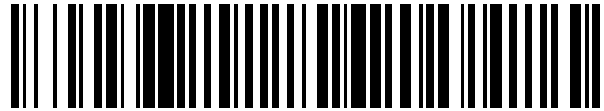


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 472**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/89** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.1999 E 04030257 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1522578**

54 Título: **Transferencia de materiales en células utilizando silicio poroso**

30 Prioridad:

**22.07.1998 GB 9815819**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2013**

73 Titular/es:

**PSIMEDICA LIMITED (100.0%)  
MALVERN HILLS SCIENCE PARK, GERALDINE  
ROAD  
MALVERN, WORCESTERSHIRE, WR14 3SZ, GB**

72 Inventor/es:

**CANHAM, LEIGH TREVOR**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 400 472 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Transferencia de materiales en células utilizando silicio poroso.

Esta invención se relaciona con formas de transferencia de materiales en células.

Se presentan ocasiones en donde es necesario transferir materiales en células, por ejemplo ácidos nucleicos o construcciones de ácido nucleico, tales como vectores o plásmidos, etc. que se tienen que transferir en una célula para propósitos de manipulación genética. Adicionalmente, también se necesita que se transfieran productos químicos a las células, por ejemplo nucleótidos o manchas, y productos químicos que afectan la fisiología de una célula. Se han desarrollado una serie de procesos químicos y físicos para transportar materiales a las células. Estas técnicas incluyen:

1. microinyección directa - se inserta una aguja en una célula y el material se expelle a través de la aguja;

2. electroporación - la membrana celular se hace permeable a algunas moléculas mediante aplicación de una descarga de alto voltaje;

3. biolística – las partículas de tungsteno u oro se recubren con la sustancia deseada que se va a introducir y se disparan en la célula;

4. co-precipitación de fosfato de calcio – las células absorben fosfato de calcio, y si se coprecipita ADN/otro material con el fosfato de calcio este también se toma en la célula;

5. transformación mediada (a través de liposomas, vectores víricos, o bacteriales); y

6. transformación de protoplasto.

Un objetivo de un aspecto de la presente invención es utilizar un nuevo material para ayudar en la transferencia de sustancias a las células.

La presente invención proporciona una forma mejorada para proporcionar pequeños volúmenes de una sustancia.

La microinyección directa implica la inserción mediante una microaguja de ADN directamente en el núcleo de células individuales. Se utiliza una micropipeta de vidrio unida a un micromanipulador para inyectar  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$   $\mu$ l de material, normalmente una solución de fragmentos de ADN, en los núcleos celulares. Los "impactos" casi con seguridad, son dados por la experticia del operador, pero la técnica es laboriosa y no se puede aplicar a un gran número de células.

La presente invención se define en y mediante las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con un primer aspecto la invención comprende un vehículo para transferir una sustancia dentro de la célula, el vehículo comprende una partícula de poro submicrónico o silicio policristalino y un material que se va a transferir en una célula y en donde el silicio es reabsorbible.

Preferiblemente se utiliza silicio poroso reabsorbible o bioerosionable.

El vehículo puede comprender, por lo menos en parte, silicio poroso, y el material que se va a transferir en la célula.

Preferiblemente el silicio poroso es reabsorbible. El vehículo puede comprender un proyectil biolístico de silicio poroso. El vehículo puede comprender una sustancia que en uso coprecipitará con una sustancia co-precipitada que se pone en la célula. El vehículo puede comprender un electrodo de silicio poroso eléctricamente conductor.

La invención permite el uso de silicio poroso como un medio de transferencia para transferir materiales en una célula viva.

Se ha descubierto que el silicio poroso es biocompatible, y ahora se ha descubierto que el silicio poroso se puede corroer en, o reabsorber en, un organismo mamífero sin efecto perjudicial significativo. Se puede utilizar silicio poroso para ubicar y sustancialmente inmovilizar materiales biológicos (o cualesquier sustancia que se introduzca en una célula), con la sustancia que está suficientemente libre una vez en la célula para combinarse con el ADN celular, o de otra forma ser liberado para que tenga un efecto.

