

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 238**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
G01N 33/58 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/12 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2005 E 05746540 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 1756289**

54 Título: **Nanopartículas que comprenden ligandos de ARN**

30 Prioridad:

24.05.2004 US 573805 P
24.05.2004 GB 0411537

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2015

73 Titular/es:

MIDATECH LTD. (100.0%)
4 & 5 DUNMORE COURT, WOOTTON ROAD
ABINGDON, OXFORD OXFORDSHIRE OX13 6BH,GB

72 Inventor/es:

RADEMACHER, THOMAS WILLIAM;
GUMAA, KHALID;
MARTIN-LOMAS, MANUEL;
PENADES, SOLEDAD;
OJEDA, RAFAEL y
BARRIENTES, AFRICA G.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 533 238 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas que comprenden ligandos de ARN

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nanopartículas, y más particularmente a nanopartículas que comprenden ligandos de ARN tales como ARN interferente pequeño (ARNip) y micro-ARN (miARN), y a su uso en varias aplicaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

Se ha encontrado que las moléculas de ARN pequeño desempeñan múltiples funciones en la regulación de la expresión génica. Estas incluyen degradación dirigida de ARNm por ARN interferentes pequeños (ARNip), silenciamiento génico post-transcripcional (PTG), represión de la traducción específica de secuencia regulada por el desarrollo de ARNm por micro-ARN (miARN) y silenciamiento génico transcripcional dirigido. La actividad de iARN limita la movilización de transposones y proporciona una defensa antiviral (Pal-Bhadra y col., 2004). También se ha demostrado una función para la maquinaria de iARN y ARN pequeños en la elección como diana de complejos de heterocromatina y el silenciamiento génico epigenético en sitios cromosómicos específicos (Verdel y col., 2004). El silenciamiento post-transcripcional dependiente de ARN bicatenario (ARNbc), también conocido como ARN inhibidor pequeño (ARNip) o interferencia por ARN (iARN), es un fenómeno en el que los complejos de ARNbc pueden elegir como diana genes específicos de homología para el silenciamiento de un periodo de tiempo corto. Actúa de señal para promover la degradación de ARNm con identidad de secuencias. Un ARNip de 20 nt es generalmente suficientemente largo para inducir el silenciamiento específico de genes, pero suficientemente corto para evadir la respuesta del huésped (Elbashir y col., 2001).

La disminución en la expresión de productos génicos elegidos como diana puede ser amplia, induciéndose el 90 % del silenciamiento por algunas moléculas de ARNip.

Como la administración de oligonucleótidos de molécula pequeña puede evitar las dificultades asociadas a la terapia génica, el uso de ARNip puede tener ventajas con respecto a la terapia génica tradicional. Hasta la fecha, la administración eficaz de genes terapéuticos basados en vector *in vivo* sigue siendo un obstáculo para la terapia génica satisfactoria. Se ha observado que, aunque la inactivación del gen diana por ARNip no es permanente, una única transfección de ARNip puede conducir a una inhibición prolongada de la proteína diana en las células parentales, así como de progenie (Tuschl, 2001). Sin embargo, todavía hay un problema en la materia en la administración de ARNip.

El documento EP 1 249 502 A describe perlas de nanopartículas semiconductoras que tienen ADN covalentemente unido a la superficie de las perlas.

El documento WO 01/00876 A1 describe nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a ellas y usos de éstas en ensayos para detectar ácidos nucleicos.

El documento WO 98/04740 A describe nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a ellas y usos de éstas en ensayos para detectar ácidos nucleicos y separar el ácido nucleico seleccionado de otros ácidos nucleicos.

El documento EP 0 990 903 A1 describe nanocristales semiconductores fluorescentes asociados a un compuesto y su uso en aplicaciones biológicas.

El documento WO 01/51665 A2 describe nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a ellas y usos de éstas en ensayos para detectar ácidos nucleicos y separar el ácido nucleico seleccionado de otros ácidos nucleicos.

Patolsky y col., 2000, CHEMICAL COMMUNICATIONS- CHEMCOM, vol. 6, nº 12, páginas 1025-1026, describen la amplificación dendrítica del análisis de ADN por nanopartículas de Au funcionalizadas con oligonucleótidos.

Matzke y col., 2003, SCIENCE, vol. 301, nº 5636, páginas 1060-1061, revisan el alcance extendido de la iARN.

Miyagishi y col. 2003, ANTISENSE AND NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, vol. 13, nº. 1, páginas 1-7, describen una comparación de los efectos supresores de oligonucleótidos antisentido y ARNip dirigidos contra las mismas dianas en células de mamífero.

Choudhury y col., 2004, INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 108, nº 1, páginas 71-77, describe cómo el ARN interferente pequeño (ARNip) inhibe la expresión del gen Her2/Neu, regula por incremento HLA de clase I e induce la apoptosis de líneas celulares tumorales positivas para Her2/Neu.

El documento WO 02/32404 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) desvela nanopartículas formadas a partir de átomos metálicos o semiconductores en los que ligandos que comprenden hidratos de carbono están ligados covalentemente al núcleo de las nanopartículas. Estas nanopartículas se usan para modular interacciones mediadas por hidratos de carbono y son solubles y no tóxicas. La solicitud PCT que reivindica prioridad del documento GB-A-0313259.4 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Midatech Limited) desvela nanopartículas magnéticas que tienen núcleos que comprenden átomos metálicos pasivos y magnéticos, estando el núcleo ligado covalentemente a ligandos.

Resumen de la invención

Ampliamente, la presente invención se refiere a nanopartículas que comprenden que tienen un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, estando el núcleo ligado a ligandos de ARN. Los ligandos de ARN son secuencias de ARN cortas diseñadas para imitar a las secuencias de ARN interferente pequeño (ARNip) y de micro-ARN (miARN). Las nanopartículas pueden usarse para administrar los ligandos de ARN y tienen aplicaciones en una amplia variedad de aplicaciones, en sistemas *in vitro* y para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. A modo de ejemplo, las nanopartículas de la presente invención pueden emplearse (1) para el silenciamiento génico transcripcional dirigido, (2) para la degradación de ARNm dirigido, (3) para ARNm de obtención de imágenes, (4) para inhibir rutas que emplean una pluralidad de ligandos de ARN sobre las mismas nanopartículas o diferentes, (5) para la administración de aerosoles, por ejemplo a los pulmones, (6) en combinación con silenciamiento de ARNm para elegir como diana ARNm resistente a ARNip y (7) para su uso como herramienta en genómica funcional.

