

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de agosto de 2020 (20.08.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/165482 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C12N 15/113 (2010.01) A61K 47/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2020/070104

(22) Fecha de presentación internacional:

14 de febrero de 2020 (14.02.2020)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201930118 15 de febrero de 2019 (15.02.2019) ES

(71) Solicitantes: SERVICIO ANDALUZ DE SALUD

[ES/ES]; Avenida de la Constitución 18, 41071 Sevilla (ES). UNIVERSIDAD DE MÁLAGA [ES/ES]; Avenida Cervantes, 2, 29071 Málaga (ES). UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ES/ES]; Paseo de las Delicias, s/n, Pabellón de Brasil, 41013 Sevilla (ES). CIBER [ES/ES]; Monforte de Lemos, 5, Pabellón I, 28029 Madrid (ES).

(72) Inventores: LHAMYANI, Said; Instituto de Investigación

Biomédica de Málaga (IBIMA), C/ Dr Miguel Díaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES). MARIEL GENTILE, Adriana; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), C/ Dr Miguel Díaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES). TINAHONES MADUEÑO, Francisco José; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), C/ Dr Miguel Díaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES). EL BEKAY RIZKY, Rajaa; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), C/ Dr Miguel Díaz Recio, 28, 29010 Málaga (ES). GIRÁLDEZ PÉREZ, Rosa María; OTRI-Universidad de Málaga, C/ Severo Ochoa, 4 (P.T.A., Campanillas), 29590 Málaga (ES). GRUESO MOLINA, Elia María; OTRI-Universidad de Sevilla, Paseo de las Delicias, s/n - Pabellón de Brasil, 41013 Sevilla (ES). PÉREZ TEJEDA, M^a Pilar; OTRI-Universidad de Sevilla, Paseo de las Delicias, s/n - Pabellón de Brasil, 41013 Sevilla (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG,

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

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

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

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: NANOSYSTEM BASED ON MICRORNA FOR TREATING OBESITY

(54) Título: NANOSISTEMA BASADO EN MICROARN PARA EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD

(57) Abstract: The present invention relates to compositions, methods and uses, consisting of a functionalised miRNA-based nanosystem for treating obesity, weight loss and/or reduction of localised fat, which comprises miR-21 or other derived or equivalent compounds such as modified polynucleotides, synthetic mimetic and/or isomiR of miR-21; and a carrier which comprises an optimised nanoparticle for effectively binding oligonucleotides, forming an adequate nanosystem for in vivo transfection and, in particular, for the in vivo release of genes in fatty tissue.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a composiciones, métodos y usos, consistentes en un nanosistema funcionalizado y basado en miARN para el tratamiento de la obesidad, la pérdida de peso y/o la reducción de grasa localizada, que comprenden miR-21 u otros compuestos derivados o equivalentes como polinucleótidos modificados, mimético sintético y/o isomiR de miR-21; y un vehículo que comprende una nanopartícula optimizada para unir efectivamente oligonucleótidos, conformando un nanosistema adecuado para la transfección in vivo, y en particular para la liberación in vivo de genes en el tejido adiposo.



WO 2020/165482 A1

DESCRIPCIÓN

Nanosistema basado en MicroARN para el tratamiento de la obesidad.

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina de precisión, más concretamente al campo de la terapia génica y, particularmente, al campo terapéutico con microARN (miARN). La presente invención describe el uso terapéutico de un nanosistema que comprende la molécula microARN-21 (miR-21) o molécula equivalente (polinucleótidos modificados derivados de ella, mimética, isomiR) y un vehículo basado en nanopartículas, frente a la obesidad y enfermedades
10 relacionadas con la pérdida de peso y/o reducción de grasa.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 La obesidad se reconoce en la actualidad como una enfermedad crónica causada, desde un punto de vista general, por un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas. La prevalencia de esta enfermedad se ha incrementado drásticamente en las últimas décadas con una tendencia claramente ascendente en un futuro a corto y largo plazo, tanto que hoy día se está considerando como uno de los problemas de salud más graves en nuestra sociedad. El aumento de las comorbilidades (enfermedades crónicas simultáneas) relacionadas con la
20 obesidad ha impulsado la creciente conciencia de la comunidad médica sobre la obesidad como una enfermedad con implicaciones que ponen en peligro la vida. Estos riesgos asociados para la salud incluyen enfermedades cardíacas, derrames cerebrales, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, apnea del sueño, osteoartritis, enfermedades de la vesícula, depresión y ciertas formas de cáncer (por ejemplo: de endometrio, senos, próstata y colón).

25 El nivel general de necesidades no satisfechas en el mercado de medicamentos para la obesidad es muy alto, con ineficiencias en todos los niveles en la relación pagador-prescriptor-paciente, lo que representa una buena oportunidad para que las industrias farmacéuticas y de dispositivos médicos brinden soluciones. La gama actual de intervenciones farmacológicas se ve afectada
30 por una escasez de opciones, y los medicamentos disponibles ofrecen solo una eficacia modesta y tienen perfiles de efectos secundarios problemáticos. Las pocas opciones de terapia son Xenical (orlistat), que es el único agente farmacológico aprobado en los siete mercados principales, Canadá y Brasil, junto con fentermina, Qsymia y Belviq, que están disponibles únicamente en los EE. UU. Ha habido una grave escasez de terapias novedosas, ya que las
35 compañías farmacéuticas desconfían de los desafíos a que se enfrentan para lograr la aprobación regulatoria. En países distintos de los Estados Unidos, los médicos solo tienen Xenical. Más comúnmente, recurren a medicamentos indicados para otras afecciones lo cual no asegura un mínimo de efectividad ni de seguridad para los pacientes, provocando efectos secundarios innecesarios de ese producto. Este mercado está muy desatendido y necesita
40 medicamentos y dispositivos innovadores para llenar el vacío.

El tratamiento de la obesidad plantea muchas dificultades en la práctica clínica diaria debido a la elevadísima tasa de fracasos a los que da lugar. Aunque inicialmente se consiguen pérdidas de peso, a medio y largo plazo los pacientes recuperan el peso perdido. La mayoría de las estrategias existentes para combatir la obesidad se basan en el establecimiento de un balance energético negativo, disminuyendo la ingesta y/o reducción de la absorción energética. Sin embargo, factores genéticos, metabólicos y neuroendocrinos parecen influir en la patogenia de la obesidad y hacen que perder peso sea un proceso mucho más complejo.

Múltiples sistemas fisiológicos están involucrados en la regulación del peso corporal y la homeostasis de la energía y estos sistemas están interrelacionados a través de múltiples mecanismos complejos de retroalimentación. Aunque esta complejidad da origen a una multiplicidad de dianas terapéuticas tratables con terapia farmacológica, la inter-regulación también hace que el desarrollo de un tratamiento farmacológico efectivo de la obesidad y el sobrepeso sea difícil y requiera mucho tiempo de investigación.

Además, una vez que se descubre un agente farmacológico generalmente efectivo para el tratamiento de la obesidad y/o el sobrepeso, las diferencias genéticas y/o fisiológicas entre los individuos puede dar origen a grandes variaciones en la eficacia dentro de una población de pacientes; es decir, existe una tendencia a que las subpoblaciones de pacientes respondan o no a un agente terapéutico en base a la fisiología del individuo.

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de esta patología, es evidente que el conocimiento actual no es suficiente para paliar esta epidemia y hay una necesidad imperante de investigar nuevas terapias para combatirla y/o prevenirla. Las estrategias actuales contra la obesidad apuntan a restringir la absorción de energía, pero, aun así, el tratamiento de la obesidad está lejos de ser satisfactorio.

Sería valioso disponer de un nuevo enfoque terapéutico que actuase sobre un mecanismo celular general, quizás a nivel génico, que fuese compartido dentro de uno o varios grupos celulares que cumplan un papel crucial, como los adipocitos, de manera que fuera común independientemente del individuo y simplificase así, la posibilidad de obtener un tratamiento efectivo.

Browning:

Hasta finales de los años ochenta, el tejido adiposo se había considerado un simple órgano de almacenamiento, sin embargo, la evidencia estableció el tejido adiposo como un órgano endocrino que secreta muchas hormonas y citoquinas que pueden influir en el metabolismo sistémico. Además, se ha establecido la existencia de distintos depósitos adiposos que desempeñan papeles específicos. El principal tejido graso es el blanco (WAT), que

principalmente almacena energía y aumenta en la obesidad, por otro lado, está el tejido “pardo o marrón” (BAT), que regula la temperatura mediante la producción de calor por un mecanismo denominado termogénesis que aumenta el consumo de energía. Un tercer tipo, surge cuando adipocitos marrones aparecen en los sitios anatómicamente característicos del WAT, en un proceso denominado “pardeamiento o *browning*” del WAT, en adelante simplemente *browning*, de manera que estos adipocitos marrones surgidos en WAT surgen de células precursoras diferentes de las de los adipocitos marrones clásicos y están más cerca del linaje de los adipocitos blancos, y a menudo se llaman “inducibles, beige o brite”. Las grasas marrón y beige se han considerado como un objetivo para combatir la obesidad.

Morfológicamente el WAT forma adipocitos uniloculares, que contienen una única gota o vacuola de lípidos almacenando el exceso de energía en forma de triglicéridos y se encuentra ampliamente distribuido en la mayor parte de los órganos como el tejido adiposo subcutáneo (SAT).

Por otro lado, el BAT forma adipocitos multiloculares, compuesto por pequeñas gotas de lípidos y un alto número de mitocondrias. Además, es un tejido altamente vascularizado y densamente innervado por el sistema nervioso simpático, que se caracteriza por producir un alto nivel de expresión de la proteína 1 desacopladora (UCP1) en la membrana interna de las mitocondrias. El BAT se localiza principalmente en los depósitos grasos interescapulares (Int SAT), supraclaviculares, suprarrenales, pericardiales, para-aórticos, alrededor del páncreas, inguinales (ISAT), riñones y tráquea.

En los adipocitos marrones, UCP1 juega un papel crítico para permitir que los electrones se liberen en lugar de almacenarse, lo que origina la liberación de calor. Los adipocitos marrones pueden disipar la energía química almacenada como triglicéridos canalizando ácidos grasos en la oxidación β cuando se activan. UCP1 es capaz de desacoplar el transporte de electrones de la producción de trifosfato de adenosina (ATP) y produce calor en los adipocitos marrones.

El tejido adiposo beige es un tejido similar al tejido adiposo marrón formado por adipocitos multiloculares, con varias gotas lipídicas, alto contenido mitocondrial y con la expresión de varios genes específicos al tejido adiposo marrón (UCP1, Cidea). Bajo condiciones basales, los adipocitos beige tienen baja actividad termogénica y menor expresión de UCP1 en comparación con los adipocitos marrones.

Es conocido, que el *browning* ocurre después de un estímulo termogénico como la exposición prolongada al frío, o puede ser mimetizado con un tratamiento crónico con activadores de los receptores β -3 adrenérgicos.

Los adipocitos beige expresan además de los genes termorreguladores, como UCP-1, otros genes marcadores de la superficie celular, tales como la CD137 y la proteína de transmembrana 26 (Tmem 26). Estudios recientes revelaron que la actividad del tejido adiposo beige esta negativamente asociada con el índice de masa corporal y/o la grasa corporal. Otros hallazgos mostraron que la estimulación de la actividad del tejido adiposo marrón y beige mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Estos datos sugieren que la inducción del proceso del *browning* y/o reclutamiento del tejido adiposo marrón en sujetos humanos puede ser una diana terapéutica contra la obesidad y la resistencia a la insulina. Otros estudios, mostraron que los ratones que tienen menos tejido adiposo marrón (mediante ingeniería genética) o que tienen un UCP 1 deficiente son más susceptibles de ganar peso y desarrollar la obesidad en comparación con ratones normales.

Hasta este punto, el *browning* está bien definido, sin embargo, seguimos sin disponer de compuestos que nos permita inducir de forma efectiva la producción de grasa beige en WAT, por consiguiente, no existen en el mercado tratamientos efectivos contra la obesidad basada en la estrategia de aumentar la cantidad y/o actividad de la grasa beige.

MicroARNs:

Es conocido en el estado de la técnica que en todos los procesos celulares importantes intervienen los microARNs, regulando la expresión génica a nivel postranscripcional. Los miARNs son bien conocidos actualmente como una clase de macromoléculas biológicas que consiste en pequeñas moléculas de ARN no codificante de aproximadamente 22 nucleótidos, que se producen naturalmente y que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional en eucariotas y por tanto participan en una amplia gama de procesos biológicos. Su principal función es regular la expresión de genes y están presentes en todas las células humanas. Actualmente se conoce la importante contribución de los miARN a la organización y puesta a punto del programa regulatorio para la expresión de genes y cómo, si estas moléculas están sobre-expresadas o sub-expresadas, pueden alterar esta regulación y provocar enfermedades. Varios estudios muestran a diversos miARNs desempeñando funciones vitales en el control de la homeostasis de la glucosa, en las vías de la insulina en el desarrollo y mantenimiento de los islotes pancreáticos etc. Otros estudios muestran que miARNs concretos intervienen durante la diferenciación y maduración del adipocito contribuyendo así en el desarrollo y/o control de la obesidad y también interviniendo en el desarrollo de resistencia a la insulina. Diversos estudios mostraron que la expresión de los miARN en preadipocitos está alterada durante el desarrollo de las células grasas y la obesidad.

Sin embargo, son necesarios estudios específicos enfocados en la comprensión del papel de los miARN en la proliferación y la diferenciación de los adipocitos durante el desarrollo de las células grasas, así como en la regulación transcripcional para regular la homeostasis metabólica, lo cual

permita identificar nuevas dianas terapéuticas contra la obesidad y, por tanto, contra sus enfermedades metabólicas asociadas.

Por tanto, en los últimos años, los miARN han surgido como un reactivo terapéutico capaz de actuar a nivel regulatorio postranscripcional; y con un enfoque diferente a los medicamentos empleados en la actualidad para enfermedades como la obesidad y/o el sobrepeso. Sin embargo, el uso de este tipo de reactivos terapéuticos plantea nuevos problemas técnicos que deben ser abordados para que se materialicen como una alternativa real y mejorada que den respuesta a los principales retos en el ámbito de la salud humana. Estos problemas técnicos serían:

- 10 - Identificar miARNs con actividad biológica efectiva,
- Encontrar composiciones de dosificación que aseguren la estabilidad funcional de estas macromoléculas.
- Idear métodos de entrega para transferir los miARNs al tejido deseado, evitando acumulación y efectos secundarios en otros tejidos.
- 15 - Diseñar composiciones que aseguren una alta transfección al interior celular.

Un gran desafío sería desarrollar métodos de entrega para transferir los miARN o sus inhibidores al tejido deseado, sin incurrir en bioacumulación en los tejidos que produjeran toxicidad y efectos secundarios indeseados. En este aspecto, algunos tejidos metabólicos pueden ser más accesibles que otros. El sistema de administración para administrar fármacos y lograr efectos terapéuticos es actualmente un campo interesante en el tratamiento de muchas enfermedades, como el cáncer.

Sin embargo, el desarrollo de terapias para la administración de los microARNs sigue siendo un gran reto a cumplir.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han **desarrollado composiciones, métodos y usos**, consistentes en un **nanosistema funcionalizado** y basado en **miARN** para el **tratamiento de la obesidad**, la pérdida de peso y/o la reducción de grasa localizada, que comprenden miR-21 u otros compuestos derivados o equivalentes como polinucleótidos modificados, mimético sintético y/o isomiR de miR-21; y un vehículo que comprende una nanopartícula optimizada para unir efectivamente oligonucleótidos, conformando un nanosistema adecuado para la transfección *in vivo*, y en particular para la liberación *in vivo* de genes en el tejido adiposo.

Como parte de la divulgación, los inventores han demostrado experimentalmente que el **nanosistema funcionalizado basado en miR-21** promueve selectivamente el gasto de energía mediante la inducción de *browning*, según se puede comprobar en el ejemplo 4. Con ello, se ha evidenciado que este miARN y equivalentes son de gran interés como agentes terapéuticos para

tratamientos anti-obesidad y que su inclusión en un vehículo optimizado con nanopartículas, formando nanosistemas de alta eficiencia, incrementa la capacidad corporal de metabolizar grandes cantidades de glucosa y lípidos medida por la grasa marrón y beige en proporción a su masa de tejido. Además, los experimentos realizados también muestran que los nanosistemas desarrollados potencian la capacidad de miR-21 de producir efectos positivos para alteraciones metabólicas asociadas con la acumulación de tejido adiposo blanco disfuncional. Esta solución presenta la ventaja de que miR-21 puede promover selectivamente el gasto de energía mediante la **inducción del *browning*** de tejido adiposo blanco; convirtiendo por tanto la grasa blanca a grasa beige e induciendo al cuerpo a metabolizar grandes cantidades de glucosa y lípidos en proporción a su masa de tejido adiposo, de manera eficaz e irreversible. Asimismo, como es sabido que la disfunción del tejido adiposo asociada a la obesidad conduce a la aparición de alteraciones metabólicas, el nanosistema diseñado por los inventores es de interés terapéutico para el tratamiento de enfermedades metabólicas como: Amiloidosis, Enfermedad cardiometabólica, Deshidratación, Diabetes (Tipo 1, tipo 2, Úlceras del pie diabético, Edema macular diabético, Neuropatía diabética, Retinopatía diabética, Nefropatía diabética, Diabetes gestacional, Dislipidemia, Hiperlipidemia), Intolerancia a la glucosa, Hipercolesterolemia, Hiperglucemia, Hiperinsulinemia o resistencia a la insulina, Hipercalemia, Hipoglucemia, Hipotasemia, Lipodistrofia (Lipoatrofia), Síndrome metabólico, Obesidad, sobrepeso, Osteopenia, Osteoporosis (incluida Osteoporosis postmenopáusicas), Fenilcetonuria (PKU), Hipersecreción de ACTH hipofisaria (síndrome de Cushing) y Enfermedad de Pompe.

Por tanto, **un primer aspecto** de la invención se refiere a un nanosistema funcionalizado para el transporte de moléculas biológicamente activas, de ahora en adelante nanosistema de la invención, que comprende:

- 25 - Una molécula biológicamente activa que se selecciona de entre la molécula de microARN miR-21, mimético, isomiR, oligonucleótido con más de un 75% de similitud de secuencia, compuestos dirigidos a aumentar la transcripción o actividad de miR-21 o una fuente de la misma, o cualquiera de sus combinaciones.
- 30 - Un vehículo, adecuado para el transporte de moléculas biológicamente activas que comprende una nanopartícula, y una molécula transportadora, capaz de ligar oligonucleótidos.

La expresión "molécula biológicamente activa" tiene un sentido amplio y comprende moléculas tales como fármacos de alto, o más preferiblemente, de bajo peso molecular, polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos, así como combinaciones de las mismas. En una variante de la invención la molécula biológicamente activa tiene como función prevenir, paliar, curar o diagnosticar enfermedades. En otra variante de la invención la molécula biológicamente activa tiene una función estética, cosmética y/o veterinaria.

Del mismo modo, en esta memoria la expresión "molécula biológicamente activa" incluye también los términos "principio activo", "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo", "agente terapéutico", "fármaco" o "ingrediente farmacéuticamente activo", es decir, significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, alivio, prevención o tratamiento de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. Incluye también a los "cosméticos" o "estéticos". El término también incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

En esta memoria se entiende por "miméticos de miARN" a moléculas diseñadas para imitar la función de un miARN concreto, de manera que contienen fragmentos de ARN de tipo miARN de doble cadena no naturales o artificiales. Estos fragmentos de ARN se construyen para contener un motivo de secuencia que le confiere una funcionalidad similar a la del miARN al que imitan. En esta memoria nos referimos a estos miméticos como aquellos miARN que contienen un porcentaje de identidad de la región funcional de un miARN concreto de al menos 70% o más preferiblemente de al menos 80% o más preferiblemente del 90%. Una vez que estos fragmentos de ARN se introducen en las células, los miméticos de miARN cumplen una función equivalente al miARN imitado. El resultado es la represión o activación postranscripcional de genes concretos, lo cual permite enfoques concretos para estudiar la función de genes de utilidad en tratamiento de enfermedades.

El término "vehículo", se refiere a un elemento que une y facilita el transporte de moléculas biológicamente activas desde un sentido amplio. Puede comprender más de un elemento en su estructura y al menos uno de estos elementos tienen la propiedad de unir con facilidad a la molécula biológicamente activa, preferiblemente une con facilidad oligonucleótidos, ésta se denomina "molécula transportadora" y pueden ser, pero sin limitarse, un polipéptido, proteína, lípido o molécula con al menos una cadena polimérica.

Del mismo modo, en esta memoria el término "vehículo" incluye también cualquier compuesto que combinada con una molécula biológicamente activa mejora la estabilidad funcional de estas, le confieren mayor capacidad para alcanzar el tejido deseado donde la molécula biológicamente activa proporciona potencialmente una actividad farmacológica o le proporcione una alta transfección al interior celular.

Preferiblemente, la molécula biológicamente activa y la nanopartícula se unen a la molécula transportadora, pero sin limitarse, de forma independiente. Esta unión podrá ser indistintamente de forma covalente o no covalente. Preferiblemente será una unión no covalente, que de manera

general sucede mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, adsorción superficial, encapsulación o intercalado en el interior de la misma.

5 El término "nanopartícula", se refiere a cualquier partícula entre 1-20 nm que pueden ser de cualquier nanomaterial conocido, como por ejemplo, pero sin limitarse, nanopartículas a base de carbón, sílice, quitosanos, metales (oro, plata, hierro u óxidos de los mismos), liposomas, niosomas, dedrímeros, o materiales compuestos de los anteriormente citados.

10 En otra realización preferida, el nanosistema está compuesto por una nanopartícula que tiene núcleo metálico de carácter catiónico de oro, que permite que la composición no se acumule en los tejidos y no aporte toxicidad a un organismo humano o animal. Además, las nanopartículas de oro le confieren al nanosistema mayor estabilidad que otros metales como la plata, por su menor tendencia a la agregación, lo cual permite una alta absorción celular. Preferiblemente, el tamaño el tamaño medio de nanopartícula está comprendido entre 3 y 7 nanómetros.

15 En una realización preferible adicional, el nanosistema, según cualquiera de las realizaciones anteriores, está compuesto por una molécula transportadora que sea un tensioactivo catiónico. Mas preferiblemente el tensioactivo catiónico es un tensioactivo de tipo gémuni, que aporta una mayor capacidad para complejar oligonucleotidos y para el que se ha constatado una gran
20 afinidad por el tejido adiposo. Los experimentos realizados por los inventores, que se muestran en el ejemplo 2, muestran que los tensioactivo gémuni 16-3-16 y 16-Ph-16 poseen unas características especialmente destacables para complejar oligonucleótidos, lo cual permite un nanosistema más compacto que proporciona una mejor transfección del nanosistema al interior celular y que tienen alta afinidad por el tejido adiposo. Adicionalmente estos tensioactivos
25 aseguran una alta biodegradabilidad y biocompatibilidad que, paralelamente a su alta eficacia, aseguran que no se acumule en los tejidos y no aporte toxicidad a un organismo humano o animal.