De la Solicitud de Patente PCT No. WO 96/10630 se conoce una matriz de púas o puntas de silicio micromecanizadas que se utilizan mecánicamente para perforar la membrana de plasma de grandes series de células simultáneamente. Esto es más eficiente que perforar una sola célula con una única aguja, lo que puede resultar en una operación laboriosa si se necesita introducir material en cientos de células. Las puntas del documento WO 96/10630 son, en retrospectiva, menos efectivas en la transferencia de material (por ejemplo ADN) en una célula perforada de lo que podrían ser. Por ejemplo, se propone en ese documento utilizar fuerzas de tensión superficial entre las puntas poco distantes para sujetar el material biológico que se va a introducir en las células en los espacios entre las puntas, y atraparlos entre las puntas (sondas) y el sustrato.

- 5 En el documento US 5 262 128 se describe una propuesta que se publicó en 1993 y pretende enseñar al experto en la técnica a producir una matriz de agujas de silicio que utiliza los Procesos de Liga. Se considera que este documento no es favorable en su fecha de presentación (y publicación). En 1989 cuando se presentó la solicitud, y en 1993 cuando se publicó, la persona medianamente versada en la técnica no podía producir agujas de silicio muy finas que tuvieran un lumen central como se discute en este documento que utiliza las técnicas discutidas. El Proceso de Liga no es adecuado para fabricar agujas huecas en silicio, y no permite que se realicen estructuras inclinadas.
- El documento US 5 457 041 describe una matriz de agujas sólidas hechas de silicio que tienen puntas irregulares.
- El documento US 5 591 139 describe una microaguja de silicio que se forma en el plano de una placa de silicio.
- 10 El documento WO 97/06101 describe un método para producir silicio bioactivo como una placa, y sugiere usos para el silicio bioactivo en la fabricación de biosensores y en bioensayos.
- El documento WO 92/01802 describe la idea de poner una sustancia en una célula al incorporar la sustancia en un líquido y hacer las partículas del líquido, y luego acelerar las partículas de hielo para penetrar las células, las partículas de hielo se funden después de la penetración celular.
- 15 El documento JP 06 034 361 describe una punta microscópica de fuerza atómica de silicio poroso. El dispositivo no penetra la superficie que se va a examinar.
- El documento US 4 969 468 describe agujas de metal sólidas para contacto eléctrico con nervios.
- La invención puede comprender un elemento que penetra la célula hecho de silicio poroso.
- El elemento que penetra la célula se puede adaptar para tener una sustancia que se va a introducir en una célula transportada por el silicio poroso.
- 20 La invención puede comprender un elemento que penetra la célula o un microperforador que comprende por lo menos una región de silicio poroso. Preferiblemente la sustancia comprende ADN o ARN, un fragmento de ADN o ARN, o una construcción de ADN o ARN.
- El elemento que penetra la célula se adapta preferiblemente para que tenga una sustancia que se va a introducir a una célula transportada por el silicio.
- 25 La región de silicio poroso se adapta para inmovilizar una sustancia (por ejemplo ADN) en comparación con su movilidad cuando se proporciona con una sustancia bioinerte tal como titanio. La región de silicio poroso puede estar en la punta del elemento que penetra la célula. El elemento que penetra la célula puede tener una capilaridad o red de poro que se extiende desde un reservorio o canal hasta una región de suministro de sustancia proporcionada sobre la superficie del elemento que penetra la célula.
- 30 El elemento que penetra la célula puede tener un recubrimiento de silicio poroso, o puede ser poroso a lo largo de su sección transversal, por lo menos en su punta (u otra región de suministro de sustancia si esa no está en la punta). Sustancialmente la superficie exterior entera del elemento que penetra la célula que penetra una célula en uso puede comprender silicio poroso. El elemento que penetra la célula puede ser una serie de micropuntas de silicio con un recubrimiento de silicio poroso.
- 35 Una ventaja de contener la sustancia que se va a introducir a la célula en la punta del elemento que penetra la célula es que el material se introduce de forma definitiva en la célula, y normalmente en lo profundo de la misma. Esto puede aumentar el índice de éxito de la operación (en muchos casos introducir ADN en células y la absorción estable del ADN/fragmento no es estadísticamente muy exitosa - un pequeño porcentaje puede tener éxito, es por eso que se tienen que inyectar muchas células).
- 40 En lugar de utilizar silicio poroso para inmovilizar el material sobre la punta/asegurar por lo menos algo del material que está presente sobre la punta, se pueden utilizar otros medios de sujeción. Por ejemplo, el silicio policristalino puede sujetar algunas sustancias en los límites del grano. Los medios de sujeción pueden comprender un material poroso.
- 45 Se conoce la inmovilización de fragmentos de ADN en silicio macroporoso en el campo de un genosensor de paso de flujo (Advances in Genosensor Research. K.L. Beattie et al. Clin. Chem. 41, 700 (1995)).
- Una ventaja del silicio poroso es que su bioactividad se puede ajustar al controlar su tamaño de poro y porosidad. Por lo tanto es posible crear un elemento que penetre la célula con punta porosa con poros adaptados para sujetar/inmovilizar una molécula o sustancia deseada particular. Por supuesto, la sustancia no se inmovilizará de tal manera que por lo menos algo del material no pueda salir de la punta cuando la punta esté en la célula.
- 50

