

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 112**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2014** **PCT/US2014/057000**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015** **WO15042585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2014** **E 14846422 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019** **EP 3049116**

54 Título: **Suministro de genes mediado por nanopartículas, edición genómica y modificación que fija como objetivo ligandos en diversas poblaciones de células**

30 Prioridad:

23.09.2013 US 201361881072 P

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

08.07.2019

73 Titular/es:

**RENSSELAER POLYTECHNIC INSTITUTE
(100.0%)
110 8th Street
Troy, NY 12180, US**

72 Inventor/es:

**KOTHA, SHIVA PRASAD;
WATSON, ANDRE RONALD y
PANDIT, VAIBHAV A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 112 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

Suministro de genes mediado por nanopartículas, edición genómica y modificación que fija como objetivo ligandos en diversas poblaciones de células

Antecedentes de la invención**5 Campo Técnico**

La presente invención se refiere, en general, al uso de nanopartículas para transfectar células. Más particularmente, la presente invención se refiere a nanopartículas recubiertas con un núcleo de poliplexo para el suministro intracelular de polinucleótidos para modificar la expresión génica.

Información de Antecedentes

- 10 La introducción de polinucleótidos en células para alterar la expresión génica requiere un empaquetamiento apropiado de los polinucleótidos para protegerlos frente a la degradación antes de la entrada de células, para permitir la entrada en células y para dirigir el suministro al compartimiento subcelular apropiado. La efectividad en la alteración de la expresión también puede depender de los marcos de tiempo de liberación de polinucleótidos desde el empaquetamiento después de la entrada celular. Tecnologías basadas en nanopartículas disponibles para
- 15 modificar la expresión génica adolecen de bajos niveles de transfección celular y una eficacia limitada tras la transfección, al menos en parte, debido a sus limitaciones para satisfacer los requisitos anteriores. Por lo tanto, es deseable obtener un agente de transfección basado en nanopartículas y un método de uso del mismo que aborde todos estos requisitos para mejorar la efectividad.

Sumario de la invención

- 20 Se superan las deficiencias de la técnica anterior y se proporcionan ventajas adicionales mediante la provisión, en un aspecto, de una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1. La nanopartícula incluye un poliplexo de núcleo y un recubrimiento de sílice en el poliplexo de núcleo, y el poliplexo incluye un polímero aniónico, un polímero catiónico, un polipéptido catiónico, que es un péptido con cola de histona, y un polinucleótido. En otro aspecto, la nanopartícula también puede incluir un polímero unido a una superficie exterior del recubrimiento de sílice.
- 25 También se proporciona un método para modificar polinucleótidos intracelulares de acuerdo con la reivindicación 13. El método incluye poner en contacto una célula con una nanopartícula que incluye un poliplexo de núcleo y un recubrimiento de sílice en el poliplexo de núcleo, y el poliplexo incluye un polímero aniónico, un polímero catiónico, un polipéptido catiónico, que es un péptido con cola de histona, y un polinucleótido. En otro aspecto, la nanopartícula también puede incluir un polímero unido a una superficie exterior del recubrimiento de sílice.
- 30 Características y ventajas adicionales se consiguen a través de las técnicas de la presente invención. Estos y otros objetos, características y ventajas de esta invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de los diversos aspectos de la invención, tomados en conjunto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

- 35 Uno o más aspectos de la presente invención se señalan particularmente y se reivindican claramente como ejemplos en las reivindicaciones en la conclusión de la memoria descriptiva. Lo que antecede y otros objetos, características y ventajas de la invención son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos que se acompañan, en los que:

Las FIGs. 1A-1B son representaciones esquemáticas de algunas realizaciones de una nanopartícula y sus componentes de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

- 40 la FIG. 2A es una representación esquemática de cómo se puede fabricar una nanopartícula de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

la FIG. 2B es una representación esquemática de medios mediante los cuales una célula puede captar y procesar intracelularmente una nanopartícula de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

- 45 la FIG. 3 es una gráfica que ilustra los efectos sobre la complejación de poliplexo de incluir diferentes relaciones de diversos polímeros cargados y polinucleótidos de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

la FIG. 4 es una gráfica que ilustra los efectos sobre la complejación de poliplexo de incluir diferentes relaciones de diversos polímeros cargados y polinucleótidos, con o sin incluir un polímero aniónico en el poliplexo, de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

- 50 la FIG. 5 es una gráfica que ilustra el efecto desestabilizante en un poliplexo de incluir cantidades crecientes de un polímero aniónico en presencia o ausencia de polipéptidos catiónicos de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

la FIG. 6 es una gráfica que ilustra tamaños de nanopartículas que poseen diversas capas de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

la FIG. 7 son fotomicrografías de células transfectadas con diversas nanopartículas que demuestran la captación celular y la localización subcelular de las nanopartículas después de la transfección de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

la FIG. 8 son fotomicrografías de células transfectadas con nanopartículas que muestran la duración de la permanencia de nanopartículas en células después de la transfección de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

las FIGs. 9A-B son fotomicrografías que muestran la captación celular de nanopartículas que poseen una capa de polímeros unidos al exterior de un recubrimiento de sílice de un políplexo de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

la FIG. 10 es una representación esquemática de péptidos TALEN codificados por un ácido nucleico incluido en una nanopartícula que provoca la inactivación de la expresión de esclerostina de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

las FIGs. 11A-11C son gráficas que ilustran los efectos de transfectar células con diferentes cantidades de nanopartículas que fijan como objetivo la expresión de esclerostina basada en la expresión de esclerostina y β -catenina de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

las FIGs. 12A-12F son gráficas que ilustran los efectos de transfectar células con diferentes cantidades de nanopartículas que fijan como objetivo la expresión de la esclerostina basada en los niveles de expresión de diversos péptidos de señalización celular de acuerdo con un aspecto de la presente invención.

la FIG. 13 son fotomicrografías que demuestran los efectos de transfectar células con nanopartículas que fijan como objetivo la expresión de esclerostina basada en la expresión de un gen informador co-transfectado que responde a factores de transcripción cuya actividad está inhibida por la señalización mediada por esclerostina de acuerdo con un aspecto de la presente invención;

las FIGs. 14A-14C son fotomicrografías que demuestran los efectos de transfectar células con nanopartículas que fijan como objetivo la expresión de esclerostina basada en la mineralización de acuerdo con un aspecto de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Aspectos de la presente invención y determinadas características, ventajas y detalles de la misma se explican más detalladamente a continuación con referencia a realizaciones no limitativas ilustradas en los dibujos que se acompañan. Se omiten descripciones de materiales bien conocidos, herramientas de fabricación, técnicas de procesamiento, etc., con el fin de no ocultar innecesariamente la invención en detalle. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones de la invención, se proporcionan solo a modo de ilustración, y no a modo de limitación. A partir de esta divulgación, los expertos en la técnica apreciarán diversas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o disposiciones dentro del alcance de los conceptos inventivos subyacentes.

La presente divulgación proporciona, en parte, una nanopartícula de múltiples capas para transfectar células con agentes para modificar la expresión génica. Se proporcionan nanopartículas diseñadas para mejorar la estabilidad del suero, el suministro fijado como objetivo a tipos de células específicos, una mayor especificidad nuclear y el desempaquetado específico de compartimientos, una capacidad mejorada para retener niveles significativos de cargamento durante las fases iniciales de la internalización y la capacidad de mantener la liberación del cargamento durante diversos tiempos después de la internalización y los métodos de uso de los mismos.

En esta memoria se describe que complejos de polinucleótidos con polímeros, o políplexos, creados por la condensación de polímeros catiónicos y polinucleótidos en presencia de polímeros aniónicos pueden mediar en el aumento de la eficacia de la transfección incrementada en comparación con conjugados de polinucleótido-polímero catiónico. Aunque este proceso puede producir más partículas y aumentar el área de superficie neta de las nanopartículas expuestas para la captación celular, un elemento repelente electrostático mejorado también puede estar en juego al liberar ácidos nucleicos a través de esta técnica. Sorprendentemente, en contraposición a una desagregación más rápida de nucleótidos de los políplexos de nanopartículas que incluyen polímeros aniónicos, como se habría predicho sobre la base de la bibliografía existente, en un aspecto de la presente invención, incluye un polímero aniónico en un núcleo de políplexo de nanopartículas que puede prolongar el tiempo de permanencia intracelular de la nanopartícula y liberar agentes que afectan a la expresión génica o que regulan de otro modo la función celular, o los cargamentos.

En esta memoria se describe que la presencia de un polipéptido catiónico en una nanopartícula puede mediar en la estabilidad, la compartimentalización subcelular y la liberación del cargamento. Como ejemplo, fragmentos del

extremo N de péptidos de histona, a los que se alude generalmente como péptidos de la cola de histona, dentro de diversos poliplexos no solo pueden ser desprotonados por diversas modificaciones de histonas, como en el caso de la acetilación mediada por histona acetiltransferasa, sino que también puede mediar el desempaquetado efectivo y específico para componentes nucleares como componentes de los poliplexos. Su tráfico puede depender de vías endocíticas alternativas que utilizan el transporte retrógrado a través del Golgi y el retículo endoplásmico, y la naturaleza de las histonas existentes dentro de la envoltura nuclear sugiere una secuencia de localización nuclear innata en los péptidos de la cola de histonas. En un aspecto de la presente invención, incluye un péptido de la cola de histonas que puede fomentar la localización nuclear de nanopartículas y dar como resultado la liberación, mediada por enzimas, de un cargamento de polinucleótidos de las mismas.

En esta memoria se describe que recubrimientos de sílice de poliplexos pueden sellar sus cargamentos antes y durante la captación celular inicial. Los poliplexos comúnmente utilizados que consisten en poli(etilenimina) y ADN tienen una tendencia a desprenderse de la mayoría (~ 90%) de sus cargamentos durante la internalización celular, y el cargamento restante permanece a menudo unido a sus restos poliméricos de nanoportadores catiónicos. Con las capas intermedias de sílice de estabilización transitoria se puede observar una mayor eficiencia de suministro intracelular, a pesar de la menor probabilidad de captación celular. En otro aspecto de la presente invención, el recubrimiento de un poliplexo de nanopartículas con un recubrimiento de sílice puede sellar el poliplexo, estabilizándolo hasta su liberación al procesarlo en el compartimiento subcelular deseado.

En esta memoria se describe que la eficacia de la transfección puede aumentarse adicionalmente añadiendo otra capa de polímero catiónico, lo que hace que la eficacia del suministro sea tanto como dos órdenes de magnitud mayor que en un poliplexo desnudo o recubierto de sílice, presumiblemente debido a que la naturaleza aniónica de un recubrimiento de sílice oligomérica es repulsiva para las células. Tal como se describe en esta memoria, los poliplexos recubiertos de sílice y sus derivados en capas adicionales son estables en suero y son adecuados para experimentos in vivo a diferencia de los conjugados de polímero catiónico / ácido nucleico por sí mismos.

Las FIGs. 1A-1B muestran ejemplos de componentes de una nanopartícula de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con la presente invención, un núcleo de poliplexo de nanopartículas puede incluir un polinucleótido, un polímero aniónico, un polímero catiónico y un polipéptido catiónico, que es un péptido de la cola de histonas. Luego se puede aplicar un recubrimiento de sílice al núcleo de poliplexo, y los polímeros se pueden unir entonces a una superficie exterior del recubrimiento de sílice. El polinucleótido puede ser un vector de ADN para impulsar la expresión intracelular de una secuencia de ácidos nucleicos que contiene. Sin embargo, una nanopartícula también puede comprender otros tipos de polinucleótidos, tales como ADN lineal o diversos tipos de ARN, incluidos el ADNdc, el ADNcs, el ARNm, el ARNip o secuencias de ARN CRISPR, u otros, o cualquier combinación de los anteriores. Una nanopartícula también puede incluir, además de o en lugar de cualquiera de los ejemplos anteriores de polinucleótidos, un ácido nucleico peptídico, otras moléculas pequeñas cargadas o polares entre 50 y 1000 Da, o alternativamente entre 200 y 10 kDa de tamaño, tales como nucleótidos cíclicos, tales como AMPc, moldes de origami de ADN, aptámeros, polipéptidos cargados, proteínas o fragmentos de proteínas entre 2 y 100 kDa, peptoides, constituyentes fosforilados o sulfatados, constituyentes modificados aniónicamente y combinaciones multiméricas u oligoméricas de los anteriores. Una persona con experiencia ordinaria entenderá que cualquiera de los anteriores, o cualquier combinación de los mismos, está incluido dentro de la presente invención.

Continuando con la FIG. 1A, en un aspecto de la invención, un polímero catiónico dentro del poliplexo puede ser un polipéptido que contiene aminoácidos catiónicos y puede ser, por ejemplo, poli(arginina), poli(lisina), poli(histidina), poli(ornitina), poli(citrulina), o un polipéptido que comprende cualquier combinación de más de uno de los anteriores. Una nanopartícula también puede incluir, además de o en lugar de cualquiera de los ejemplos anteriores de polímeros catiónicos, poli(etilenimina), poli(aspartamida), polipeptoides, un poliéster con carga funcional, un polisacárido catiónico, un amino azúcar acetilado, quitosano, o una variante o variantes que comprenden cualquier combinación de más de uno de los anteriores, en forma lineal o ramificada.