En la materia, las secuencias de ARN cortas se llaman "ARN interferentes pequeños" (ARNip) o "micro-ARN" (miARN) dependiendo en su origen. Pueden usarse ambos tipos de secuencia para regular por disminución la expresión génica uniéndose a ARN complementarios (ARNm) y tanto provocando la eliminación de ARNm (iARN) como deteniendo la traducción de ARNm en proteína. Los ARNip se derivan por procesamiento de ARN bicatenarios largos y cuando se encuentran en la naturaleza normalmente son de origen exógeno. Los micro-ARN interferentes (miARN) son ARN no codificantes pequeños endógenamente codificados, derivados por el procesamiento de horquillas cortas. Tanto el ARNip como el miARN pueden inhibir la traducción de ARNm que llevan secuencias diana parcialmente complementarias sin escisión de ARN y degradar ARNm que llevan secuencias completamente complementarias. La 4 ruta de iARN también actúa sobre el genoma como se trata en Science, 301: 1060-1061, 2003).

El ARN asociado a las nanopartículas puede ser monocatenario o bicatenario (dúplex). Si se usan secuencias similares a miARN como ligandos, las secuencias de ARN pueden ser horquillas, es decir, incluyen regiones parcialmente complementarias hacia sus extremos que pueden hibridarse para formar la horquilla. Las nanopartículas pueden comprender opcionalmente adicionalmente tipos de ligandos, tales como hidratos de carbono para formar gluconanopartículas, y/o más de una especie de ARNip. Las nanopartículas y sus usos se tratan más abajo en más detalle. Ventajosamente, la unión del ARNip a la nanopartícula puede proporcionar protección para el ARNip de las exorribonucleasas presentes en la sangre, medios de cultivo de tejido o dentro de las células.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona nanopartículas para su uso en un método de terapia, en el que dichas nanopartículas comprenden un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, y en el que el núcleo está ligado covalentemente a una pluralidad de ligandos que comprenden al menos un ligando de ARN que comprende una molécula de ARNip o de miARN.

Las nanopartículas para su uso según el primer aspecto de la invención pueden ser para su uso en un método que es un método *in vivo* de regulación por disminución de un gen diana.

Las nanopartículas para su uso según el primer aspecto de la invención pueden ser para su uso en un método de tratamiento de cáncer, una infección viral o degeneración macular del ojo. En algunos casos, el cáncer es cáncer de mama o el virus es VIH, hepatitis o gripe.

Las nanopartículas para su uso según el primer aspecto de la invención pueden comprender una señal de translocalización de la membrana de manera que pueden permear a través de la membrana celular.

Según el primer aspecto de la invención, la nanopartícula puede estar ligada covalentemente a dicho ligando de ARNip mediante un grupo conector. En algunos casos, el grupo conector es un grupo tiol, un grupo etileno o un grupo péptido.

Según el primer aspecto de la invención, el ligando puede ser un ligando de ARNip y puede comprender un nucleótido protuberante de 3' de 2 ribonucleótidos.

Según el primer aspecto de la invención, una primera hebra codificante o no codificante de una molécula de ARN puede ligarse covalentemente a un núcleo de nanopartícula mediante su extremo 5' y/o 3'. En algunos casos, una segunda hebra de la molécula de ARN que es complementaria a la primera hebra se hibrida con la primera hebra de la molécula de ARN. En algunos casos, la segunda hebra de ARN se liga covalentemente a un núcleo de

nanopartícula mediante su extremo 5' y/o 3'. En algunos casos, la primera y segunda hebras de la molécula de ARN se ligan por separado a núcleos de nanopartículas y posteriormente se hibridan juntas.

5 Según el primer aspecto de la invención, el ligando de ARN puede ser un ligando de miARN que comprende una horquilla.

Según el primer aspecto de la invención, el ligando de ARN puede basarse en una secuencia del gen Her2.

10 Según el primer aspecto de la invención, dicho ligando de ARN puede ser monocatenario o bicatenario.

Según el primer aspecto de la invención, dicho ligando de ARN puede tener entre:

- 15 10 y 40 ribonucleótidos,
17 y 30 ribonucleótidos,
19 y 25 ribonucleótidos, o
21 y 23 ribonucleótidos.

20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para regular por disminución un gen diana, comprendiendo el método poner en contacto las células que contienen el gen con nanopartículas según el primer aspecto de la invención. En algunos casos, el método produce una inactivación transitoria del gen diana.

25 En algunos casos, el método del segundo aspecto de la invención emplea nanopartículas que tienen al menos dos ligandos de ARN diferentes, tanto conjugados con las mismas nanopartículas como presentes en una composición de al menos dos tipos diferentes de nanopartículas, para regular por disminución la expresión en al menos dos genes en una ruta. En algunos casos, la ruta es una ruta inflamatoria, una ruta antiviral, una ruta de señalización en cáncer, una ruta de metástasis o una ruta metabólica. En algunos casos, el ligando de ARN se basa en un dominio conservado de una familia de genes para regular por disminución la expresión de una pluralidad de miembros de la familia de genes.

30 Se describirán ahora a modo de ejemplo realizaciones de la presente invención con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

35 La **Figura 1** muestra una micrografía electrónica de transmisión de nanopartículas de ARN-Au-Glc.

La **Figura 2** muestra la prueba de la presencia de ARN en las nanopartículas preparadas. (a) Sin luz UV: 1. nanopartículas de ARN-Au-Glc + EtBr; 2. Glc-Au + EtBr; 3. Glc-Au; 4. residuo de solución de lavado + EtBr. (b) Con luz UV: 1. nanopartículas de ARN-Au-Glc + EtBr; 2. Glc-Au + EtBr; 3. Glc-Au; 4. residuo de solución de lavado + EtBr.