El silicio poroso tiene otra gran ventaja ya que existe la selección de material para un elemento que penetra la célula en aquellas técnicas de micromaquinización para fabricar dispositivos a pequeña escala de silicio, por ejemplo en la industria de electrónicos.

Se sabe cómo hacer una estructura de silicio porosa (ver por ejemplo US 5 348 618).

5 Se puede proporcionar una matriz de elementos que penetran la célula.

También se conoce una matriz de micropuntas para un propósito completamente diferente – para cátodos de emisión de campo utilizados en aplicaciones microelectrónicas de vacío. Aquí, un chip de silicio de 5 mm cuadrados normalmente contiene aproximadamente 500 micropuntas de forma piramidal con anchuras de punta de 50nm – 1µm y alturas de 10 – 100µm, dependiendo de los parámetros de fabricación seleccionados. En retrospectiva, esto sería adecuado para la porosificación y luego para el uso como microperforadores para transferir una sustancia en las células. Incluso también se conocen que tienen cátodos piramidales de silicio poroso - por ejemplo emisión de campo a partir de cátodos piramidales cubiertos en silicio poroso. P.R. Wilshaw et al. J. Vac. Sci. Techn. B12,1 (1994); Fabrication of Si field emitters by forming porous silicon. D. Kim et al. J. Vac. Sci. Techn. B14, 1906 (1996); y Porous silicon field emission cathode development. J.R. Jessing et al. J. Vac. Sci. Techn. B14, 1899 (1996). Sin embargo, estos existen en un campo totalmente diferente, y ninguno muestra un microperforador que se mantenga sobre el ADN, ARN, o cualquier otra sustancia que se va a introducir en una célula.

El vehículo para transferir material en una célula, puede comprender por lo menos en parte material reabsorbible.

El vehículo puede comprender silicio reabsorbible, tal como silicio poroso, o silicio policristalino. La totalidad del vehículo se puede hacer del material reabsorbible, o solo parte de este. El vehículo puede comprender silicio bioactivo. (Por “reabsorbible” se entiende que el material se corroe/absorbe/erosiona/ o de otra forma desaparece in situ en fluidos fisiológicos. Por “bioactivo” se entiende que el material puede inducir la sedimentación de precipitados de fosfato de calcio sobre su superficie bajo condiciones fisiológicas (cuando está en fluidos corporales)).

Si se retiene el vehículo en la célula se absorberá/corroerá/erosionará o reabsorberá, o parcialmente se reabsorberá, y será menos que una irritación/ cuerpo extraño para la célula a su debido tiempo.

25 Se puede utilizar silicio reabsorbible/ otro material en un técnica biolística. Por ejemplo el vehículo para transferir material en una célula puede ser un proyectil biolístico.