En un ejemplo, un polímero catiónico puede comprender una poli(arginina), tal como poli(L-arginina). Un polímero catiónico dentro del poliplexo puede tener un peso molecular de entre 1 kDa y 200 kDa. Un polímero catiónico dentro del poliplexo también puede tener un peso molecular de entre 10 kDa y 100 kDa. Un polímero catiónico dentro del poliplexo también puede tener un peso molecular de entre 15 kDa y 50 kDa. En un ejemplo, un polímero catiónico comprende poli(L-arginina) con un peso molecular de aproximadamente 29 kDa, tal como se representa por la SEQ ID NO: 1 (PLR). En otro ejemplo, un polímero catiónico puede comprender poli(etilenimina) lineal con un peso molecular de 25 kDa (PEI). En otro ejemplo, un polímero catiónico puede comprender poli(etilenimina) ramificada con un peso molecular de 10 kDa. En otro ejemplo, un polímero catiónico puede comprender poli(etilenimina) ramificada con un peso molecular de 70 kDa. En otro ejemplo, un polímero catiónico puede comprender un isómero D de poli(arginina) o de cualquiera de los polímeros anteriores, tales como polipéptidos, que puede ser particularmente ventajoso debido a que polímeros tales como polipéptidos que contienen un isómero D pueden ser menos susceptibles a la degradación dentro de una célula y, por lo tanto, tienen un efecto prolongado en influir en la liberación del cargamento y la tasa de la misma a lo largo del tiempo.

Continuando con la FIG. 1A, en un aspecto adicional de la invención, un polímero aniónico dentro del poliplexo puede ser un polipéptido que contiene aminoácidos aniónicos, y puede ser, por ejemplo, ácido poli-glutámico o ácido poli-aspartico, o un polipéptido que comprende cualquier combinación de los anteriores. Una nanopartícula también

puede incluir, además de o en lugar de cualquiera de los ejemplos anteriores de polímeros aniónicos, un glicosaminoglicano, una glicoproteína, un polisacárido, poli(ácido manurónico), poli(ácido gulurónico), heparina, sulfato de heparina, condroitina, sulfato de condroitina, queratán, sulfato de queratán, agregano, poli(glucosamina) o un polímero aniónico que comprende cualquier combinación de los anteriores. En un ejemplo, un polímero aniónico puede comprender ácido poli-glutámico. Un polímero aniónico dentro del poliplexo puede tener un peso molecular de entre 1 kDa y 200 kDa. Un polímero aniónico dentro del poliplexo también puede tener un peso molecular de entre 10 kDa y 100 kDa. Un polímero aniónico dentro del poliplexo también puede tener un peso molecular de entre 15 kDa y 50 kDa. En un ejemplo, un polímero aniónico es poli(ácido glutámico) con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. Polímeros que consisten en o que incluyen un isómero D del ácido glutámico pueden ser particularmente ventajosos, debido a que pueden ser menos susceptibles a la degradación dentro de una célula y, por lo tanto, tienen un efecto prolongado para influir en la liberación del cargamento y su tasa a lo largo del tiempo. Por ejemplo, el polímero aniónico dentro del poliplexo puede tener la secuencia representada por la SEQ ID NO: 2 (PDGA). En otro ejemplo, un polímero aniónico puede comprender un isómero D de cualquiera de los polímeros o polipéptidos anteriores, que puede ser particularmente ventajoso debido a que polímeros tales como polipéptidos que contienen un isómero D pueden ser menos susceptibles a la degradación dentro de una célula y, por lo tanto, tienen un efecto prolongado en influir en la liberación del cargamento y la tasa de la misma a lo largo del tiempo.

Continuando con la FIG. 1A, en otro aspecto de la invención, un péptido catiónico en un núcleo de poliplexo de nanopartículas es un fragmento de un péptido de histona, tal como de las proteínas H1, H2, H3 o H4. El fragmento puede incluir aminoácidos, cuya secuencia corresponde al extremo N de una proteína histona. Por ejemplo, el fragmento puede comprender hasta los primeros 5 (SEQ ID NO: 9), 10 (SEQ ID NO: 10), 15 (SEQ ID NO: 11), 20 (SEQ ID NO 12), 25 (SEQ ID NO: 13) o más aminoácidos N-terminales de una proteína histona. El fragmento también puede estar amidado en su extremo C. El fragmento también puede haber sido modificado de modo que uno o más residuos de lisina estén metilados, uno o más residuos de histidina, lisina, arginina u otros residuos complementarios estén acetilados o sean susceptibles de acetilación tal como histona acetiltransferasa o sustrato de acetil CoA, o cualquier combinación de los anteriores. Por ejemplo, un péptido catiónico en un núcleo de poliplexo de nanopartículas puede tener la secuencia representada por la SEQ ID NO: 3, que comprende los primeros 25 aminoácidos de la proteína histona 3 humana, amidada en su extremo C y tri-metilada en la lisina 4 de acuerdo con la presente invención (HTP).

En otra realización, una nanopartícula puede incluir o contener, además de los polipéptidos catiónicos anteriores, una secuencia de localización nuclear. Un polipéptido catiónico puede comprender una secuencia de localización nuclear en su extremo N o C. Una secuencia de localización nuclear puede comprender un sustrato de importina o de carioferina, o puede tener o contener una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 8. En otra realización, una nanopartícula puede incluir, además de los polipéptidos catiónicos anteriores, una señal de localización mitocondrial o un fragmento peptídico de mtHSP70.

Continuando con la FIG. 1B, en otro aspecto de la invención, la nanopartícula puede comprender un recubrimiento reversible que proporciona estabilidad al núcleo de poliplexo antes de la internalización celular o compartimental, evitando la degradación o desestabilización prematura. Por ejemplo, se puede aplicar un recubrimiento de sílice al núcleo de poliplexo. En otro ejemplo, se puede aplicar fosfato de calcio o hidroxapatita a un núcleo de poliplex. En otro ejemplo, se puede aplicar un polímero catiónico ramificado, un polipéptido o peptoide a un núcleo de poliplex, con un exceso de carga aniónica. Un recubrimiento, tal como un recubrimiento de sílice, puede proteger el poliplexo de la degradación antes de la exposición al microentorno endosomal.

En otro aspecto, una nanopartícula puede comprender una capa de polímeros unida o electrostáticamente unida a la superficie exterior del poliplexo recubierto, tal como a o con la superficie externa de un recubrimiento de sílice. Polímeros externos de este tipo pueden servir para prevenir la repulsa celular del poliplexo recubierto para fomentar el contacto con y la absorción por parte de una célula. Una capa de polímero externa también puede servir para fomentar la internalización por parte de tipos de células específicos, tales como si el polímero unido externamente es o imita un ligando a un receptor expresado por un tipo de célula del cual se desea la transfección. Un polímero en una capa de polímero unida a la superficie exterior del recubrimiento en un poliplexo puede tener un tamaño de entre 0,1 y 20 kDa, o puede tener un tamaño de hasta 40 o 50 kDa.

Ejemplos de polímeros que comprenden una capa de polímero unida a la superficie exterior del poliplexo del núcleo recubierto incluyen los representados por la SEQ ID NO: 4, que es un polímero de poli(arginina) de aproximadamente 10 kDa, y la SEQ ID NO: 5, que es una proteína del factor de crecimiento endotelial vasoactivo humano, de acuerdo con la presente invención. En otro ejemplo, un polímero que comprende una capa unida a la superficie externa del poliplexo recubierto puede comprender un sustrato de anclaje de entre 1 y 25 restos aniónicos o catiónicos repetitivos en el extremo N, el extremo C, el extremo 5' o 3' de un polímero, polipéptido o polinucleótido para proporcionar conjugación electrostática de un motivo de fijación como objetivo contenido en el polímero, polipéptido, o polinucleótido hacia el núcleo del poliplexo recubierto. En otro ejemplo, un polímero que comprende una capa unida a la superficie externa del poliplexo del núcleo recubierto puede comprender una secuencia de polímero, polipéptido o polinucleótido que exhibe una complementariedad del par de bases o una afinidad de unión por un motivo de unión a la secuencia de aminoácidos para unir capas adicionales que se pueden agregar sobre ellas.

En otro aspecto de la presente invención, ilustrado en la FIG. 2A, se crea un poliplexo catiónico y luego se recubre con un recubrimiento de sílice. Los núcleos de poliplexo de las nanopartículas pueden crearse a través de interacciones electrostáticas que conducen a la condensación. Se pueden crear dos soluciones de igual volumen, una con HEPES 40 mM sin ajustar el pH (pH ~ 5,5) combinada con un 0,1% p/v de polímero catiónico y un polipéptido catiónico en agua y la otra con Tris-HCl 30 mM (pH ~ 7,4) combinados con 0,1% p/v de polímeros aniónicos y un polinucleótido en agua. En una realización, el polímero catiónico comprende la SEQ ID NO: 1, el polímero aniónico comprende la SEQ ID NO: 2 y el polipéptido catiónico comprende la SEQ ID NO: 3. Estas soluciones pueden combinarse mediante la adición gota a gota de la solución catiónica a la aniónica sin agitación. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se puede añadir gota a gota una solución de 200 uL que contiene 10 µg de ácidos nucleicos dentro de los poliplexos a una solución de silicato de sodio 45 mM (Sigma) en Tris-HCl (pH = 7,4) y se deja incubar entre 8 y 24 horas a temperatura ambiente. Poliplexos recubiertos de sílice pueden ser aislados a través de centrifugación con un filtro Nanosep® de 300 kDa (Pall, Port Washington, NY) a 3000 g con el fin de aislar complejos de especies de sílice y polímeros no unidos. Las nanopartículas pueden resuspenderse adicionalmente en una solución que contiene un polímero para unirse a la superficie externa del recubrimiento de sílice. Por ejemplo, pueden resuspenderse en una solución que comprende un polímero representado por la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5 a 0,1% p/v durante una hora. Las nanopartículas se pueden centrifugar nuevamente antes de la resuspensión en medio de transfección. Este método es solo un ejemplo de la fabricación de nanopartículas de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 2B es una representación esquemática de poner en contacto una célula con una nanopartícula de acuerdo con la presente invención que conduce a la internalización de la nanopartícula, tal como por endocitosis mediada por caveolas o macropinocitosis. Las nanopartículas pueden ser transportadas de forma retrógrada a través del Golgi y el retículo endoplásmico o pueden ser procesadas a través de vías lisosomales, lo que resulta en la pérdida del recubrimiento, tal como un recubrimiento de sílice, y la exposición del núcleo de poliplexo. El núcleo de poliplexo se puede trasladar adicionalmente al núcleo celular, en que el procesamiento enzimático puede degradar el polímero catiónico, tal como a través de la actividad de arginasas, o fomentar de otra manera el desempacado del núcleo del poliplexo, tal como a través de la acetilación de un péptido de la cola de histonas dentro del poliplexo, conduciendo a la liberación de polinucleótidos tales como ADN plasmídico desde el núcleo poliplexo, de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con la presente invención también pueden producirse otras etapas de procesamiento intracelular que modifican los constituyentes de una nanopartícula y su núcleo de poliplexo o su recubrimiento o capa de polímero unida al recubrimiento.

En un aspecto adicional, la presente invención incluye relaciones optimizadas de polímeros aniónicos y catiónicos, polipéptidos catiónicos y polinucleótidos para la complejación de un núcleo de poliplexo como parte de una nanopartícula. En un ejemplo, el ADN plasmídico se marcó de forma fluorescente con bromuro de etidio (40 ng de EtBr / µg de ADN) antes de la adición de diversos constituyentes poliméricos en las relaciones molares [I(positivo)]:[I(negativo)] de [amina (n)]:[fosfato (p) + carboxilato (c)], o de c:p en el caso de la adición de poli(ácido D-glutámico) (PDGA; SEQ ID NO: 2). La adición de poli(etilenimina) lineal (PEI, 25 kDa) se comparó con la adición de poli(L-arginina) (PLR, 29 kDa; SEQ ID NO: 1) de forma independiente, así como junto con un péptido de la cola histona H3K4 (Me3) (HTP; SEQ ID NO: 3), con el fin de cuantificar comportamientos de complejación similares entre los dos polímeros como parte de un complejo binario (es decir, PEI + ADN o PEI + ADN) o complejos ternarios (HTP + PEI + ADN o HTP + PLR + ADN). La relación molar relativa de cada uno de los componentes polímero catiónico y polipéptido catiónico, puede ser 60%:40%, respectivamente. Se utilizaron un filtro Zeiss y un espectrofotómetro para excitar el ADN marcado con EtBr a 510 nm para una emisión a 595 nm, y los resultados se compararon entre diversas formulaciones con EtBr no unido como un control negativo.

La FIG. 3 es una gráfica que muestra los efectos de variar la relación de polímeros o polipéptidos aniónicos o catiónicos a polinucleótidos. El eje X muestra la relación de polímero a fosfato cargado y el eje Y muestra la fluorescencia relativa después de la combinación de los constituyentes indicados. Una disminución en la fluorescencia relativa indica el desplazamiento de EtBr del ADN y la formación de poliplexo. Relaciones de polímero catiónico, o de polímero catiónico y polipéptido catiónico, a ADN de aproximadamente 5:1 y superior exhibieron una disminución de aproximadamente el 40% en la fluorescencia, lo que indica la complejación de ADN y los polímeros en poliplexos. La adición de PDGA en ausencia de polímeros catiónicos o polipéptidos catiónicos no afectó a la complejación.

