como se ilustra en la figura 8.

20 • Complejación con un microARN sintético: preparación de formulaciones «finales» que comprenden secuencias nucleotídicas de microARN sintético (*mimic*).

[0276] Se siguió el procedimiento general siguiente:

25 **[0277]** La complejación consiste en un simple mezcla de la formulación premezcla A3 preparada anteriormente y de una solución de microARN (miRIDIAN Mimic Human has-miR612 (ThermoScientific REF#C-300937-01 n° de lote 130611)), todo en un tampón. La elección del tampón está en función de la aplicación prevista: para un estudio *in vitro*, se utilizó el medio de cultivo optimizado para las etapas de transfección, OptiMEM®. Para un estudio de complejación, se utilizó tampón Hepes 5 mM.

30 **[0278]** Se utilizó una cantidad de 0,5 µg de microARN (miRIDIAN Mimic Human has-miR612 (ThermoScientific REF#C-300937-01 n° de lote 130611)).

35 **[0279]** La mezcla se agitó durante 30 minutos a 600 rpm, esto a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

[0280] La complejación se visualizó mediante revelación de un gel de agarosa obtenido mediante electroforesis, que permite observar la migración de los microARN. Si hay una buena complejación, entonces las gotitas que comprenden los microARN complejados son más pesadas que los microARN libres y se visualizarán en 40 los pocillos. Si la complejación es menor, los microARN libres migran a otra posición.

[0281] La cantidad de formulación premezcla A3 necesaria para tener un rendimiento de complejación cuantitativo de los microARN se optimizó.

45 **[0282]** En la práctica, las cargas negativas aportadas por los microARN son compensadas por las cargas positivas de la formulación premezcla (es decir las cargas positivas del tensioactivo catiónico DOTAP). Típicamente, cuando el único tensioactivo catiónico de la formulación premezcla es DOTAP (que solamente comprende una única carga positiva), se obtiene un rendimiento cuantitativo de complejación cuando la relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa 50 aportada por los microARN (relación N/P) es superior a 8/1, como anteriormente con los ARNip.

[0283] La figura 9 representa un gel de electroforesis revelado con UV realizado después de la complejación de microARN con la formulación A3 con concentraciones precisadas en la tabla 9, mezclando una solución de microARN y la formulación premezcla A3 en un tampón HEPES 5 mM. Antes del depósito sobre gel de agarosa al 1,5%, se añadieron 2 µl de tampón de carga a los ensayos. Después de 1 h 30 de electroforesis a 100 V, el gel se sumergió en GelRed 3X. Finalmente, se realizó una revelación con UV.

Tabla 9

	relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de cargas negativas aportadas por los microARN	1/1	2/1	4/1	6/1	8/1	10/1	12/1	16/1
Concentración de microARN (µg/ml)	25								
Concentración de DOTAP (µg/ml)	0	25	50	100	150	200	250	300	400

[0284] La figura 9 muestra que, para un relación de cantidad de cargas positivas debidas al tensioactivo catiónico en la formulación «premezcla» respecto a la cantidad de carga negativa aportada por los microARN superior a 8/1, ya no hay microARN libre en el medio y que el microARN se ha complejado completamente, como se ilustra en las figuras 2 y 3 con los ARNip.