40 La **Figura 3a** muestra una transferencia Western de la proteína Her-2/neu a partir de volúmenes iguales de lisados de células SKBR3 48 horas después de la transfección con un ARNip de Her-2/neu. C = células de control (sin tratar); Au = células tratadas con ARNip acoplado a nanopartículas de oro sin RNAiFectamine; S = ARNip de silenciamiento con RNAiFectamine; NS = ARNip no de silenciamiento con RNAiFectamine.

45 La **Figura 3b** muestra una transferencia Western de la proteína Her-2/neu a partir de volúmenes iguales de lisados de células OVCAR 72 horas después de la transfección con un ARNip de Her-2/neu. C = células de control (sin tratar); Au = células tratadas con ARNip acoplado a nanopartículas de oro sin RNAiFectamine.

50 La **Figura 4** muestra una representación esquemática de una nanopartícula preferida de la invención que comprende ARNip y ligandos de hidrato de carbono.

55 La **Figura 5** muestra el efecto sobre la proliferación celular sobre células OVCAR transfectadas con ARNip solo (**A**) o con nanopartículas de ARNip (**B**) a 0,25 µg (diamantes), 0,5 µg (cuadrados), 1,0 µg (triángulos), 1,5 µg (cruz gris) y 2,0 µg (cruz negra) de nanopartículas de ARNip por 1000 células. Eje x = días; eje y = número de células (log₁₀)

60 La **Figura 6** muestra el efecto sobre la proliferación celular sobre células OVCAR transfectadas con nanopartículas de ARNip con y sin reactivo de transfección. Se usaron tres concentraciones de nanopartículas:

- 1: con reactivo de transfección (cuadrados) y sin reactivo de transfección (diamantes);
2: con reactivo de transfección (cruces grises) y sin reactivo de transfección (triángulos);
3: con reactivo de transfección (círculos) y sin reactivo de transfección (cruces negras).

65 Eje x = días; eje y = número de células (log₁₀)

Descripción detallada

Ejemplos

5 El oncogén Her-2/neu y su producto codificado p185Her-2/neu pertenecen a las tirosina cinasas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Bargmann y col., 1986). La familia del receptor HER consiste en cuatro tirosina cinasas transmembrana: EGFR (también conocida como Her-1 o erbB-1), erbB-2 (Her-2), erbB-3 (Her-3) y erbB-4 (Her-4). Las rutas de señalización de Her-2/neu son conocidas por desempeñar funciones críticas en el crecimiento y diferenciación celular, transformación maligna y resistencia a agentes quimioterapéuticos (Yarden & Sliwkowski, 10 2001). Her-2/neu se expresa en exceso en aproximadamente un tercio de los casos de cánceres de mama u ovario humanos, y su expresión en exceso está asociada a mal pronóstico (Berchuck y col., 1990).

Se han hecho numerosos intentos para inhibir la expresión de Her-2/neu en células cancerosas como posible enfoque terapéutico. Un anticuerpo monoclonal humanizado contra Her-2/neu (Trastuzumab o Herceptin) ha sido 15 eficaz en cáncer metastásico que expresa en exceso Her-2/neu (Mendelsohn & Baselga, 2000; Baselga y col., 1996), pero se encontró que regulaba por incremento la expresión de Her-3. Se ha mostrado que un oligonucleótido antisentido contra Her-2/neu induce la apoptosis en líneas de células de cáncer de mama humano que expresan en exceso Her-2/neu (Roh y col., 2000). La terapia génica con E1A, administrada por liposomas o por vectores adenovirales, puede reducir la mortalidad entre ratones portadores de tumor en un modelo de cáncer de ovario que 20 expresa en exceso Her-2/neu y puede reducir la incidencia de metástasis distantes en un modelo de cáncer de mama (Chang y col., 1996).

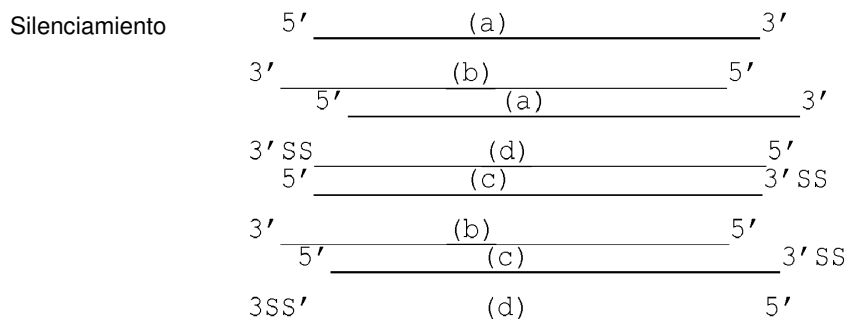
Se encontró que la regulación por disminución de la expresión de Her-2/neu condujo a disminuciones en PI3K, Akt y Akt fosforilada que produjeron una disminución de la expresión de la ciclina D1, una ciclina que participa en la 25 regulación de la detención de células G0/G1 y transformación oncogénica (Sherr & Roberts, 1999). Un estudio reciente que compara la eficacia de oligonucleótidos antisentido y ARNip demostró que los ARNip son al menos 10 veces más eficaces en una base nM en el silenciamiento de un gen indicador (Miyagishi y col., 2003). Varios estudios previos han demostrado que Her-2/neu estimula la transcripción de VEGF, un potente factor proangiogénico (Kumar & Yarmand-Bagheri, 2001) cuyo nivel disminuyó marcadamente después del silenciamiento 30 de la expresión de Her-2/neu. La regulación por disminución de Her-2/neu por ARNip retroviral aumentó los niveles de trombospondina-1, un poderoso inhibidor de la angiogénesis (Izumi y col., 2002). Los datos *in vitro* demostraron que el tratamiento con ARNip de HER2 también regula significativamente por incremento la expresión superficial de HLA de clase I en tumores humanos (Choudhury y col., 2004).