30 En esta memoria el término "tensioactivo gémuni" se refiere a un grupo de surfactantes diméricos, con dos colas hidrofóbicas o apolares y dos grupos hidrofóbicos o polares con un espaciador que une los dos grupos polares de forma rígida o flexible, que de forma esquemática se representan como m-s-m (siendo "m" las colas hidrofóbicas y "s" el espaciador). Los grupos polares pueden presentar carga positiva (amonio) o negativa (fosfato, sulfato, carboxilato), mientras que los grupos polares no iónicos pueden ser poliéteres o azúcares. En su estructura puede incorporar
35 componentes peptídicos, glucídicos o, principalmente, lipídicos. La molécula espaciadora central puede estar hecha a medida de nuestras necesidades uniendo dos o más moléculas de interés. Para minimizar los problemas potenciales de toxicidad de estos compuestos, la estructura de las moléculas espaciadoras puede estar constituida por α -aminoácidos, carbohidratos, espermina, etc., los cuales además son biodegradables. Los grupos polares son principalmente amonios,
40 aunque podrán estar incluidos con estructuras más complejas, como aminoácidos.

Teniendo en cuenta las características anteriormente señaladas, la presente invención pretende combinar la mayor eficiencia que tienen las nanopartículas en cuanto a su absorción/eliminación en el interior celular, así como de protección de biomoléculas como el ARN frente a la degradación enzimática; con la mayor capacidad que presentan los tensioactivos gémmini catiónicos para inducir la compactación de las biomoléculas y su baja toxicidad; construyendo así, nuevos vectores más eficientes y de baja toxicidad. Sin embargo, no existen estudios hasta la fecha de síntesis de nanosistemas basados en dichos tensioactivos que acomplejen biomoléculas como ADN o ARN, de ahí la novedad del sistema sintetizado. Para llevar a cabo con éxito el proceso de síntesis, se prepararán en primer lugar, nanopartículas de oro funcionalizadas con los tensioactivos gémmini biodegradables, también llamados precursores 16-3-16 y 16-Ph-16.

Además, ya que estos tensioactivos han sido inicialmente diseñados para actuar como posibles detergentes son compuestos potencialmente afines al tejido graso donde las moléculas biológicamente activas son capaces de inducir el *browning* del tejido graso. Todo ello permite reducir considerablemente la cantidad de mi-ARN necesario para actuar en el tejido diana al tiempo que supone un dispositivo altamente selectivo evitando efectos adversos en tejidos no deseados. Por tanto, el nanosistema funcionalizado de la invención, consigue focalizar la actuación de la molécula biológicamente activa de mi-ARN, haciendo posible el control de la descarga de material en el tejido diana, dotándolo de las propiedades idóneas para su empleo en el tratamiento de la obesidad.

En una realización particular del primer aspecto de la invención, el tamaño medio de la nanopartícula en un nanosistema que estuviera compuesto por tensioactivo gémmini 16-3-16 el tamaño medio de las nanopartículas estaría comprendido entre 3 y 4 nanómetros; mientras que para un nanosistema que estuviera compuesto por tensioactivo gémmini 16-ph-16 el tamaño medio de las nanopartículas estaría comprendido entre 5 y 6 nanómetros.

En otra realización particular, el nanosistema según cualquiera de las realizaciones anteriores tiene un tamaño medio comprendido entre 30 y 80 nanómetros. Mas preferiblemente en un nanosistema que estuviera compuesto por tensioactivo gémmini 16-3-16 el tamaño medio de las nanopartículas estaría comprendido entre 40 y 60 nanómetros; mientras que para un nanosistema que estuviera compuesto por tensioactivo gémmini 16-ph-16 el tamaño medio de las nanopartículas estaría comprendido entre 50 y 70 nanómetros.

De acuerdo con las realizaciones particulares anteriores, los autores de la presente invención han comprobado la bondad del nanosistema en la eliminación corporal posterior a la administración en un cuerpo del hombre u otros animales, una vez que la molécula biológicamente activa realizado su función. Esta capacidad está directamente relacionada con el

reducido tamaño del núcleo de oro del nanosistema y su elevada carga positiva que confiere estabilidad adicional al sistema.

5 Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende al menos un nanosistema de la invención, de ahora en adelante composición de la invención. Esta composición será, preferiblemente, una composición farmacéutica.

10 Un **tercer aspecto** de la invención se refiere al nanosistema de la invención, o a la composición de la invención para su uso como medicamento.

15 Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al nanosistema de la invención, o a la composición de la invención para prevenir, retrasar, aliviar, revertir, curar y/o tratar una enfermedad metabólica. Más preferiblemente, la enfermedad metabólica se selecciona de la lista que consiste en: amiloidosis, enfermedad cardiometabólica, deshidratación, diabetes (tipo 1, tipo 2, úlceras del pie diabético, edema macular diabético, neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, diabetes gestacional, dislipidemia, hiperlipidemia), intolerante a la glucosa, hipercolesterolemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia o resistencia a la insulina, hipercalemia, hipoglucemia, hipopotasemia, lipodistrofia (lipoatrofia), síndrome metabólico, obesidad, sobrepeso, osteopenia, osteoporosis (incluida osteoporosis postmenopáusica), fenilcetonuria (PKU), hipersecreción de ACTH hipofisaria (síndrome de Cushing) y Enfermedad de Pompe.

20 En una realización preferida, la enfermedad metabólica se selecciona de entre la obesidad, el sobrepeso y la hiperinsulinemia.

25 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al nanosistema de la invención o la composición de la invención para prevenir, retrasar, aliviar, revertir, curar y/o tratar una enfermedad asociada con aumento de peso corporal. Más preferiblemente la enfermedad asociada con aumento de peso corporal se selecciona de la lista que consiste en (Hipotiroidismo, Síndrome de Cushing, Hipogonadismo, Lesiones Hipotalámicas, Deficiencia de la hormona de crecimiento, Síndromes Prader–Willi, Bardet–Biedl, Cohen, MOMO, Ansiedad y Depresión; o cualquiera de sus combinaciones.

30 Un **sexto aspecto** de la invención proporciona un kit de partes, de ahora en adelante kit de partes de la invención, que comprende entre sus componentes (a) el nanosistema de la invención, o la composición de la invención; y un medicamento que se selecciona de entre:

(b1) un medicamento asociado a aumento de peso que se selecciona de la lista que consiste en: Atenolol, Carbamazepina, Citalopram, Clozapina, Mesilato de Doxazosina, Doxepin, Escitalopram, Fluvoxamina, Gabapentina, Ácido gamma-hidroxibutírico, Leuprolide, Litio,

Metoprolol, Mirtazapina, Nateglinida, Nortriptilina, Olanzapina, Paroxetina, Pioglitazona, Propranolol, Quetiapina, Repaglinida, Risperidona, Terazosina, Valproato y Fenitoína; o

(b2) un medicamento aprobado en alguna agencia nacional contra la obesidad que se selecciona de la lista que consiste en: acetato de megestrol, benzfetamina, cafeína, catinona, cetilistat, clobenzorex, clorhidrato de clorfentermina, clorhidrato de dexfenfluramina, clorhidrato de dietilpropion, clorhidrato de fenfluramina, clorhidrato de fenmetrazina, clorhidrato de fentermina, clorhidrato de lorcaserina, clorhidrato de mefenorex, clorhidrato de sibutramina, dronabinol, fendimetrazina, fenfluramina, fenilpropanolamina, fenproporex, fentermina, fluoxetina, levocarnitina, levotiroxina sódica, mazindol, metanfetamina, metilcelulosa, orlistat, phendimetrazina, rimonabant, Saxenda, sibutramina, sulfato de anfetamina, tartrato de fendimetrazina, "clorhidrato de bupropión + naltrexona", "clorhidrato de fentermina + topiramato", "levocarnitina + sibutramina" y "metformina + sibutramina"; o

(b3) un medicamento en fase clínica de desarrollo contra la obesidad que se selecciona de la lista que consiste en: Adipotida, AKR-001, AM-833, AMG-598, Beloranib, BI-456906, biotina, clorhidrato de betahistina, clorhidrato de lorcaserina, clorhidrato de lorcaserina, efpeglenatide, G-3215, GMA-102, GT-001, GTS-21, HM-12525A, HM-15211, HSG-4112, LLF-580, MEDI-0382, MET-2, Miricorilant, NGM-313, NGM-386, NN-9277, NN-9423, NN-9536, NNC-01651562, NNC-01651875, Novdb-2, NovOB, pegapamodutide, REGN-4461, RZL-12, S-237648, S-237648, SAR-425899, SCO-792, setmelanotide, setmelanotide, tesofensina, TP-0101, VP-01, ZGN-1061, ZP-4982, (acarbosea + orlistat), (leucina + citrato de sildenafil), (leucina + clorhidrato de metformina + citrato de sildenafil) y (metoprolol + tesofensina).

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al kit de partes de la invención para prevenir, retrasar, aliviar, revertir, curar y/o tratar una enfermedad metabólica. Más preferiblemente, la enfermedad metabólica se selecciona de la lista que consiste en: amiloidosis, enfermedad cardiometabólica, deshidratación, diabetes (tipo 1, tipo 2, úlceras del pie diabético, edema macular diabético, neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, diabetes gestacional, dislipidemia, hiperlipidemia), intolerante a la glucosa, hipercolesterolemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia o resistencia a la insulina, hipercalemia, hipoglucemia, hipopotasemia, lipodistrofia (lipoatrofia), síndrome metabólico, obesidad, sobrepeso, osteopenia, osteoporosis (incluida osteoporosis postmenopáusica), fenilcetonuria (PKU), hipersecreción de ACTH hipofisaria (síndrome de Cushing) y Enfermedad de Pompe.

En una realización preferida, la enfermedad metabólica se selecciona de entre la obesidad, el sobrepeso y la hiperinsulinemia.

Un **último aspecto** se refiere a un procedimiento para sintetizar el nanosistema de la invención, de ahora en adelante procedimiento de la invención, que comprende:

(a) La adición de tensioactivo gémuni como agente estabilizante en una disolución de hidrógeno tetracloroaurato tetrahidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),

(b) La reducción de hidrógeno tetracloroaurato tetrahidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) mediante la adición controlada de un agente reductor, y

5 (c) La complejación con la molécula biológicamente activa, mediante la adición controlada de la molécula de microARN miR-21, mimético, isomiR, oligonucleótido con más de un 75% de similitud de secuencia, compuestos dirigidos a aumentar la transcripción o actividad de miR-21 o una fuente de la misma, o cualquiera de sus combinaciones; manteniéndose unas condiciones de exceso del polímero y agitación."

10 Preferiblemente, la reducción de hidrógeno tetracloroaurato tetrahidratado que se realiza en el paso (b) del procedimiento de la invención se realiza mediante el uso de una disolución de borohidruro sódico (NaBH_4) como agente reductor. Mas preferiblemente el NaBH_4 en una concentración conocida entre 0.1 y 0.2M; y, aun mas preferiblemente con una dosificación

15 fraccionada gota a gota.

En otra realización preferida, entre el paso (a) y el paso (b) del procedimiento de la invención se realiza un paso de agitación vigorosa. Preferiblemente este paso se realiza en ausencia de luz. Más preferiblemente, esta agitación vigorosa se produce durante al menos 3 minutos, aún más

20 preferiblemente durante al menos 4 minutos, y mucho más preferiblemente durante al menos 5 minutos.

En otra realización preferida, entre el paso (b) y el paso (c) del procedimiento de la invención se realiza un paso de agitación. Preferiblemente este paso se realiza en ausencia de luz. Más

25 preferiblemente, esta agitación se produce durante al menos 10 minutos, aún más preferiblemente durante al menos 13 minutos, y mucho más preferiblemente durante al menos 15 minutos.

En otra realización preferida, tras el paso (c) del procedimiento de la invención se realiza un paso

30 de agitación suave. Preferiblemente este paso se realiza durante al menos 20 minutos, más preferiblemente durante al menos 25 minutos, y aún más preferiblemente durante al menos 30 minutos

En una realización preferida adicional, la concentración de tensioactivo gémuni, [T], de los pasos

35 (a) y (b) del procedimiento de la invención será de una concentración concreta para obtener un nanosistema de un tamaño y una estabilidad óptimos. Esta concentración, [T], estará directamente relacionada con la concentración micelar crítica del tensioactivo, cmc, siendo la relación entre ellas equivalente a $[T]/\text{cmc}$ menor de 20 y mayor de 1. Preferiblemente, esta relación será $[T]/\text{cmc}$ menor de 7 y mayor de 3. Más preferiblemente, esta relación será $[T]/\text{cmc}$

40 será igual a 5.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Los signos numéricos relativos a los dibujos y colocados entre paréntesis en una reivindicación, son solamente para intentar aumentar la comprensión de la reivindicación, y no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la protección de la reivindicación. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **Fig. 1A.** Espectro de UV-vis para precursor Au@16-Ph-16.

Fig. 1B. Espectro de UV-vis para precursor Au@16-3-16.

20 **Fig. 1C.** Espectro de UV-vis para nanosistema funcionalizado Au@16-Ph-16/miR-21, R = 0.124.

Fig. 1D. Espectro de UV-vis para nanosistema funcionalizado Au@16-3-16/miR-21, R = 0.378.

Fig. 1E. Espectro de UV-vis para nanosistema funcionalizado Au@16-Ph-16/miR-21, R = 0.093.

25 **Fig. 1F.** Espectro de UV-vis para nanosistema funcionalizado Au@16-3-16/miR-21, R = 0.283.

Fig. 1G. Espectro de UV-vis para nanosistema funcionalizado Au@16-Ph-16/miR-21, R = 0.062.

30 **Fig. 1H.** Espectro de UV-vis para nanosistema funcionalizado Au@16-3-16/miR-21, R = 0.189.

Fig. 2. Imágenes TEM correspondientes a la síntesis de las nanopartícula recubiertas por tensioactivo gémini catiónico: (A) Au@16-Ph-16 y (B) Au@16-3-16.

35 **Fig. 3.** Imágenes de topografía de AFM de Au@16-3-16/miR-21 adsorbidas sobre mica modificada con APTES, a diferentes relaciones de R. (A-B) R = 0.378; (C-D) R = 0.283; (E-F) R = 0.189. Las Figuras B, D y F corresponden al análisis transversal de alturas a lo largo de la línea señalada correspondientes a las imágenes A, C y E, respectivamente.

40 **Fig. 4.** Imágenes de topografía de AFM de Au@16-Ph-16/miR-21 adsorbidas sobre mica modificada con APTES, a diferentes relaciones de R. (A-B) R = 0.124; (C-D) R = 0.093; (E-F) R

= 0.062. Las Figuras B, D y F corresponden al análisis transversal de alturas a lo largo de la línea señalada correspondientes a las imágenes A, C y E, respectivamente.

Fig. 5A: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16 in situ.

5

Fig. 5B: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16 a las 24 horas.

Fig. 5C: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16 a las 48 horas.

10 **Fig. 5D:** Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16 a 1 semana.

Fig. 5E: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16 a 2 semanas.

Fig. 5F: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16 a 1 mes.

15

Fig. 5G: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.124, in situ.

Fig. 5H: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.124, a las 24 horas.

20

Fig. 5I: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.124, a las 48 horas.

Fig. 5J: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.124, a 1 semana.

25

Fig. 5K: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.124, a 2 semanas.

Fig. 5L: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.124, a 1 mes.

30

Fig. 5M: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.093, in situ.

Fig. 5N: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.093, a las 24 horas.

35

Fig. 5O: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.093, a las 48 horas.

Fig. 5P: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.093, a 1 semana.

40

Fig. 5Q: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.093, a 2 semanas.

Fig. 5R: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.093, a 1 mes.

5

Fig. 5S: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.063, in situ.

Fig. 5T: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.063, a las 24 horas.

10

Fig. 5U: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.063, a las 48 horas.

Fig. 5V: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.063, a 1 semana.

15

Fig. 5W: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.063, a 2 semanas.

Fig. 5X: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-pH-16/miR-21, R = 0.063, a 1 mes.

20

Fig. 6A: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16 in situ.

Fig. 6B: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16 a las 24 horas.

Fig. 6C: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16 a las 48 horas.

Fig. 6D: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16 a 1 semana.

Fig. 6E: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16 a 2 semanas.

30

Fig. 6F: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16 a 1 mes.

Fig. 6G: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.378, in situ.

Fig. 6H: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.378, a las 24 horas.

Fig. 6I: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.378, a las 48 horas.

Fig. 6J: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.378, a 1 semana.

40

Fig. 6K: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.378, a 2 semanas.

Fig. 6L: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.378, a 1 mes.

5

Fig. 6M: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.283, in situ.

Fig. 6N: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.283, a las 24 horas.

10

Fig. 6O: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.283, a las 48 horas.

Fig. 6P: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.283, a 1 semana.

15

Fig. 6Q: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.283, a 2 semanas.

Fig. 6R: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.283, a 1 mes.

20

Fig. 6S: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.189, in situ.

Fig. 6T: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.189, a las 24 horas.

Fig. 6U: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.189, a las 48 horas.

25

Fig. 6V: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.189, a 1 semana.

Fig. 6W: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.189, a 2 semanas.

30

Fig. 6X: Formación y estabilidad del nanosistema Au@16-3-16/miR-21, R = 0.189, a 1 mes.

Fig. 7: Imágenes microscópicas representativas de todos los tejidos hígado, pulmón, cerebro, bazo y riñón; correspondientes a tinción por hematoxilina eosina. (A) Agua, (B) Au@16-ph-16 (Sola) (C) Au@16-ph-16 miR21, (D) Au@16-3-16 (Sola), (E) Au@16-3-16 miR21.

35

Fig. 8: Imágenes microscópicas representativas de las secciones histológicas de las grasas blancas: visceral (VAT) y subcutáneas (Inguinal). Tinción hematoxilina-eosina.

Fig. 9: Imágenes CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) de diferentes tejidos de ratones después de 48 horas de tratamiento con Au@gémini/miR-21 ($R = 0,30$) y tejidos de control no tratados. (A) PBS en el tejido de control; (B) Au@16-3-16/miR-21 en el tejido de control; (C) Au@16-Ph-16/miR-21 en el tejido de control; (D, G) Hígados obtenidos de (D) ratones Au@16-3-16/miR-21 y (G) Au@16-Ph-16/miR-21; (E, H) Bazos obtenidos de (E) Ratones tratados con Au@16-3-16/miR-21 y (H) Au@16-Ph-16/miR, y (F, I) Grasa SAT obtenida de (F) Au@16-3-16/miR-21 y (I) ratones tratados con Au@16-Ph-16/miR.

Fig. 10. $* < 0,05$ $** < 0,01$ 45% HFD Au@16-ph-16 vs 45% HFD mimético miR-21 0,2ug. $+ < 0,05$ $++ < 0,01$ 45% HFD Au@16-ph-16 vs 45% HFD mimético miR-21 0,3ug. & cambia en comparación con el valor basal (0) esto quiere decir que los ratones del grupo control aumentan de peso de manera significativa con la dieta HFD en comparación con el valor basal 0 que es el peso inicial de cada ratón.

Fig. 11. Imágenes microscópicas representativas de las secciones histológicas de la grasa blanca interscapular, grasa blanca visceral, grasa subcutánea blanca inguinal y grasa marrón interscapular; con tinción hematoxilina-eosina.

Fig. 12. Análisis de la expresión génica con ARN mensajero extraído de los tejidos adiposos subcutáneos inguinal (ISAT) e interscapular (Int SAT) y también del tejido adiposo marrón interscapular de ratones tratados *in vivo* con el nanosistema Au@16-Ph-16-miR-21 y un control con Au@16-Ph-16 sin miARN. La expresión génica de los genes Ucp1, Tmem26, Prdm16, Pgc1- α y Vegf-A se ha cuantificado mediante PCR a tiempo real.

Fig. 13. Análisis de expresión proteica mediante imágenes de inmunohistoquímica del tejido adiposo marrón, tejido adiposo blanco subcutáneo inguinal y tejido adiposo blanco visceral de ratones tratados *in vivo* con el nanosistema Au@16-Ph-16-miR-21 y un control con Au@16-Ph-16 sin miARN. Se emplearon anticuerpos específicos de la proteína UCP-1 (marcado en Rojo), de la proteína TMEM26 (marcado en verde), del contenido de ADN con 4',6-diamino-2-fenilindo o DAPI (marcado en azul) y un marcaje que contiene los tres anteriores, denominado MERGE.

Fig. 14. Imágenes de micrografía electrónica de abundancia mitocondrial en grasa blanca subcutánea (inguinal) de ratones control y en ratones tratado con el nanosistema Au@16-pH-16-miR-21.

35

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN/EJEMPLOS

Ejemplo 1. Caracterización y comprobación de la estabilidad del nanosistema.

El proceso de síntesis de los nanosistemas parte de la síntesis previa de los tensioactivos géminis y emplea HAuCl_4 para aportar el contenido de oro de la nanopartícula. En primer lugar,

40

se tomaron 390 μL de una disolución acuosa de HAuCl_4 23 mM de concentración preparado en disolución acuosa, a lo que se añadieron 30 mL del tensioactivo gémuni 16-Ph-16 o 16-3-16 a la concentración de $4 \cdot 10^{-5}$ M y $1 \cdot 10^{-4}$ M, respectivamente. Dicha preparación se sometió a agitación continua y vigorosa durante 5 minutos en ausencia de luz, obteniéndose como resultado una disolución nítida amarilla brillante. Seguidamente, se añaden gota a gota 100 μL de una disolución acuosa de borohidruro sódico 0.4 M, manteniendo la mezcla bajo agitación moderada durante 15 minutos en la oscuridad. Durante este intervalo de tiempo la mezcla vira del amarillo a un color rojizo nítido. Como resultado se obtuvieron las nanopartículas de oro precursoras denominadas Au@16-Ph-16 y Au@16-3-16, en este ejemplo a las concentraciones de $5.6 \cdot 10^{-8}$ M and $1.7 \cdot 10^{-7}$ M, respectivamente.

Partiendo de la síntesis de los nanosistemas precursores se prepararon nanosistemas funcionalizados con la biomolécula mi-ARN en las distintas proporciones. La complejación con miR-21 se efectuó trabajando siempre en condiciones de exceso del polímero. Así, partiendo de una cantidad fija de nanosistema precursor, $C_{\text{Au@m-s-m}} = 5.6 \cdot 10^{-9}$ y $1.7 \cdot 10^{-8}$ M para Au@16-Ph-16 y Au@16-3-16, respectivamente, se añadieron cantidades variables del biopolímero, $C_{\text{miR-21}} = 4.5 \cdot 10^{-8}$ M, $6.0 \cdot 10^{-8}$ M, y $9.0 \cdot 10^{-8}$ M. Como resultado se obtuvieron las siguientes preparaciones correspondientes a las siguientes proporciones en relación de concentraciones analíticas, $R = C_{\text{Au@m-s-m}}/C_{\text{miR-21}}$ para cada sistema: $R = 0.124$, 0.093 y 0.063 para Au@16-Ph-16/miR-21; y $R = 0.378$, 0.283 y 0.189 para Au@16-3-16/miR-21. De esta forma, se obtuvieron complejos estables tipo Au@m-s-m/miR-21 por agitación continua, requiriéndose para la obtención de un volumen de preparado de 30 mL un total de 30 minutos de agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se espera 24 horas antes de la inyección a los individuos de experimentación siendo fundamental el acondicionamiento previo del nanosistema a 4°C de temperatura. Un cambio moderado hacia una tonalidad ligeramente púrpura es indicativo de la estabilización y formación del nanosistema funcionalizado con miR-21 resultante.