REIVINDICACIONES

1. Formulación en forma de nanoemulsión, que comprende una fase acuosa continua y al menos una fase dispersada, y que comprende:
- 5
- al menos un 5% molar de lípido anfífilo,
 - del 15 al 70% molar de al menos un tensioactivo catiónico que comprende:
- 10
- al menos un grupo lipófilo seleccionado entre:
 - un grupo R o R-(C=O)-, donde R representa una cadena hidrocarbonada lineal que comprende de 11 a 23 átomos de carbono,
 - un éster o una amida de ácidos grasos que comprende de 12 a 24 átomos de carbono y fosfatidiletanolamina, y
 - un poli(óxido de propileno), y
- 15
- al menos un grupo hidrófilo que comprende al menos un grupo catiónico seleccionado entre:
 - un grupo alquilo lineal o ramificado que comprende de 1 a 12 átomos de carbono e interrumpido y/o sustituido por al menos un grupo catiónico, y
- 20
- un grupo polimérico hidrófilo que comprende al menos un grupo catiónico, y
 - del 10% al 55% molar de un cotensioactivo que comprende al menos una cadena de poli(óxido de etileno) que comprende al menos 25 unidades de óxido de etileno,
 - un lípido solubilizante,
- 25
- opcionalmente un lípido fusógeno,
 - opcionalmente un aceite,
 - opcionalmente un agente de imagenología, et
 - opcionalmente un agente terapéutico lipófilo,
- 30
- donde los porcentajes molares de lípido anfífilo, de tensioactivo catiónico y de cotensioactivo son con respecto al conjunto (lípido anfífilo/tensioactivo catiónico/cotensioactivo/lípido fusógeno opcional), y donde la proporción molar del conjunto (lípido solubilizante/aceite opcional/agente de imagenología opcional/agente terapéutico lipófilo opcional) con respecto a la fase dispersada es del 10 al 80%.
- 35
2. Formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proporción molar del conjunto (lípido solubilizante/aceite opcional/agente de imagenología opcional/agente terapéutico lipófilo opcional) con respecto a la fase dispersada es del 25 al 75%, preferentemente del 33,35 al 73,99%.
3. Formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el tensioactivo catiónico se selecciona
- 40
- entre:
- *N*[1-(2,3-dioleiloxi) propil]-*N,N,N*-trimetilamonio,
 - 1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano,
 - *N*-(2-hidroxietyl)-*N,N*-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi-1-propano),
- 45
- 1-[2-(oleiloxi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxietyl)imidazolinio, y
 - dioctadecilamidoglicilispermina.
4. Formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un lípido fusógeno, tal como 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.
- 50
5. Formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el lípido anfífilo es un fosfolípido.
6. Formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un agente de
- 55
- imagenología.
7. Formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende un agente terapéutico.

8. Formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende un cotensioactivo injertado con una molécula de interés, preferentemente un ligando biológico de direccionamiento.

5 9. Formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o doble, que comprende menos de 200 bases para una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o menos de 200 pares de bases para una secuencia nucleotídica de cadena doble, y susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN.

10. Formulación de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicha secuencia nucleotídica se selecciona
10 entre:

- un ARN interferente pequeño,
- un ácido nucleico bloqueado, y
- un microARN sintético.

15

11. Formulación de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha secuencia nucleotídica es un ARN interferente pequeño.

12. Procedimiento de preparación de una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9
20 a 11, que comprende las siguientes etapas:

(i) preparar una fase oleosa que comprende un lípido solubilizante, un lípido anfífilo, el tensioactivo catiónico;

(ii) preparar una fase acuosa que comprende el cotensioactivo;

25 (iii) dispersar la fase oleosa en la fase acuosa bajo la acción de un cizallamiento suficiente para formar una formulación en forma de nanoemulsión tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y a continuación

30 (iv) añadir una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o doble, que comprende menos de 200 bases para una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o menos de 200 pares de bases para una secuencia nucleotídica de cadena doble, y susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN a la formulación en forma de nanoemulsión tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y a continuación

(v) recuperar la formulación formada de este modo.

13. Método de introducción *in vitro* de una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o doble, que
35 comprende menos de 200 bases para una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o menos de 200 pares de bases para una secuencia nucleotídica de cadena doble, y susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN en una célula eucariota, que comprende la puesta en contacto de la célula eucariota con una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.

14. Formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su utilización para la
40 prevención y/o el tratamiento de una enfermedad.

15. Kit que comprende la formulación en forma de nanoemulsión tal como se define de acuerdo con
45 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y por separado, al menos una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o doble, que comprende menos de 200 bases para una secuencia nucleotídica de cadena sencilla o menos de 200 pares de bases para una secuencia nucleotídica de cadena doble, y susceptible de modular mecanismos endógenos de interferencia por ARN.