Después de la complejación de PLR-HTP-ADN, PEI-HTP-ADN, PLR-ADN y PEI-ADN y de la determinación de que PDGA no posee capacidad para provocar la complejación de polinucleótidos, se estableció la influencia de PDGA en la cinética de formación mediante la comparación de relaciones molares [5,5 (positivo)]:[1(negativo)] y [10(positivo)]:[1(negativo)] de [amina (n)]:[fosfato (p)] y [amina (n)]:[fosfato (p) + carboxilato (c)] en las eficiencias de complejación para determinar los efectos del exceso de relaciones de carga catiónicas e igualadas en la complejación de nanopartículas. Se esperaba que la inclusión de grupos carboxilato de PDGA tuviera efectos sobre la cinética de formación global equiparable a la inclusión de grupos fosfato de ADN. La fluorescencia relativa se comparó con el ADN sin la adición de polímeros o polipéptidos o EtBr en ausencia de ADN como controles.

La FIG. 4 indica los efectos de añadir PDGA a polímeros catiónicos y polipéptidos catiónicos en la cinética de complejación de poliplex. El ADN se complejó con HTP, PLR o PEI, con o sin adición de PDGA. Se muestran los experimentos que utilizan relaciones molares de polímero catiónico (PLR o PEI) a polinucleótido de 5,5:1 (tal como

se muestra en las barras marcadas con $n/p = 5,5$) y relaciones molares de polímero catiónico (PLR o PEI) a polinucleótido más polímero aniónico de 5.5:1 y 10:1 (tal como se muestra en las barras marcadas $n/(p + 2c) = 5,5$ o 10), con o sin adición de HTP. La adición de PDGA no afectó a la cinética de complejación en ninguna de las relaciones molares sometidas a ensayo.

5 También se determinaron los efectos de incluir un polímero catiónico y un polipéptido catiónico en la desestabilización de poliplexos, tal como se muestra en la FIG. 5. Las relaciones molares de nanopartículas de poliplexo de ADN y polipéptidos catiónicos (PLR con o sin HTP o PEI con HTP) con [(PDGA) carboxilato (c):(ADN) fosfato (p)] que variaban de 0 a 100 se complejaron tal como se describe, en comparación con el ADN o EtBr solo como controles, y se determinaron los efectos de la desestabilización (según lo indicado por el aumento de la fluorescencia). En ausencia de HTP, la adición de PDGA no condujo a la desestabilización del poliplex. Sin embargo, en presencia de HTP, la adición de relaciones molares de PDGA a ADN de 20 y superior condujo a la desestabilización de poliplex. Estos resultados indican un sorprendente efecto sinérgico del polipéptido catiónico y el polímero aniónico en la desestabilización del complejo. La incorporación de polipéptidos catiónicos, y/o la inclusión de constituyentes catiónicos de pesos o tamaños moleculares dispares, en un núcleo de poliplexo de nanopartículas puede potenciar beneficiosamente la capacidad de un polímero catiónico para fomentar la disociación y liberación del cargamento del polinucleótido del poliplexo y sus otros componentes.

Se utilizó la dispersión dinámica de la luz (BRAND) para determinar los radios hidrodinámicos de nanopartículas en diversas fases de formación. Las nanopartículas que contienen poliplexo de núcleo con ADN plasmídico, PLR, PDGA y HTP, en una relación molar de [amida]:[(fosfato)] de 5.5:1 se complejaron tal como se describe. Algunos núcleos de poliplexo se recubrieron adicionalmente con sílice según se describe. Y algunos poliplexos recubiertos de sílice se colocaron en capas adicionales con polímero catiónico (SEQ ID NO: 4) tal como se describe. Se obtuvieron 30 - 60 minutos de mediciones después de la formación inicial del núcleo de complejos ternarios, recubrimiento de sílice de los núcleos y el recubrimiento de polímero catiónico de los núcleos recubiertos de sílice. La FIG. 6 es una gráfica que muestra diámetros de nanopartículas. Los núcleos de poliplexo no recubiertos y los núcleos de poliplexo recubiertos con sílice tenían un diámetro medio de aproximadamente 70-150 nm. En otras realizaciones, los núcleos de poliplexo y los núcleos de poliplexo recubiertos con sílice pueden estar dentro de un intervalo de 100-170 nm de diámetro medio. La adición de un recubrimiento de polímero catiónico al recubrimiento de sílice proporcionó una nanopartícula con un diámetro medio de aproximadamente 170 nm. En otras realizaciones, los núcleos de poliplexo recubiertos con sílice con una capa adicional de polímero catiónico unido a la capa exterior de sílice pueden estar dentro de un intervalo de aproximadamente 80-200 nm de diámetro medio.

También se determinó la captación celular de nanopartículas. Isotiocianato de fluoresceína (FITC) se conjugó de modo covalente con aminas de PEI (25 kDa lineal) y PLR (29 kDa), de modo que la relación molar de aminas a FITC fue de 100:1. La reacción se realizó en la oscuridad a temperatura ambiente durante cuatro horas en volúmenes iguales de agua y DMSO. Con el fin de establecer la conjugación, se centrifugó una solución al 0,05% p/v de 500 μ L de cada uno de los polímeros modificados con fluorescencia en un filtro Nanosep® de 10 kDa y la intensidad de fluorescencia del eluato (485 ex./520 em.) se comparó con la solución de polímero sin filtrar, así como con el agua. El plásmido mCherry (Addgene) se incluyó en las nanopartículas para permitir la detección fluorescente de la expresión dirigida por plásmidos.

Se cultivaron osteoblastos murinos MC3T3 en matraces de plástico de cultivo de tejidos de poliestireno T-75 (Corning, CA, EE.UU.). Medio de Eagle modificado por Dulbecco, complementado con suero bovino fetal al 10% (Thermo Fisher Scientific, VA, EE.UU.) se utilizó para los osteoblastos junto con penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen, NY, EE.UU.). Se añadió naranja xilenol a los medios de cultivo celular desde el día 15 hasta el día 25 después del inicio del cultivo celular. El día 25 las células fueron fijadas y analizadas en cuanto a la mineralización. Para el suministro del plásmido mCherry utilizando nanopartículas modificadas con FITC, los osteoblastos se cultivaron a razón de 1000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante 12 - 16 horas en DMEM libre de antibióticos que contenía FBS al 10%. Inmediatamente antes de la transfección, el medio se reemplazó por volúmenes iguales de nanopartículas suspendidas en OptiMEM y DMEM que contenían FBS al 10%.

Todos los complejos se marcaron con FITC y se sometieron a observación cualitativa de intensidad de fluorescencia (488/520 ex./em.) antes de la transfección. Se transfectaron osteoblastos de 96 pocillos (1000 células/pocillo) con 200 ng de plásmidos por triplicado para cada uno de los complejos binario (plásmido y polímero catiónico), ternario (plásmido y polímero catiónico, más polímero aniónico o polipéptido catiónico) y cuaternario (plásmido, polímero catiónico, polímero aniónico y polipéptido catiónico), así como su equivalente recubierto con sílice, con 1 conjunto control y 8 conjuntos experimentales ($n = 3$) en total. Se utilizó un 5% de suero con el fin de estudiar los efectos del suero sobre las propiedades extracelulares de la agregación.

A las 30 horas posteriores a la transfección, la formación de imágenes fluorescentes bimodales permitió la observación simultánea de nanopartículas marcadas con FITC (488 ex./520 em.) y la expresión del gen mCherry de la que eran responsables (633 ex./680 em.). Se observó un mínimo de 20 células en diferentes ubicaciones en cada pocillo y se obtuvieron imágenes representativas. Se utilizó ImageJ para procesar las imágenes superpuestas y combinar los canales de contraste de fase, 488/520 y 633/680.

Fotomicrografías que demuestran la captación celular se muestran en la FIG. 7. Los círculos en la FIG. 7 indican

dónde se evidencian altos niveles de localización nuclear. Las nanopartículas binarias recubiertas con sílice muestran propiedades de liberación por explosión (es decir, la localización nuclear no es evidente en las muestras de ADN-PLR + sílice). La inclusión de PDGA en los núcleos de poliplex provoca la liberación prolongada de plásmido dentro de los núcleos celulares. Este efecto de PDGA para provocar una liberación prolongada fue sorprendente a la vista de la bibliografía que sugiere lo contrario: que la inclusión de polímeros catiónicos en poliplexos de nanopartículas aceleraría y acortaría la duración de la disociación del cargamento de polinucleótidos de otros constituyentes del poliplexo. La adición de HTP también provoca una extensa localización nuclear.

El recubrimiento adicional de nanopartículas recubiertas con sílice (ADN-HTP-PDGA-PLR + Si) con poli(arginina) (SEQ ID NO: 4) hace que las nanopartículas sean estables en el suero y provoca la permanencia extendida del cargamento de nanopartículas dentro de las células. La FIG. 8 son fotomicrografías que muestran la captación y retención celular de núcleos de poliplexos conjugados con FITC recubiertos de sílice, a los que se ha añadido una capa adicional de poli(L-arginina) (SEQ ID NO: 4), por parte de osteoblastos murinos MC3T3, de acuerdo con la presente invención. A diferencia de las nanopartículas recubiertas con sílice mostradas en la FIG. 7, en la FIG. 8 no se observa agregación de nanopartículas que contengan una capa adicional de polímeros catiónicos en el exterior del recubrimiento de sílice, lo que indica que nanopartículas de este tipo permanecen estables en el suero. Además, se observa que estas nanopartículas exhiben una permanencia prolongada dentro del núcleo celular, de modo que la fluorescencia alcanza cualitativamente un pico en aproximadamente 1,5 días y la fluorescencia detectable se mantuvo a lo largo de 14 días.

La estratificación de núcleos de poliplexo recubiertos con sílice con polímeros específicamente dirigidos a unirse a tipos de células particulares puede mejorar aún más la captación. La asociación de ligandos para receptores celulares con la superficie de una nanopartícula puede potenciar la afinidad de la nanopartícula para células que expresan dichos receptores y aumentan la transfección de este tipo de células. Como un ejemplo de acuerdo con la presente invención, poliplexos recubiertos con sílice se recubrieron con VEGF (SEQ ID NO: 5), un ligando de alta afinidad para los receptores de VEGF, que se expresan en niveles altos por las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs). Las HUVECs se incubaron con poliplexos conjugados con FITC recubiertos con sílice con poli(L-arginina) (SEQ ID NO: 4) o VEGF humano (SEQ ID NO: 5) unida a la superficie exterior del recubrimiento de sílice durante 40 min antes de lavarse dos veces con PBS y luego se resuspenden en DMEM (FBS al 10%). Se tomaron imágenes de las células 4 horas más tarde. Después de este corto período de incubación, solo se observaron niveles bajos de transfección con nanopartículas que contenían una capa de poli(L-arginina) unida a la superficie externa de sílice (FIG. 9A), mientras que el recubrimiento con VEGF en lugar de poli(L-arginina) dio lugar a una internalización celular significativamente mayor en este punto de tiempo de cuatro horas. Un experto en la materia reconocería que virtualmente cualquier otro tipo de célula también puede ser transfectado por nanopartículas de acuerdo con la presente invención, y que una capa de polímeros puede unirse a la capa exterior de núcleos de poliplexo revestidos con sílice para fomentar o influir de otro modo en este efecto. Una persona así también comprendería que también estarían incluidos dentro de la presente invención otros medios para poner en contacto células con nanopartículas para lograr dichos resultados, tales como i.p., i.v., i.m., o s.c. u otra administración mediante inyección o transdermal o vía supositorio, o ingesta o inhalación oral o nasal por un ser humano o animal, o el contacto con tejido explantado o células o células madre.

En otro aspecto de la invención, un polinucleótido que codifica una nucleasa puede incorporarse en el núcleo de poliplexo de nanopartículas. Como un ejemplo no limitativo, un polinucleótido que codifica e impulsa la expresión de un TALEN (siglas inglesas de nucleasas de efector de tipo factor de transcripción) puede incluirse en la nanopartícula. Al igual que las nucleasas de dedos de zinc, las TALEN utilizan un motivo de unión al ADN modular (TALE) que se puede modificar para introducir nuevas especificidades de unión al ADN e incluso nucleasas (TALEN). Los TALEN consisten en dirresiduos variables de repetición múltiple (RVDs, por sus siglas en inglés), cada uno de los cuales especifica la unión a un solo nucleótido. Las matrices TALE se hacen encadenando RVDs en un orden específico para proporcionar especificidad y afinidad de unión a las secuencias de ADN deseadas. Comúnmente, estas herramientas de corte y empalme del genoma se diseñan mediante la fusión de dominios de escisión no específicos, tales como las nucleasas FokI, con TALE. Están disponibles protocolos de ensamblaje de TALEN que permiten el ensamblaje de estas secuencias repetitivas, incluido un método de ensamblaje de fuente abierta conocido como Golden Gate.

Tal como se comenta en esta memoria, las nanopartículas pueden diseñarse y utilizarse de una manera para regular la expresión de moléculas de señalización para alterar la función celular. Por ejemplo, secuencias de ADN cromosómico pueden eliminarse o alterarse para generar modelos celulares o animales de estados patológicos o tratamientos para los mismos, o para tratar estados patológicos o mejorar la salud humana. Un ejemplo no limitante de una proteína cuya expresión puede modificarse de acuerdo con la presente invención es esclerostina (SOST). La unión de SOST al receptor LRP5/6 inhibe la señalización Wnt, quizás a través de sistemas de retroalimentación entre Wnt3A, Wnt7B, Wnt10A, esclerostina, β -catenina, LEF1 y TCF1. La eliminación de estas cascadas mediante la separación de esclerostina puede resultar en un aumento significativo de la actividad de mineralización.