35 **a. Estrategia: Silenciamiento**

Secuencia diana de ADNc de Her2/Neu: **AAG CCT CAC AGA GAT CTT GAA**

- 40 a) Sentido: **5'- G CCU CAC AGA GAU CUU GAAdTdT - 3'**
- b) Antisentido: **3' - dTdTC GGA GUG UCU CUA GAA CUU - 5'**
- c) Sentido: **5'- G CCU CAC AGA GAU CUU GAAdTdT-3'SS**
- 45 d) Antisentido: **3'SS-dTdTC GGA GUG UCU CUA GAA CUU - 5'**

b. Hibridación



50

c. Posibles combinaciones de GNP

ARNip	Hibridación	GNP		
		Glc-	Glcβ4 glcNAc	Glcβ4 glcNH ₂
Silenciamiento	a-b			
	a-d			
	c-b	X		
	c-d			
X = usado en este estudio.				

d. Métodos

5

1. Líneas celulares

Adenocarcinoma mamario humano SK-BR-3 de ATCC (Cat. nº HTB-30). Adenocarcinoma de ascitis humano de OVCAR-3 del repositorio de líneas tumorales/celulares de NCI-Frederick Cancer DCTD (vial 0502296).

10

2. Soluciones madre de ARNip

La secuencia diana de ADN de Her-2/neu elegida fue AAGCCTCACAGAGATCTTGAA.

15 El ARNip sentido tuvo una secuencia r(GCCUCACAGAGAUUUGAA) d(TT)3ThSS (PM de la sal de K 7416,25) y la secuencia no codificante r(UUCAAGAUCUCUGUGAGGC) d(TT)3ThSS (PM de la sal de K 7409,57) se obtuvo de Qiagen.

20 Las secuencias del dúplex de ARNip de control (no de silenciamiento) de Qiagen (Cat nº 1022076) fueron sentido r(UUC UCC GAA CGU GUC ACG U)d(TT) y antisentido r(ACG UGA CAC GUU CGG AGA A)d(TT) y el peso molecular de la sal de K hibridada fue 14839,5.

25 Disolver los contenidos (296,65 µg) de un tubo de ARNip sentido en 1 ml de tampón estéril (acetato de potasio 100 mM, Hepes-KOH 30 mM, acetato de magnesio 2 mM a pH 7,4) para preparar una solución madre 40 µM. Cada µl contendrá 0,297 µg de ARNip.

30 El contenido (296,38 µg) de un tubo de ARNip antisentido se disolvió en 1 ml de tampón estéril (acetato de potasio 100 mM, Hepes-KOH 30 mM, acetato de magnesio 2 mM a pH 7,4) para preparar una solución madre 40 µM. Cada µl contendrá 0,297 µg de ARNip.

Para la hibridación, 30 µl de cada solución de oligonucleótidos de ARN se combinaron con 15 µl de 5X tampón de hibridación. La concentración de tampón final fue Tris 50 mM, pH 7,5 - 8,0, NaCl 100 mM en agua tratada con DEPC. El volumen final fue 75 µl y la concentración final del dúplex de ARNip fue 16 µM.

35 La solución se incubó durante 1 minuto en un baño de agua a 90-95 °C y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente (es decir, por debajo de 30 °C). El tubo se centrifugó brevemente para recoger todo el líquido en el fondo del tubo. El enfriamiento lento hasta temperatura ambiente duró 45-60 minutos. La solución resultante se almacenó a -20 °C hasta que estuvo lista para uso y fue resistente a congelación y descongelación repetida.

40 3. Solución madre de ARNip-nano-oro**Métodos generales**

45 Se compraron HAuCl₄ (99,999 %) y NaBH₄ de Aldrich Chemical Company. Se sintetizó 2-tioetil-β-D-glucopiranosido en el laboratorio de los presentes inventores usando procedimientos convencionales. Para todos los experimentos y soluciones, se usó agua nanopura (18,1 mΩ) tratada con DEPC (dietilpirocarbonato). Todos los eppendorf, espátulas y viales estuvieron libres de RNasa. El ARNip bicatenario hibridado se compró de Qiagen-Xeragon Inc. Las especificaciones fueron:

50 Secuencia diana de ADN AAGCCTCACAGAGATCTTGAA.
 ARNip sentido r(GCCUCACAGAGACUUGAA) d (TT) Conector de 3'-tiol-(SS)-C3 sobre 3'
 (PM de la sal de K 7416,25)
 Antisentido r(UUCAAGAUCUCUGUGAGGC)d(TT)
 (PM de la sal de K 7409,57)

55

e. Preparación de nanopartículas de ARN-Au-Glc

A una solución de 2-tioetil-β-D-glucopiranosido (0,9 mg, 3,75 μmoles) y ARNip (0,148 mg, 0,01 μmoles) en tampón Tris 100 mM, pH 7,7 (250 μl), se añadió una solución acuosa de HAuCl₄ (22 μl, 0,025 M). A continuación, se añadió solución 1 N acuosa de NaBH₄ (30 μl) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión marrón formada se agitó durante 1 h adicional a 4 °C. La suspensión se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 4 °C, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, lavando con 125 μl de tampón Tris. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 250 μl de tampón Tris y se liofilizó proporcionando 4 mg de nanopartículas de ARN-Au-Glc (la resuspensión del sólido en 1 ml de agua debe dar una solución 6 ± 1 μM de ARN en tampón Tris 20 mM). El filtrado se desaló usando AMICON (PM 3000, 4 °C, 14000 rpm) y se liofilizó. El peso del residuo fue < 50 μg. La micrografía electrónica de transmisión (TEM) mostrada en la Figura 1 muestra que el tamaño promedio de las partículas fue 2,8 nm, con un promedio de 807 átomos de oro/partícula, ARNip y 100 moléculas del derivado de glucosa como se representa en la Figura 4 y tiene un PM aproximado >160.000.

f. Comprobación de la presencia de ARN en nanopartículas

Nanopartículas de ARN-Au-Glc, nanopartículas de Glc-Au y el residuo de lavado de las nanopartículas de ARN-Au-Glc que supuestamente contiene oligonucleótido de ARN y derivado de glucosa se disolvieron cada uno en 30 μl de agua. Se mezclaron alícuotas de estas soluciones (1 μl) con solución acuosa de bromuro de etidio (EtBr) (1 μl, 0,1 % v/v). La fluorescencia se observó bajo una lámpara de UV (véase la Figura 2) *demostrando* que las nanopartículas así preparadas han incorporado ARNip (Figura 2b, tubo 1), mientras que las nanopartículas que contienen solo glucosa no muestran ninguna fluorescencia (Figura 2b, tubo 2).