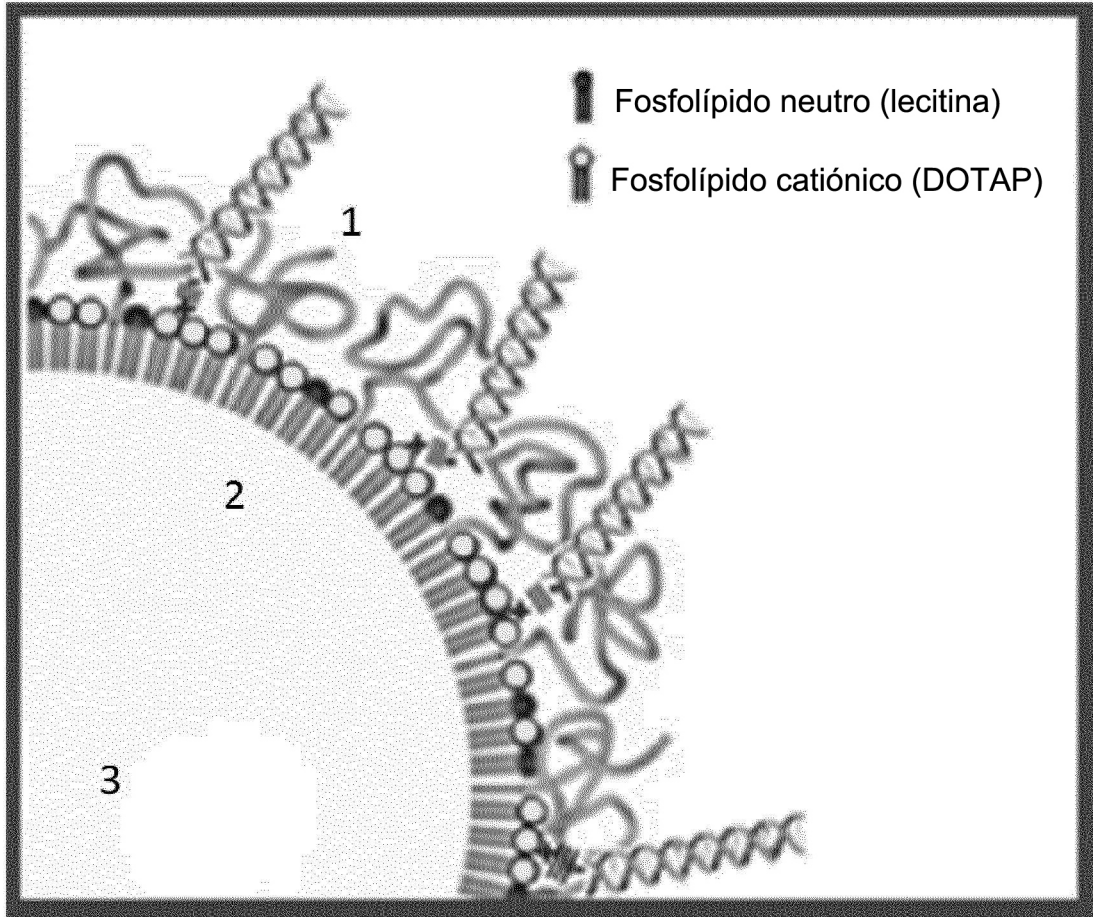


FIG.1

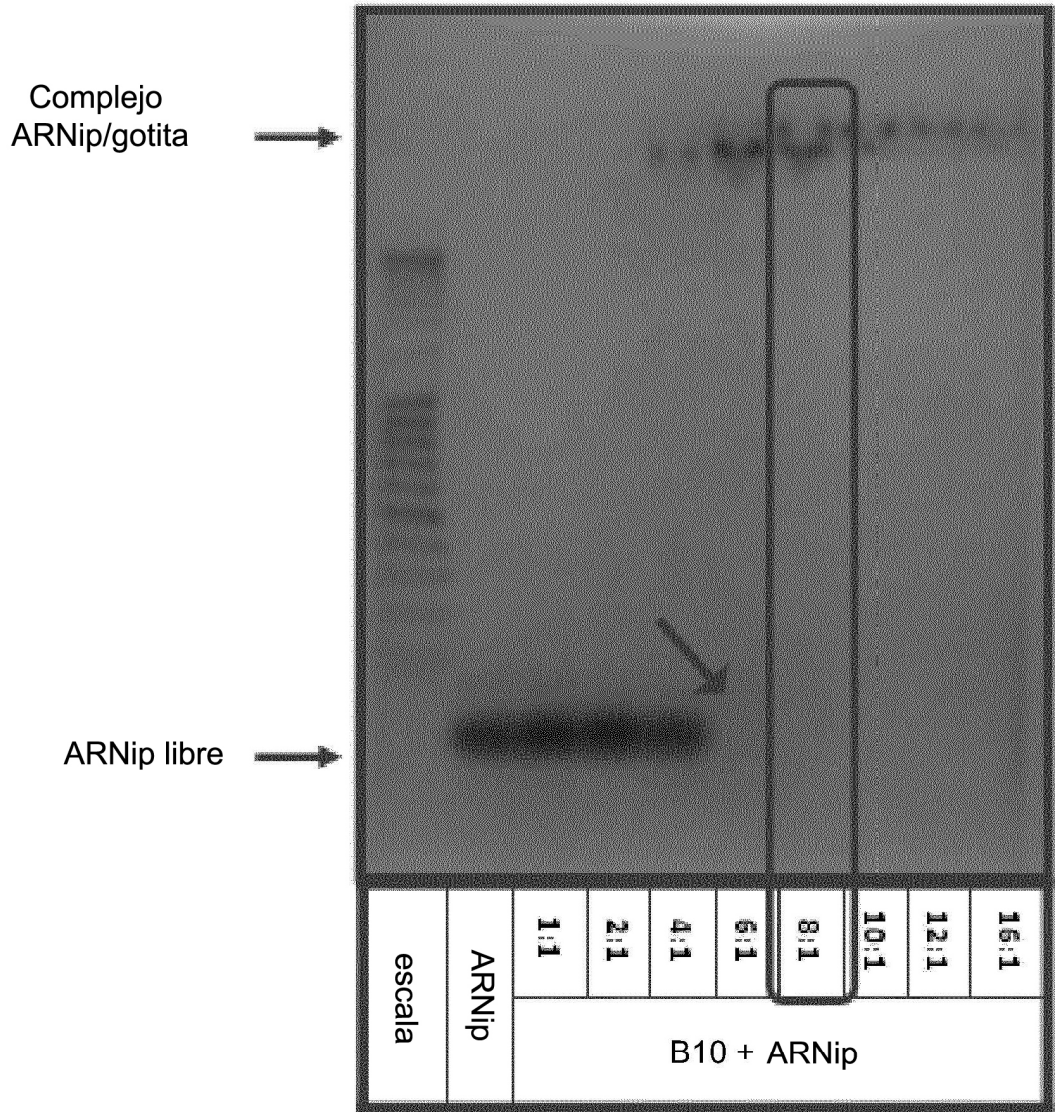