También se espera que el osteoprogenitor (OPG) y RANKL desempeñen un papel de respuesta a la delección de SOST, en que RANKL se expresa como un receptor para fomentar la osteoclastogénesis a través de la unión de RANK u ODF (factor de diferenciación de osteoclastos) ligados a osteoclastos, y OPG se une de forma antagónica a RANKL. Por lo tanto, la relación entre OPG y RANKL es un factor determinante de la relación entre la formación del

hueso y la resorción. Sin embargo, los cultivos individuales de osteoblastos se comunicarán a través de otras formas de señalización paracrina y esta relación debe reflejar más el comportamiento de las células alteradas en el co-cultivo con osteoclastos o in vivo.

Una nanopartícula puede diseñarse de modo que permita la transfección con una TALEN que puede alterar la expresión de SOST y, por consiguiente, generar un fenotipo de masa ósea alta. Como ejemplo, TALENS pueden diseñarse para unirse específicamente a loci en el gen SOST y crear rupturas de doble cadena en el genoma para interrumpir la transcripción o traducción y reducir la expresión de SOST. Como un ejemplo adicional, una nanopartícula puede contener plásmidos que codifican dos TALENs que crean roturas de doble cadena en cada lado del lugar cromosómico del codón de inicio para SOST. La reparación del ADN genómico endógeno después de la escisión de la secuencia que codifica el codón de inicio puede resultar en la transcripción de ARNm de esclerostina que carece del codón de inicio que no se puede traducir correctamente a la proteína SOST, reduciendo con ello la expresión y la actividad de SOST. Una representación esquemática de este modelo se muestra en la FIG. 10, en donde una TALEN "izquierda" y una TALEN "derecha" se unen y escinden sitios en lados opuestos del locus del codón de inicio de SOST. Como ejemplo, una TALEN izquierda puede tener la secuencia representada por la SEQ ID NO: 6, y una TALEN derecha puede tener la secuencia representada por la SEQ ID NO: 7. Una nanopartícula puede comprender un plásmido de expresión, tal como pUC19 (Número de acceso a Genbank L09137 X02514), en el que se ha subclonado una secuencia de nucleótidos que codifica una TALEN derecha o izquierda, tales como las representadas por la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7, para impulsar la expresión celular de la TALEN codificada. Una nanopartícula también puede incluir combinaciones de plásmidos de expresión que comprenden secuencias que codifican TALENs izquierda y derecha.

Una nanopartícula también puede comprender otras secuencias TALEN, que fijan como objetivo SOST o cualquier otro gen de interés, y también puede comprender otros vectores de expresión, de acuerdo con la presente invención. Una nanopartícula puede comprender otros tipos de polinucleótidos o análogos de los mismos, tales como especies de ARN o ADN que incluyen ARNm, ARNsi, ARNm, aptámeros, ARNsh, ácidos nucleicos derivados de AAV, ARN morfoleno, ácidos nucleicos peptoides y péptidos, ADNc, ADN origami, ADN y ARN con nucleótidos sintéticos, ADN y ARN con estructuras secundarias predefinidas, secuencias CRISPR, y multímeros y oligómeros, y cualquier combinación de los anteriores, de acuerdo con la presente invención. En otro ejemplo, una nanopartícula puede comprender polinucleótidos, cuya secuencia puede codificar otros productos tales como cualquier proteína o polipéptido cuya expresión se desee. Un experto en la materia reconocerá que los ejemplos anteriores están de acuerdo con la presente invención y pueden abarcarse por las reivindicaciones de la misma.

Después de la transfección de los osteoblastos murinos MC3T3 con nanopartículas diseñadas para inactivar la expresión de SOST de acuerdo con la presente invención, se realizaron ensayos ELISA y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en lisado celular y fracciones de sobrenadante. Las FIGs. 11A-11C son gráficas que demuestran la efectividad de diferentes cantidades (800 ng, 1600 ng o 2500 ng) de nanopartículas (NP) que contienen plásmidos de expresión que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican SOST TALENs izquierda (SEQ ID NO: 6) y derecha (SEQ ID NO: 7), de acuerdo con la presente invención, en la modulación de la expresión de SOST y la expresión de β -catenina a lo largo de un período de hasta más de 20 días después de la transfección. Para comparación, otras células se transfectaron con ARNm que codifica las mismas TALENs utilizando Lipofectamina, un agente conocido para la transfección celular. Tal como se muestra en las FIGs. 11 A-11C, los niveles intracelulares y extracelulares de SOST también se suprimieron durante la menos varias semanas después de la transfección con nanopartículas de acuerdo con la presente invención, mientras que la expresión de β -catenina se reguló al alza de forma concomitante, lo que significa una eficacia de las nanopartículas en regular a la baja la expresión y actividad de SOST.

También se realizó una qPCR para determinar si la regulación a la baja de la expresión de SOST con nanopartículas de acuerdo con la presente invención puede tener efectos posteriores en otros componentes de la cascada de señalización relevante. Las células se transfectaron tal como se describe anteriormente. Resultados sobre la expresión de numerosos componentes de la vía de señalización (SOST, β -catenina, TCF1, LEF1, Wnt3A, Wnt7B, Wnt10b, OPG y RANKL), a los 5, 14 y 21 días después de la transfección con diferentes cantidades de nanopartículas según se indica, se muestran en las FIGs. 12A-12F. Para comparación, se transfectaron otras células con ARNm que codifican las mismas TALENs utilizando Lipofectamina. Los resultados de la PCR en tiempo real mostraron una mayor regulación al alza de genes que responden a Wnt en líneas celulares transfectadas con nanopartículas que suministran SOST TALENs en comparación con SOST TALENs suministradas por Lipofectamina en hasta 2 a 6 veces en respuesta a una inactivación de esclerostina inhibidora de la señalización de Wnt.

La transcripción mediada por TCF/LEF-1 también se puede regular al alza después de la inactivación de la expresión de SOST de acuerdo con la presente invención. Células MC3T3-E1 fueron transfectadas con construcciones de plásmidos informadores de luciferasa TOPflash y FOPflash de control (Addgene n°s 12456 y 12457) que contienen sitios de unión a TCF/LEF-1. Las células se sembraron en placas a una densidad de 5000 células/pocillo de los portaobjetos de cámaras Labtek de 8 pocillos y se transfectaron con 1 μ g de plásmido TOPflash y FOPflash por separado. Para controlar la eficacia de la transfección, se utilizó un plásmido de control Renilla (Promega). La FIG. 13 son fotomicrografías que muestran la regulación al alza de la transcripción mediada por TCF/LEF-1 durante 21 días después de la transfección con nanopartículas que contienen plásmidos que codifican TALENs dirigidas a SOST, de acuerdo con la presente invención, son consistentes con una regulación al

alza de la expresión y actividad de TCF/LEF-1 después de la transfección con las nanopartículas inventadas.

La inactivación de la expresión de SOST de acuerdo con la presente invención también puede aumentar la mineralización en células de la médula ósea del estroma y osteoblastos. La mineralización se cuantificó mediante dos métodos separados, el primero basado en el umbral de la imagen de cultivos vitales marcados con naranja xilenol utilizando MATLAB (Mathworks, Natick, MA) y el segundo mediante espectroscopia de absorción atómica (AAS). Para el umbral del naranja xilenol, se tomaron imágenes de la fase y la fluorescencia (con Texas Red Filter Set) en cinco regiones adyacentes de los pocillos y luego se cosieron en una imagen más grande de 8 bits (4x, Nikon Ti-100). El canal de fase se restó de la fluorescencia, y se estableció un umbral en la mitad del nivel entre el fondo y la señal (-6 dB). El número de píxeles por encima del umbral se contó y se utilizó para expresar el porcentaje de área mineralizada en cada uno de los pocillos. La combinación de fase y fluorescencia permitió distinguir el xilenol naranja no unido, mientras que el uso de niveles de decibelios permitió la corrección de los niveles de fondo variados en cada una de las imágenes.

La mineralización también se cuantificó por absorción atómica con un espectrómetro de absorción atómica (AA-Perkin Elmer, MA). Cada uno de los pocillos se preparó mediante la adición de 0,5 ml de ácido nítrico al 10%, y el contenido de calcio resultante se midió con respecto a una curva estándar y se comparó entre los grupos. Se tuvo cuidado para minimizar la Interferencia debida a la precipitación de calcio ionizado con fases de fosfato, por lo que se agregó un gran exceso de iones potasio y lantano a cada uno de los pocillos.

Las FIGs. 14A-14C muestran los efectos de la transfección con nanopartículas de acuerdo con la presente invención sobre la mineralización después de la inactivación de SOST. La FIG. 14A son fotomicrografías de la tinción de la matriz mineralizada formada 25 días después de la inactivación de SOST. Las células del estroma se muestran en los paneles A-C, en donde el panel A muestra células de control, el panel B muestra células transfectadas a través de Lipofectamine, y el panel C muestra células transfectadas con nanopartículas que contienen plásmidos que codifican TALENs dirigidas contra SOST tal como se describe y de acuerdo con la presente invención. Células de osteoblastos MC3T3-E1 se muestran en los paneles D-G, en donde el panel D muestra células de control y los paneles E-G muestran células transfectadas con nanopartículas que contienen plásmidos que codifican TALENs dirigidos contra SOST tal como se describe, a dosis de 800 ng, 1600 ng y 2500 ng, respectivamente. de acuerdo con la presente invención. Las FIGs. 14B y 14C son gráficas que muestran la cuantificación de la mineralización. Las FIGs. 14 A-C demuestran una concentración aumentada de calcio en las células de la médula ósea del estroma y los osteoblastos después de la transfección con TALENs que fijan como objetivo SOST a través de nanopartículas de acuerdo con la presente invención, lo que confirma adicionalmente la efectividad de esta técnica para modificar la expresión celular y la actividad de los genes y las vías de señalización aguas abajo.

Listado de secuencias

<110> Rensselaer Polytechnic Institute

<120> SUMINISTRO DE GENES MEDIADO POR NANOPARTÍCULAS, EDICIÓN GENÓMICA Y MODIFICACIÓN QUE FIJA COMO OBJETIVO LIGANDOS EN DIVERSAS POBLACIONES DE CÉLULAS

<130> 0094.183WO

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 186

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada en laboratorio.

<400> 1

ES 2 719 112 T3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
50 55 60

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
65 70 75 80

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
85 90 95

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
100 105 110

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
115 120 125

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
130 135 140

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
145 150 155 160
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
165 170 175

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
180 185

<210> 2

5 <211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia creada en laboratorio.

<220>

<221> Característica miscelanea

<222> (1)..(116)

15 <223> Isómero D.

<400> 2

ES 2 719 112 T3

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
20 25 30

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
35 40 45

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
50 55 60

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
85 90 95

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
100 105 110

Glu Glu Glu Glu
115

<210> 3
<211> 25
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Trimetilación.

<220>
15 <221> Característica miscelanea
<222> (25)..(25)
<223> Amidado.

<400> 3

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala
20 25

<210> 4
<211> 64
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia creada en laboratorio.

<400> 4

ES 2 719 112 T3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
50 55 60

<210> 5

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45
Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
115 120 125

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
130 135 140

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
145 150 155 160

Asp Lys Pro Arg Arg
165

<210> 6

<211> 936

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia creada en laboratorio.

ES 2 719 112 T3

<400> 6

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Tyr Pro Tyr Asp
1 5 10 15

Val Pro Asp Tyr Ala Ile Asp Ile Ala Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr
20 25 30

Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val
35 40 45

Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His
50 55 60

Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val
65 70 75 80

ES 2 719 112 T3

Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Ala
 85 90 95
 Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala
 100 105 110
 Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp
 115 120 125
 Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val
 130 135 140
 Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn
 145 150 155 160
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 165 170 175
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 180 185 190
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 195 200 205
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 210 215 220
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 225 230 235 240
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 245 250 255
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 260 265 270
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 275 280 285
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 290 295 300
 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 305 310 315 320
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 325 330 335

ES 2 719 112 T3

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
340 345 350

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
355 360 365

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
370 375 380

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
385 390 395 400

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
405 410 415

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
420 425 430

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
435 440 445

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
450 455 460

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
465 470 475 480

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
485 490 495

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
500 505 510

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
515 520 525

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
530 535 540

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
545 550 555 560

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
565 570 575

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
580 585 590

ES 2 719 112 T3

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 595 600 605
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 610 615 620
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 625 630 635 640
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 645 650 655
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 660 665 670
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 675 680 685
 Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala
 690 695 700
 Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg
 705 710 715 720
 Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Gly Asp Pro Ile Ser Arg
 725 730 735
 Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg
 740 745 750
 His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile
 755 760 765
 Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu
 770 775 780
 Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser
 785 790 795 800
 Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr
 805 810 815
 Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro
 820 825 830
 Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr

ES 2 719 112 T3

835

840

845

Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser
850 855 860

Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly
865 870 875 880

Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn
885 890 895

Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile
900 905 910

Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn
915 920 925

Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
930 935

<210> 7

<211> 942

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia creada en laboratorio.