El vehículo para transferir material en la célula puede comprender un proyectil biolístico que comprende silicio poroso.

El proyectil puede tener una sustancia que se introduce en la célula adherida a este. El proyectil se puede impregnar con material (por ejemplo material de ADN). Se puede saturar sustancialmente con material. El proyectil puede comprender una partícula de silicio submicrónica. La partícula de silicio se puede volver porosa mediante las técnicas de ataque de mancha. La partícula es preferiblemente mesoporosa.

Un proyectil biolístico reabsorbible no dejaría detrás en la célula una partícula, como los proyectiles biolísticos de oro o tungsteno. El proyectil no necesita ser poroso en todo el trayecto - puede tener un revestimiento poroso. El proyectil reabsorbible no se fabrica necesariamente de silicio poroso, o es todo de silicio, pero se ha identificado el silicio poroso como un material especialmente adecuado.

La invención permite un método para transferir material en una célula que comprende las etapas de disparar el vehículo que transporta dicho material en la célula. El vehículo puede ser un proyectil y preferiblemente se dispara el proyectil en la célula por medio de un gas presurizado, por ejemplo helio.

40 El proceso de biolístico biológico se utiliza a menudo en donde la mayoría de las técnicas estándar no funcionan. Los materiales impregnados reabsorbibles, tales como silicio poroso ofrecen ventajas biocompatibles sobre las series de materiales metálicos resistentes a corrosión.

La presente invención permite un método para fabricar un vehículo para transferir material en una célula que comprende las etapas de hacer el vehículo por lo menos parcialmente poroso e introducir al vehículo el material que se va a transferir a la célula.

Preferiblemente el vehículo comprende un proyectil de silicio, más preferiblemente una partícula de silicio submicrónica que se puede hacer porosa, preferiblemente mediante técnicas de ataque de mancha. El proyectil puede tener el material que se va a introducir a la célula, adherido a este o alternativamente se puede impregnar con el material.

50 El vehículo puede ser una partícula submicrónica y el material que se va a transferir se puede coprecipitar (con una sustancia precipitada) utilizando el vehículo como un sitio de nucleación.

El vehículo para transferir material en una célula puede comprender silicio bioactivo. El vehículo puede estar asociado con el material que se va a transferir en una forma adaptada para co-precipitar con una sustancia que ha sido tomada por las células. El coprecipitado puede ser un precipitado de fosfato de calcio.

5 La invención permite un método de introducción de material en una célula que comprende asociar el material con una partícula de silicio, precipitar el fosfato de calcio sobre la partícula para formar una partícula combinada de fosfato de calcio/silicio, y disponer la célula para que absorba la partícula combinada de fosfato de calcio/silicio de partícula combinación.

10 En la técnica de electroporación de la membrana celular puede hacerse permeable mediante la exposición de las células a un choque eléctrico breve de muy alta tensión. El silicio bioactivo de baja porosidad es eléctricamente conductor y está adecuadamente desarrollado como una matriz de acoplamiento íntimo de células adherentes de mamíferos que crecen en matrices de microelectrodos.

Al tener silicio bioactivo, por ejemplo silicio poroso o silicio policristalino, como uno o ambos electrodos en el aparato de electroporación se prevé que tiene lugar mejor transferencia de ADN.

15 La invención permite un método de electroporación que comprende proporcionar un electrodo bioactivo de silicio eléctricamente conductor.

Preferiblemente el método comprende cultivar células sobre el electrodo. El método puede comprender proporcionar una matriz de electrodos de silicio bioactivo, posiblemente con células que crecen en ellos. El electrodo, o electrodos, se pueden recubrir con silicio poroso o pueden ser de silicio poroso a lo largo de su sección transversal, por lo menos en una región de su altura.

20 La invención también permite un aparato de electroforesis que comprende un electrodo bioactivo. Preferiblemente el electrodo es silicio bioactivo, más preferiblemente silicio poroso. Se puede proporcionar una matriz de electrodos, o microelectrodos.