4 mg del complejo de ARNip/nano-oro generado a partir de 148 μg de ARNip se disolvieron después en 1 ml de agua para obtener una solución madre 6 ± 1 μM en Tris 20 mM. Cada μl de solución contuvo el equivalente de 0,078 μg de ARNip.

Siembra de células

1. 24 h antes de la transfección, 6 x 10⁴ células se pipetearon en una placa de 24 pocillos y se enrasó hasta 0,5 ml con medio de cultivo apropiado.
2. Se dejó que las células alcanzaran el 50-80 % de confluencia, durando aproximadamente 24 h.
3. El medio de cultivo se eliminó y se sustituyó con 300 μl de medio fresco/pocillo.

Transfección de células con complejo de ARNip

1. Se dispensaron 3,3 μl (o 12,8 μl del complejo de nano-oro) de la solución madre del ARNip dúplex apropiado a una placa de 24 pocillos correspondiente a aquella con células.
2. A cada pocillo se añadieron 96,7 μl (o 87,2 μl para el complejo de nano-oro) del medio de cultivo apropiado y se mezclaron bien pipeteando arriba y abajo 5 veces.
3. A cada pocillo (distinto de los pocillos del complejo de nano-oro) se añadieron 6 μl de RNAiFect y se mezclaron bien pipeteando arriba y abajo 5 veces.
4. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos para permitir la formación de complejos.
5. Las células en 300 μl de medio de cultivo se recubrieron con los 100 μl del complejo de transfección apropiado.
6. La placa se balanceó suavemente para mezclar evitando girarla.
7. La placa se incubó a 37 °C en una estufa de incubación con CO₂ durante 48-72 h.
8. El medio se eliminó y las células se lavaron tres veces con PBS helado.
9. Las células se lisaron y se determinó el contenido de proteína de los lisados.
10. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE, seguido de transferencia Western usando un anticuerpo de conejo policlonal para Her2/ErbB2 de Cell Signalling technology (Cat. n° 2242).
11. Las transferencias se trataron con un conjugado de anti-IgG de conejo-HRP seguido de desarrollo por ECL.

g. Resultados

En las Figuras 3a y 3b se muestran observaciones preliminares usando 1 µg de ARNip/pocillo. Se añadieron nanopartículas de ARNip-oro a células sin RNAiFectamine. Las células SKBR3 fueron más lentas en alcanzar el 80 % de confluencia que las células OVCAR. Los resultados de SKBR3 son de lisados 48 h después de la transfección, mientras que los resultados de OVCAR fueron de lisados 72 h después de la transfección. Un esquema de las nanopartículas se muestra en la Figura 4.

No toxicidad de nanopartículas ARNip-Au-Glc para células

Se transfectaron células con ARNip solo y con ARNip conjugado con gluconanopartículas de oro. La Figura 5 muestra que el ARNip conjugado con nanopartículas fue eficaz y no tuvo efectos tóxicos. Se observó un efecto dependiente de la dosis sobre el número de células que indica que las nanopartículas de ARNip aumentaron la proliferación celular.

Entrada de nanopartículas de ARNip-Au-Glc en células

Se transfectaron células OVCAR con nanopartículas de ARNip con y sin el reactivo de transfección normalmente requerido para la transfección de células con ARNip. La Figura 6 muestra que el reactivo de transfección no se requirió para la entrada de nanopartículas de ARNip en las células. Los resultados muestran que las nanopartículas de ARNip se administraron eficazmente a las células incluso en ausencia de reactivo de transfección; de hecho, la administración pareció ser más eficaz sin reactivo de transfección. La dependencia de la dosis del efecto sobre el número de células indica una respuesta genuina a las nanopartículas de ARNip.