10

<400> 7

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Lys Glu Thr Ala
1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Ile Asp Ile Ala Asp
20 25 30

Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro
35 40 45

Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His
50 55 60

Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro
85 90 95

Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly
100 105 110

ES 2 719 112 T3

Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Val	Ala	Gly	Glu	Leu	Arg	Gly
115						120						125			
Pro	Pro	Leu	Gln	Leu	Asp	Thr	Gly	Gln	Leu	Leu	Lys	Ile	Ala	Lys	Arg
130						135				140					
Gly	Gly	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Ala	Val	His	Ala	Trp	Arg	Asn	Ala	Leu
145				150						155				160	
Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala
				165				170						175	
Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu
		180						185				190			
Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala
		195				200						205			
Ile	Ala	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Ala
210						215				220					
Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val
225				230						235				240	
Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val
				245				250						255	
Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln
		260						265				270			
Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu
275						280						285			
Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr
290						295				300					
Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala
305				310						315				320	
Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly
				325				330						335	
Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Lys
		340						345				350			
Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala

ES 2 719 112 T3

355	360	365
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly		
370	375	380
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys		
385	390	395
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn		
405	410	415
Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
420	425	430
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala		
435	440	445
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu		
450	455	460
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala		
465	470	475
Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg		
485	490	495
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val		
500	505	510
Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
515	520	525
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu		
530	535	540
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
545	550	555
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
565	570	575
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala		
580	585	590
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
595	600	605

ES 2 719 112 T3

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
610 615 620

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
625 630 635 640

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
645 650 655

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
660 665 670

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
675 680 685

Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg
690 695 700

Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu
705 710 715 720

Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu
725 730 735

Gly Asp Pro Ile Ser Arg Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu
740 745 750

Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr
755 760 765

Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu
770 775 780

Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly
785 790 795 800

Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val
805 810 815

Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser
820 825 830

Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr
835 840 845

Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp
850 855 860
Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val

865 870 875 880

5

Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn 885 890 895

His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu 900 905 910

10

Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val 915 920 925

Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp

ES 2 719 112 T3

930 935 940

5 <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia creada en laboratorio.

<400> 8

Asp	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys
1				5					10					15	

Lys

15 <210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 9

Ala	Arg	Thr	Lys	Gln
1			5	

25 <210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 10

Ala	Arg	Thr	Lys	Gln	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser
1			5					10	

35 <210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 11

Ala	Arg	Thr	Lys	Gln	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala
1			5					10					15	

45 <210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala	Arg	Thr	Lys	Gln	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro
1			5					10					15		

50 Arg Lys Gln Leu
20

<210> 13
<211> 25
<212> PRT
55 <213> Homo sapiens

ES 2 719 112 T3

<400> 13

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala
20 25

5

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula, que comprende:

un poliplexo de núcleo y un recubrimiento de sílice sobre el mismo, en donde dicho poliplexo de núcleo comprende:

5 uno o más polímeros aniónicos seleccionados del grupo que consiste en poli(ácido glutámico), un glicosaminoglicano, una glicoproteína, un polisacárido, poli(ácido manurónico), poli(ácido gulurónico), heparina, sulfato de heparina, condroitina, sulfato de condroitina, queratán, sulfato de queratán, agregano, poli(glucosamina) y cualquier combinación de dos o más de los anteriores,

10 uno o más polímeros catiónicos seleccionados del grupo que consiste en poli(arginina), poli(lisina), poli(histidina), poli(ornitina), poli(citrulina), poli(etilenimina), poli(aspartamida), un polipeptido catiónico, un poliéster con carga funcional, un polisacárido catiónico, un amino azúcar acetilado, quitosano, o cualquier combinación de más de uno de los anteriores,

un polipéptido catiónico que es un péptido con cola de histona, y

un polinucleótido.

2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el polímero aniónico es poli(ácido D-glutámico).

15 3. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el polímero catiónico se selecciona del grupo que consiste en poli(etilenimina) y poli(L-arginina).

4. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el polímero catiónico es poli(L-arginina).

5. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el péptido con cola de histona es péptido con cola de histona H3 humano.

20 6. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el polímero aniónico es poli(ácido D-glutámico) y el péptido con cola de histona es péptido con cola de histona H3 humano.

7. La nanopartícula de la reivindicación 6, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una nucleasa.

8. La nanopartícula de la reivindicación 7, en donde la nucleasa es una TALEN.

25 9. La nanopartícula de la reivindicación 8, en donde la TALEN es capaz de inducir una rotura en un lugar específico para el sitio de ADN, en donde la rotura resulta en un cambio de la expresión de una proteína codificada por un gen.

10. La nanopartícula de la reivindicación 9, en donde el cambio es una disminución y el gen codifica una proteína esclerostina.

30 11. Una nanopartícula de la reivindicación 6, que comprende, además, un polímero unido a una superficie exterior de dicho recubrimiento de sílice.

12. Una nanopartícula de la reivindicación 11, en donde dicho polímero unido a una superficie exterior de dicho recubrimiento de sílice comprende poli(L-arginina) o un péptido del factor de crecimiento endotelial vasoactivo.

13. Un método in vitro de modificar polinucleótidos intracelulares con una nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicho método comprende poner en contacto una célula con la nanopartícula.

35 14. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso como un medicamento.

40 15. El método de la reivindicación 13 o una nanopartícula para uso en medicina de la reivindicación 14, en el que el polímero aniónico es poli(ácido D-glutámico), el polímero catiónico se selecciona del grupo que consiste en poli(etilenimina) y poli(L-arginina), y el polipéptido catiónico es un péptido con cola de histona, opcionalmente en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una nucleasa, en donde la nucleasa es una TALEN, en donde la TALEN es capaz de inducir una rotura en un lugar específico para el sitio de ADN, en donde la rotura resulta en una disminución de la expresión de una proteína codificada por un gen y el gen codifica una proteína esclerostina.