La invención también permite el uso de silicio bioactivo, preferiblemente silicio poroso, en la preparación de aparatos para la introducción de materiales en células.

25 Puede ser útil clarificar que los materiales bioactivos son una clase de materiales que cuando provocan in vivo una respuesta biológica específica esa resulta en la formación de un enlace entre el tejido vivo y ese material. Los materiales bioactivos también se conocen como biomateriales de superficie reactiva. Los materiales reabsorbibles son materiales que están diseñados para desaparecer o degradarse in vivo gradualmente con el tiempo, y pueden o no pueden ser reemplazados por tejido. Los materiales bioerosionables son materiales que se erosionan in vivo, con  
30 el material que posiblemente se absorbe por las células, o posiblemente no se absorba. Un material bioinerte es un material que no provoca una respuesta biológica local bruta in vivo.

Varias realizaciones de la presente invención se describirán ahora por medio solo de ejemplo con referencia a las Figuras, en las que:

La Figura 1 muestra un proyectil de silicio poroso impregnado con ADN;

35 La Figura 2 muestra un núcleo de silicio poroso impregnado con el ADN y rodeado por fosfato de calcio;

La Figura 3 ilustra una técnica de electroporación,

Las Figuras 4 y 5 muestran gráficos SIMS que demuestran la afinidad del ADN para el silicio poroso y que se pueden liberar desde una superficie de silicio poroso.

40 La Figura 1 muestra un proyectil biolístico 40 que comprende una partícula de silicio submicrónica que se hace mesoporosa mediante ataque con mancha.

45 En uso, el proyectil 40 se impregna con la sustancia que se va a introducir en una célula y se dispara en la célula utilizando helio presurizado. Como el silicio poroso es un material reabsorbible, preferiblemente se reabsorberá completamente, y por lo menos se reabsorberá parcialmente, por la célula a la que ingresa, y por lo tanto comprende menos de un cuerpo extraño que los proyectiles biolísticos tales como oro o tungsteno que llevan partículas de metal en la célula.

50 La Figura 2 muestra un núcleo de silicio poroso 50 impregnado con una sustancia que se introduce en una célula (por ejemplo ADN/ARN) y el precipitado de fosfato de calcio 52 formado alrededor del núcleo 50. El fosfato de calcio 52 se coprecipita con ADN/ARN, de tal manera que una capa de material genético/fosfato de calcio rodea el núcleo de silicio bioactivo 50. El núcleo de silicio bioactivo induce localmente la supersaturación de fosfato de calcio. Puede ser posible colocar un núcleo de silicio bioactivo junto a una célula/contra la pared de una célula, y co-precipitar ADN/Ca(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> contra el núcleo y contra la pared de la célula. Si el núcleo es fagocitado este se puede reabsorber.

El núcleo 50 no necesita tener sobre si ningún ADN/ARN/ni ninguna sustancia activa – puede servir simplemente como un buen sitio de nucleación para co-precipitación de ADN/Ca(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

Se conoce el uso de perlitas de vidrio como un sitio de nucleación para transfección de ADN por co-precipitación de fosfato de calcio – véase por ejemplo el documento de Watson y Latchman en "Methods (San Diego) 1996 10(3), 289-291 (Eng).

Se apreciará que los microporos son poros con un diámetro de 2 nm o menos; los mesoporos tienen un diámetro de 2 nm-50 nm y los macroporos tienen un diámetro de 50 nm o más.

También se ha dado cuenta de que es posible mejorar la eficiencia de la introducción de materiales a las células en una técnica de electroporación, como se muestra en la Figura 3, utilizando silicio poroso, preferiblemente silicio mesoporoso (pero también son útiles el silicio macroporoso y microporoso).

El uso de un electrodo de silicio poroso (o de otro material poroso bioactivo, o silicio policristalino bioactivo) 60, 61 alcanza mejor desempeño en la electroporación. Debido a que el electrodo es bioactivo, en lugar de ser bioinerte, las células (típicamente células animales) tienen una afinidad con este y se localizan sobre su superficie.