FIG.2

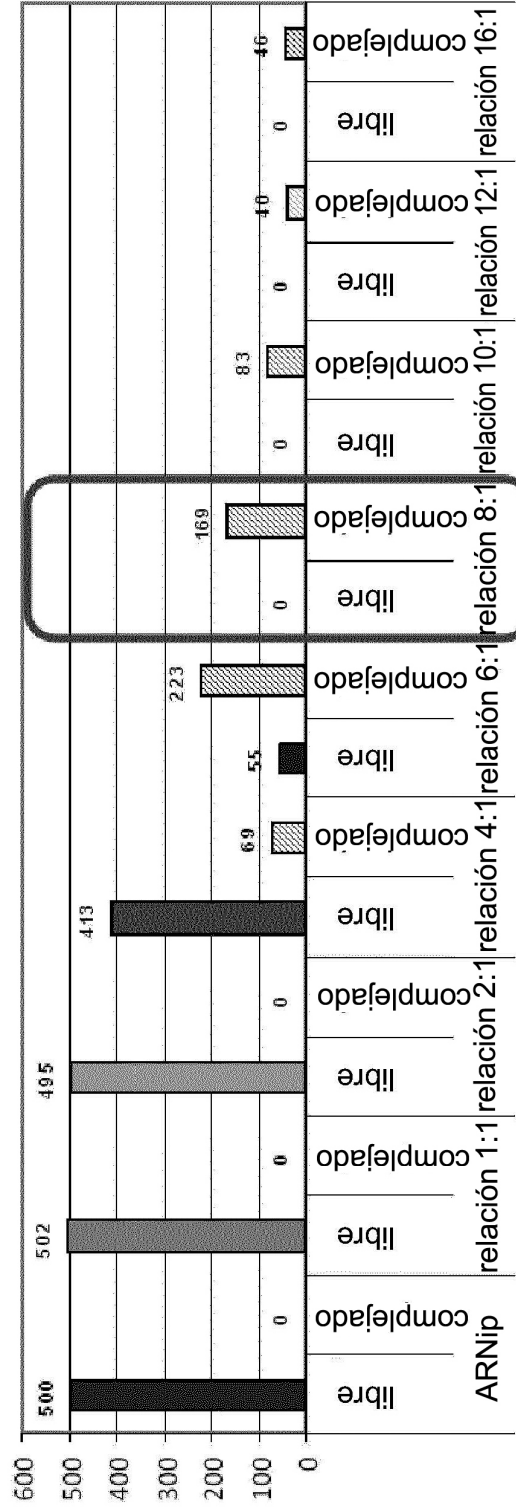


FIG.3