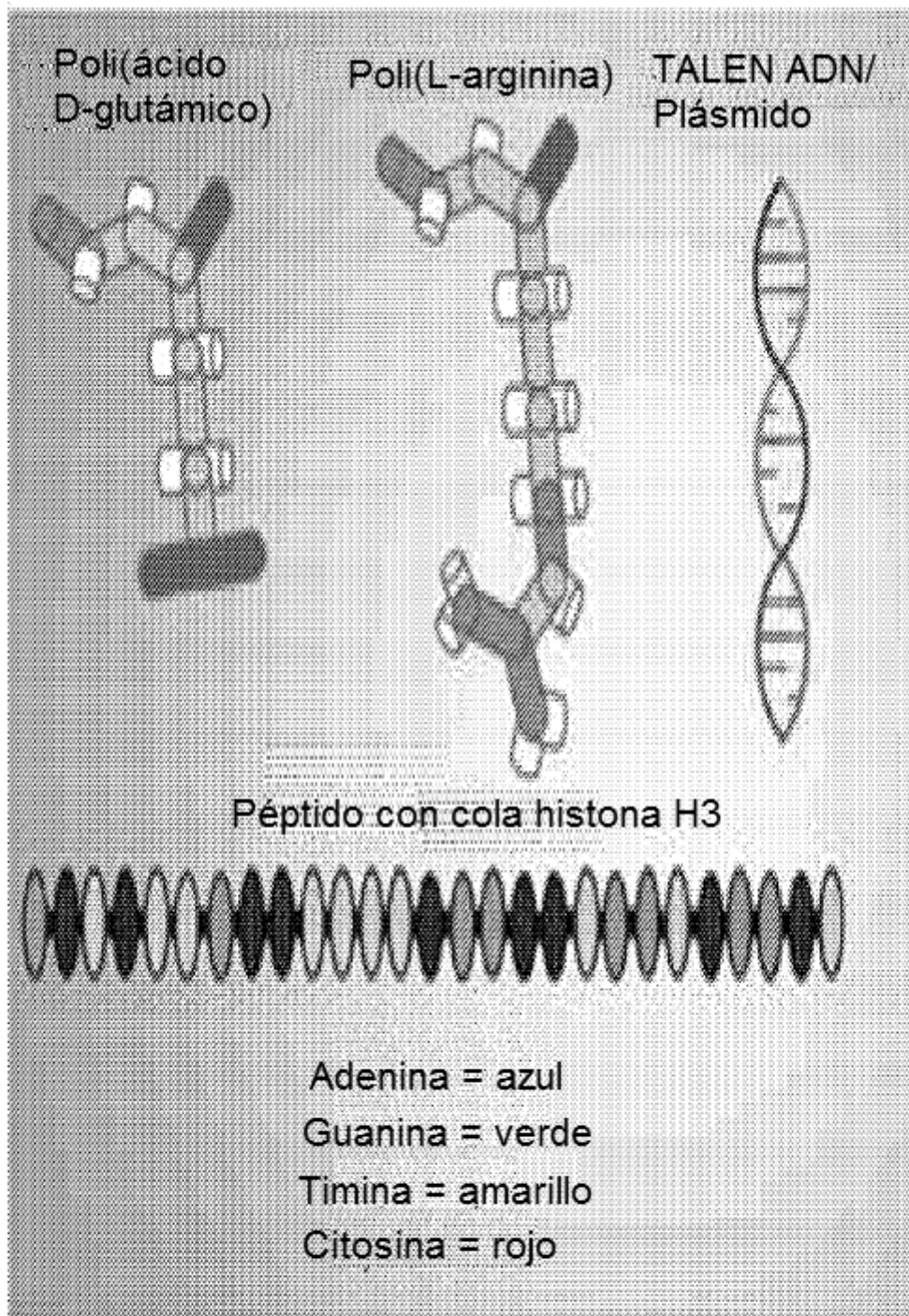


FIGURA 1A

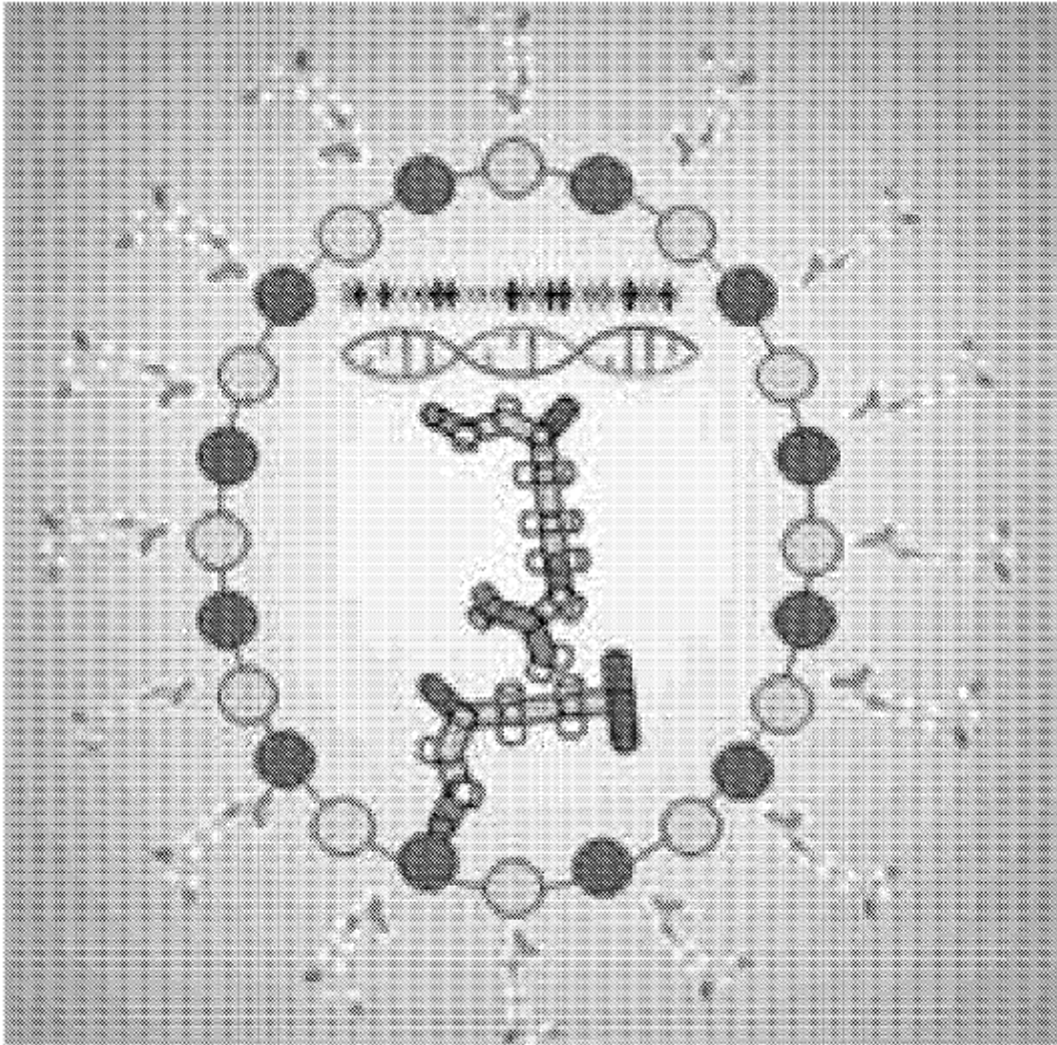


FIGURA 1B

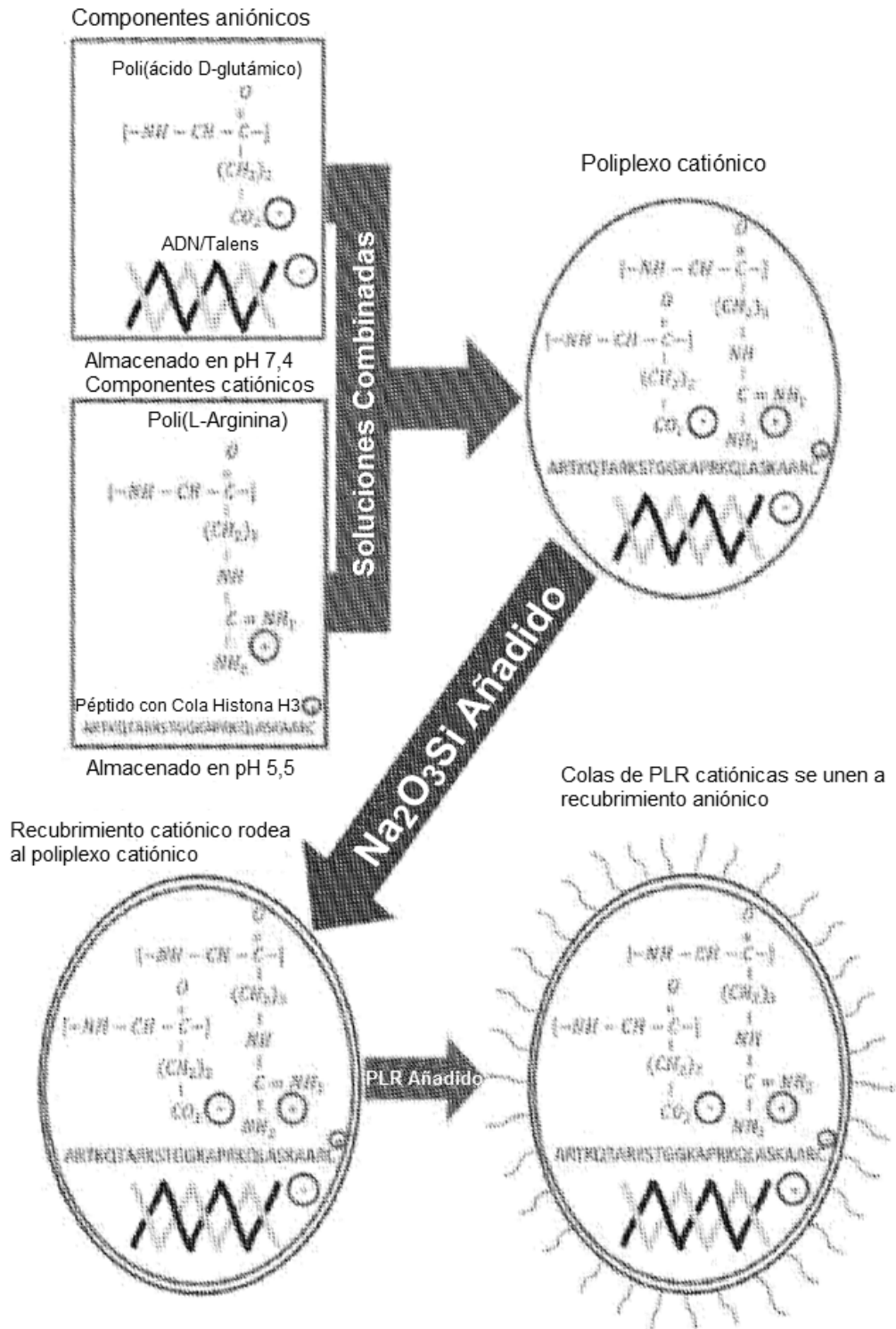


FIGURA 2A

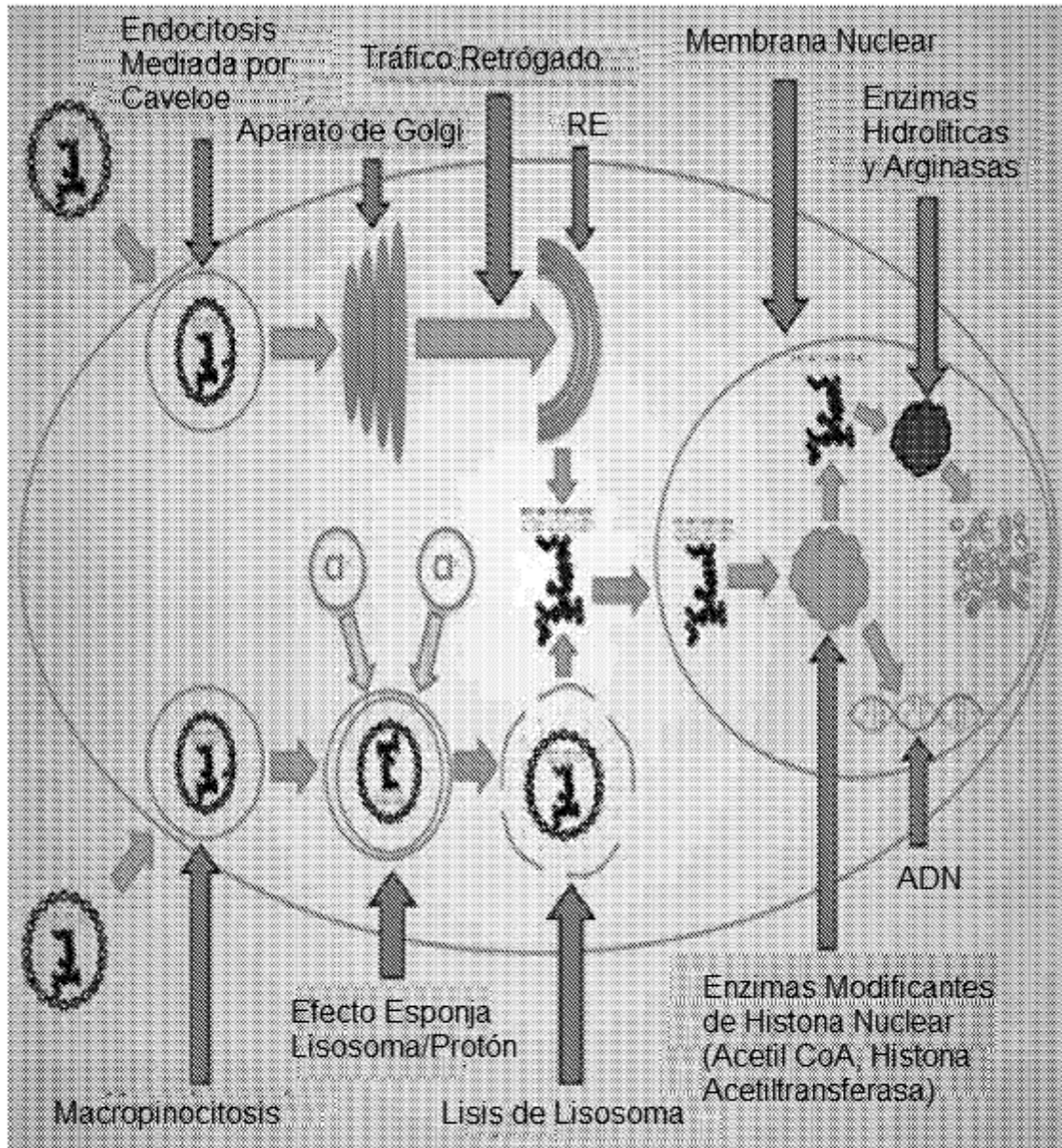
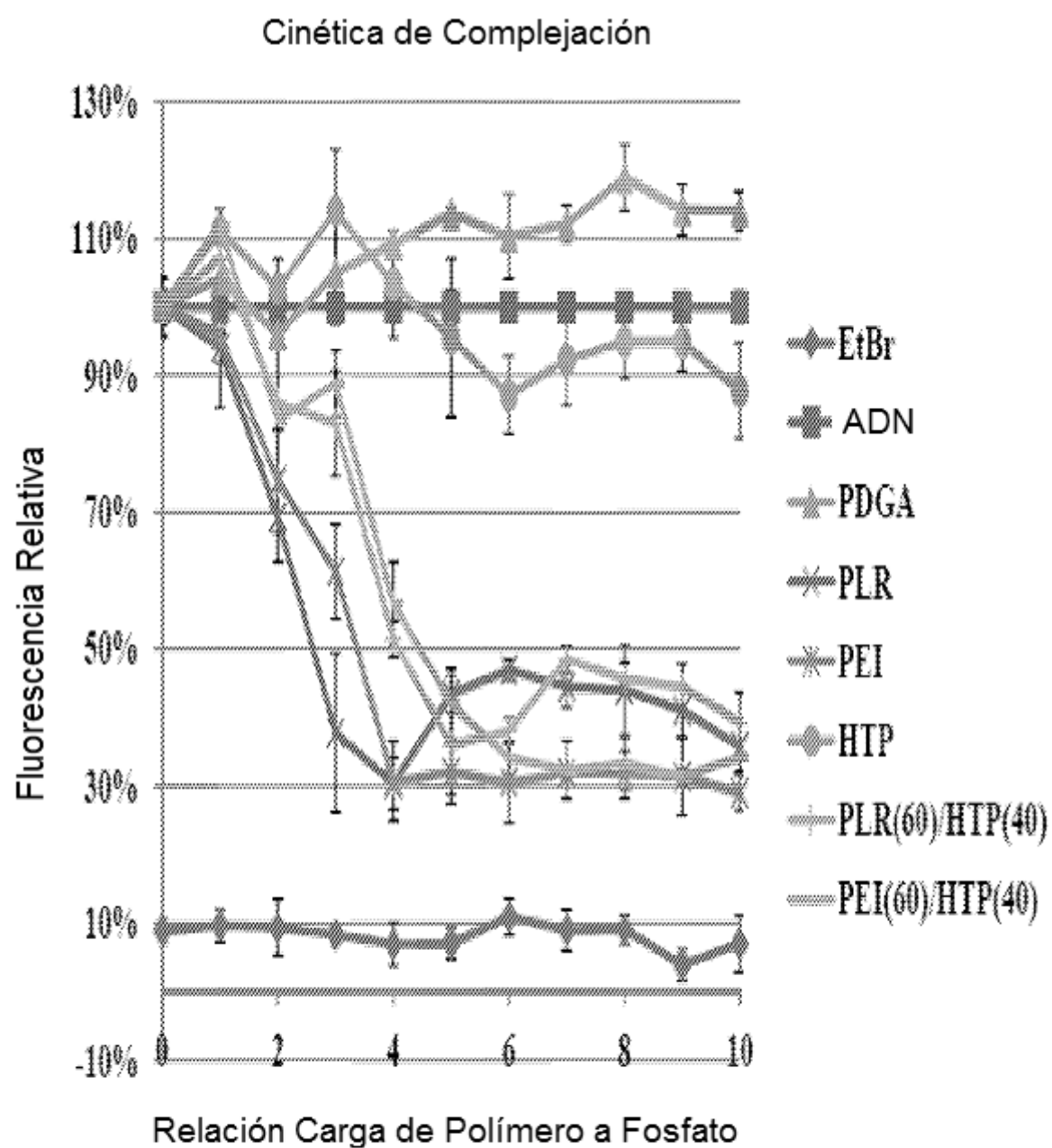