El silicio bioactivo de baja porosidad (50% o menos, o 30% o menos, o 10% o menos) es eléctricamente conductor y es una matriz íntima compleja adecuada de células de mamífero adherentes 62, que pueden crecer en una matriz de microelectrodos 60, 61. Así, es posible cultivar células de mamífero en electrodos de silicio poroso bioactivos y, luego introducir ADN (u otras sustancias) en las células al utilizar electroporación, con el sustrato sobre el que se cultivan las células que están en un electrodo, o incluso ambos electrodos 60, 61, del aparato de electroporación. Esto tiene ventajas en el manejo de las células, y alcanza un mejor índice de eficiencia de introducción de ADN que sólo tienen las células suspendidas en un medio líquido 63.

Se ha demostrado el hecho de que el silicio poroso es reabsorbible/erosionable in vivo en los mamíferos por los inventores, y esto sustenta algunos aspectos de la invención. El hecho de que el silicio puede ser bioactivo sustenta otros aspectos de la invención.

La Figura 4 muestra un gráfico SIMS (Espectroscopía de Masas de Iones Secundarios) que muestra la concentración de nitrógeno con profundidad en una lámina de silicio poroso. El ADN es rico en nitrógeno, y la detección de altos niveles de nitrógeno en el silicio poroso es una medida de cuánto ADN está presente. El gráfico 70 muestra el la lámina de silicio poroso "envejecida" analizada para el nitrógeno, sin ADN agregado a la superficie de la lámina. El nivel de fondo de nitrógeno depende del tipo de película de silicio poroso y su "edad" - la duración de almacenamiento en el aire ambiente. El gráfico 72 muestra el análisis de la lámina de silicio poroso después de que se ha aplicado una sola gota de agua a la superficie de la lámina de silicio poroso. Es 1 ng por  $\mu$  litro de ADN en la gota de agua. La gota de solución de ADN se seca a 50° C antes de analizar la lámina. El gráfico 74 muestra la cantidad de nitrógeno en el silicio poroso cuando el mismo 1 ng por  $\mu$  litro de ADN en gota de agua se aplica a la lámina y se seca y, luego la lámina se lava en agua desionizada a 50° C.

Como se observará, no se muestra más nitrógeno en el gráfico 72 que en el gráfico 70, que muestra que el ADN está siendo detectado por la prueba. El gráfico 74 muestra que la etapa de lavado se elimina algo, pero no todo, el ADN - que algo del ADN fue probablemente parcialmente inmovilizado en el silicio poroso, que se va a liberar más adelante (durante el lavado).

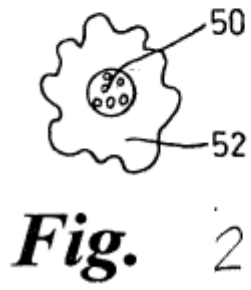
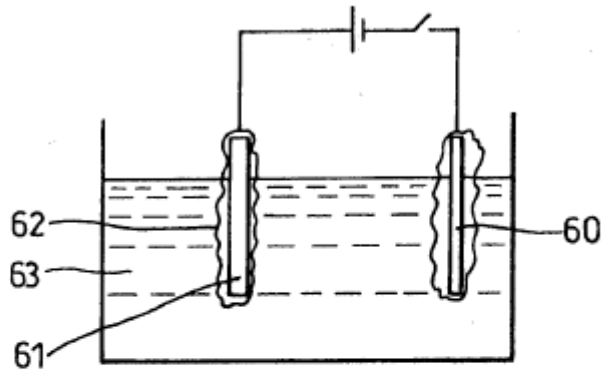
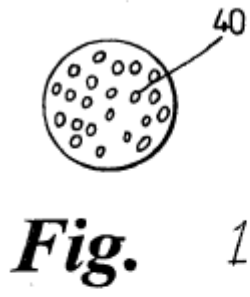
La Figura 5 muestra gráficos SIMS equivalentes para la misma capa después de tratamiento de agua pura. El silicio poroso "madurado" se ha almacenado al aire ambiente y ha adquirido un nivel de fondo de nitrógeno debido a la adsorción de óxidos de nitrógeno y amoníaco - gases de traza contaminantes comunes. El gráfico 80 muestra el silicio poroso madurado sin ADN, el gráfico 82 el silicio poroso madurado con un depósito de gotitas de agua (sin solución de ADN), y el gráfico 84 muestra de nuevo la comparación del análisis del silicio poroso madurado con 1 ng/ $\mu$ litro de ADN en solución agregado y secado a 50 °C.