La estabilidad de las nanopartículas de oro recubiertas con tensioactivo (16-Ph-16@AuNPs y 16-3-16@AuNPs), así como las nanopartículas recubiertas con tensioactivo gémuni y miR-21 (miR-21/16-Ph-16@AuNPs and miR-21/16-3-16@AuNPs), fue evaluada mediante espectroscopía de UV-visible, siguiendo la forma y longitud de onda del máximo de la banda de plasmón superficial en función del tiempo.

Los espectros de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro CARY 500 SCAN UV-vis-NIR (Varian). Los datos se recolectaron cada 2 nm con una celda de vidrio estándar de 10 mm de espesor, y los espectros se registraron en el rango de longitud de onda de 800 a 400 nm. La resonancia de plasmón superficial exhibida por los nanosistemas se mostró como una banda de absorción fuerte en la región visible. La precisión de la longitud de onda y el ancho de banda espectral fueron de ± 0.3 nm y 0.5 nm, respectivamente.

40

Los espectros de absorción de cada muestra se midieron durante 30 minutos, en el peor de los casos, y la posición del máximo del plasmón de superficie se comprobó durante al menos un mes en condiciones de esterilidad, no encontrándose cambios apreciables en la posición original de la banda de plasmón de superficie, ni en la longitud de onda del máximo de absorción. Por tanto, no se observaron evidencias de agregación en ninguno de los nanosistemas estudiados.

Los experimentos se llevaron a cabo en disolución acuosa a una concentración de oro coloidal fija de $5.6 \cdot 10^{-9}$ M y $5.6 \cdot 10^{-8}$ M para los sistemas 16-Ph-16 y $1.7 \cdot 10^{-8}$ M y $1.7 \cdot 10^{-7}$ M para los correspondientes sistemas de nanopartículas de oro 16-3-16, respectivamente. Además, los espectros de los complejos de miR-21/16-Ph-16-AuNPs and miR-21/16-3-16-AuNPs se llevaron a cabo con diferentes relaciones molares (definida como $R = C_{\text{Au-gémini}}/C_{\text{miR-21}}$): $R = 0.124$, 0.093 y 0.063 para miR-21-16-Ph-16-AuNPs y $R = 0.378$, 0.283 y 0.189 para miR-21-16-3-16-AuNPs.

Los gráficos UV-visible que se muestran en las Fig. 1A-1H muestran que la posición del pico de plasmón (λ_{spr}) de los nanosistemas recubiertos con tensioactivos gémini (Au@16-3-16 y Au@16-Ph-16), es similar con un valor de alrededor de 519 nm. Según la correlación de H. Wolfgang, $\lambda_{\text{spr}} = 512 + 6.53 \cdot \exp(0.0216xd)$, donde d es el diámetro del núcleo de oro, a $\lambda_{\text{spr}} = 519$ nm corresponde a un AuNP de tamaño de núcleo de 3.2 nm, aproximadamente. Es interesante destacar que en las distintas preparaciones de Au@16-3-16/miR-21 no se observó ninguna modificación en la posición del máximo λ_{spr} , pero se observó un aumento en las intensidades de absorbancia con referencia al correspondiente precursor de Au@16-3-16, lo cual indica la formación efectiva de los complejos Au@16-3-16-miR-21 (véase Fig. 1A). Sin embargo, en el caso de los nanosistemas Au@16-Ph-16, se observa un desplazamiento de aproximadamente 2 nm en la posición del máximo de absorción ($\lambda_{\text{spr}} = 521$ nm) para las preparaciones correspondientes a $R = 0.124$ - 0.093 y de 10 nm ($\lambda_{\text{spr}} = 529$ nm) para la $R = 0.063$, todo ello junto con una disminución en la intensidad de absorbancia al ser modificados con miR-21 en sus diferentes proporciones (ver Fig. 1B). El aumento observado en las posiciones del máximo de longitud de onda sin modificación significativa en la banda de SPR demuestra que la formación de los complejos de tensioactivo gémini/miR-21 se realiza correctamente y no se han producido procesos de agregación significativos.

Por otra parte, los diferentes nanosistemas fueron caracterizados para determinar tanto la morfología como el tamaño y carga del complejo resultante empleando diferentes técnicas estructurales y en disolución. En concreto, se emplearon las técnicas de microscopía TEM y AFM para determinar el tamaño y forma de los complejos. Así, se determinó que las nanopartículas Au@16-3-16 y Au@16-Ph-16 tienen un tamaño promedio de 3.8 ± 0.5 nm y 5.5 ± 0.5 nm, respectivamente (Fig. 2). Por otro lado, se evidencia la formación del complejo Au@16-3-16/mi-ARN y Au@16-Ph-16/mi-ARN (Fig. 3 y 4). El análisis de la sección transversal muestra nanosistemas que coinciden en espesor con el diámetro de las nanopartículas obtenido por TEM, al tiempo que muestra la unión del mi-ARN, obteniéndose complejos Au@16-3-16/mi-ARN y

Au@16-Ph-16/mi-ARN cuyos tamaños promedio en la dirección x-y son de aproximadamente 50 nm y 60 nm, respectivamente. Los resultados obtenidos mediante la técnica de dispersión de luz en disolución, DLS, confirma los resultados obtenidos por microscopía.

5 Para el examen TEM se colocó una gota (10 μ l) de la solución acuosa de nanopartículas de oro en una rejilla de cobre recubierta con película de carbono, que luego se dejó secar al aire durante varias horas a temperatura ambiente. El análisis de TEM se llevó a cabo en un microscopio electrónico Philips CM que funcionaba a 200 kV, y las imágenes resultantes se analizaron utilizando el software gratuito ImageJ.

10 Las imágenes de AFM se obtuvieron con un Picoscan 2500 de Imagen Molecular (tecnologías Agilent). Se utilizaron cantilevers de silicio (modelo Pointprobe, Nanoworld) con una frecuencia de resonancia de alrededor de 240 kHz y una constante de fuerza nominal de 42 N/m. Todas las imágenes de AFM fueron grabadas en el aire y en modo tapping, con velocidades de escaneo
15 de aproximadamente 0,5 Hz y recolección de datos a 256×256 píxeles.

Finalmente, se empleó la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) y mediciones de potencial Zeta para evaluar la distribución de tamaño y carga de los nanosistemas precursores y funcionalizados con miR-21. Para las medidas de DLS se empleó el equipo Zetasizer Model
20 ZS-90 (Malvern Instrument, Ltd., Reino Unido). La muestra se iluminó con un láser con una disposición de detección fija de 90° hacia el centro del área de la celda para analizar la fluctuación en la intensidad de la luz dispersada. Se tomaron al menos 5 medidas de tamaño para cada muestra y se calculó que el error relativo para el diámetro hidrodinámico era $< 5\%$. Los resultados se obtuvieron en términos de diámetros hidrodinámicos promedio, obteniéndose el porcentaje de
25 los diferentes complejos obtenidos en disolución. Se utilizó una célula capilar de policarbonato DTS1060 y las muestras fueron introducidas en relaciones molares idénticas a las pruebas de UV-visible.

Los potenciales zeta de las diferentes muestras revelan la formación de estructuras de elevada
30 carga positiva (Tabla 1), lo cual permite que estos nanosistemas sean potenciales vectores para el transporte de medicamentos a la célula.

Tabla 1. Potencial zeta y distribución de tamaño DLS por número de nanopartículas Au@gémini libres y funcionalizadas con miR-21 en diferentes relaciones molares en agua (definido como $R = C_{\text{Au@gémini}}/C_{\text{miR-21}}$).

Nanosistema Au@gémini/miR-21		
$C_{\text{miR-21}} = 4.5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	$C_{\text{miR-21}} = 6.0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	$C_{\text{miR-21}} = 9.0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$

5	Nanosistemas tipo Au@16-3-16	R = 0.378 (46 ± 5) mV (18 ± 3) nm; 8% (4.6 ± 1.4) nm; 92%	R = 0.283 (35.6 ± 1.2) mV (5.0 ± 0.7) nm	R = 0.189 (50.5 ± 1.7) mV (11 ± 4) nm
	Nanosistemas tipo Au@16-Ph-16	R = 0.124 (43 ± 6) mV (22 ± 2) nm; 47% (6.5 ± 1.4) nm; 53%	R = 0.093 (35 ± 4) mV (10.9 ± 1.6) nm	R = 0.063 (31.4 ± 1.2) mV (13.3 ± 1.4) nm

Ejemplo 2. Eficiencia de nanosistema para complejar mi-ARN.

Para comprobar la formación efectiva de los diferentes nanosistemas funcionalizados se realizaron espectros de UV-vis en función del tiempo a los nanosistemas descritos en el ejemplo 1, y se estudiaron las modificaciones pertinentes en la banda de plasmón de superficie de la nanopartícula, así como su estabilidad con el tiempo. Las Figuras 5 y 6, muestran el seguimiento de la formación de los nanosistemas funcionalizados con miR-21 a partir de los precursores Au@16-Ph-16 y Au@16-3-16, respectivamente. En el caso de los nanosistemas funcionalizados que tienen como precursor la nanopartícula Au@16-Ph-16 en sus diferentes proporciones de R (0.124, 0.093 y 0.063) la formación del nanosistema resultante se evidencia, claramente, pasadas 24 horas desde la finalización del proceso de agitación continua (véase ejemplo 1), que se considera como preparación "in situ" o tiempo cero. Así, si se comparan los espectros de UV-vis desde la mezcla in situ hasta las 24 horas de formación, en las diferentes preparaciones, se denota un desplazamiento de la banda de plasmón de superficie hacia el azul, unido a una disminución clara en la intensidad de la banda (véanse Figuras 5A-5X). El efecto hipocrómico observado puede interpretarse como una consecuencia de la neutralización de los grupos fosfato del miR-21 al unirse a los diferentes tensioactivos de carga positiva y opuesta, que rodean la nanopartícula precursora. La no evidencia de cambios significativos en posición y forma de la banda pasadas las 24 horas de la mezcla y hasta al menos un mes de la síntesis, evidencia tanto

la formación completa del nanocomplejo a las 24 horas de la mezcla, como su estabilidad en función del tiempo. Por otra parte, si una vez estabilizados, se compara la posición de la banda plasmón del nanosistema precursor y funcionalizados, se observa un desplazamiento batocrómico que es propio de los procesos intercalativos.

5

De la misma forma, la formación de los nanosistemas funcionalizados que tienen como precursor la nanopartícula Au@16-3-16 en sus diferentes proporciones de R (0.378, 0.283 y 0.189) también es evidente pasadas las 24 horas desde el proceso de mezcla. En este caso, la comparación de los espectros desde la mezcla in situ hasta t =24 horas muestra un aumento en la intensidad de la banda de plasmón de superficie, sin evidenciarse desplazamiento alguno en la posición de la banda (véanse Figuras 6A-6X). Esta diferencia puede deberse a un cambio en el modo de unión del tensioactivo al miR-21 que origina nanosistemas de estructura más regular y dispersa, produciendo un efecto hipercrómico en la intensidad de absorción de la banda de plasmón del precursor, Au@16-3-16.

15

Ejemplo 3. Efecto tóxico de tratamiento empleando miARN

Tabla 2a: Efecto de miR-21-Nano sobre el peso de los ratones a corto plazo. Los ratones fueron tratados diariamente durante 7 días mediante inyecciones subcutáneas de 200µL con miR-21-Nano y se pesaron después de 48h.

Código	Tipo de Nano	Cantidad miR-21 (µg)	Peso pre tratamiento (t=0)	Peso post tratamiento (t=48H)
A1	H ₂ O DEPC	0	28,9	27,5
A2	Au@16-pH-16	0	26,1	25,5
A3	Au@16-pH-16	0,495	25,1	25,4
A4	Au@16-pH-16	0,22	25,5	25,8
A5	Au@16-pH-16	0,11	24,3	24,4
A6	Au@16-3-16	0	29,9	29,2
A7	Au@16-3-16	0,495	26,6	26,3
A8	Au@16-3-16	0,22	30,4	28,8
A9	Au@16-3-16	0,11	27,3	26,6
S1	Suero fisiológico	0	26,7	25,6

DEPC: Pirocarbonato de dietilo

Se realizaron pruebas para descartar el posible efecto tóxico del nanosistema (nanopartículas de Au@gémini/miR-21). Ratones C57BL/6J fueron inyectados durante 7 días diariamente con el nanosistema miR-21 que tenía diferentes concentraciones de miR-21. Las inyecciones fueron subcutáneas en la parte interscapular del ratón. A continuación, un grupo de ratones fueron

20

sacrificados a las 48 horas para evaluar el efecto agudo de dicho complejo (Tabla 2a) y otro grupo fue sacrificado al mes para evaluar el efecto crónico (Tabla 2b). En el estudio además de grupos control con suero y con agua, se incluyó otro grupo de ratones que fue tratado con el miR-21 conjugado al *in vivo*-JetPEI® delivery reagent con una concentración de 0.5µg de miR-21.

Tabla 2b: Efecto de miR-21-Nano sobre el peso de los ratones a largo plazo. Los ratones fueron tratados diariamente durante 7 días mediante inyecciones subcutáneas de 200µL con miR-21-Nano y se pesaron después de 15 días y 30 días.

Código	Tipo de Nano	Cantidad de miR-21 (µg)	Peso pre tratamiento (t=0)	Peso post tratamiento (t=15d)	Peso post tratamiento (t=30d)
B1	H ₂ O DEPC	0	25,7	26,7	27,2
B2	Au@16-pH-16	0	24,9	25,4	26
B3	Au@16-pH-16	0,495	26,4	27,2	27,3
B4	Au@16-pH-16	0,22	28	28,8	28,6
B5	Au@16-pH-16	0,11	26,7	27,5	27,1
B6	Au@16-3-16	0	27	28,7	28,6
B7	Au@16-3-16	0,495	29,2	29,7	30,5
B8	Au@16-3-16	0,22	27	28,3	28,6
B9	Au@16-3-16	0,11	24	26,9	27,3
S2	Suero fisiológico	0	26,8	28,3	27,9
1	jetPei	0,5	24,1	27	27,5
2	jetPei	0,5	25,9	28,2	27,4
3	jetPei	0,5	26,2	27,7	27,9
4	jetPei	0,5	26	27,2	27,9
5	jetPei	0,5	25	25	27,2

Con estas pruebas no se apreció alteraciones en el pelaje normal, comportamiento, actividad, nivel de peso de los ratones, ningún signo de depresión y no se detectó ningún nódulo palpable. Además, ningún ratón había muerto antes de la finalización del estudio.

Se analizaron muestras sanguíneas, antes del sacrificio, para realizar los hemogramas correspondientes y se compararon con los valores con los del grupo de referencia (Tabla 3), sin encontrar cambios.

Tabla 3a: Efecto de miR-21-Nano en la composición sanguínea de los ratones a corto plazo. Hemograma correspondiente a los ratones tratados diariamente durante 7 días mediante inyecciones subcutáneas de 200µL con miR-21-Nano y después de 48h.

Tipo de Nano	H2 O d.p .c.	Suero fisiológico	Au @16 -ph-16	Au @16 -3-16	Au @16 -ph-16- miR-21-0,5	Au @16 -ph-16- miR-21-0,2	Au @16 -ph-16- miR-21-0,1	Au @16 -3-16- miR-21-0,5	Au @16 -3-16- miR-21-0,2	Au @16 -3-16- miR-21-0,1	VALOR ES REFERENCIA (n=4)
Código	A1	S1	A2	A6	A3	A4	A5	A7	A8	A9	
HEMATÍE S (x10 ⁶ /µl)	9,21	9,33	10.06	9.08	10.03	8.98	10.01	8.69	8.14	10.05	9,84 ± 0,35
HEMATOCRITO (%)	42.7	42.7	45.2	41.3	45,5	40.2	45.2	38.9	36.4	45.4	45,95 ± 1,34
HEMOGLOBINA (g/dl)	14,2	14.1	15,5	13.5	15.3	13	15	12.7	11.2	15,4	14,37 ± 0,67
V.C.M. (fl)	46.4	45,5	44.9	45,5	45,4	44.8	45.2	44.8	44.7	45.2	46,75 ± 0,40
C.H.C.M. (g/dl)	33.2	33,2	34,3	32,6	33.6	32,3	32.6	32,6	30.8	33,9	31,2 ± 0,59
H.C.M. (pg)	15,4	15,1	15,4	14.8	15,3	14,4	15	14,6	13.8	15.3	14,57 ± 0,23
R.D.W. (%)	14.4	12.7	12.9	13,7	11.8	13,9	12.8	13,9	14	13,8	13,82 ± 0,36

LEUCOCITOS (x10 ³ /μl)	1.6 2	2	1.98	1.75	1.13	2.64	1.48	4.4	1.88	3,54	3,54 ± 0,24
NEUTRÓFILOS (%)	9.5 6	37.12	9.79	10.1	19.6 8	6.98	11.8 6	10.1	7.08	5.03	17,46 ± 2,98
EOSINÓFILOS (%)	0	0	0.49	0.17	1.71	0.72	1.6	0.31	0.93	0.89	0,71 ± 0,16
BASÓFILOS (%)	0	0	0	0,46	0	0	0	0.52	0	0	0,29 ± 0,10
LINFOCITOS (%)	89. 31	62.44	88.1 2	88.8 8	76.3 8	90.0 4	85	84.4 4	90.4 2	89.7	78,58 ± 3,38
MONOCITOS (%)	1.1 3	0.44	1.6	1.64	2.61	1.9	1.5	1.45	1.57	4.38	2,96 ± 0,89
PLAQUETAS (x10 ³ /μl)	19 8	147	468	84	105	160	144	131	152	298	187.75± 32.49
PLAQUETOCRITO (%)	0.1 5	0.11	0.39	0.06	0.06	0.11	0.11	0.08	0.12	0.21	0.15 ± 0.03
V.P.M. (fl)	7.6	7.5	8.4	7.2	5.9	7	7.7	6.6	7.6	7.1	8.32 ± 0.12

Tabla 3b: Efecto de miR-21-Nano en la composición sanguínea de los ratones a largo plazo. Hemograma correspondiente a los ratones tratados diariamente durante 7 días mediante inyecciones subcutáneas de 200μL con miR-21-Nano y después de 30 días.

Tipo de Nano	H2O	Suero fisiológico	Au @16	Au @16	Au @16 -ph-	Au @16 -ph-	Au @16 -ph-	Au @16 -3-	Au @16 -3-	Au @16 -3-	VALORES
--------------	-----	-------------------	--------	--------	-------------	-------------	-------------	------------	------------	------------	---------

	d.p .c.		-ph- 16	-3- 16	16- miR- 21- 0,5	16- miR- 21- 0,2	16- miR- 21- 0,1	16- miR- 21- 0,5	16- miR- 21- 0,2	16- miR- 21- 0,1	REFER ENCIA (n=4)
Código	B1	S2	B2	B6	B3	B4	B5	B7	B8	B9	
HEMATÍE S (x10 ⁶ /μl)	9.2 7	8.87	9.28	10	9.77	9.97	8.8	10.5 2	10.1 4	8.76	9,84 ± 0,35
HEMATO CRITO (%)	45. 8	39.6	44.3	46.2	45	46.9	41.6	48.2	46.8	44.6	45,95 ± 1,34
HEMOGL OBINA (g/dl)	14. 6	13.6	15.4	15.2	14.6	15.2	14.6	15.3	15.3	14.9	14,37 ± 0,67
V.C.M. (fl)	49. 5	44.7	47.8	46.2	46.1	47.1	47.3	45.9	46.2	51	46,75 ± 0,40
C.H.C.M. (g/dl)	31. 8	34.3	34.7	32.9	32.4	32.4	35	31.7	32.6	33.4	31,2 ± 0,59
H.C.M. (pg)	15. 7	15.3	16.5	15.2	14.9	15.2	16.5	14.5	15	17	14,57 ± 0,23
R.D.W. (%)	12. 6	14	14.9	12.5	13.5	12.3	13.2	12.6	12.6	13.1	13,82 ± 0,36
LEUCOCI TOS (x10 ³ /μl)	2.6 3	3.12	3.07	2.61	1.83	4.78	3.13	3.76	3.29	2.61	3,54 ± 0,24
NEUTRÓ FILOS (%)	21. 5	29.82	25.2	17.6 6	14.4	14.2 4	24.1 5	21.4 6	13.4 9	21.2	17,46 ± 2,98
EOSINÓF ILOS (%)	0.9 1	0.64	2.05	0.69	14.6 5	1.23	0.97	2.99	4.24	4.18	0,71 ± 0,16
BASÓFIL OS (%)	0.2 7	0.64	0.38	0.26	0.23	0.41	0.41	0.12	0.12	0.11	0,29 ± 0,10
LINFOCI TOS (%)	63. 66	58.19	77.8 1	72.5 7	66.4 7	74.2 9	71.6 8	63.0 9	70.2 6	67.4 6	78,58 ± 3,38
MONOCI TOS (%)	13. 66	10.71	2.56	8.82	4.25	9.83	2.79	12.3 4	11.8 9	7.05	2,96 ± 0,89
PLAQET AS (x10 ³ /μl)	16 2	857	812	384	191	792	618	667	827	351	187.75± 32.49

PLAQUE TO CRITO (%)	0.1 1	0.71	0.67	0.32	0.15	0.67	0.55	0.53	07	0.28	0.15 ± 0.03
V.P.M. (fl)	7.3	8.3	8.3	8.5	8	8.5	8.9	8	8.5	8	8.32 ± 0.12

A continuación, se realizaron estudios morfológicos que consistirán en la realización del estudio histoquímico de hematoxilina eosina (Fig. 7A-D) para valorar las posibles anomalías a nivel tisular. Esto permitió comprobar, mediante microscopía óptica, si los distintos tejidos presentan anomalías estructurales o morfológicas susceptibles de patología. Para ello se extraerán diversos órganos: hígado, pulmón, cerebro, bazo, riñón, grasa visceral y grasa inguinal. Los órganos no han sufrido ninguna alteración durante el tratamiento, las modificaciones más destacadas se apreciaron a nivel de tejido adiposo inguinal, en el cual destaca la aparición de tejido adiposo multilocular (correspondiente al tejido adiposo beige) con 7 días de tratamiento con los nano sistemas Au@16-Ph-16-MiR-21 y Au@16-3-16-miR-21 (Fig. 8).

Para detectar la posible acumulación de nanopartículas en los tejidos se utilizarán espectrometría Raman en rodajas de tejidos de 10 micras. La microscopía CARS (Coherent Antistokes Raman Spectroscopy) permitió obtener imágenes de alta resolución en los tejidos recién extraídos sin necesidad de marcaje o preparación previa con un cromóforo permitiendo, a su vez, detectar la distribución espacial del componente específico que se selecciona para mapear la muestra en el área de imagen seleccionada (Fig. 9).

Los tejidos hepáticos y pulmonares de ratones recién extraídos se diseccionaron en cortes finos de tejidos de aproximadamente 10 µm de espesor y luego se sumergieron bajo PBS y se colocaron en un portaobjetos de vidrio para su examen. Para llevar a cabo la técnica se utilizarán dos líneas paralelas de excitación láser independientes (láser de Ti: Zafiro, modelo Tsunami, Spectra Physics) que generan pulsos de entre unos 3 a 13 picosegundos que deben solaparse de manera muy cuidadosa, espacial y temporalmente, es decir, deben incidir exactamente en el mismo punto de la muestra y además que pulsen simultáneamente, para que al incidir en la muestra generen la señal CARS adecuada. Los haces están ópticamente acoplados a un microscopio vertical (Olympus, modelo BX61WI) con barrido ultrarrápido por espejos galvanométricos. Fijando la energía del pump a 727nm (con una anchura de pulso de unos 4,5ps y 60mW de potencia a la entrada del microscopio) y la energía del stokes se ha seleccionado a 858nm (con una anchura de pulso de unos 8ps y 80mW de potencia a la entrada del microscopio) para observar la vibración de 2100cm⁻¹ (señal CARS a 631nm), para detectar nanopartículas de oro en tejidos. Con estas pruebas pudimos confirmar la no acumulación de las nanopartículas en los tejidos.