FIGURA 2B

**FIGURA 3**

Cinética de Complejación Optimizada

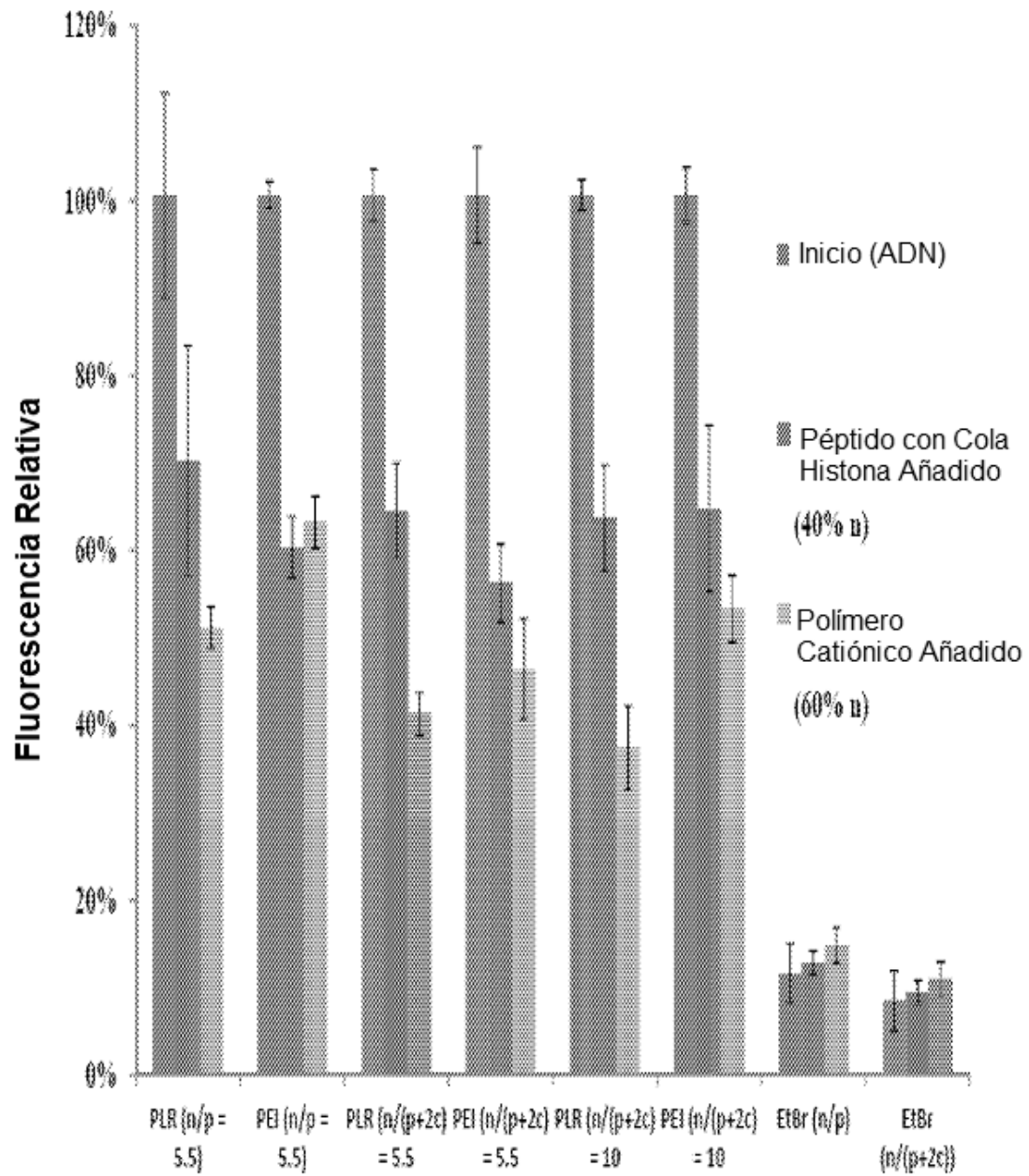
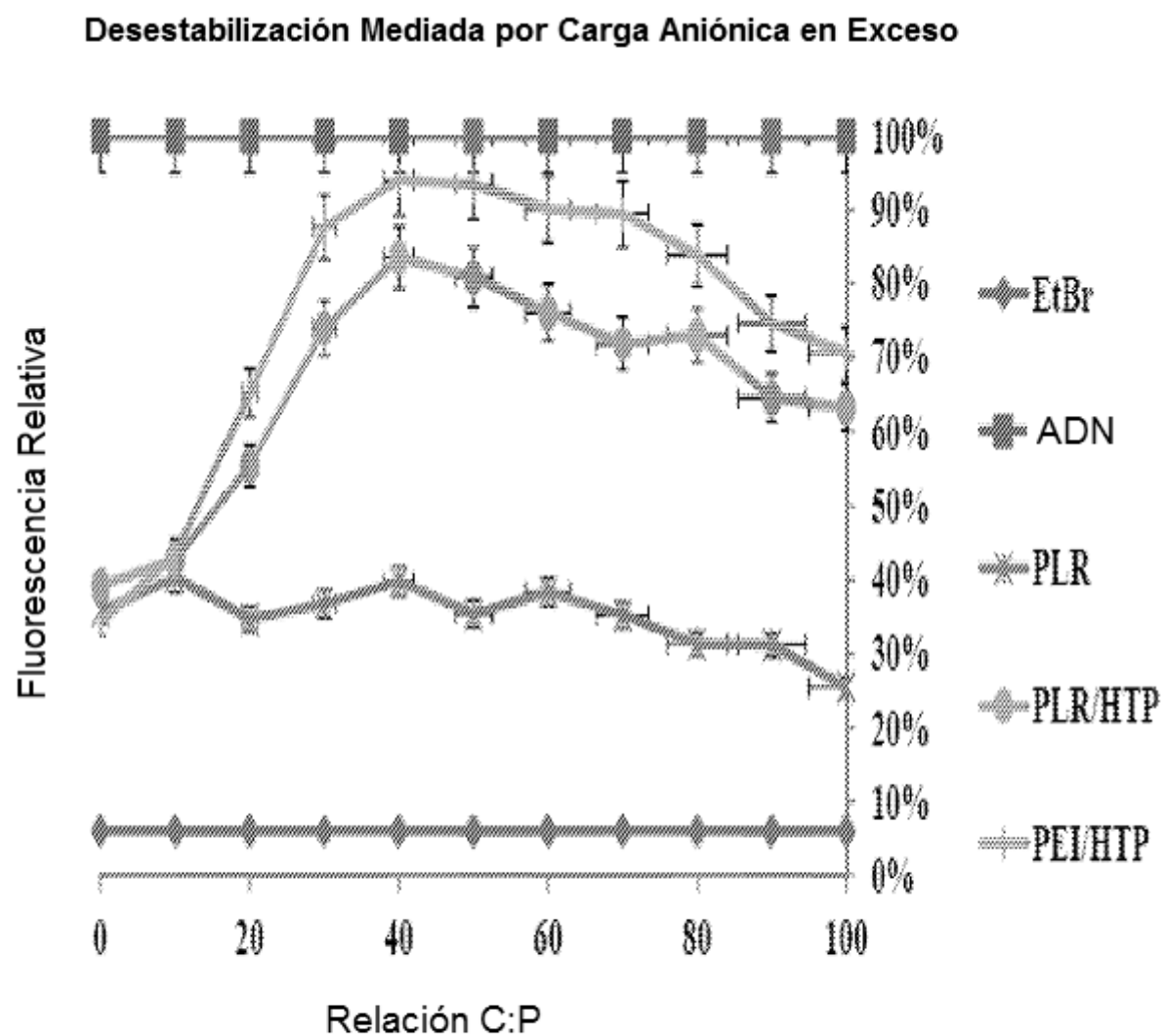