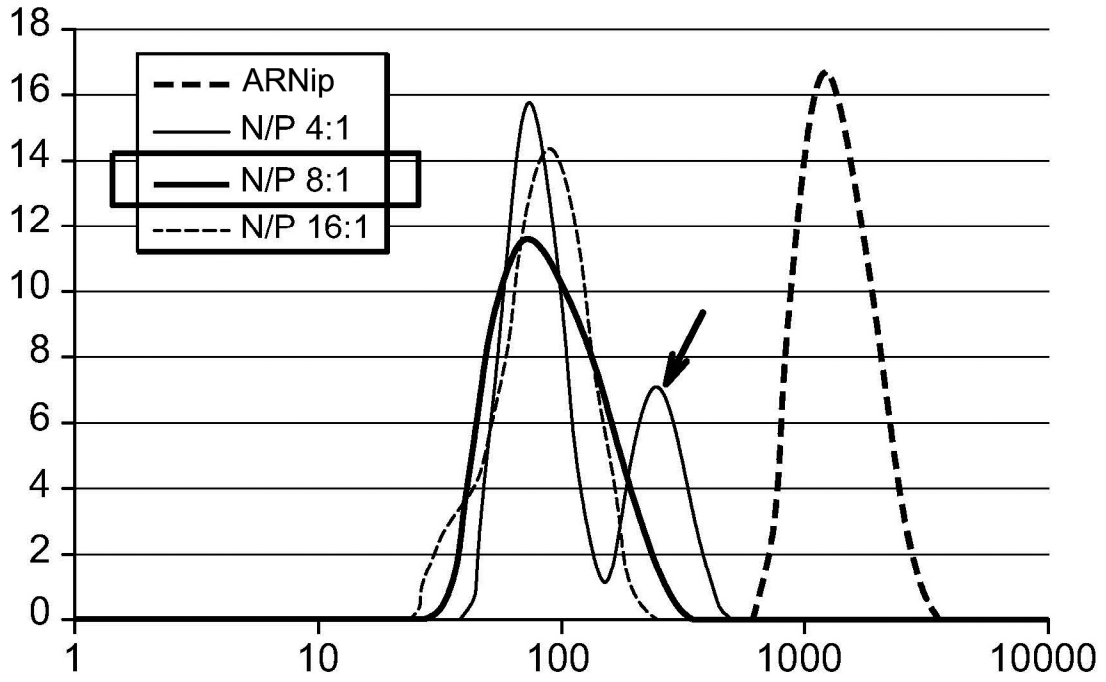


FIG.4

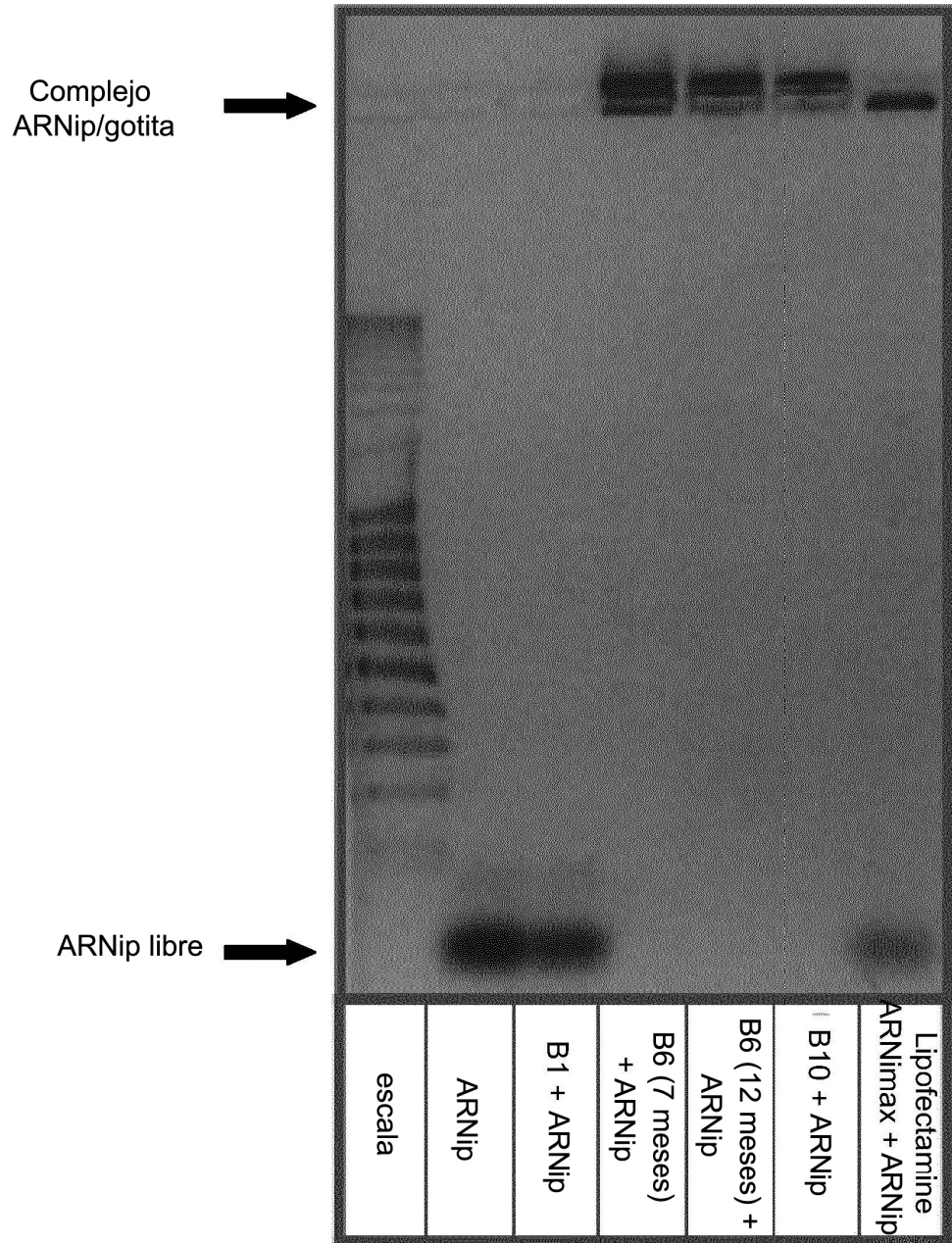