Los análisis *in vitro* y la acumulación a nivel tisular en modelos animales son fundamentales para comprender el nivel de toxicidad de los nanosistemas. Como sabemos, las nanopartículas de oro mejoran la señal anti-Stoke Raman de aminoácidos cercanos, por lo que la aplicación de la técnica CARS de control adecuada puede detectar la presencia de AuNP que miden este efecto.

5 Para verificar la posible acumulación de nanopartículas de oro funcionalizadas en diferentes órganos de ratones, se realizaron experimentos de microscopía CARS *ex vivo* en diferentes tejidos recién diseccionados después de 48 horas de tratamiento (ver Fig. 9). Además, algunos experimentos de control se llevaron a cabo *in situ* depositando directamente nanopartículas de oro y tampón PBS sobre los tejidos de control (ver Fig. 9 A-C).

10 Como era de esperar, las imágenes CARS del PBS no mostraron un contraste apreciable en la condición no resonante (ver Fig. 9A), mientras que la señal CARS se mejoró claramente en presencia de Au@16-Ph-16-miR-21 y Nanopartículas de Au@16-3-16-miR-21 en el tejido de control (ver Fig. 9 A-C), que muestran puntos brillantes mejorados. La mejora localizada de la
15 señal Raman anti-Stroke a una longitud de onda de excitación de 858nm se observó para hígados, bazo, pulmones, cerebros, riendas y tejidos de grasa VAT y SAT extraídos de los derivados de miR-21-AuNPs (ver Fig. 9 D-I) en la concentración más alta de CmiR-21 (R 0.189 y 0.062 para Au@16-3-16-miR-21 y Au@16-Ph-16-miR-21, respectivamente) y precursores de AuNPs ratones tratados. Como resultado, la señal Raman estuvo totalmente ausente para todos
20 los tejidos estudiados tratados con los nanosistemas de miR-21 cubiertos y no cubiertos después de 48 horas de tratamiento. En este sentido, nuestra evidencia indica que no hay acumulación de nanopartículas en los órganos principales estudiados, lo que denota ausencia de toxicidad debido al posible efecto de acumulación de nuestros nanosistemas. Sin embargo, se deben realizar más experimentos para evaluar una caracterización completa de la toxicidad.

25 En definitiva, las imágenes CARS del "control" no mostraron un contraste apreciable en la condición no resonante, mientras que las señales CARS de las AuNPs aumentaron considerablemente, apareciendo como puntos brillantes dispersos en las imágenes tomadas de las muestras tratadas con AuNPs. La mejora probablemente se debió a la fuerte dispersión de
30 las AuNPs y la gran polarizabilidad de tercer orden de las AuNPs. En conclusión, los datos demostraron que estos nanosistemas no han mostrado ningún efecto tóxico en los ratones tratados a corto y a largo plazo, y que no se produce acumulación de las nanopartículas de oro en los tejidos.

35 **Ejemplo 4. Estudio del efecto del tratamiento *in vivo* con los nanosistemas Au@16-Ph-16-miR-21 y Au@16-3-16-miR-21 sobre la ganancia de peso y la grasa en ratones modelo de obesidad sometidos a dieta alta en grasa.**

Durante el estudio se usaron ratones machos C57BL/6J obtenidos de Jackson Laboratory. C57BL/6J es un modelo animal ampliamente usado en el estudio de la obesidad y la diabetes
40 tipo 2. Los animales fueron alojados individualmente y fueron mantenidos bajo fotoperiodos de

12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a 24 °C y 45% ± 5% de humedad. Durante los 7 días de adaptación, los animales siguieron la dieta normal utilizada en el animalario. A continuación, los animales fueron sometidos a una dieta alta en grasa (HFD, 45% Kcal) durante 53-55 días para generar el fenotipo obeso. Los ratones se pesaron y fueron tratados 2 veces por semana durante 5 6 semanas con 0,2 µg ó 0,3 µg de mimético miR-21 conjugado con la nano Au@16-Ph-16 o Au@16-3-16 en un volumen final de 200 µL mediante inyecciones subcutáneas (interscapular o inguinal). Durante el sacrificio se sacaron los tejidos adiposos (subcutáneo inguinal y interescapular, visceral y pardo) y la sangre.

10 Los ratones sometidos al tratamiento con los nano sistemas Au@16-Ph-16-miR-21 y Au@16-3-16-miR-21 frenaron la ganancia de peso comparado con los controles, especialmente, el tratamiento con el nanosistema 16-ph-16-miR-21 tanto con 0,2µg como 0.3µg de miR-21 redujo significativamente la ganancia de peso en los ratones sometidos a la dieta rica en grasa comparado con el control (Fig. 10).

15 El estudio se complementó con un análisis histológico y de expresión génica y proteica en tejido adiposo blanco subcutáneo inguinal, interscapular y visceral y grasa interscapular marrón procedentes de los ratones sometidos a tratamiento *in vivo* con los nanosistemas Au@16-Ph-16-miR-21 y Au@16-3-16-miR-21.

20 Por un lado, las imágenes histológicas de los tejidos, que fueron preparados con tinción hematoxilina-eosina (Fig. 11), mostraron que el tratamiento *in vivo* con los nanosistemas Au@16-Ph-16-miR-21 y Au@16-3-16-miR-21 ha transformado parte de la grasa blanca (formada de adipocitos uniloculares) en grasa beige (formada de adipocitos multiloculares).

25 Por otro lado, se efectuó un análisis de la expresión génica con ARN mensajero, obtenido de los tejidos adiposos subcutáneos inguinal e interscapular, de los genes marcadores de la termogénesis (*UCP1* y *PGC-1α*), de los marcadores de las células beige (*Tmem26*) y los genes reguladores del proceso del *browning* *Vegf-A* y *Prdm16* mediante PCR a tiempo real (Fig.12).

30 Los datos, demuestran que tanto la termogénesis como el *browning* están significativamente inducidos por el tratamiento con el nanosistema Au@16-Ph-16-miR-21 0.2µg.

A continuación, se realizó un análisis de expresión proteica por inmunohistoquímica sobre tejido adiposo blanco subcutáneo inguinal y tejido adiposo blanco visceral con anticuerpos frente a las 35 proteínas UCP-1 (como marcador de tejido adiposo marrón) y TMEM26 (como marcador de adipocitos beige) individualmente y combinados (merge) (Fig. 13). Las imágenes de inmunostiquímica muestran la aparición de una fuerte señal en la grasa blanca subcutánea inguinal correspondiente a la proteína UCP-1 y TMEM26 con el tratamiento nanosistema-miR-21 comparado con el control (sin miR-21). Además, con un doble marcaje con ambos anticuerpos 40 reveló la co-localización de adipocitos con alta expresión de UCP-1 y TMEM26 únicamente en la

grasa blanca subcutánea inguinal procedente de ratones tratados con el nanosistema-miR-21 comparado con el control (sin miR-21).

5 Se evaluó también el número de mitocondrias en tejido adiposo inguinal mediante imágenes por microscopio electrónico (Fig. 14). Estas imágenes muestran la escasez de mitocondrias en la grasa blanca subcutánea (inguinal) de ratones control en contraste con una abundancia de grandes organelos densos en electrones en la grasa blanca subcutánea (inguinal) de ratones tratados con el nanosistema Au@16-pH-16-miR-21.

10 Los datos confirman que el efecto de los nanosistemas Au@16-pH-16-miR-21 Au@16-3-16-miR-21 (a concentración baja de miR-21 de 0.2 y 0.3 μg) sobre la reducción en la ganancia de peso estaría mediado por una inducción del *Browning* en el tejido adiposo subcutáneo blanco y la activación de la termogénesis tanto en la grasa marrón como en la grasa blanca subcutánea mediante la conversión de los adipocitos blancos en adipocitos beige.

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un nanosistema funcionalizado para el transporte de moléculas biológicamente activas que comprende:
- 5 (a) una molécula biológicamente activa que se selecciona de entre la molécula de microARN miR-21, mimético, isomiR, oligonucleótido con más de un 75% de similitud de secuencia, compuestos dirigidos a aumentar la trascrición o actividad de miR-21 o una fuente de la misma, o cualquiera de sus combinaciones; y
- 10 (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende una nanopartícula, y una molécula transportadora capaz de ligar oligonucleótidos.
- 2.- El nanosistema según la reivindicación anterior, en la que la molécula biológicamente activa y la nanopartícula se unen a la molécula transportadora de forma independiente. Ambas uniones pueden ser indistintamente de tipo covalente o no covalente. Generalmente, mediante
- 15 interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, adsorción superficial, encapsulación o intercalado en el interior de la misma.
- 3.- El nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula biológicamente activa y la nanopartícula se unen a la molécula transportadora de forma
- 20 independiente mediante unión de tipo no covalente que pueden ser: interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, adsorción superficial, encapsulación o intercalado en el interior de la misma.
- 4.- El nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la nanopartícula comprende un núcleo metálico de carácter catiónico.
- 25 5.- El nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el núcleo metálico de carácter catiónico es de oro.
- 6.- El nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tamaño medio
- 30 de las nanopartículas está comprendido entre 1 y 20 nanómetros.
- 7.- El nanosistema según la reivindicación 6, donde el tamaño medio de las nanopartículas está comprendido entre 3 y 7 nanómetros y/o el tamaño medio del nanosistema está comprendido entre 30 y 80 nanómetros.
- 35 8.- El nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula transportadora del nanosistema es un tensioactivo catiónico.
- 9.- El nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula
- 40 transportadora es un tensioactivo catiónico de tipo gémini.

- 10.- El nanosistema según la reivindicación 9, donde el tensioactivo gémuni es 16-3-16.
- 11.- El nanosistema según de la reivindicación 10, donde el tamaño medio de la nanopartícula está comprendido entre 3 y 4 nanómetros y/o el tamaño medio del nanosistema está comprendido entre 30 y 80 nanómetros.
- 12.- El nanosistema según la reivindicación 9, donde el tensioactivo gémuni es 16-Ph-16.
- 13.- El nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 12, donde el tamaño medio de la nanopartícula está comprendido entre 5 y 6 nanómetros y/o el tamaño medio del nanosistema está comprendido entre 40 y 60 nanómetros.
- 14.- Una composición que comprende al menos un nanosistema según las reivindicaciones 1-13.
- 15.- La composición según la reivindicación anterior, que es una composición farmacéutica.
- 16.- Un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una composición según las reivindicaciones 14-15, para su uso como medicamento.
- 17.- Un nanosistema o la composición según la reivindicación anterior para prevenir, retrasar, aliviar, revertir, curar y/o tratar una enfermedad metabólica; donde la enfermedad metabólica se selecciona de la lista que consiste en: amiloidosis, enfermedad cardiometabólica, deshidratación, diabetes (tipo 1, tipo 2, úlceras del pie diabético, edema macular diabético, neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, diabetes gestacional, dislipidemia, hiperlipidemia), intolerante a la glucosa, hipercolesterolemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia o resistencia a la insulina, hipercalcemia, hipoglucemia, hipopotasemia, lipodistrofia (lipoatrofia), síndrome metabólico, obesidad, osteopenia, osteoporosis (incluida osteoporosis postmenopáusicas), fenilcetonuria (PKU), hipersecreción de ACTH hipofisaria (síndrome de Cushing) y Enfermedad de Pompe.
- 18.- El nanosistema o composición según la reivindicación anterior, donde la enfermedad metabólica se selecciona de entre la obesidad, el sobrepeso y la hiperinsulinemia o resistencia a la insulina.
- 19.- Un nanosistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición según las reivindicaciones 14-15, para prevenir, retrasar, aliviar, revertir, curar y/o tratar una enfermedad asociada con aumento de peso corporal. Más preferiblemente la enfermedad asociada con aumento de peso corporal se selecciona de la lista que consiste en Hipotiroidismo, Síndrome de Cushing, Hipogonadismo, Lesiones Hipotalámicas, Deficiencia de la hormona de crecimiento,

Síndromes Prader–Willi, Bardet–Biedl, Cohen, MOMO, Ansiedad y Depresión; o cualquiera de sus combinaciones.

20.- Un kit de partes que comprende:

- 5 (a) un nanosistema según las reivindicaciones 1-13 o una composición según las reivindicaciones 14-15; y (b) un medicamento que se selecciona de entre:
- (b1) un medicamento asociado a aumento de peso que se selecciona de la lista que consiste en: Atenolol, Carbamazepina, Citalopram, Clozapina, Mesilato de Doxazosina, Doxepin, Escitalopram, Fluvoxamina, Gabapentina, Ácido gamma-hidroxi-
 10 butírico, Leuprolide, Litio, Metoprolol, Mirtazapina, Nateglinida, Nortriptilina, Olanzapina, Paroxetina, Pioglitazona, Propranolol, Quetiapina, Repaglinida, Risperidona, Terazosina, Valproato y Fenitoína; o
- (b2) un medicamento aprobado en alguna agencia nacional contra la obesidad que se selecciona de la lista que consiste en: acetato de megestrol, benzfetamina, cafeína, catinona, cetilistat, clobenzorex, clorhidrato de clorfentermina, clorhidrato de dexfenfluramina, clorhidrato de dietilpropion, clorhidrato de fenfluramina, clorhidrato de fenmetrazina, clorhidrato de fentermina, clorhidrato de lorcaserina, clorhidrato de mefenorex, clorhidrato de sibutramina, dronabinol, fendimetrazina, fenfluramina, fenilpropanolamina, fenproporex, fentermina, fluoxetina, levocarnitina, levotiroxina
 15 sódica, mazindol, metanfetamina, metilcelulosa, orlistat, phendimetrazina, rimonabant, Saxenda, sibutramina, sulfato de anfetamina, tartrato de fendimetrazina, ""clorhidrato de bupropión + naltrexona"", ""clorhidrato de fentermina + topiramato"", ""levocarnitina + sibutramina"" y ""metformina + sibutramina""; o
- (b3) un medicamento en fase clínica de desarrollo contra la obesidad que se selecciona
 20 de la lista que consiste en: Adipotida, AKR-001, AM-833, AMG-598, Beloranib, BI-456906, biotina, clorhidrato de betahistina, clorhidrato de lorcaserina, clorhidrato de lorcaserina, efpeglenatide, G-3215, GMA-102, GT-001, GTS-21, HM-12525A, HM-15211, HSG-4112, LLF-580, MEDI-0382, MET-2, Miricorilant, NGM-313, NGM-386, NN-9277, NN-9423, NN-9536, NNC-01651562, NNC-01651875, Novdb-2,
 25 NovOB, pegapamodutide, REGN-4461, RZL-12, S-237648, S-237648, SAR-425899, SCO-792, setmelanotide, setmelanotide, tesofensina, TP-0101, VP-01, ZGN-1061, ZP-4982, (acarbosea + orlistat), (leucina + citrato de sildenafil), (leucina + clorhidrato de metformina + citrato de sildenafil) y (metoprolol + tesofensina).

- 35 21.- Un kit de partes según la reivindicación anterior para prevenir, retrasar, aliviar, revertir, curar y/o tratar una enfermedad metabólica, donde la enfermedad metabólica se selecciona de la lista que consiste en: amiloidosis, enfermedad cardiometabólica, deshidratación, diabetes (tipo 1, tipo 2, úlceras del pie diabético, edema macular diabético, neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, diabetes gestacional, dislipidemia, hiperlipidemia), intolerante a la glucosa,
 40 hipercolesterolemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia o resistencia a la insulina, hipercalemia,

hipoglucemia, hipopotasemia, lipodistrofia (lipoatrofia), síndrome metabólico, obesidad, osteopenia, osteoporosis (incluida osteoporosis postmenopáusica), fenilcetonuria (PKU), hipersecreción de ACTH hipofisaria (síndrome de Cushing) y Enfermedad de Pompe.

5 22.- El kit de partes según la reivindicación 21, donde la enfermedad metabólica se selecciona de entre la obesidad, el sobrepeso y la hiperinsulinemia o resistencia a la insulina.

23.- Un procedimiento para sintetizar un nanosistema según las reivindicaciones 1-13, que comprende:

- 10 (a) La adición de tensioactivo gémuni como agente estabilizante en una disolución de hidrógeno tetracloroaureato tetrahidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),
- (b) La reducción de hidrógeno tetracloroaureato tetrahidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) mediante la adición controlada de un agente reductor, y
- 15 (c) La complejación con la molécula biológicamente activa, mediante la adición controlada de la molécula de microARN miR-21, mimético, isomiR, oligonucleótido con más de un 75% de similitud de secuencia, compuestos dirigidos a aumentar la transcripción o actividad de miR-21 o una fuente de la misma, o cualquiera de sus combinaciones; manteniéndose unas condiciones de exceso del polímero y agitación."

20 24.- El procedimiento según la reivindicación anterior, donde el agente reductor es borohidruro sódico (NaBH_4).

25 25.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23-24, donde el agente reductor se dosifica mediante adición fraccionada gota a gota.

26.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23-25, donde entre el paso (a) y el paso (b) se realiza una agitación vigorosa y en ausencia de luz durante, al menos, 3 minutos.

30 27.- El procedimiento según la reivindicación anterior, donde la agitación vigorosa en ausencia de luz se realiza al menos 4 minutos.

28.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23-27, donde entre el paso (b) y el paso (c) se realiza una agitación y en ausencia de luz durante, al menos, 10 minutos.

35 29.- El procedimiento según la reivindicación anterior, donde la agitación en ausencia de luz se realiza al menos 12 minutos.

40 30.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23-28, donde tras el paso (c) se realiza una agitación suave durante, al menos, 20 minutos.

31.- El procedimiento según la reivindicación anterior, donde la agitación suave se realiza al menos 25 minutos.