Referencias

- Pal-Bhadra y col. RNAi-Mediated targeting of Heterochromatin by the RITS complex. *Science* (2004) vol. 303, 669.
- Verdel y col. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi Machinery. *Science* (2004) vol. 303, 672.
- Elbashir y col. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
- Tuschl. RNA interference and small interfering RNAs. *Chem Biochem* 2001;2:239-45.
- Bargmann y col. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. (1986) *Nature* 319, 226-230.
- Yarden & Slivkowski. Untangling the ErbB signalling network. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-137.
- Berchuck y col. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. (1990) *Cancer Res* 50, 4087-4091.
- Mendelsohn & Baselga. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. (2000) *Oncogene* 19, 6550-6565.
- Baselga y col. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu over expressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:737-44.
- Roh y col. Down regulation of HER2/neu expression induces apoptosis in human cancer cells that over-express HER2/neu. (2000) *Cancer Res* 60, 560-565.
- Chang y col. Inhibition of intratracheal lung cancer development by systemic delivery of E1A. (1996) *Oncogene* 13, 1405-1412.
- Sherr & Roberts. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. (1999) *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Miyagishi y col. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003;13:1-7.
- Kumar & Yarmand-Bagheri. The role of HER2 in angiogenesis. (2001) *Semin Oncol* 28, 27-32.
- Izumi y col. Tumour biology: herceptin acts as an antiangiogenic cocktail. (2002) *Nature* 416, 279-280.
- Choudhury y col. Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/Neu gene, upregulates HLA Class I and induces apoptosis of Her2/Neu positive tumour cell lines. *Int J Cancer* 108, 71-77, 2004.
- Overbaugh, HTLV sweet-talks its way into cells. *Nat. Med* (2004) vol. 10, 20.
- Check. RNA to the rescue. *Nature* (2003)vol 425, 10 - 12.
- Zamore y col. siRNAs knock down hepatitis. *Nature* (2003) vol 9, 266-267.
- Song y col. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* (2003)vol. 9, 347-351.
- Matzke & Matzke. RNAi Extends its Reach. *Science* (2003) Vol 301, 1060 - 1061.
- Documento WO 02/32404
- Solicitud PCT que reivindica prioridad del documento GB-A-0313259.4.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanopartículas para su uso en un método de terapia, en donde dichas nanopartículas comprenden un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, y en donde el núcleo está ligado covalentemente a una pluralidad de ligandos que comprende al menos un ligando de ARN que comprende una molécula de ARNip o de miARN.
2. Nanopartículas para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho método es un método *in vivo* de regular por disminución un gen diana.
- 10 3. Nanopartículas para su uso en un método de tratamiento de cáncer, una infección viral o degeneración macular del ojo, en donde dichas nanopartículas son como se han definido en la reivindicación 1.
- 15 4. Nanopartículas para su uso según la reivindicación 3, en donde el cáncer es cáncer de mama o el virus es VIH, hepatitis o gripe.
- 20 5. Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las nanopartículas comprenden una señal de translocalización de la membrana de manera que pueden permear a través de la membrana celular.
- 25 6. Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nanopartícula está ligada covalentemente a dicho ligando de ARNip mediante un grupo conector.
7. Nanopartículas para su uso según la reivindicación 6, en donde el grupo conector es un grupo tiol, un grupo etileno o un grupo péptido.
- 30 8. Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ligando es un ligando de ARNip y comprende un nucleótido protuberante en 3' de 2 ribonucleótidos.
- 35 9. Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una primera hebra codificante o no codificante de una molécula de ARN está ligada covalentemente a un núcleo de nanopartícula mediante su extremo 5' y/o 3'.
10. Nanopartículas para su uso según la reivindicación 9, en donde una segunda hebra de la molécula de ARN que es complementaria a la primera hebra está hibridada con la primera hebra de la molécula de ARN.
- 40 11. Nanopartículas para su uso según la reivindicación 10, en donde la segunda hebra de ARN está ligada covalentemente a un núcleo de nanopartícula mediante su extremo 5' y/o 3'.
12. Nanopartículas para su uso según la reivindicación 10 o de la reivindicación 11, en donde la primera y la segunda hebras de la molécula de ARN se ligan por separado a núcleos de nanopartícula y posteriormente se hibridan juntas.
- 45 13. Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ligando de ARN es un ligando de miARN y comprende una horquilla.
- 50 14. Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ligando de ARN se basa en una secuencia del gen Her2.
15. Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho ligando de ARN es monocatenario o bicatenario.
- 55 16. Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho ligando de ARN tiene entre:
 - 10 y 40 ribonucleótidos,
 - 17 y 30 ribonucleótidos,
 - 19 y 25 ribonucleótidos, o
 - 21 y 23 ribonucleótidos.
- 60 17. Un método *in vitro* para regular por disminución un gen diana, comprendiendo el método poner en contacto células que contienen el gen con nanopartículas como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 65 18. El método de la reivindicación 17, en donde el método produce una inactivación transitoria del gen diana.

19. El método de la reivindicación 17 o de la reivindicación 18, en donde el método emplea nanopartículas que tienen al menos dos ligandos de ARN diferentes, tanto conjugados con las mismas nanopartículas como presentes en una composición de al menos dos tipos diferentes de nanopartículas, para regular por disminución la expresión en al menos dos genes en una ruta.
- 5 20. El método de la reivindicación 19, en el que la ruta es una ruta inflamatoria, una ruta antiviral, una ruta de señalización en cáncer, una ruta de metástasis o una ruta metabólica.
- 10 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que el ligando de ARN se basa en un dominio conservado de una familia de genes para regular por disminución la expresión de una pluralidad de miembros de la familia de genes.

Figura 1 – TEM de nanopartículas de ARN-Au-Glc

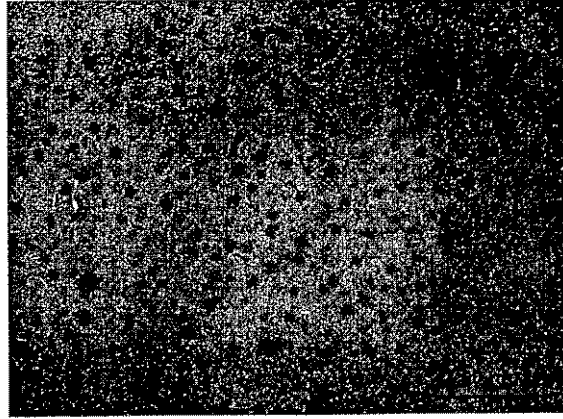
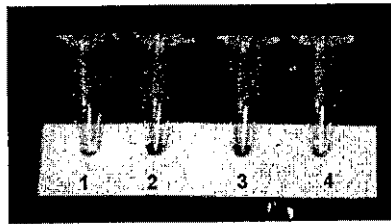
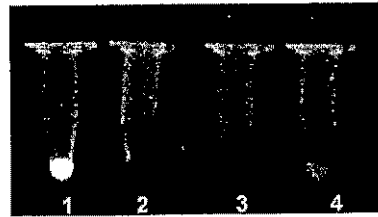


Figura 2 – Prueba de la presencia de ARN en las nanopartículas preparadas



a.



b.