FIG.5

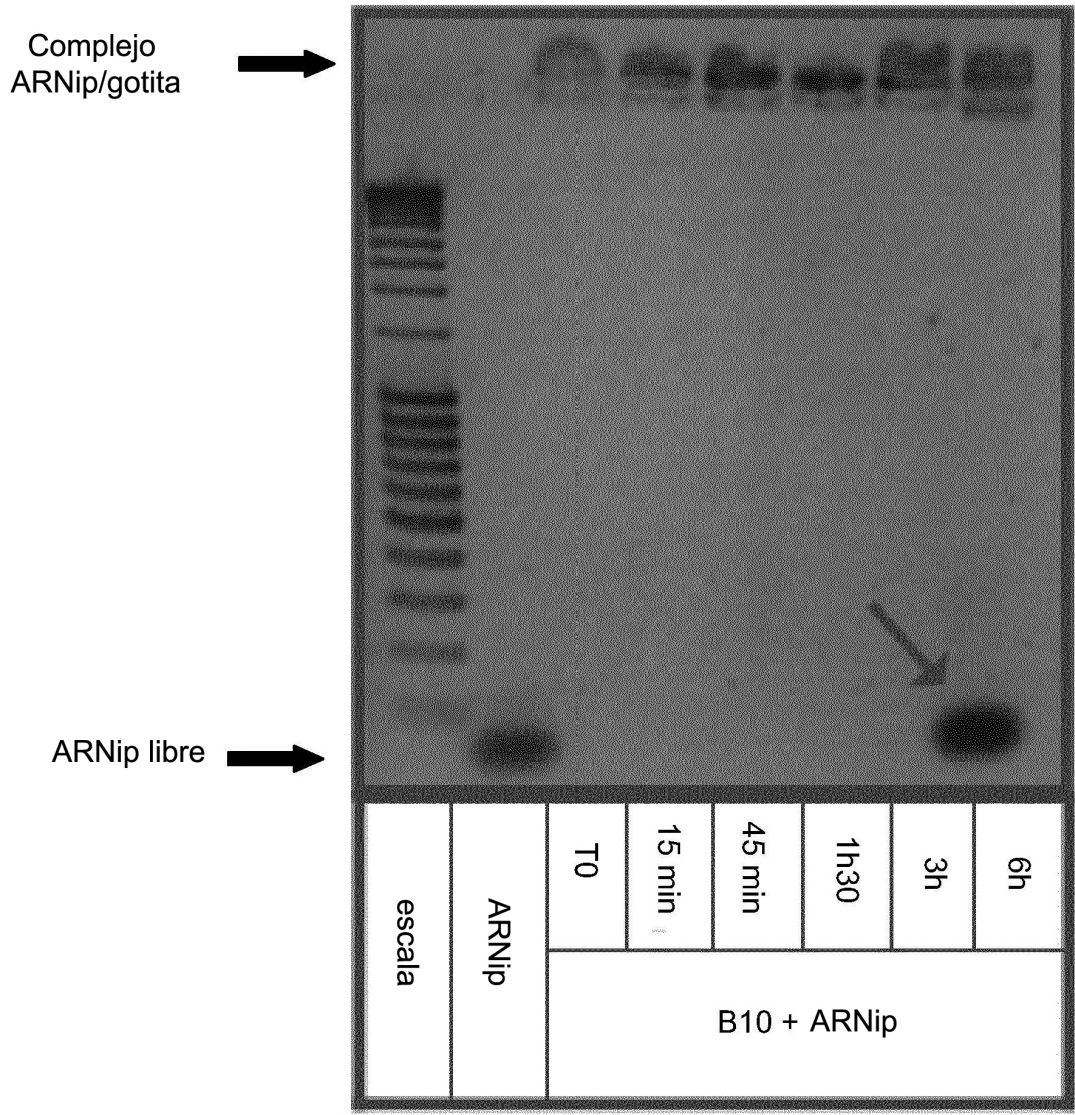


FIG.6