FIGURAS

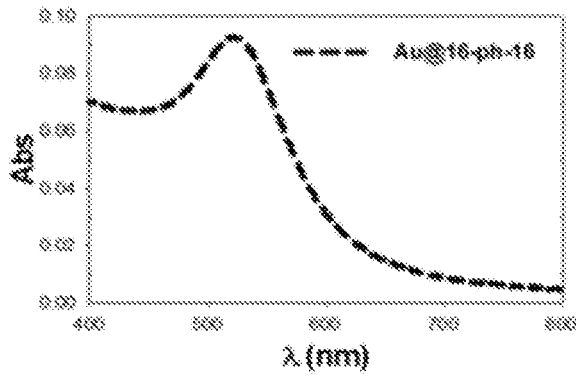


Fig.1A

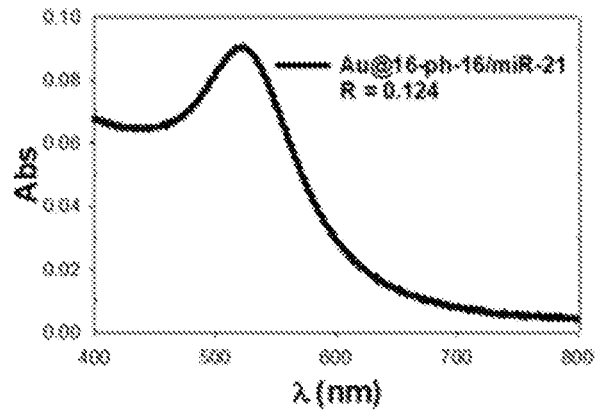


Fig.1C

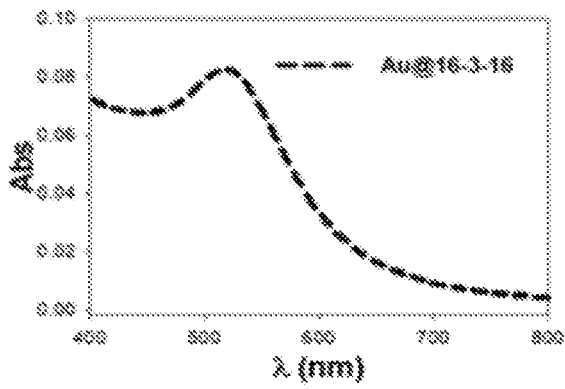


Fig.1B

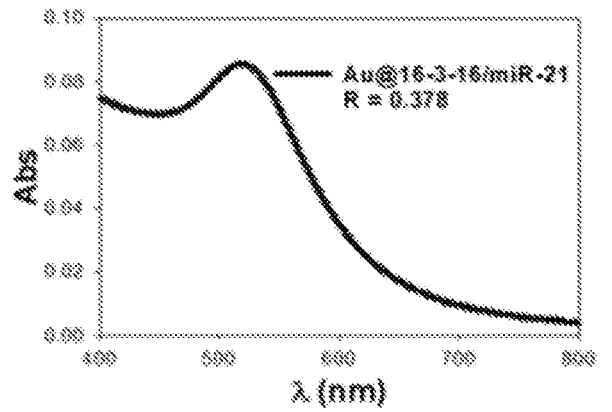


Fig.1D

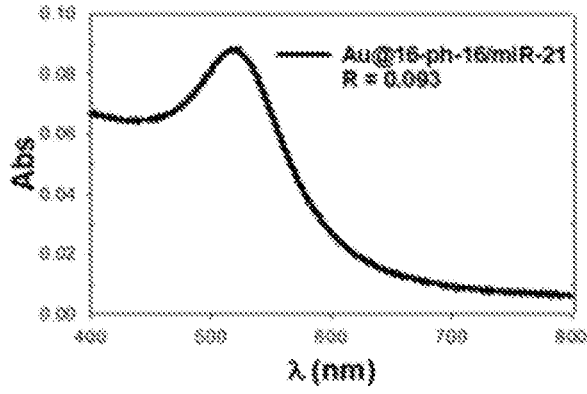


Fig.1E

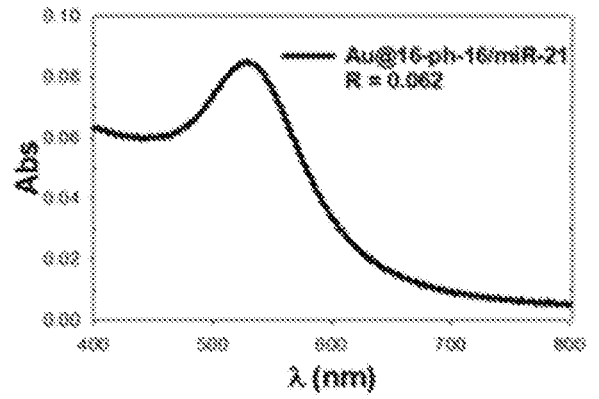


Fig.1G

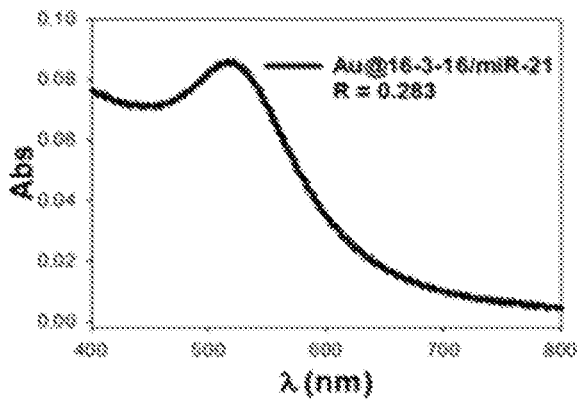


Fig.1F

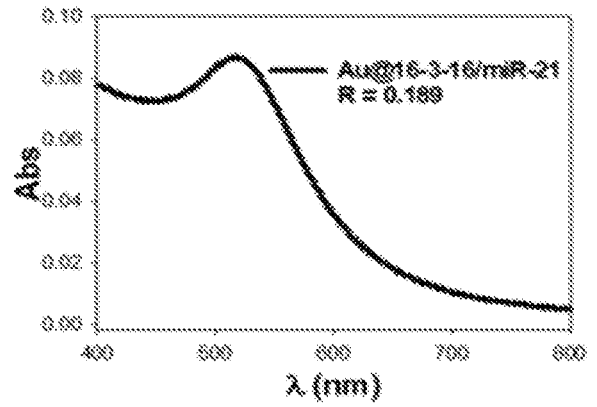


Fig.1H

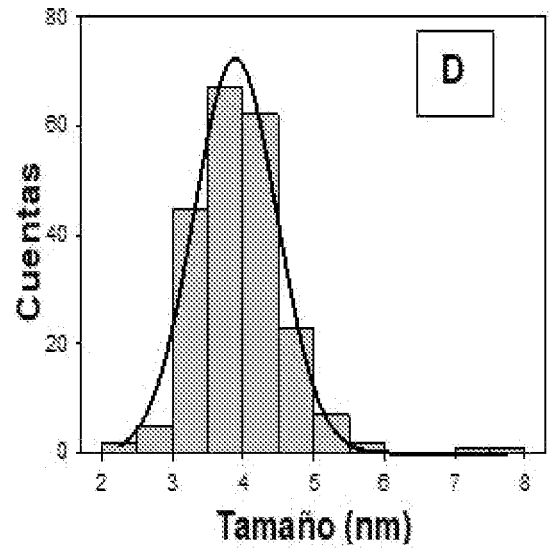
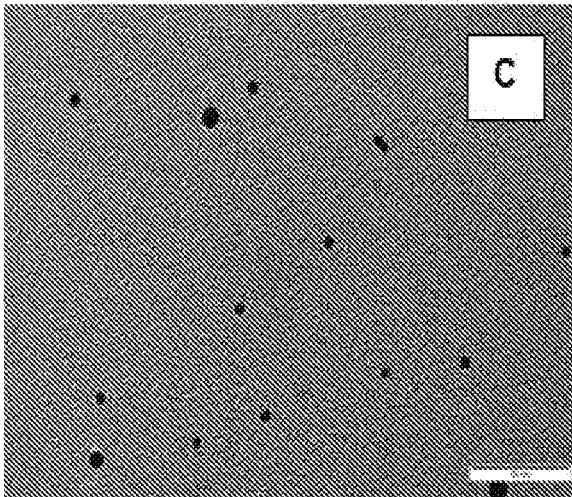
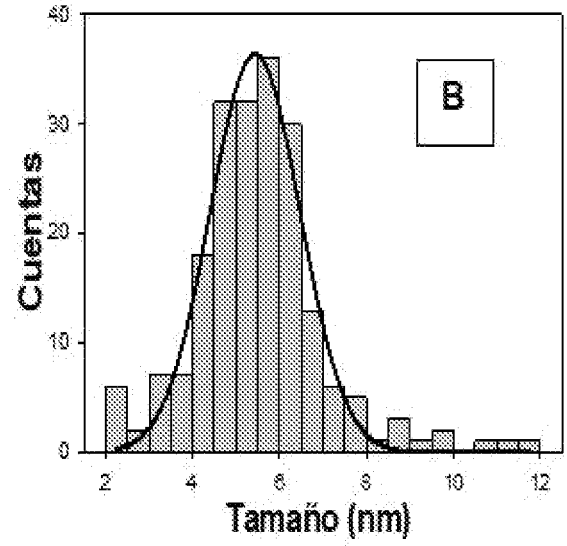
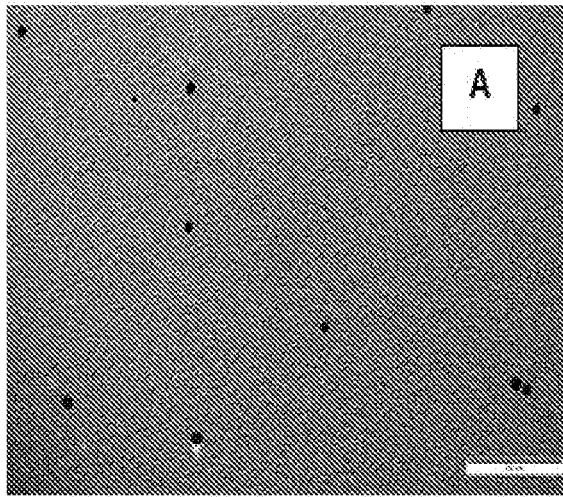