Figura 3a

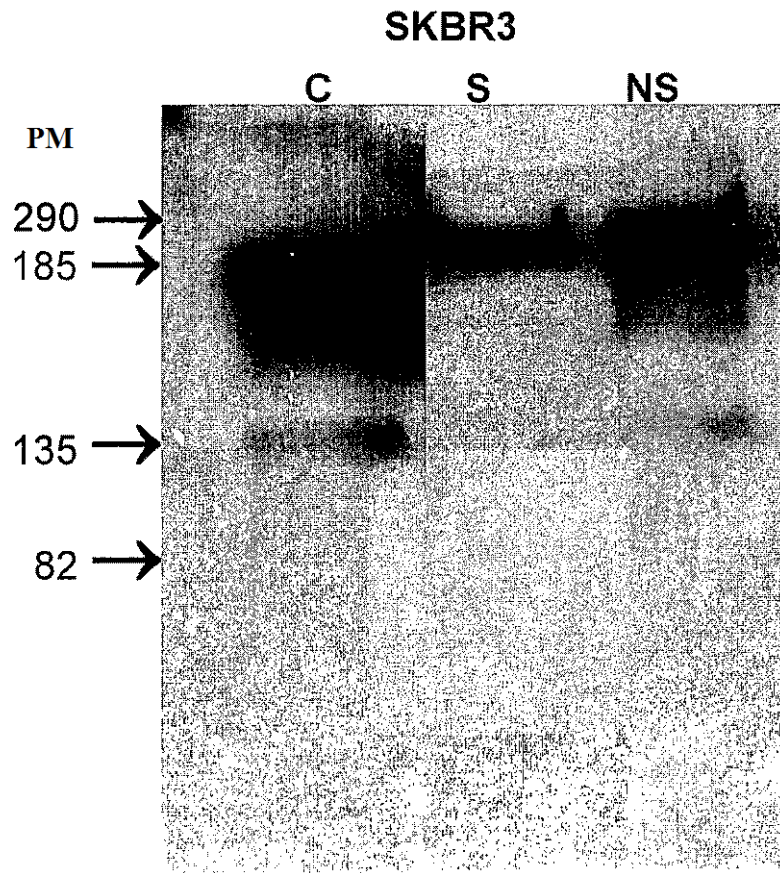
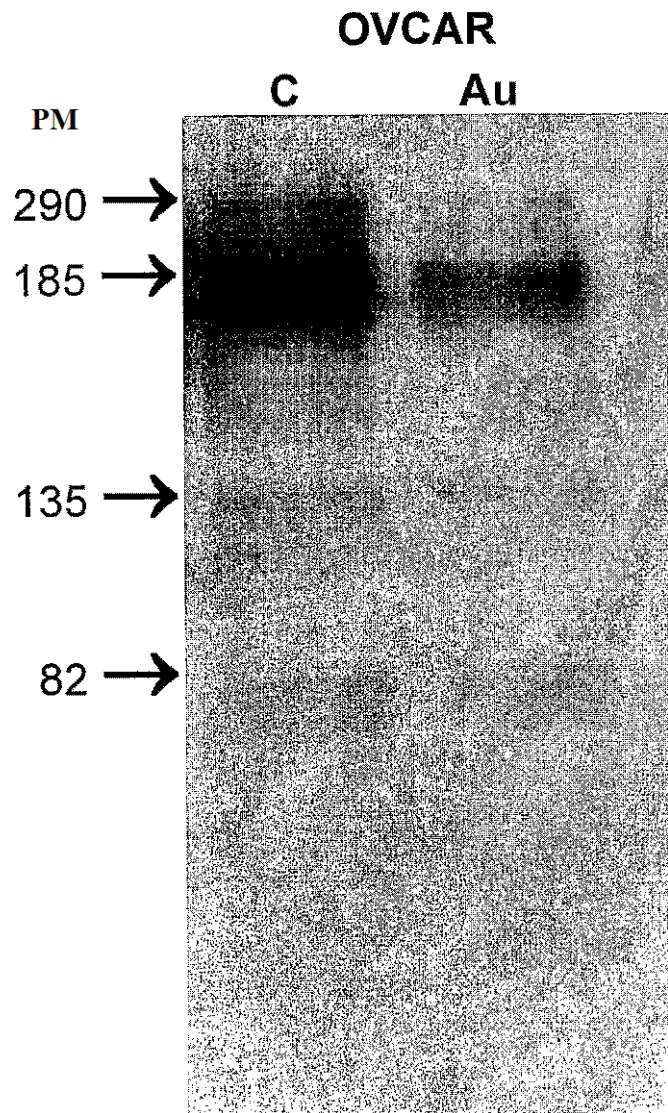