Los datos de SIMS mostrados en las Figuras 4 y 5 demuestran que el silicio poroso puede unirse de forma reversible al ADN.

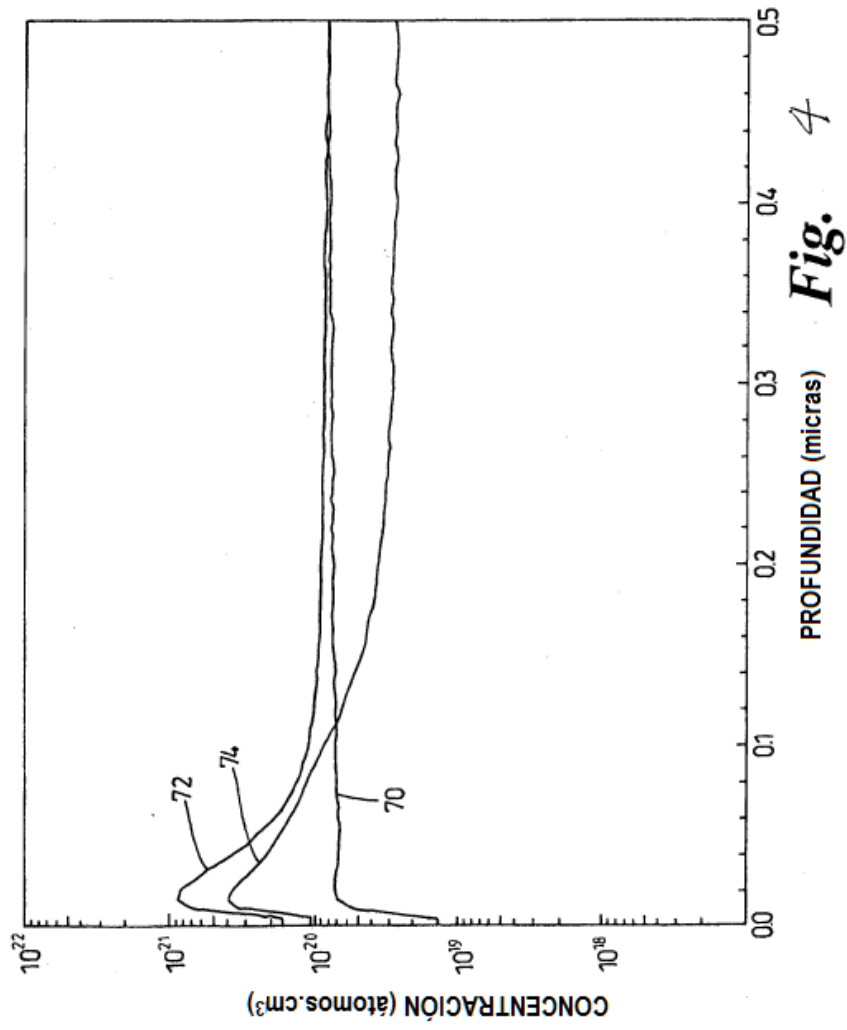
Quizás se puede considerar que la invención utiliza silicio poroso (o tal vez silicio policristalino) como un vector inorgánico para transportar/transferir material en una célula viva.