Fig.2

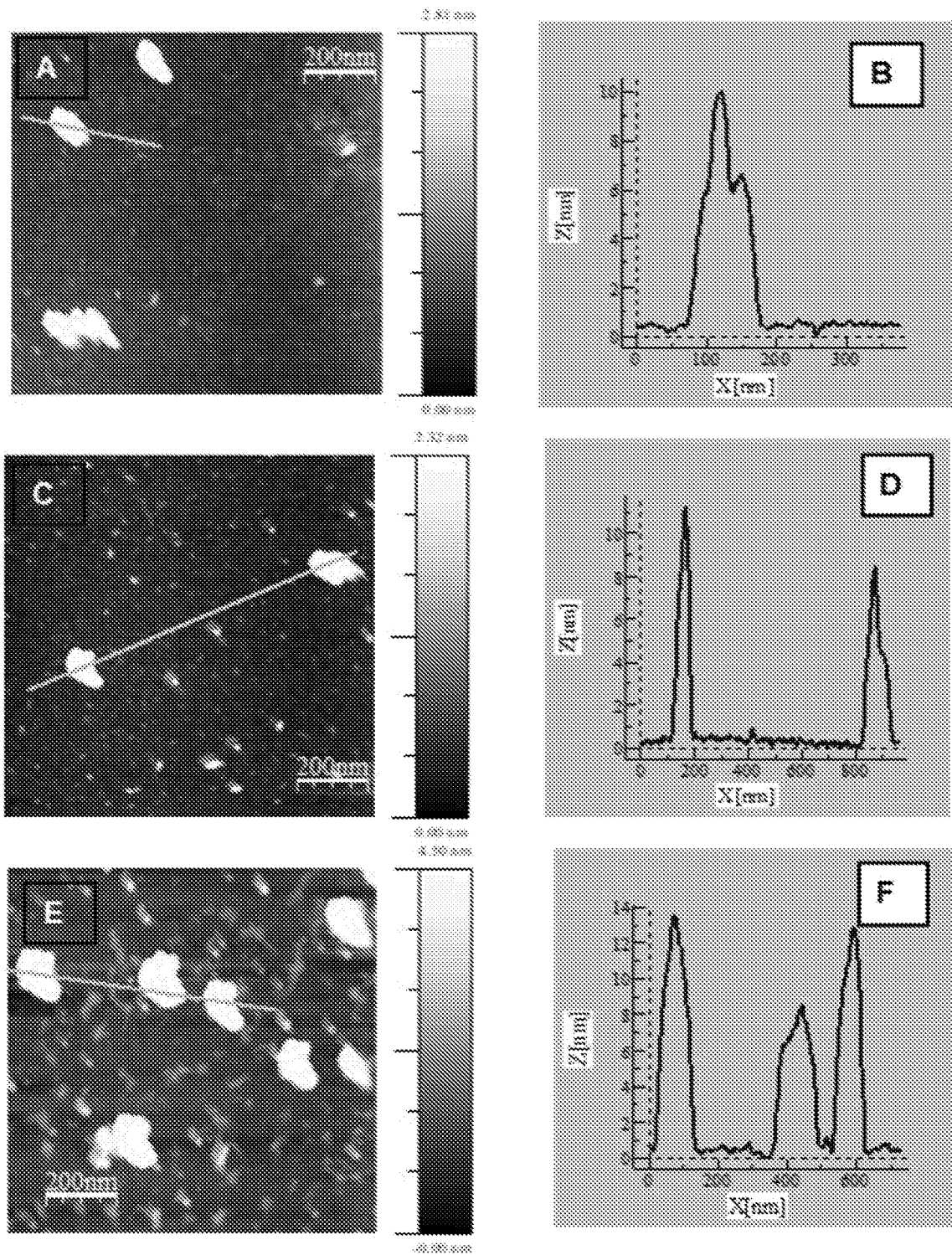


Fig.3

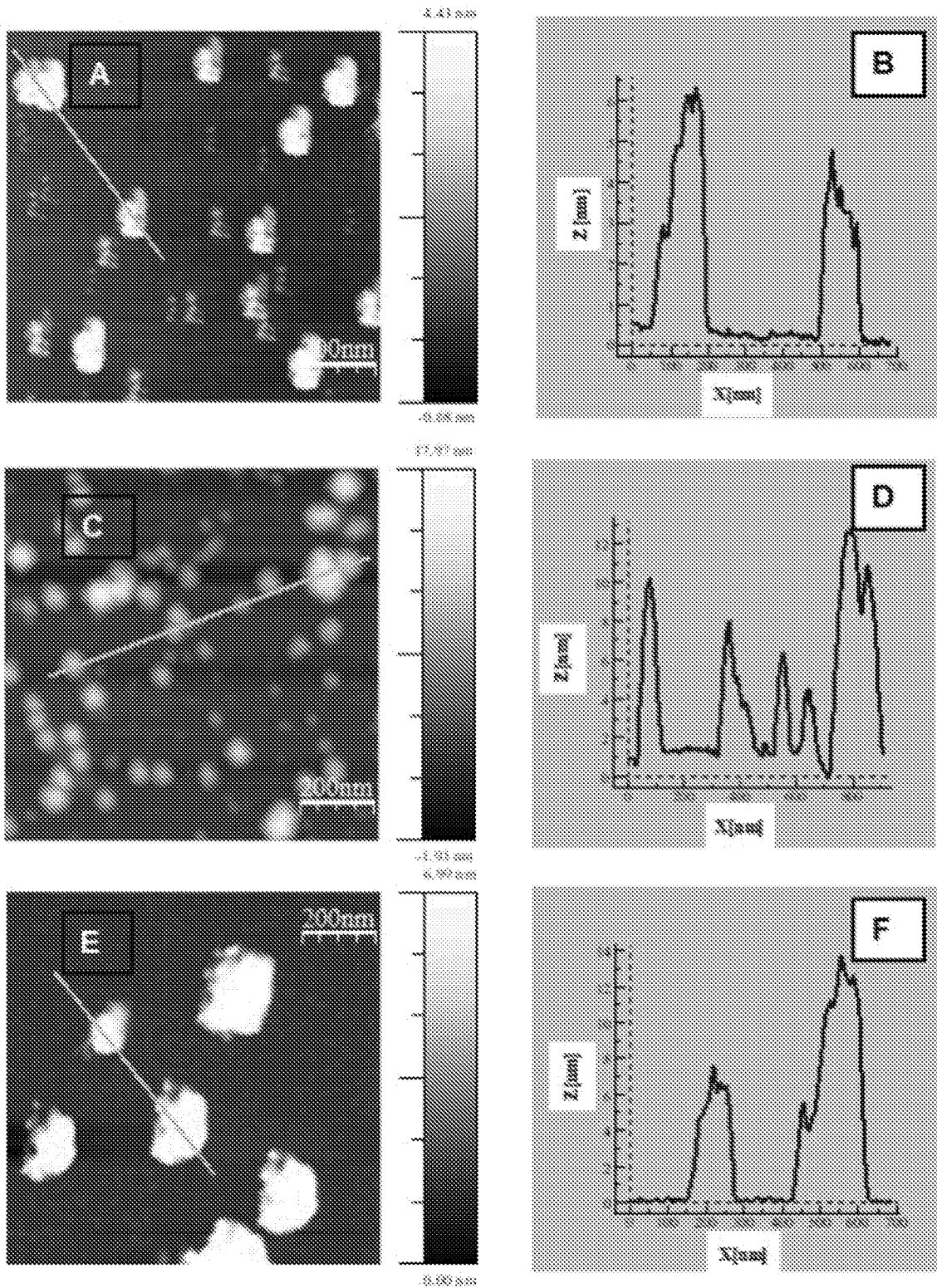


Fig.4

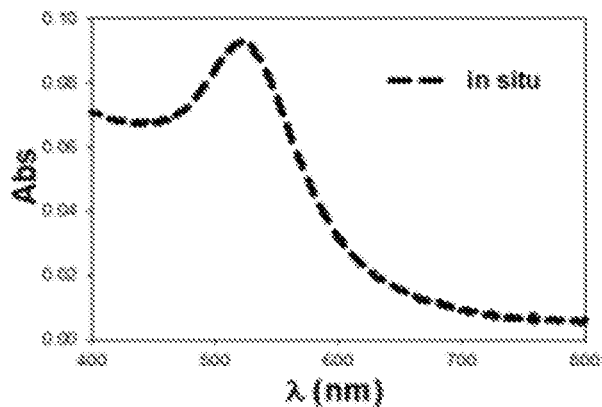


Fig.5A

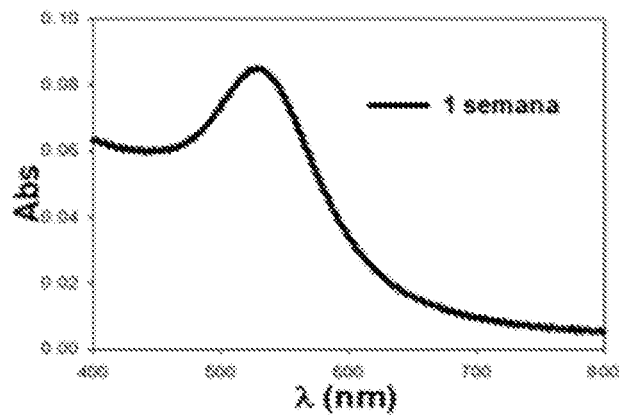


Fig.5D

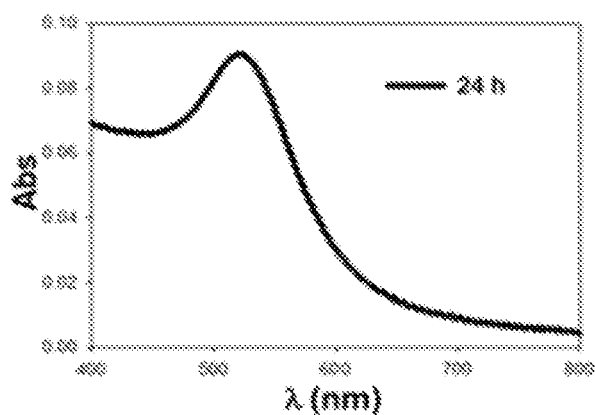


Fig.5B

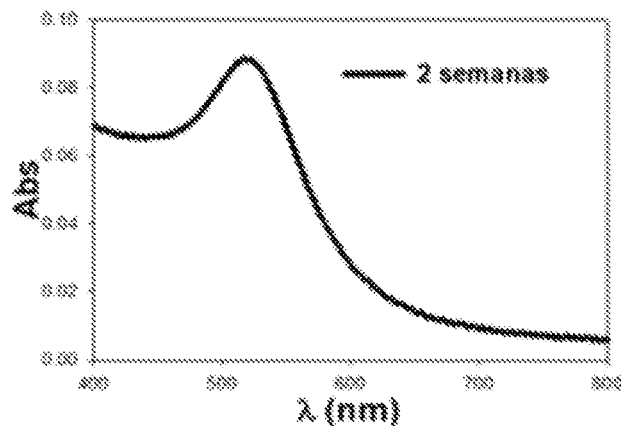


Fig.5E

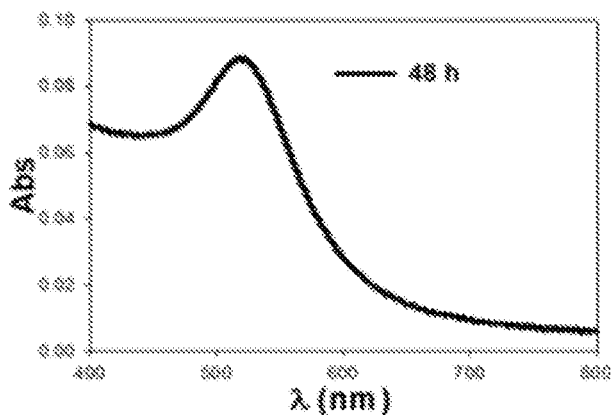


Fig.5C

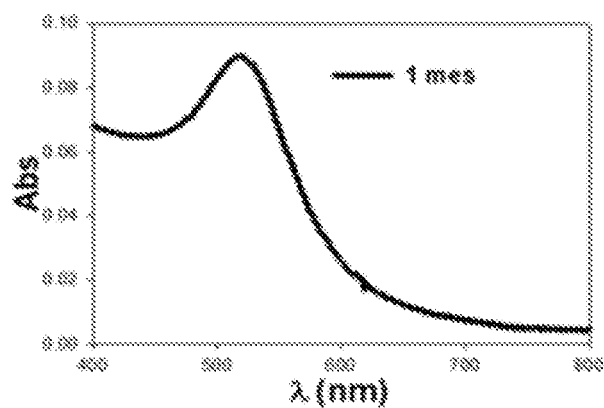


Fig.5F

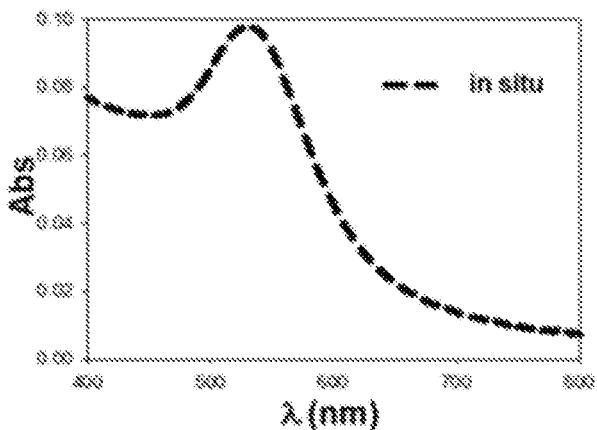


Fig.5G

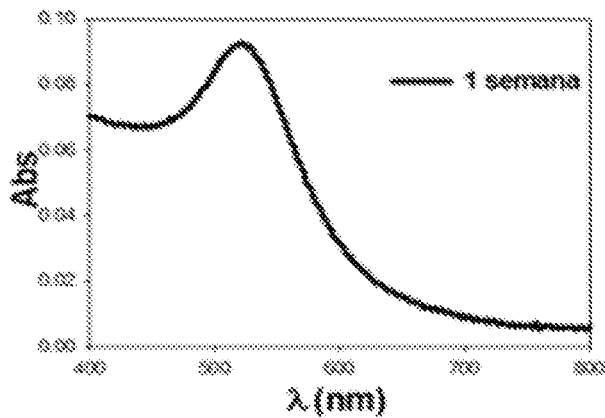


Fig.5J

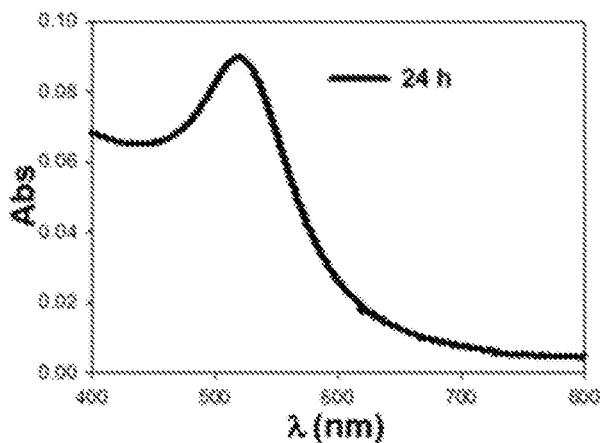


Fig.5H

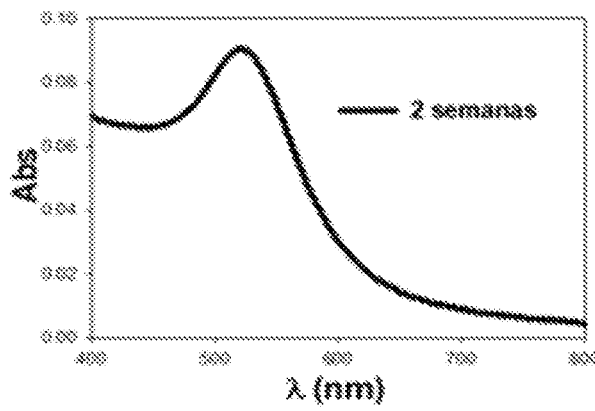


Fig.5K

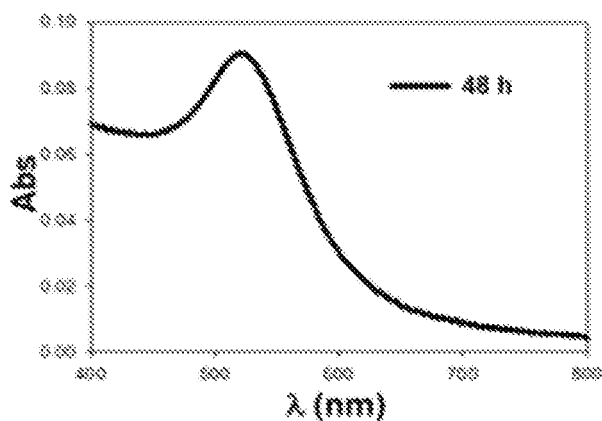


Fig.5I

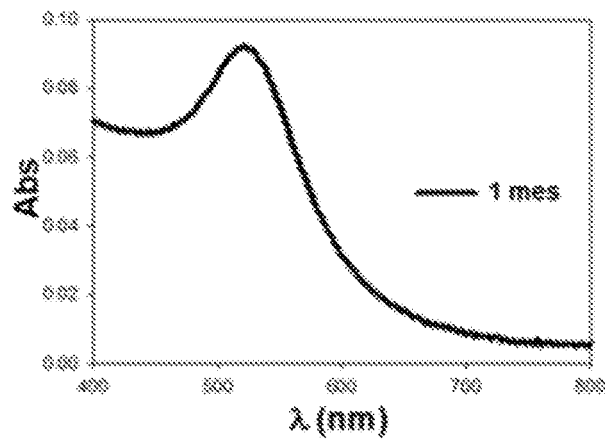


Fig.5L

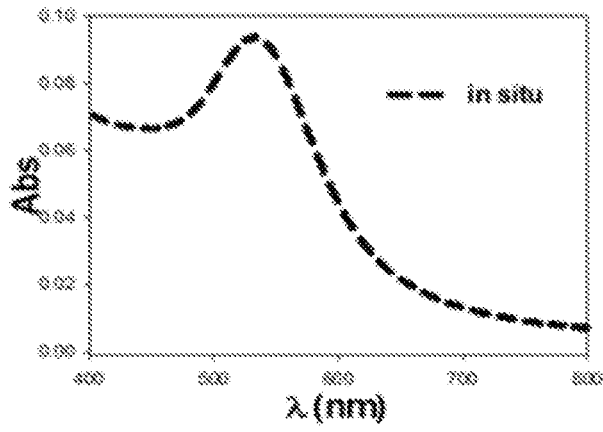


Fig.5M

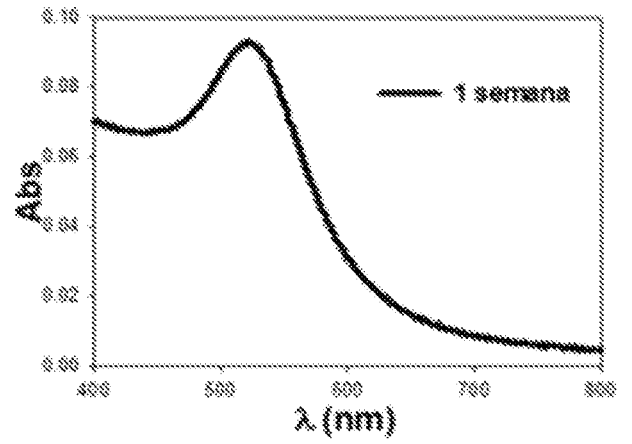


Fig.5P

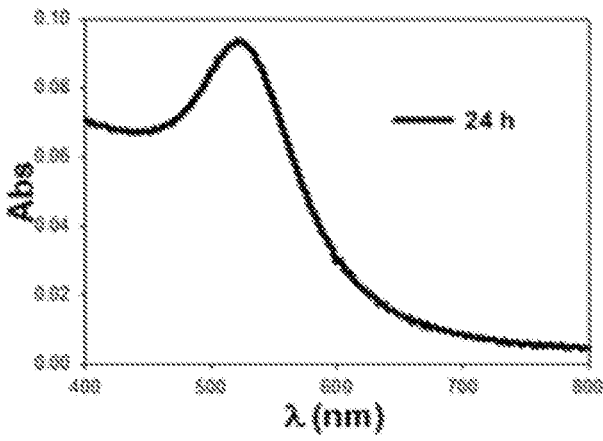


Fig.5N

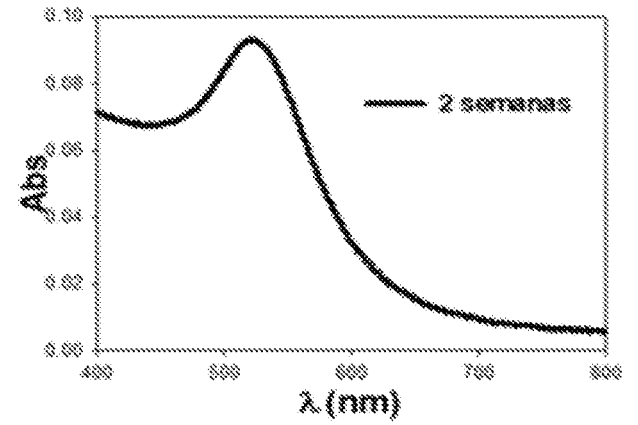


Fig.5Q

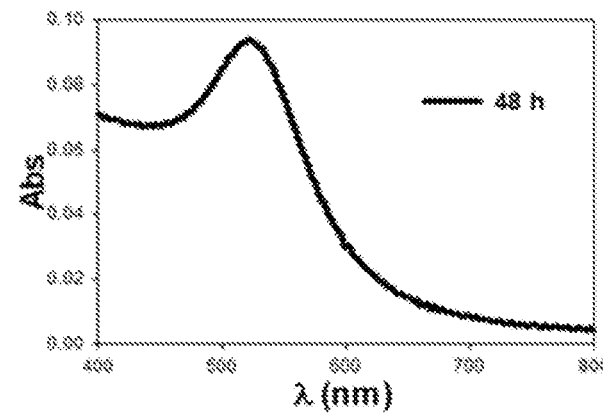


Fig.5O

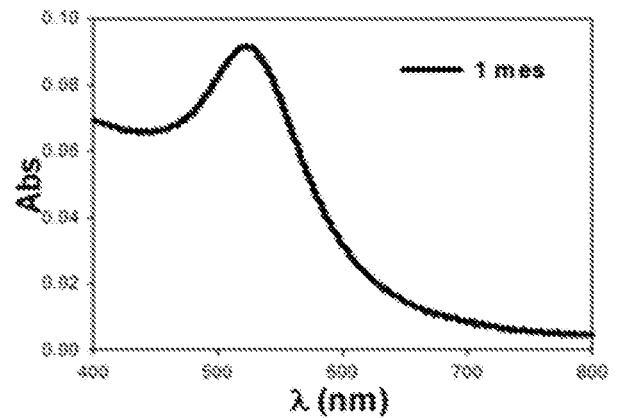


Fig.5R

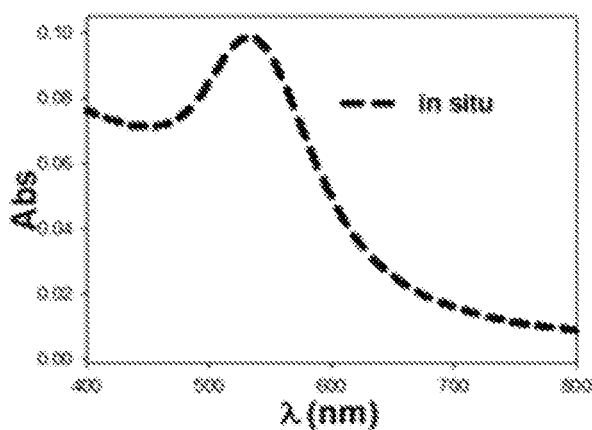


Fig.5S

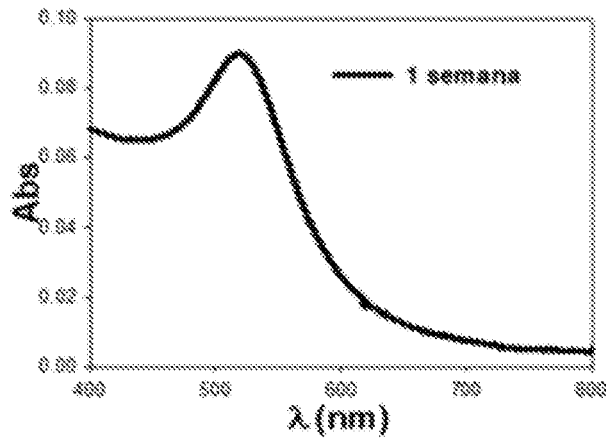


Fig.5V

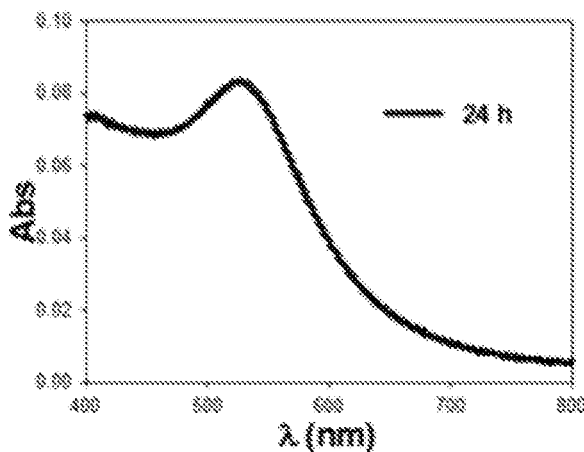


Fig.5T

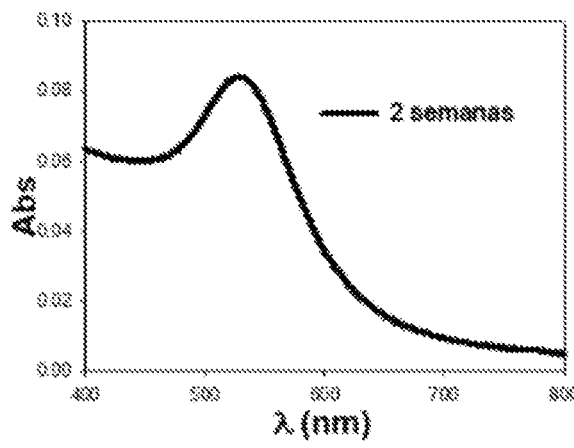


Fig.5W

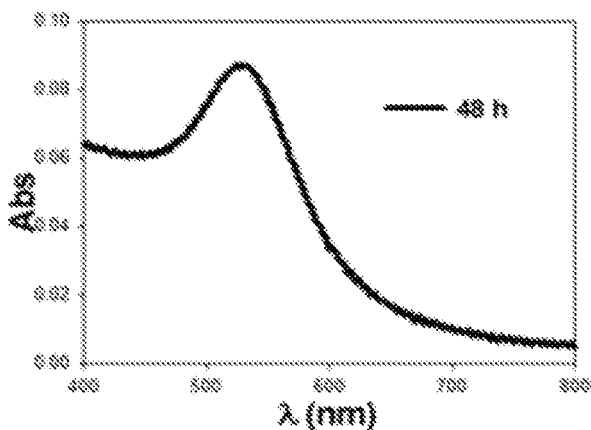


Fig.5U

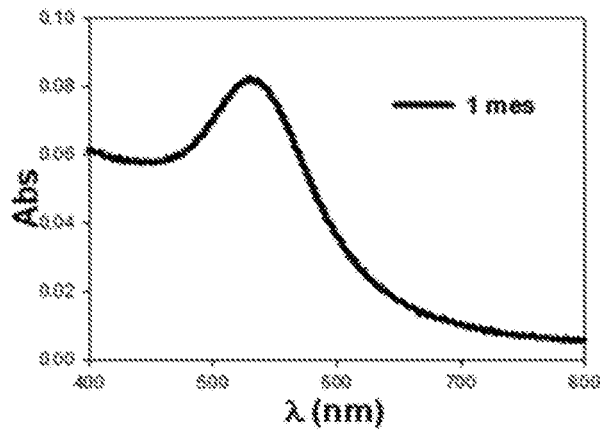


Fig.5X

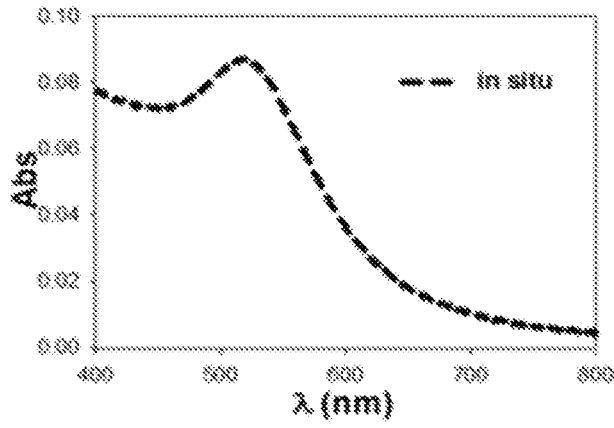


Fig.6A

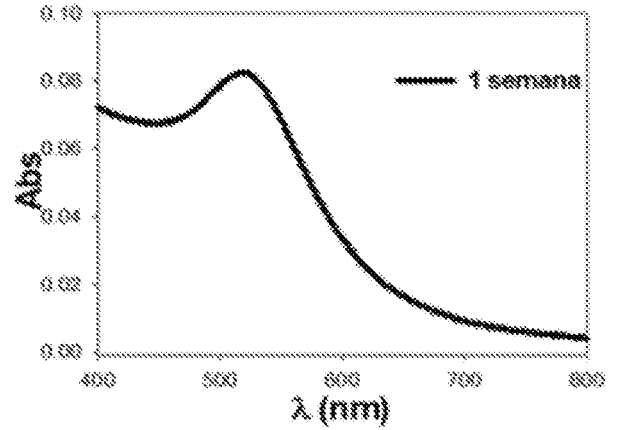


Fig.6D

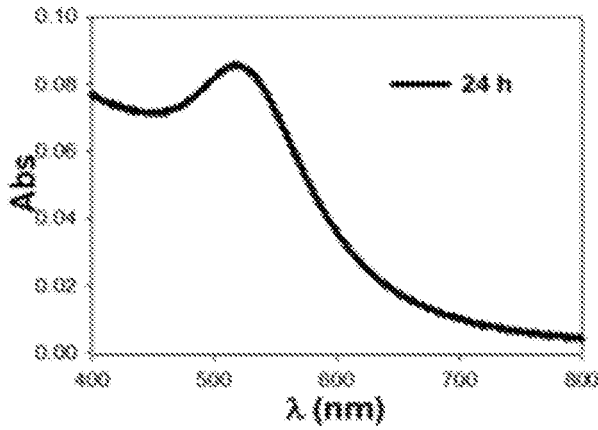


Fig.6B

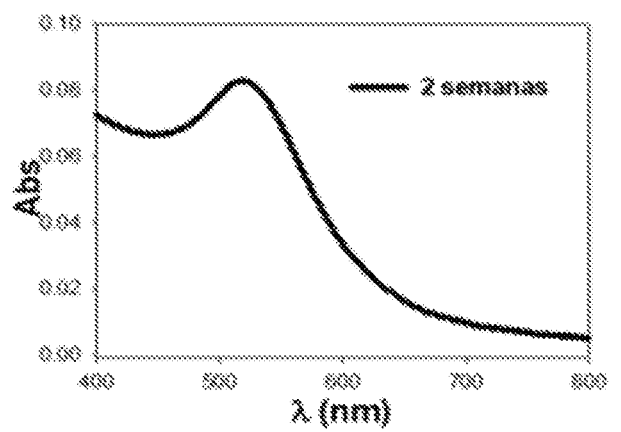


Fig.6E

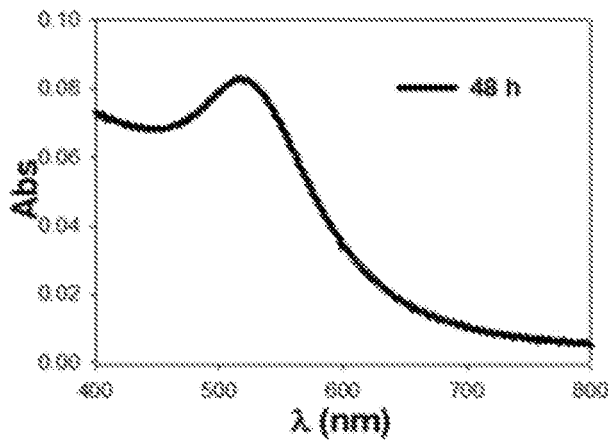


Fig.6C

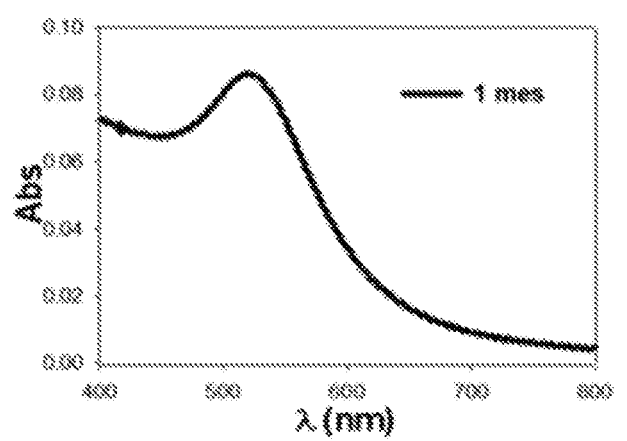


Fig.6F