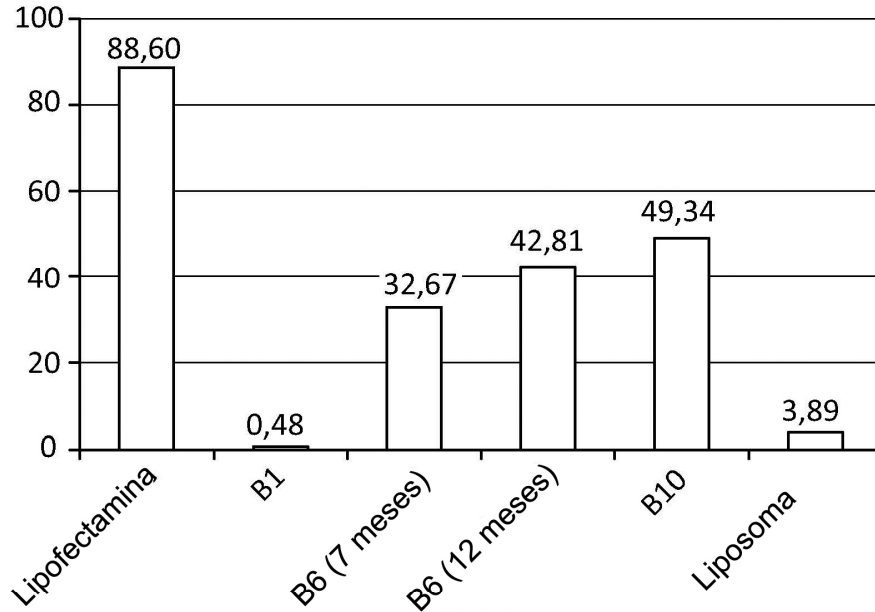


FIG.7

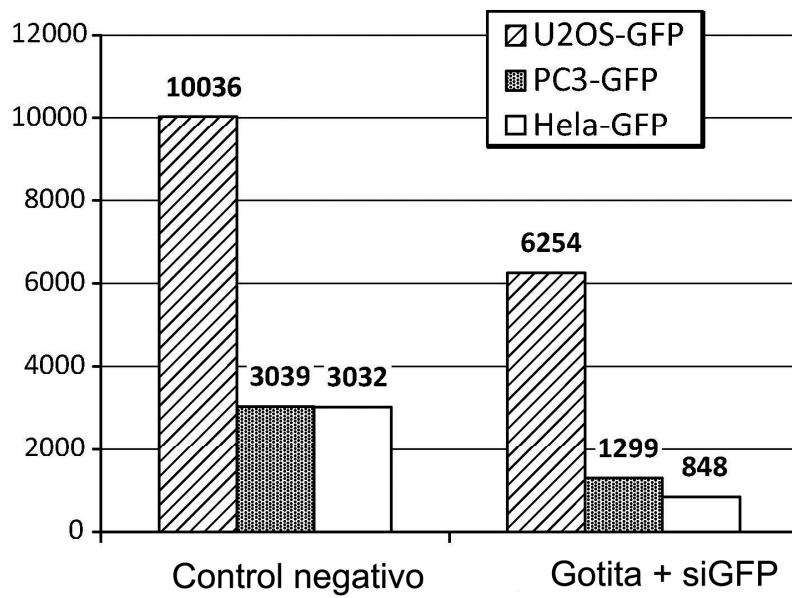