Figura 3b



Nanopartículas de ARN-Au-Glc

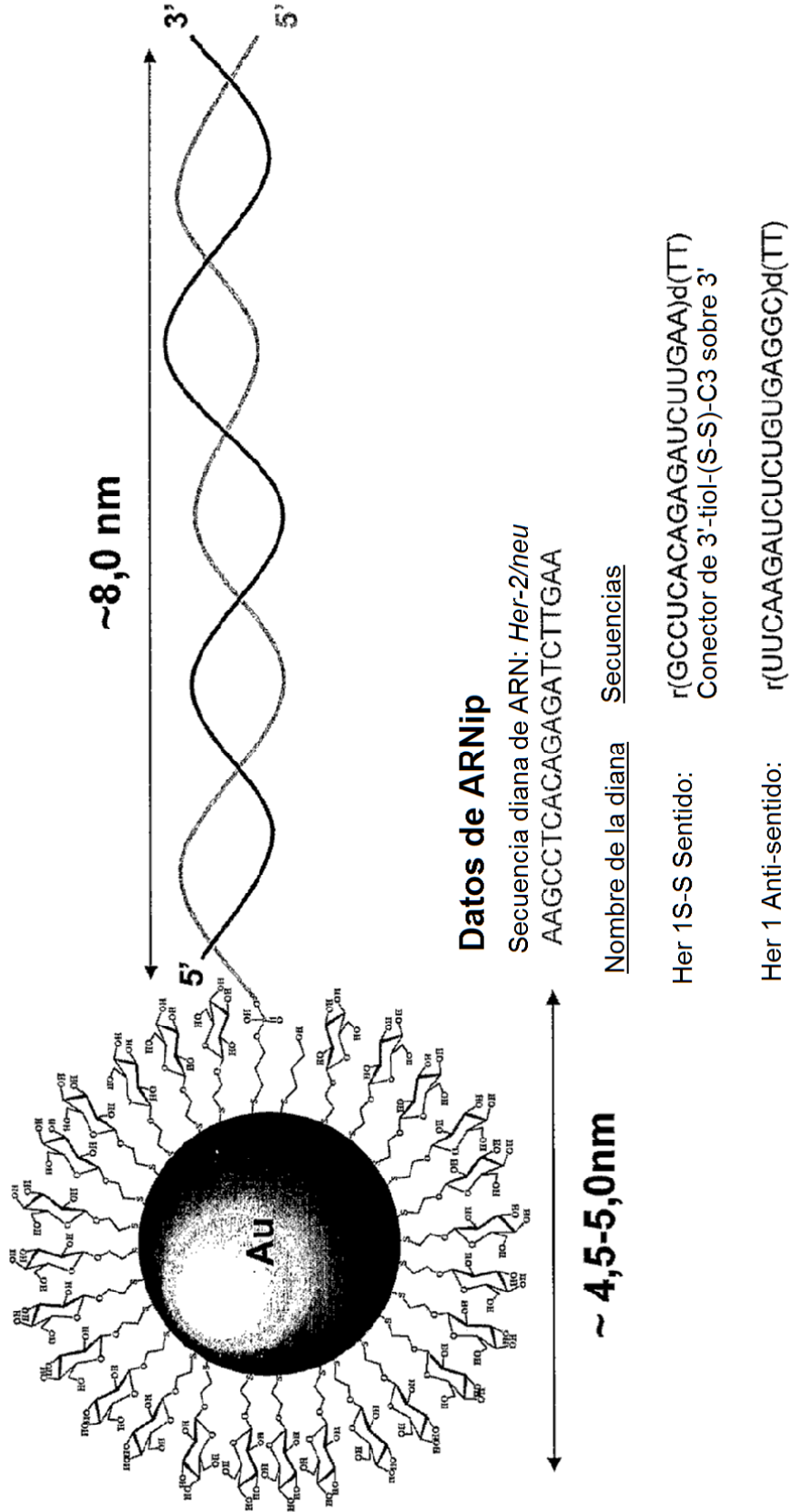


Figura 4

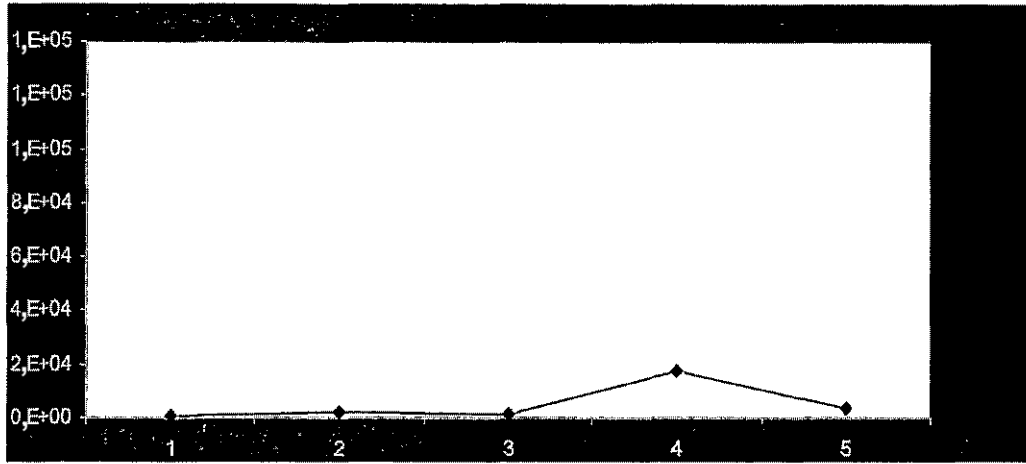


Fig. 5A

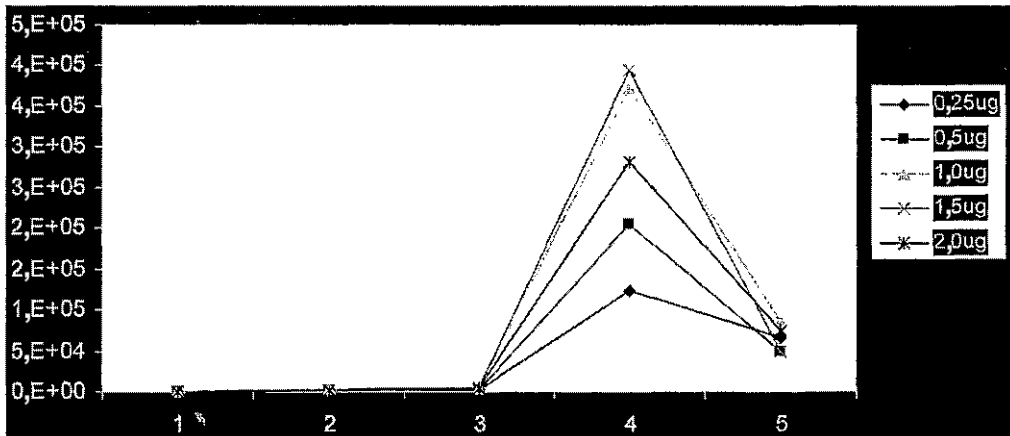


Fig. 5B

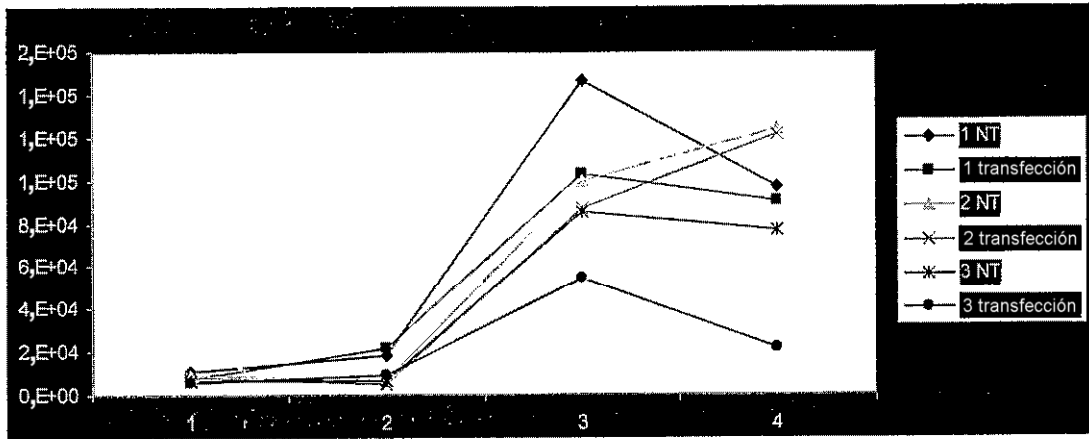


Fig. 6