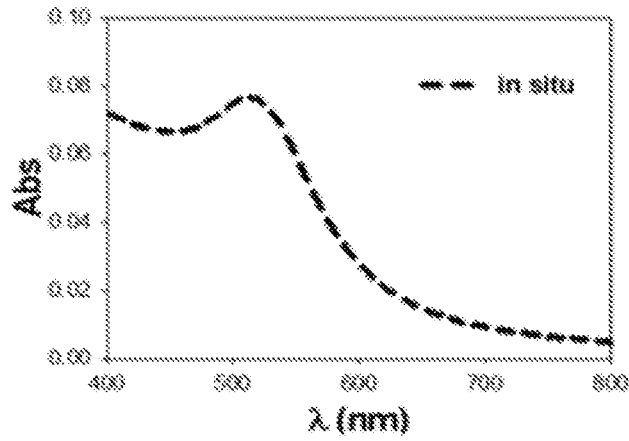


Fig.6G

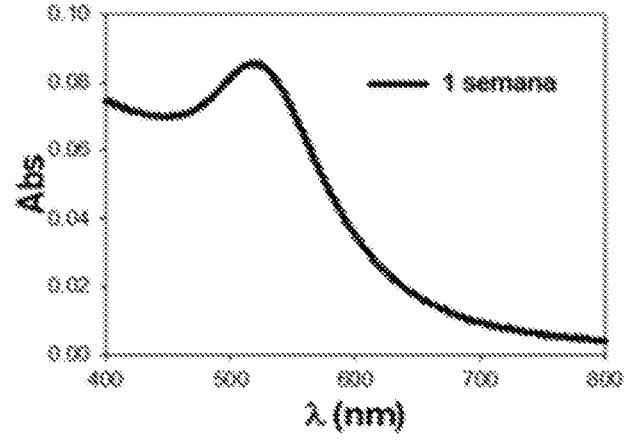


Fig.6J

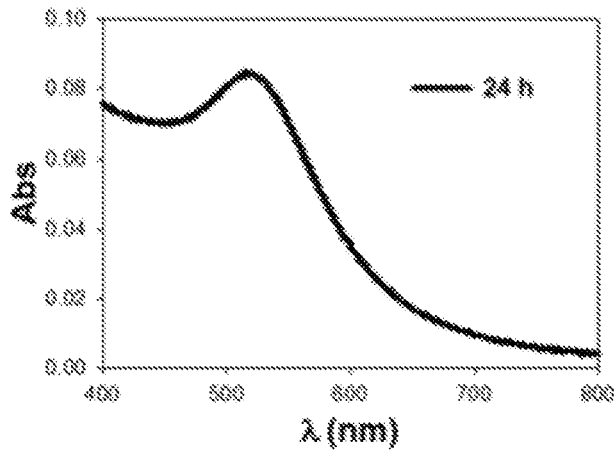


Fig.6H

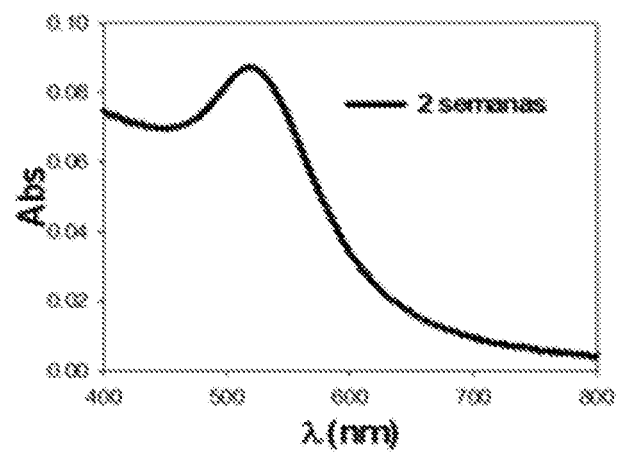


Fig.6K

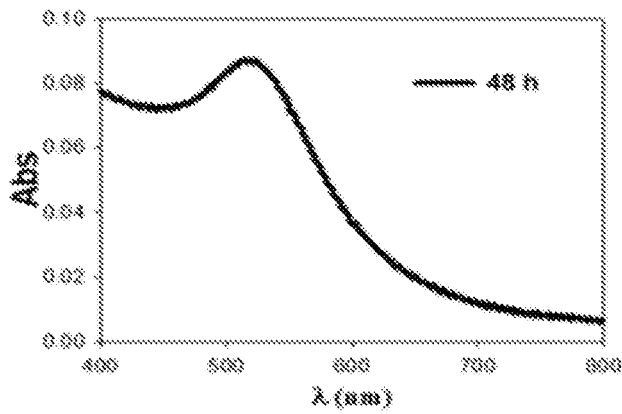


Fig.6I

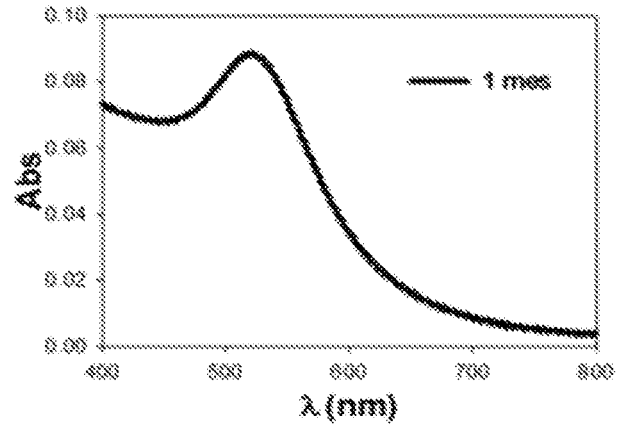


Fig.6L

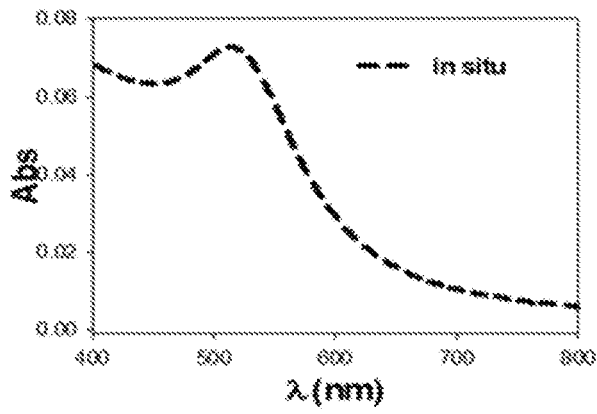


Fig.6M

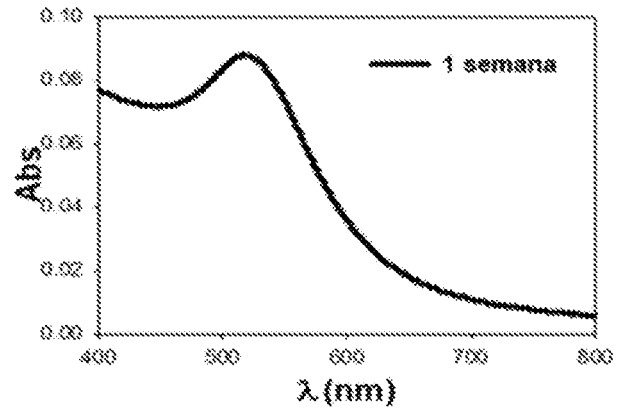


Fig.6P

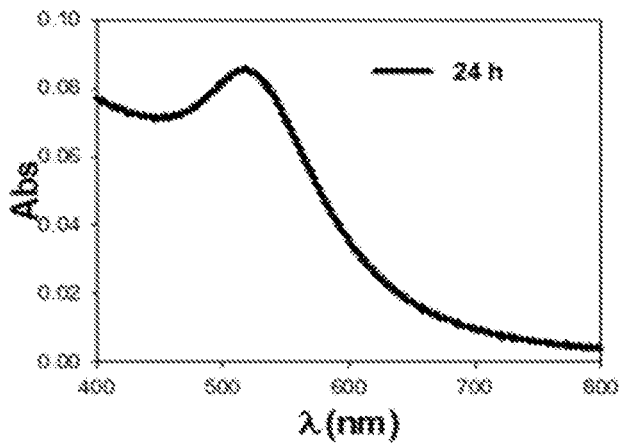


Fig.6N

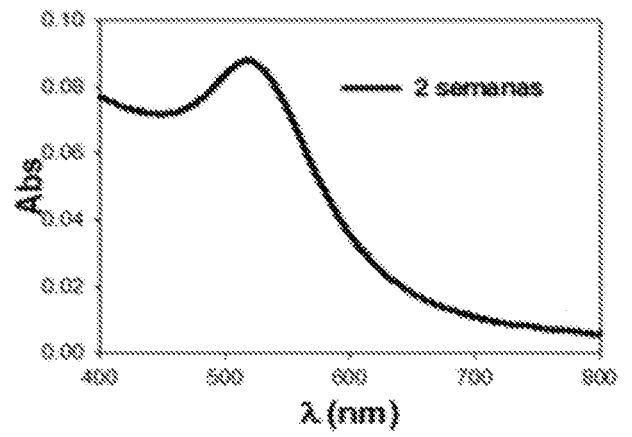


Fig.6Q

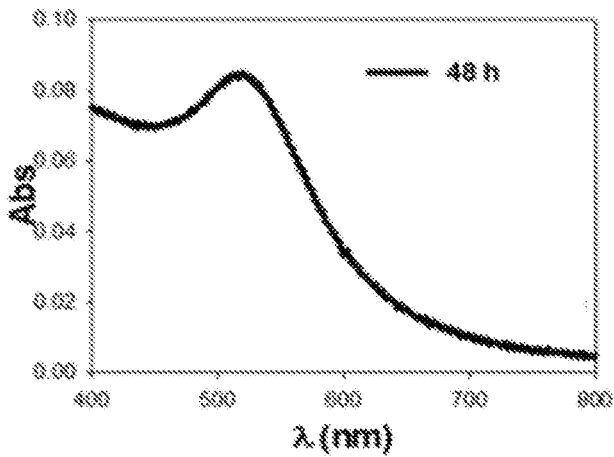


Fig.6O

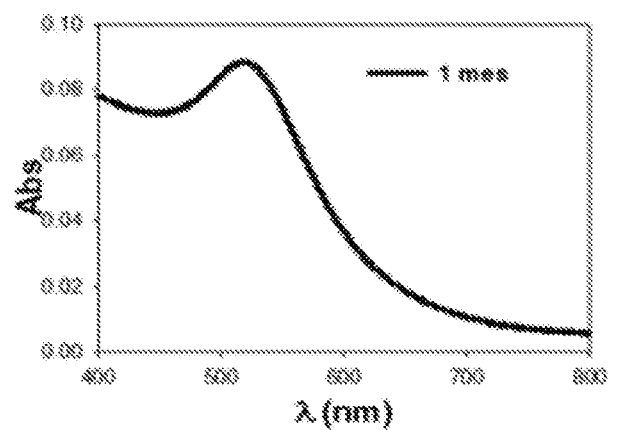


Fig.6R

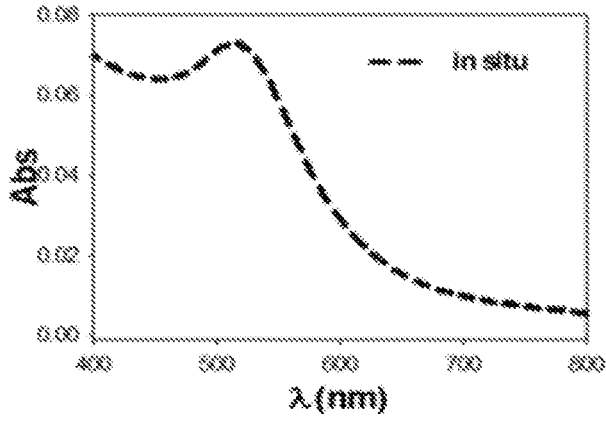


Fig.6S

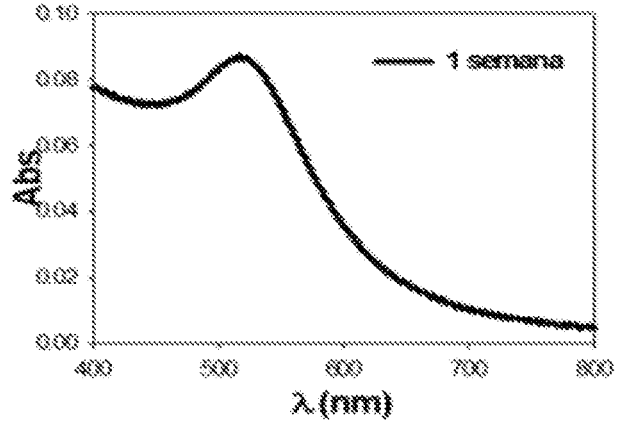


Fig.6V

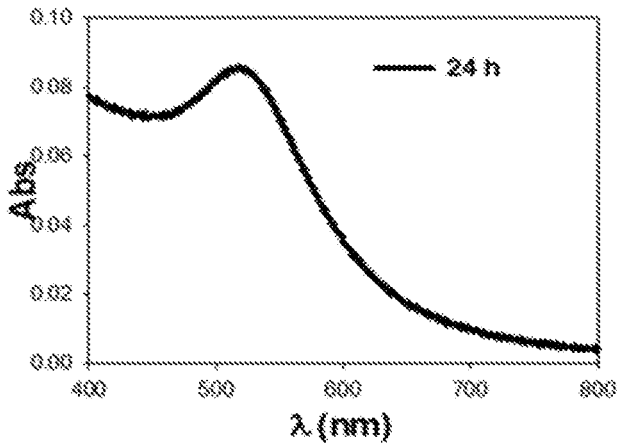


Fig.6T

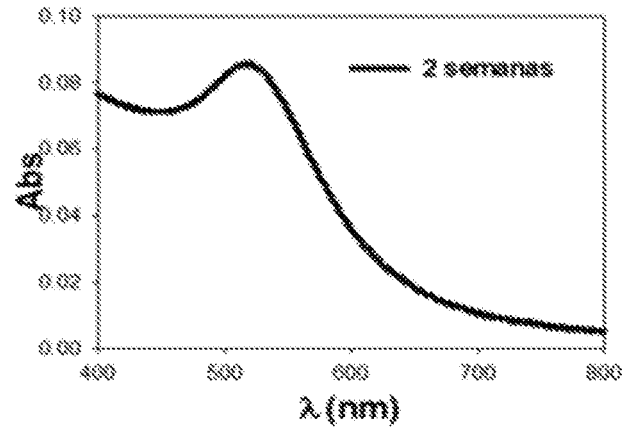


Fig.6W

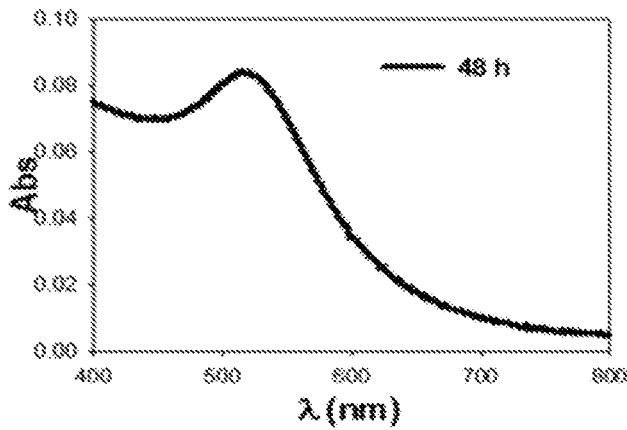


Fig.6U

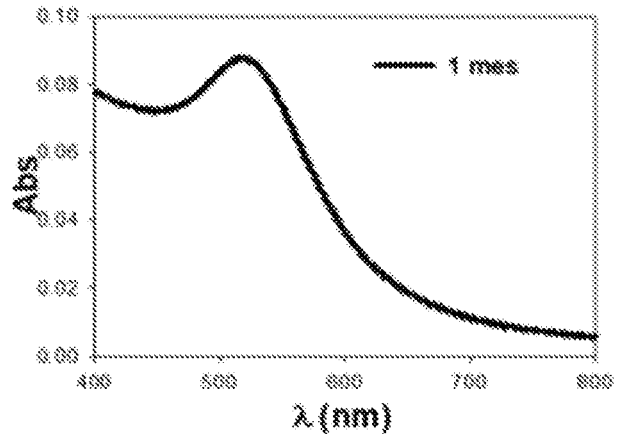


Fig.6X

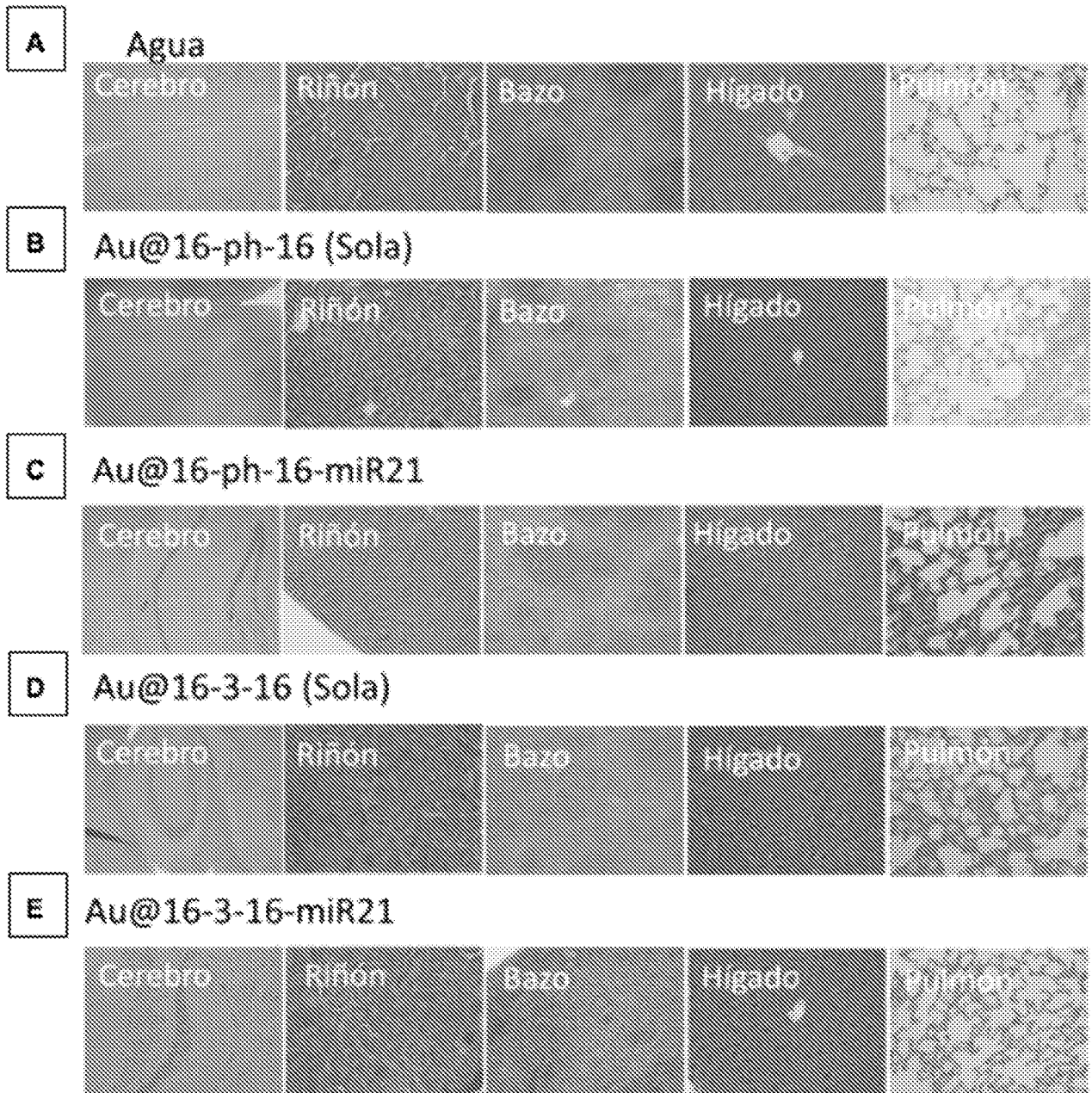
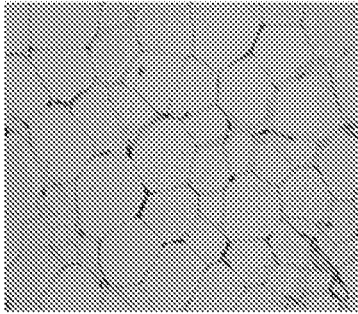
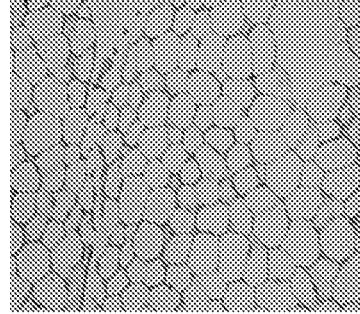


Fig.7

Sólo nano Aug@16-ph-16
VAT



Sólo nano Aug@16-ph-16
SAT (inguinal)

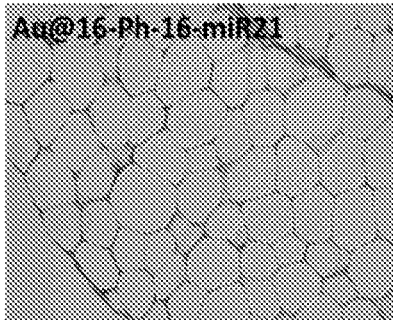


(VAT)

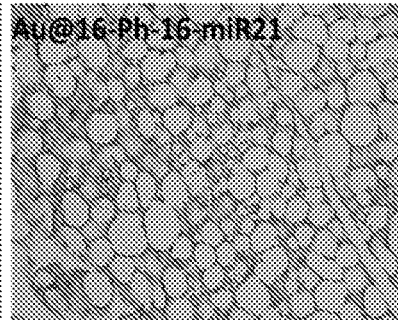
(SAT Inguinal)

(SAT Inguinal)

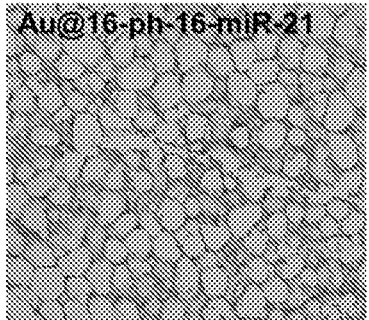
Au@16-Ph-16-miR21



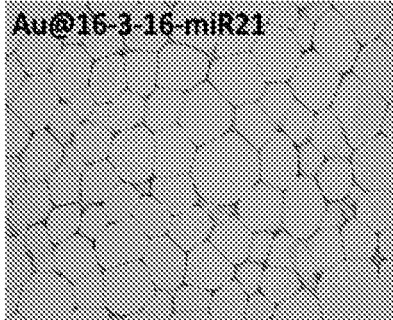
Au@16-Ph-16-miR21



Au@16-ph-16-miR-21



Au@16-3-16-miR21



Au@16-3-16-miR21



Au@16-3-16-miR-21

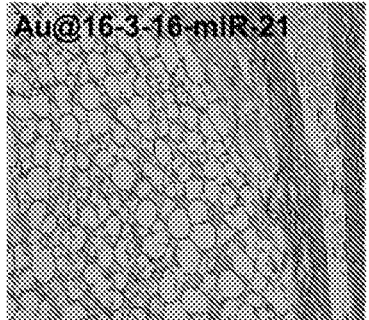


Fig. 8

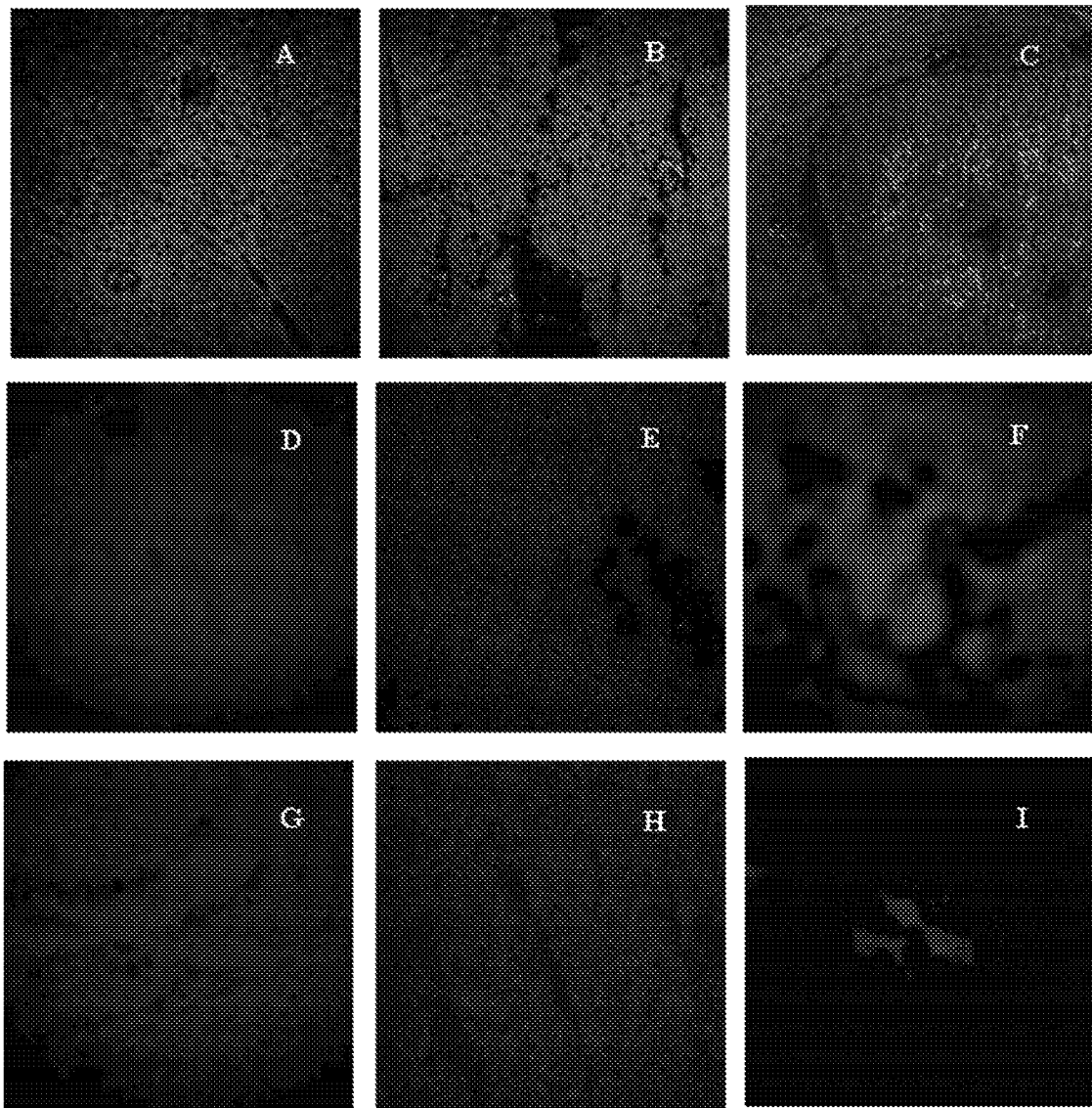


Fig. 9

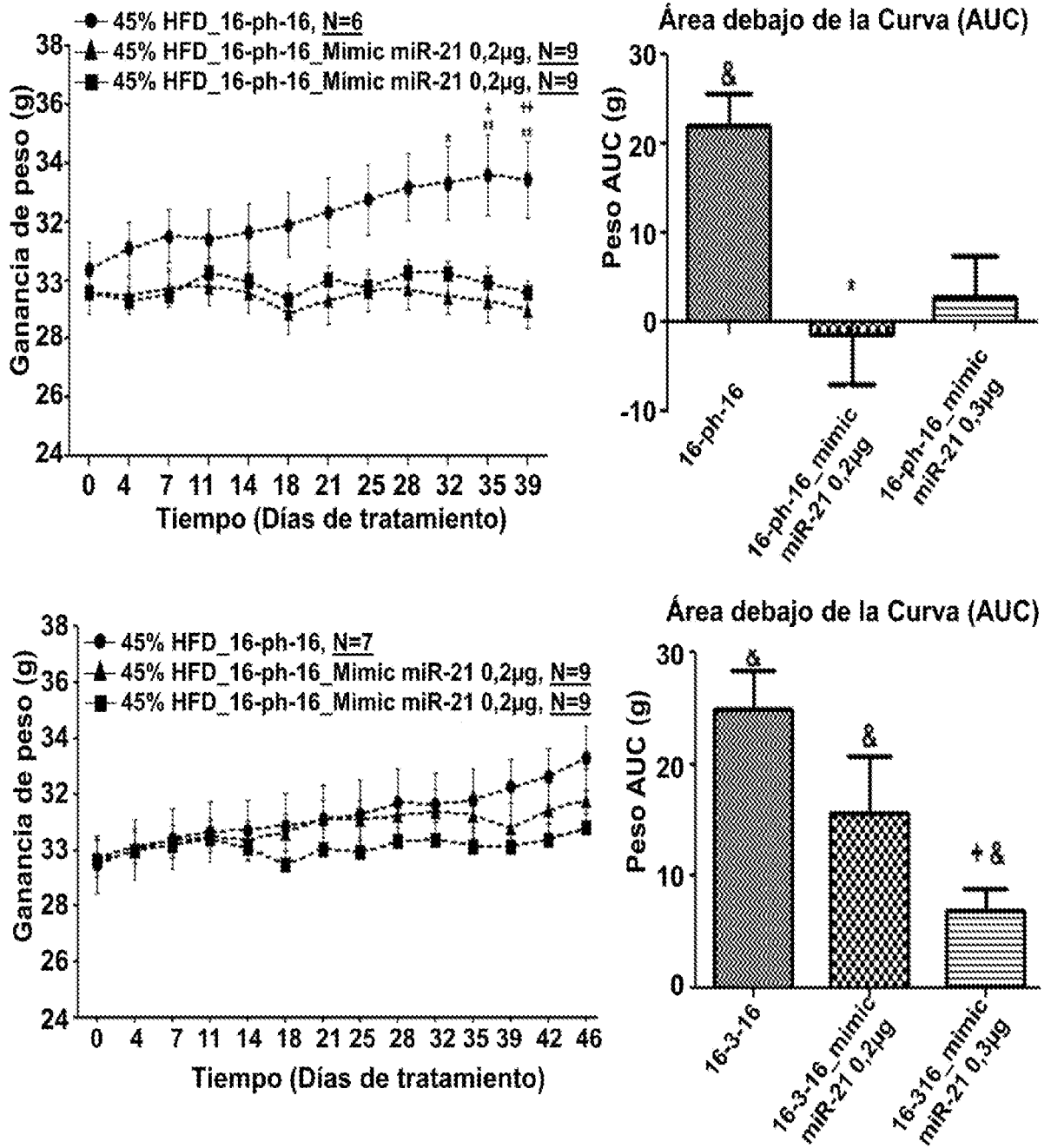
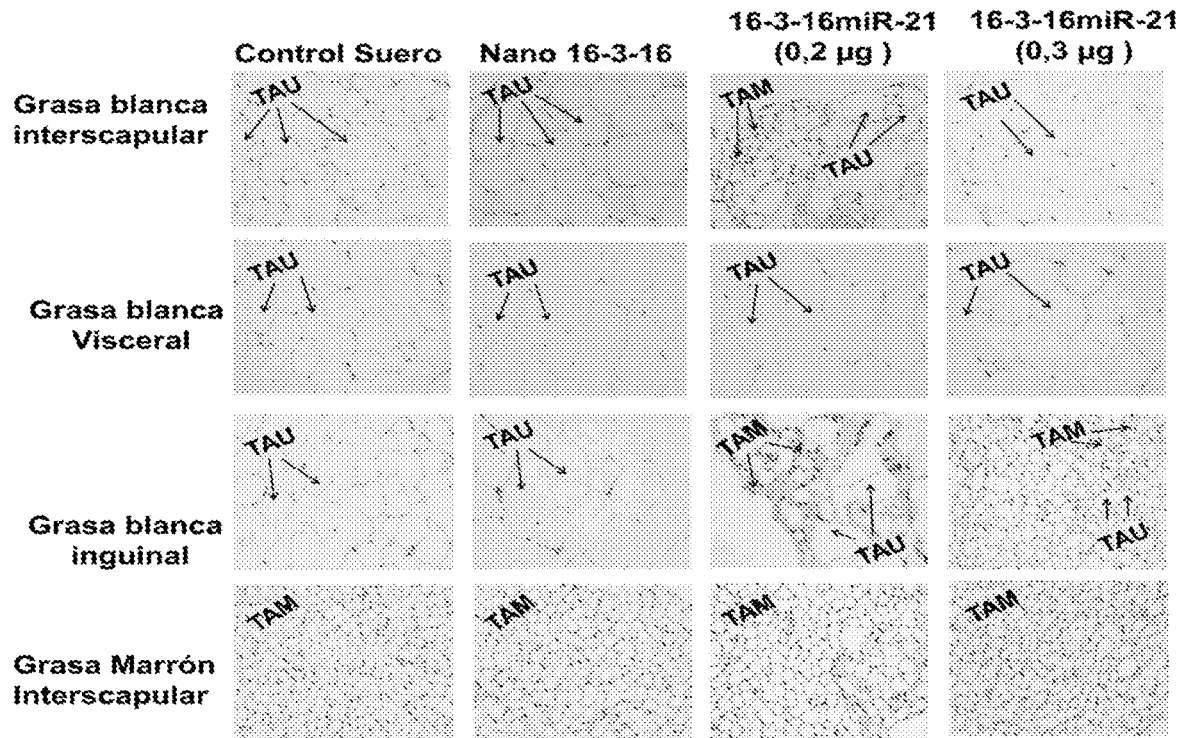