**REIVINDICACIONES**

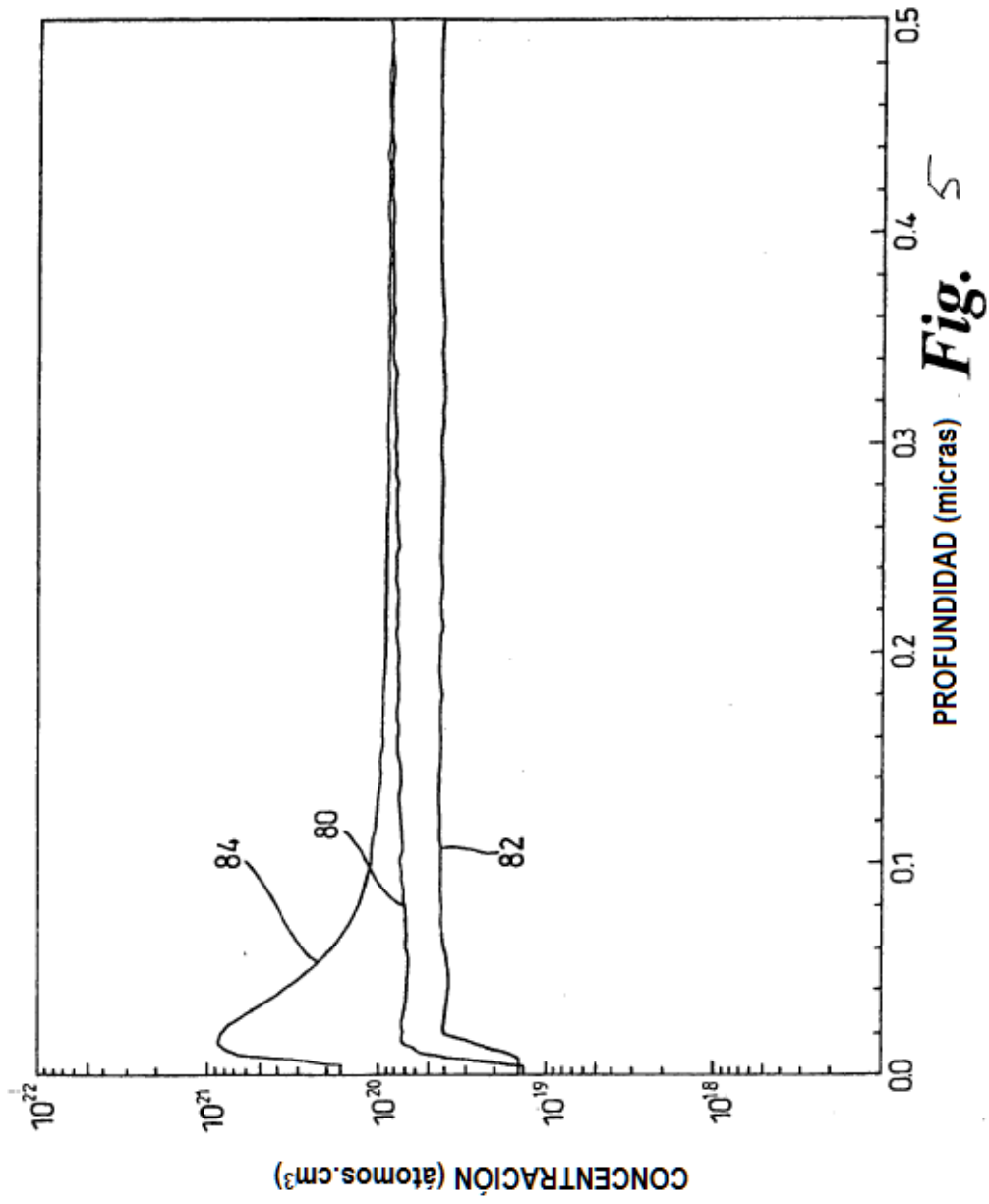
1. Un vehículo para transferir material en una célula, el vehículo comprende una partícula de poro submicrónico o silicio policristalino y un material que se va a transferir en una célula y en donde el silicio es reabsorbible.
- 5 2. Un vehículo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la partícula submicrónica comprende una capa de silicio porosa.
3. Un vehículo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la partícula submicrónica comprende silicio bioactivo.







**Fig. 4**



**Fig. 5**