FIG.8

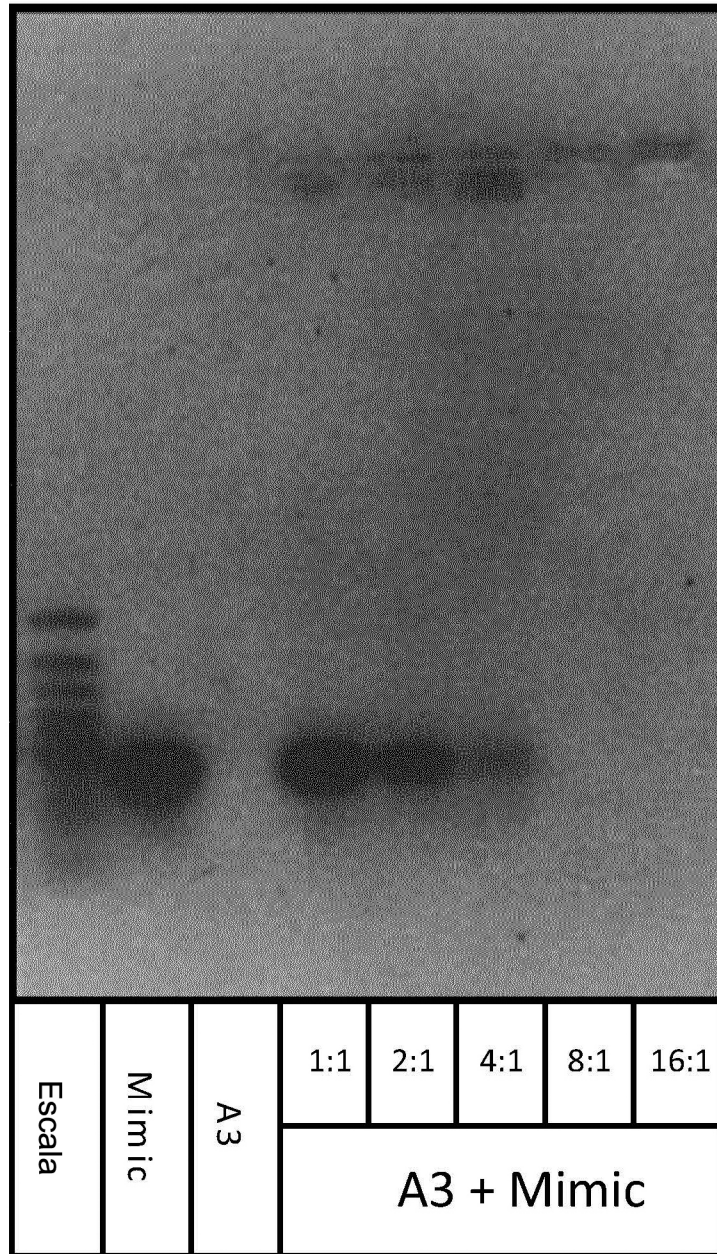


FIG.9