Fig.10



TAU: Tejido adiposo Unilocular
 TAM: Tejido adiposo multilocular

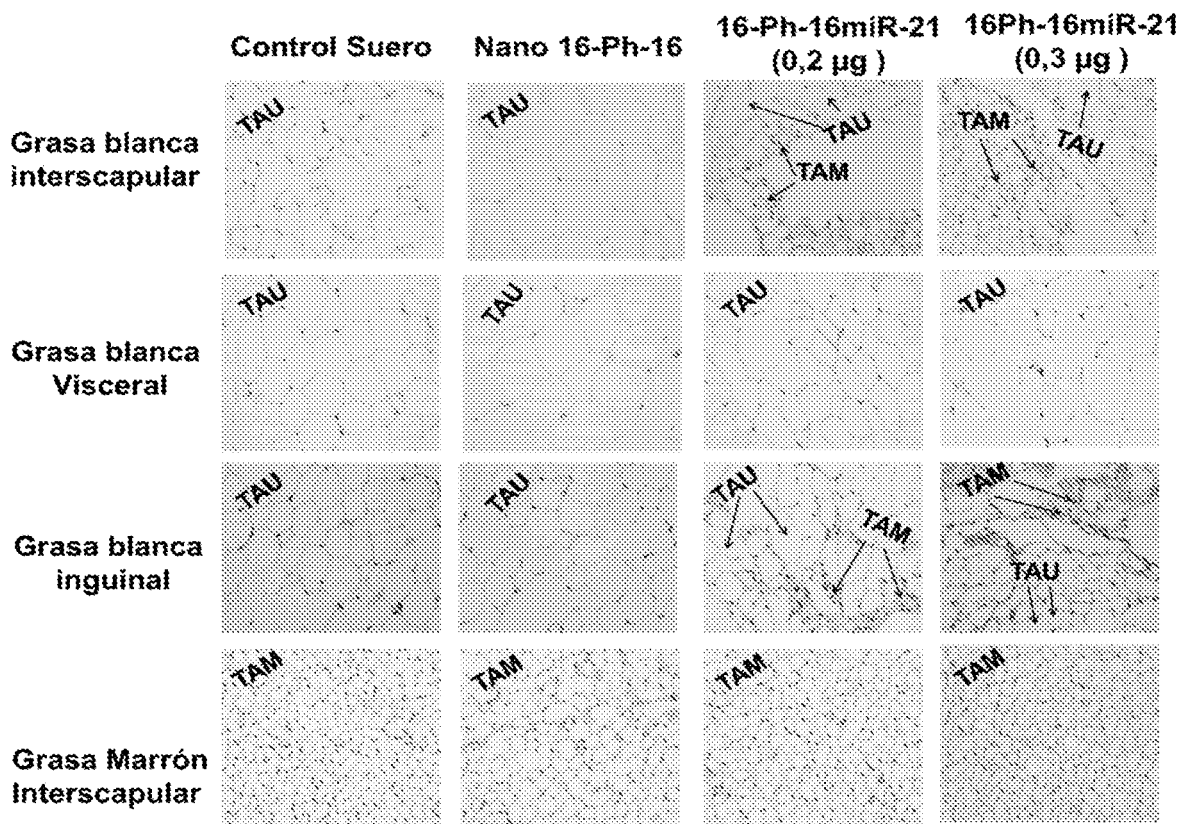


Fig.11

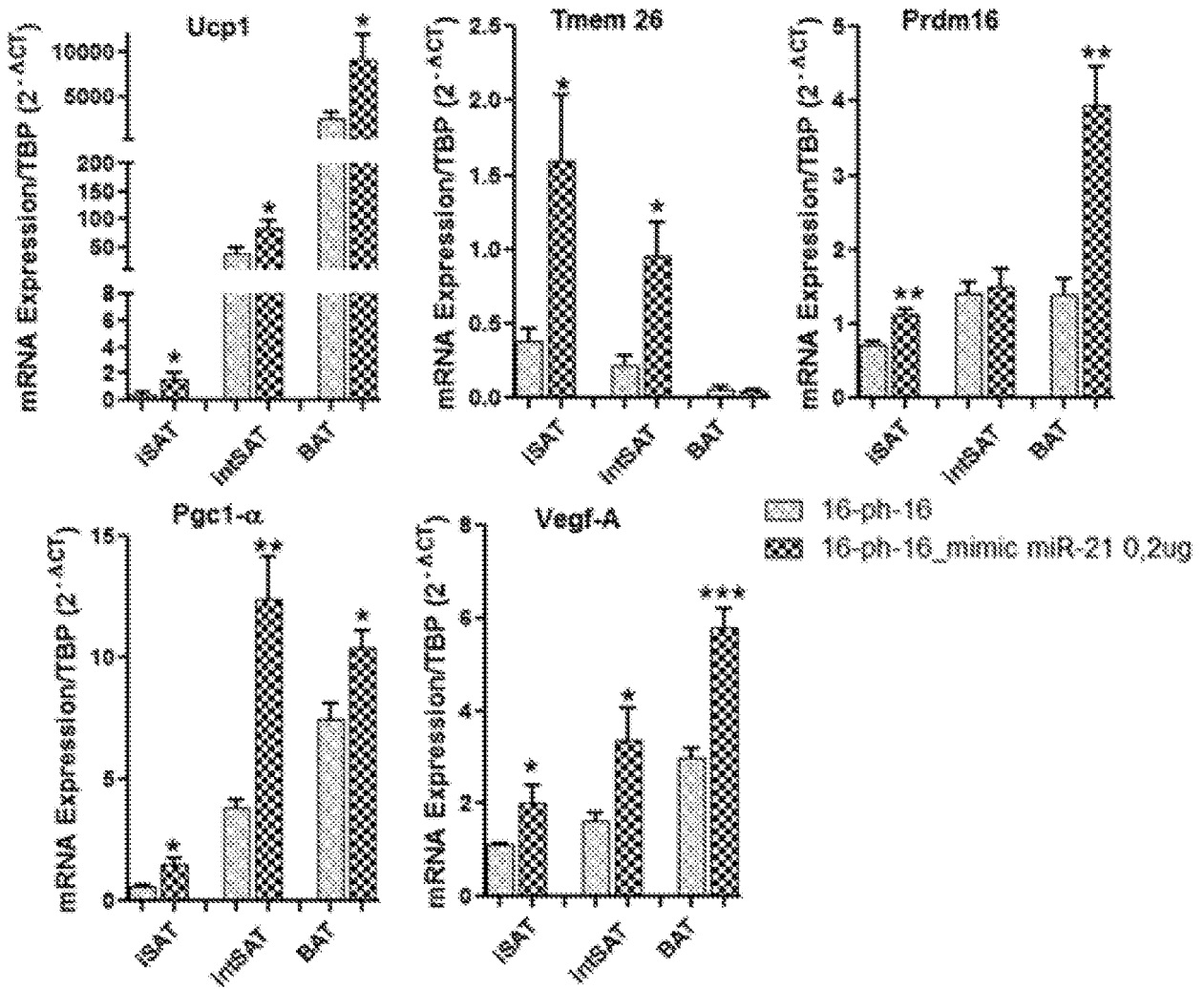


Fig.12

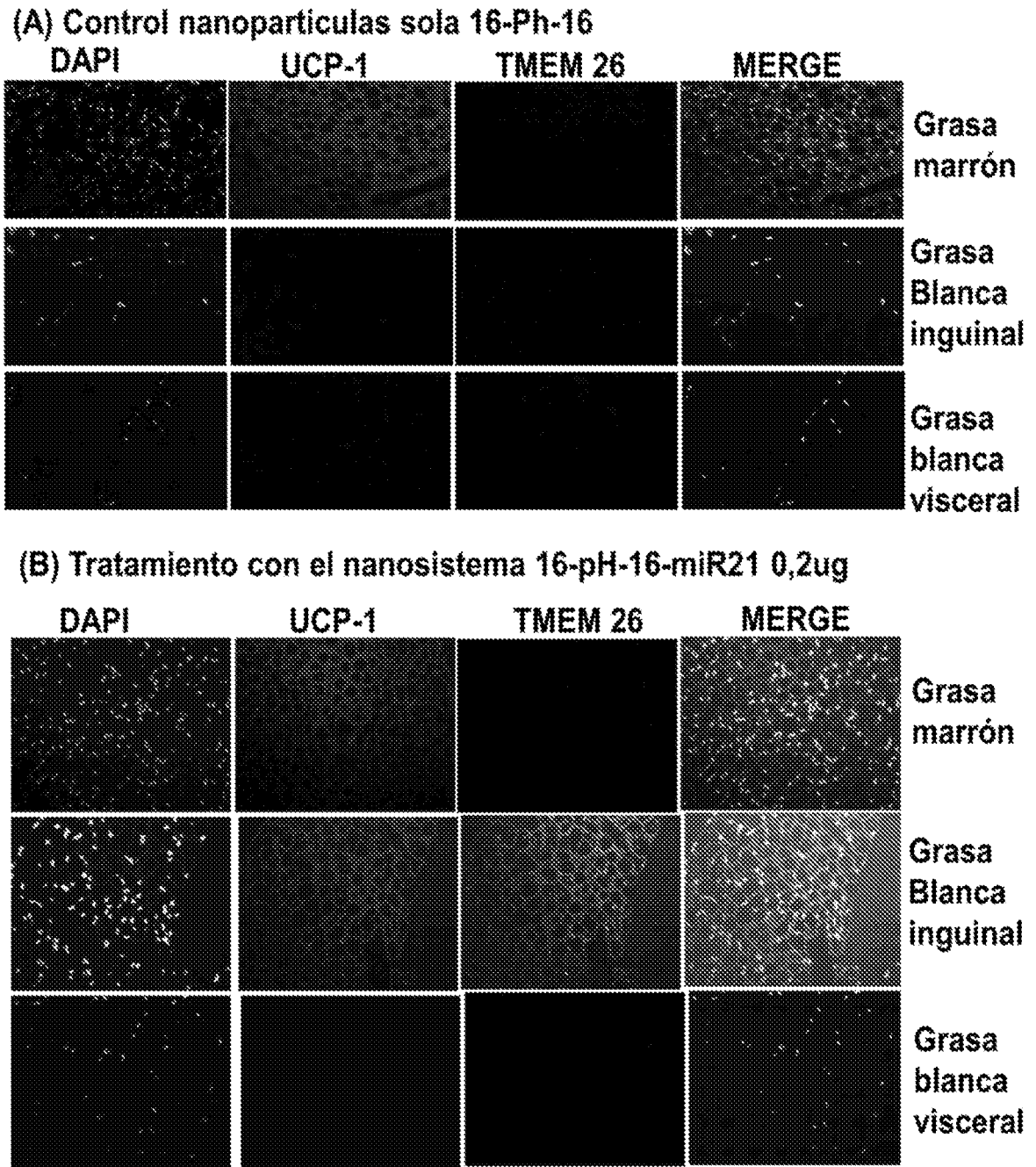
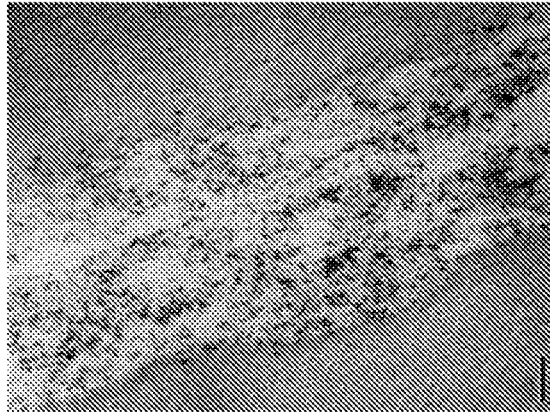


Fig.13

Control



Au@16-ph-16-miR21

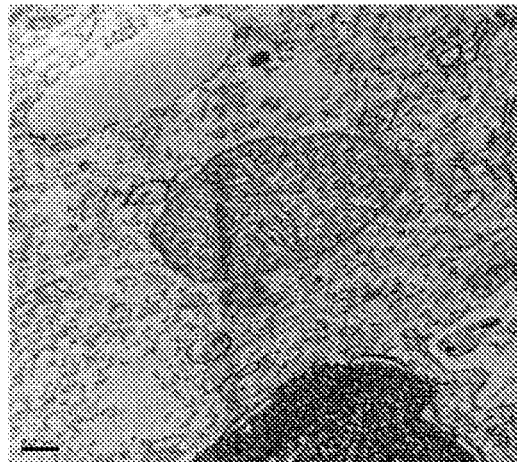
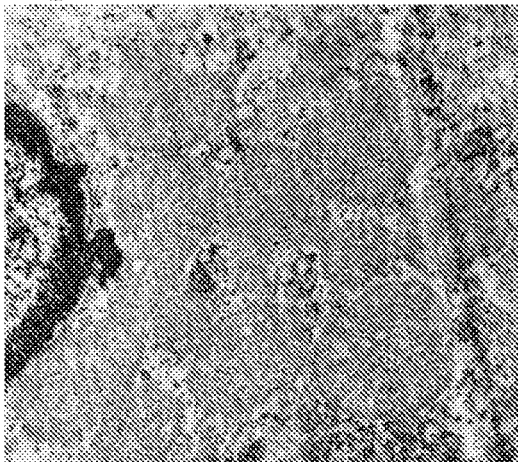


Fig.14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2020/070104

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N, A61K

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, Z. et al. Microarc-oxidized titanium surfaces functionalized with microRNA-21-loaded chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promote the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. International Journal Of Nanomedicine, 2015, Vol. 10, pages 6675-6687, ISSN: 1178-2013(print), ISSN: 1178-2013(electronic), <DOI: 10.2147/IJN.S94689> Results, Conclusions	1, 14-16
Y		17-19, 20-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30/06/2020

Date of mailing of the international search report
(30/06/2020)

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer
J. Vizán Arroyo

Telephone No. 91 3498573

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070104

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LHAMYANI S et al.. The effect of miR-21 on beige adipose tissue increase and its relationship with obesity . Diabetologia., Aug 2016, Vol. 59, No. Suppl. 1, Pags S287-S288, ISSN: 0012-186X(print), ISSN: 1432-0428(electronic). 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), Munich, Germany. 12 to 16, Sep. 2016. Abstract No. 605. [on line][retrieved on 22/06/2020]. Retrieved of <URL: https://www.easd.org/virtualmeeting/home.html#resources/the-effect-of-mir-21-on-beige-adipose-tissue-increase-and-its-relationship-with-obesity >,	17-19
Y	CAIXAS A. Pharmacological treatment of obesity. Endocrinologia y Nutricion, 2000, Vol. 47, N° 1, pages 16 - 30 [on line][retrieved the 22/06/2020]. Retrieved of <URL: https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-tratamiento-farmacologico-obesidad-9266 >, ISSN 1575-0922 (print) the whole document.	20-22
A	WO 2014022852 A1 (APTAMIR THERAPEUTICS INC) 06/02/2014, the whole document.	1-31
A	ZAIYOU, M. et al., The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. Nutrition, Metabolism And Cardiovascular Diseases, 01/02/2018, Vol. 28, N° 2, pages 91 - 111, ISSN 0939-4753 (print) ISSN 1590-3729 (electronic), <DOI: 10.1016/j.numecd.2017.10.015 pubmed:29170059> the whole document.	1-31
A	IACOMINO, G. et al., Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. Genes And Nutrition, 2017, Vol. 12, N° 23, pages 1555-8932, ISSN: 1555-8932 (print), ISSN: 1865-3499 (electronic), <DOI: 10.1186/s12263-017-0577-z> the whole document.	1-31
A	CREW ELIZABETH et al.. MicroRNA conjugated gold nanoparticles and cell transfection.. Analytical Chemistry, 03/01/2012, Vol. 84, N° 1, pages 26 - 29, ISSN 1520-6882 (Electronic), <DOI: 10.1021/ac202749p pubmed:22148593> the whole document.	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2020/070104

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GHOSH RAJIB et al.. A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells. <i>Biomaterials</i> , 31/12/2012, Vol. 34, N° 3, pages 807-816, ISSN 0142-9612(print) ISSN 1878-5905(electronic), <DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.023> the whole document.	1-31
A	WANG WENTAO et al.. Seeded growth of gold nanoparticles in aqueous solution of cationic gemini surfactants with different spacer length: influences of molecular and aggregate structures. <i>Journal Of Nanoparticle Research</i> , 25/01/2019, Vol. 21, N° 2, pages 1 - 13, ISSN 1388-0764, <DOI: 10.1007/s11051-019-4465-x> the whole document.	1-31
A	TIWARI A K et al.. Study on metal nanoparticles synthesis and orientation of gemini surfactant molecules used as stabilizer. <i>Journal of Colloid and Interface Science</i> , 01/05/2015, Vol. 445, pages 76 - 83, ISSN 0021-9797 (print) ISSN 1095-7103 (electronic), <DOI: 10.1016/j.jcis.2014.12.064> the whole document.	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2020/070104

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2014022852 A1	06.02.2014	HK1211317 A1 US2015216892 A1 CA2880833 A1 EP2880161 A1	20.05.2016 06.08.2015 06.02.2014 10.06.2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070104

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/113 (2010.01)
A61K31/7105 (2006.01)
A61K47/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2020/070104

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N, A61K

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WANG, Z. et al. Microarc-oxidized titanium surfaces functionalized with microRNA-21-loaded chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promote the osteogenic differentiation of human bonemarrow mesenchymal stem cells. International Journal Of Nanomedicine, 2015, Vol. 10, páginas 6675-6687, ISSN: 1178-2013(print), ISSN: 1178-2013(electronic), <DOI: 10.2147/IJN.S94689> Resultados, Conclusiones	1, 14-16
Y		17-19, 20-22

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

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
30/06/2020

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
30 de junio de 2020 (30/06/2020)

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

Funcionario autorizado
J. Vizán Arroyo
Nº de teléfono 91 3498573

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070104

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	<p>LHAMYANI S et al.. The effect of miR-21 on beige adipose tissue increase and its relationship with obesity . Diabetologia,, Aug 2016, Vol. 59, No. Suppl. 1, Págs. S287-S288, ISSN: 0012-186X(print), ISSN: 1432-0428(electronic). Presentado en: 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), Munich, Germany. 12 a 16, Sep. 2016. Resumen No. 605.[en línea][recuperado el 22/06/2020]. Recuperado de <URL: https://www.easd.org/virtualmeeting/home.html#resources/the-effect-of-mir-21-on-beige-adipose-tissue-increase-and-its-relationship-with-obesity> ,</p>	17-19
Y	<p>CAIXAS A. Pharmacological treatment of obesity. Endocrinología y Nutricion, 2000, Vol. 47, Nº 1, páginas 16 – 30, ISSN 1575-0922 (print). [en línea] [recuperado el 22/06/2020]. Recuperado de <URL: https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-tratamiento-farmacologico-obesidad-9266> , todo el documento.</p>	20-22
A	<p>WO 2014022852 A1 (APTAMIR THERAPEUTICS INC) 06/02/2014, todo el documento.</p>	1-31
A	<p>ZAIYOU, M. et al., . The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 01/02/2018, Vol. 28, Nº 2, páginas 91 - 111, ISSN 0939-4753 (print) ISSN 1590-3729 (electronic), <DOI: 10.1016/j.numecd.2017.10.015 pubmed:29170059> todo el documento.</p>	1-31
A	<p>IACOMINO, G. et al.,. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. Genes And Nutrition, 2017, Vol. 12, Nº 23, páginas 1555-8932, ISSN: 1555-8932 (print), ISSN: 1865-3499 (electronic), <DOI: 10.1186/s12263-017-0577-z> todo el documento.</p>	1-31
A	<p>CREW ELIZABETH et al.. MicroRNA conjugated gold nanoparticles and cell transfection.. Analytical Chemistry, 03/01/2012, Vol. 84, Nº 1, páginas 26 - 29, ISSN 1520-6882 (Electronic), <DOI: 10.1021/ac202749p pubmed:22148593> todo el documento.</p>	1-31

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070104

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	<p>GHOSH RAJIB et al.. A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells. <i>Biomaterials</i>, 31/12/2012, Vol. 34, Nº 3, páginas 807-816, ISSN 0142-9612(print) ISSN 1878-5905(electronic), <DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.023> todo el documento.</p>	1-31
A	<p>WANG WENTAO et al.. Seeded growth of gold nanoparticles in aqueous solution of cationic gemini surfactants with different spacer length: influences of molecular and aggregate structures. <i>Journal Of Nanoparticle Research</i>, 25/01/2019, Vol. 21, Nº 2, páginas 1 - 13, ISSN 1388-0764, <DOI: 10.1007/s11051-019-4465-x> todo el documento.</p>	1-31
A	<p>TIWARI A K et al.. Study on metal nanoparticles synthesis and orientation of gemini surfactant molecules used as stabilizer. <i>Journal of Colloid and Interface Science</i>, 01/05/2015, Vol. 445, páginas 76 - 83, ISSN 0021-9797 (print) ISSN 1095-7103 (electronic), <DOI: 10.1016/j.jcis.2014.12.064> todo el documento.</p>	1-31

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2020/070104

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2014022852 A1	06.02.2014	HK1211317 A1 US2015216892 A1 CA2880833 A1 EP2880161 A1	20.05.2016 06.08.2015 06.02.2014 10.06.2015

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

C12N15/113 (2010.01)
A61K31/7105 (2006.01)
A61K47/00 (2006.01)