FIGURA 4

**FIGURA 5**

Tamaños Hidrodinámicos de Estratificaciones Progresivas

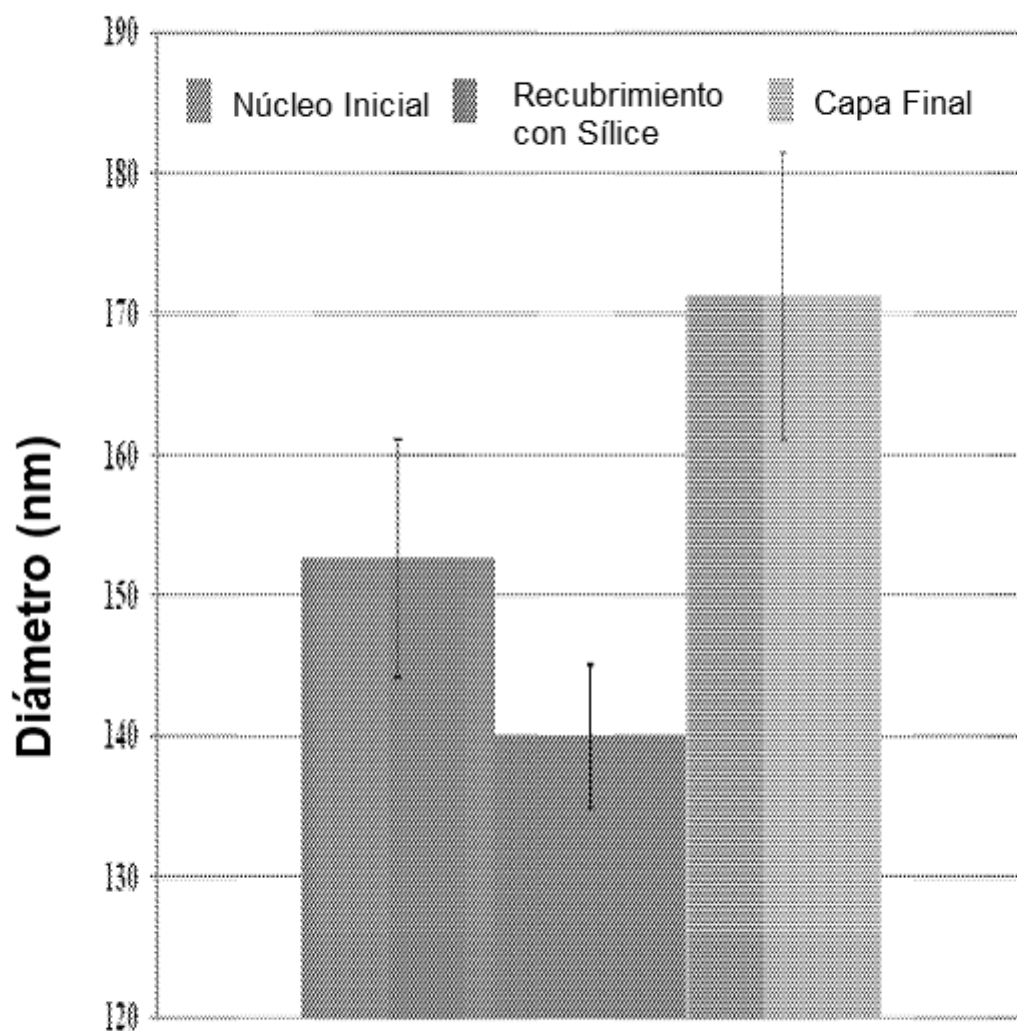


FIGURA 6

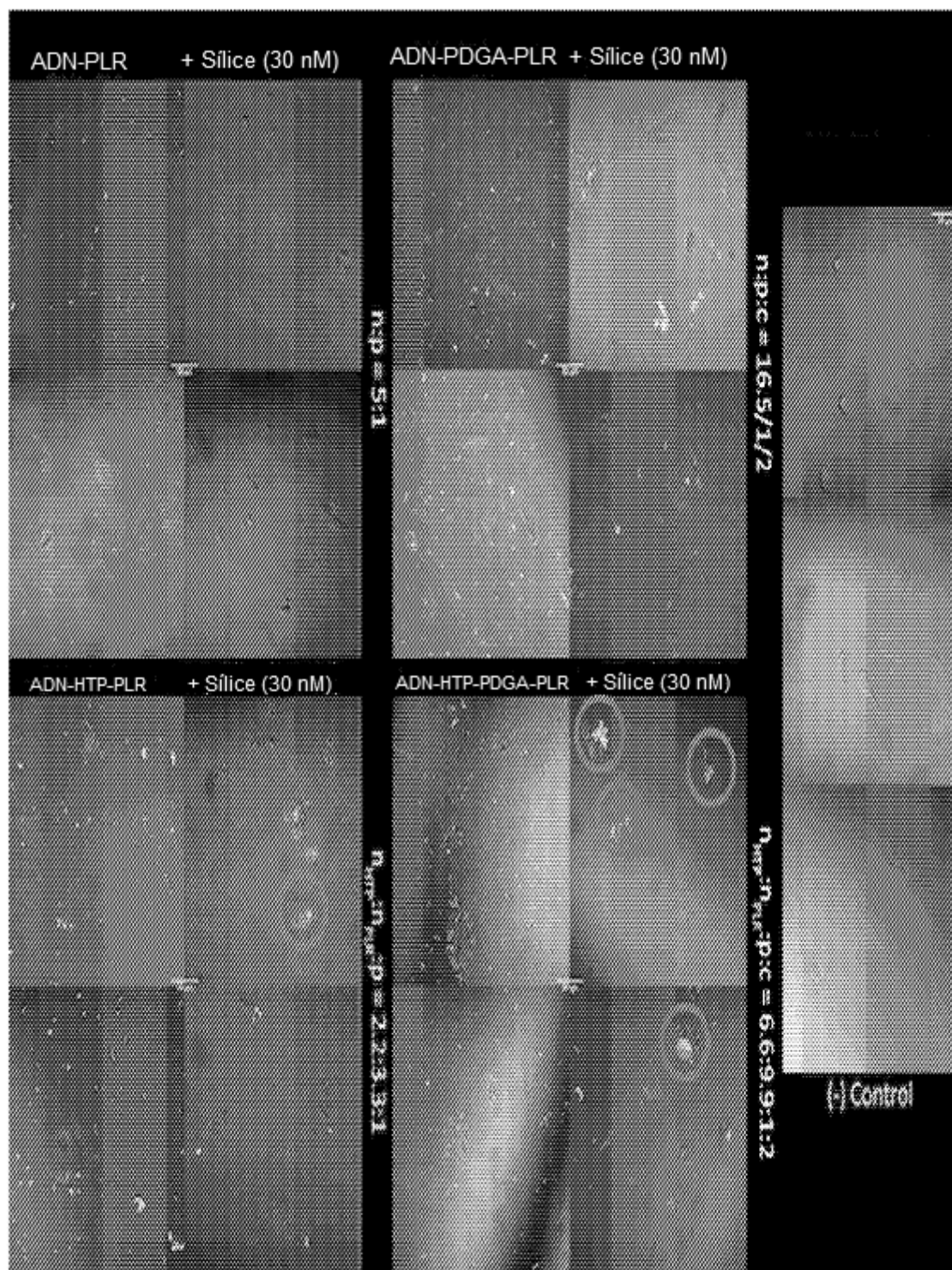


FIGURA 7

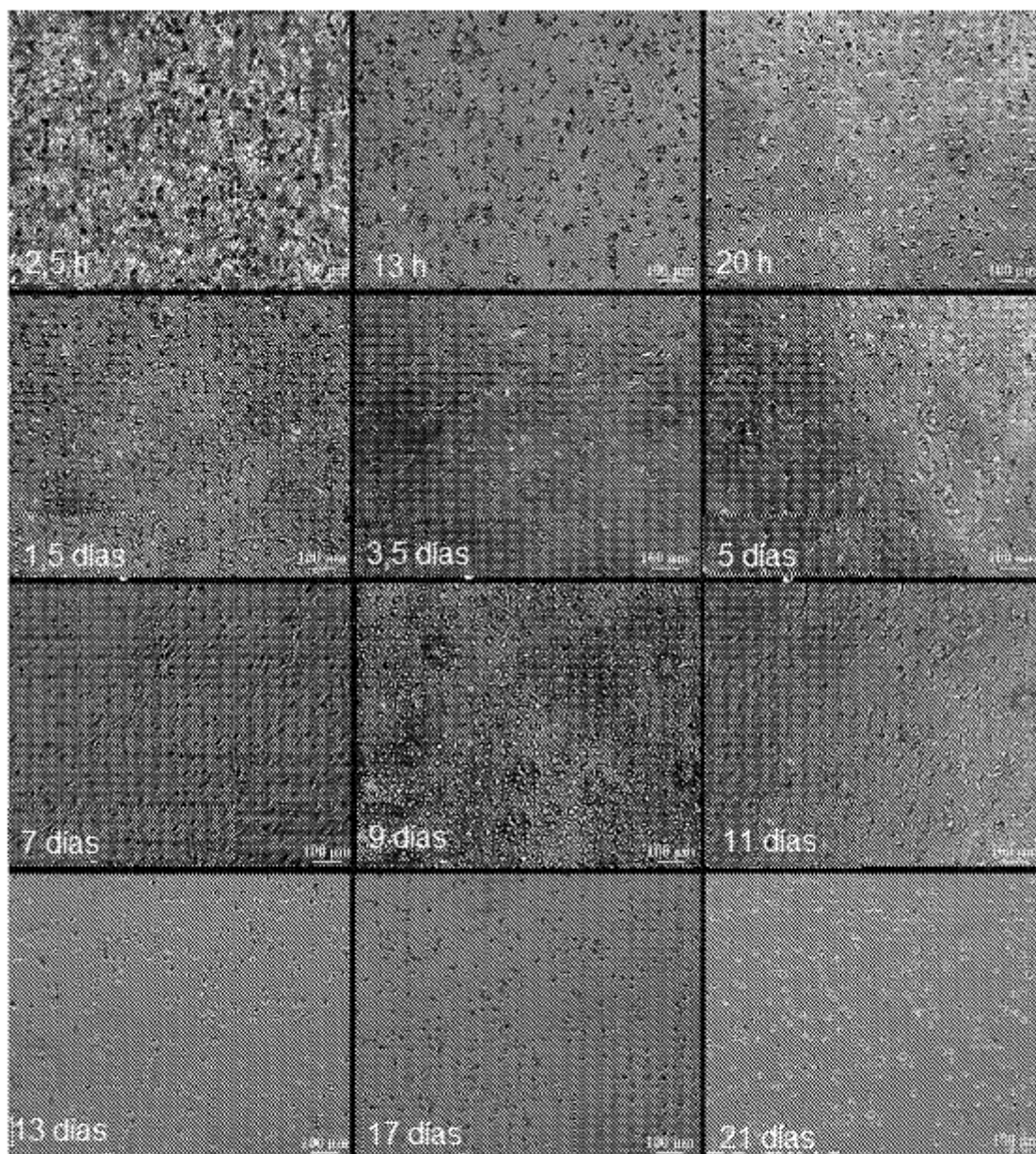


FIGURA 8

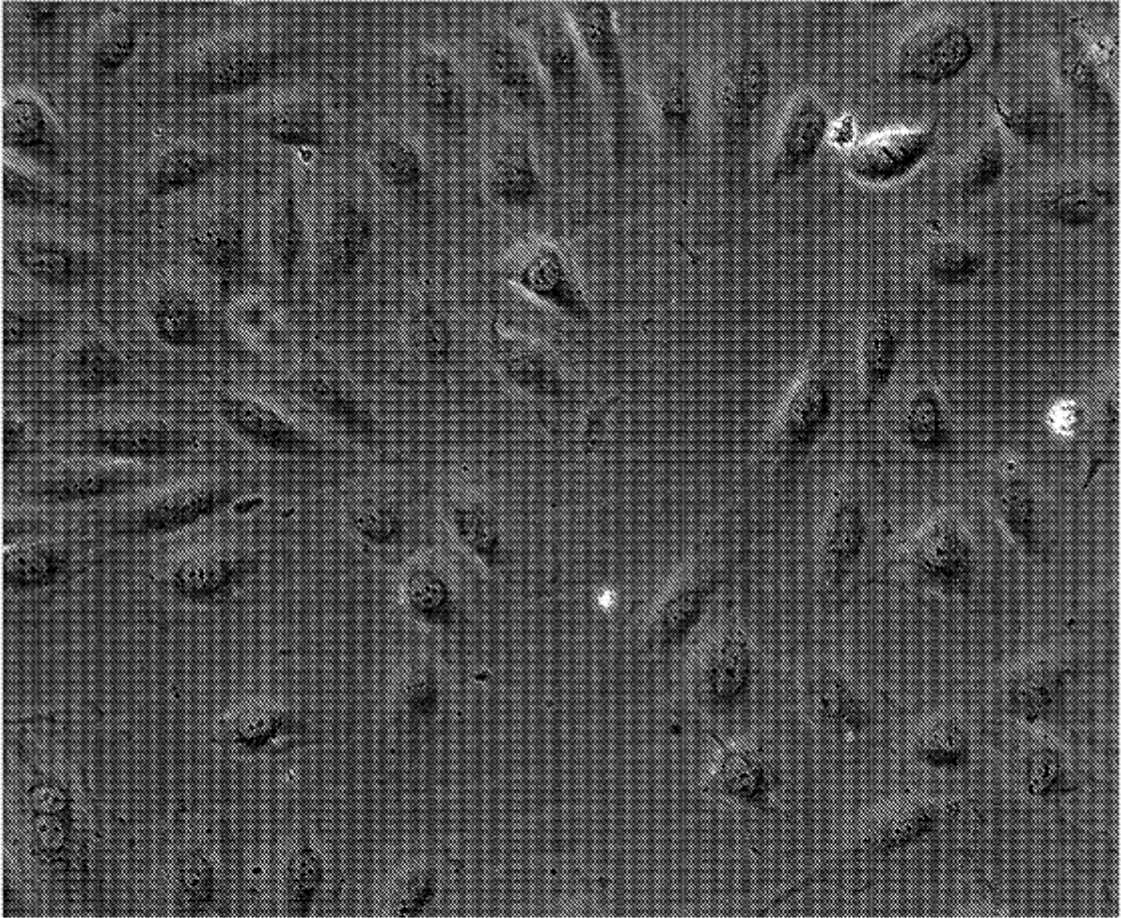


FIGURA 9A

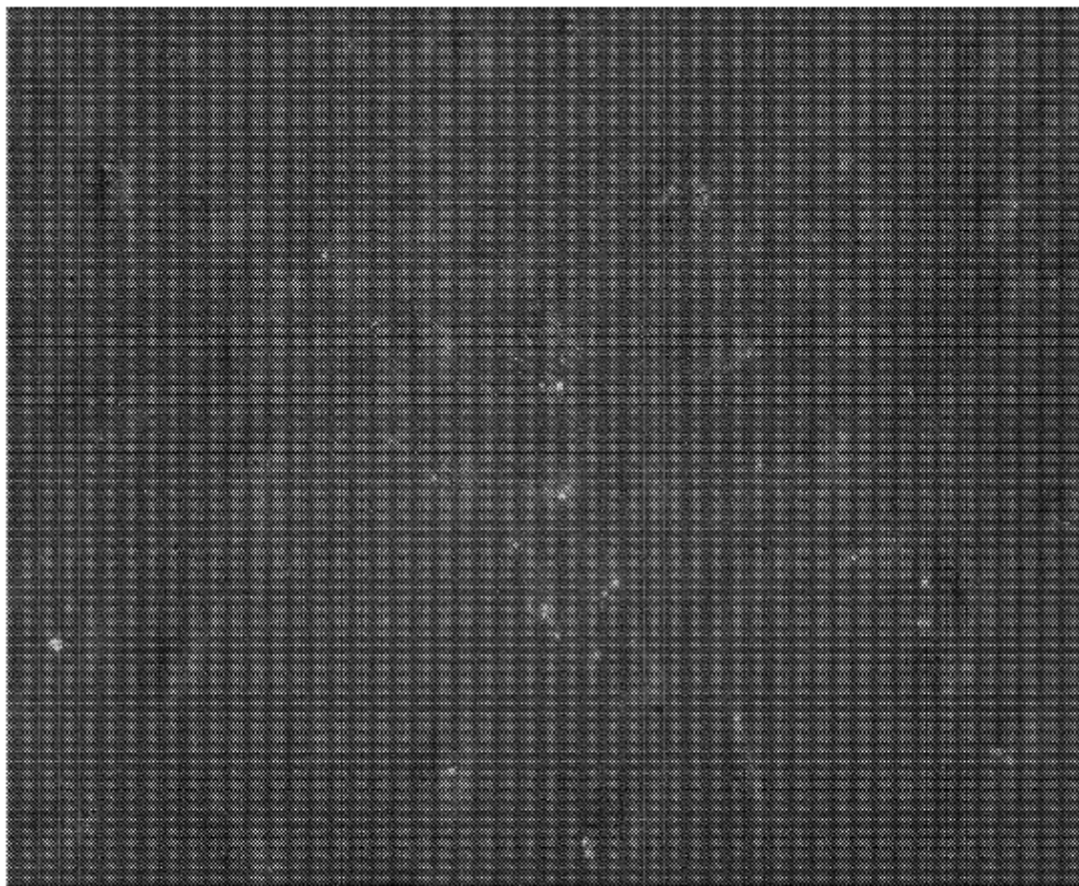


FIGURA 9B

Sitio de unión a TALEN; 16 Bases

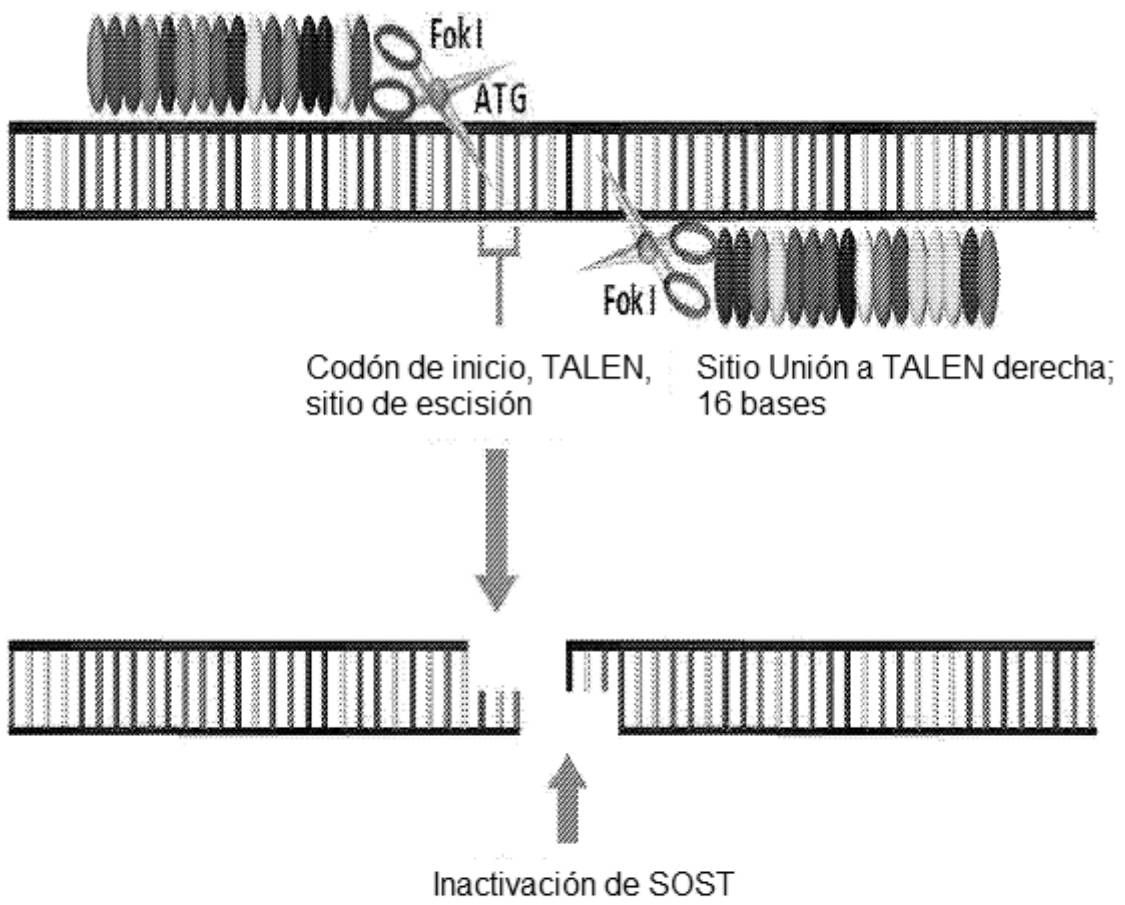


FIGURA 10

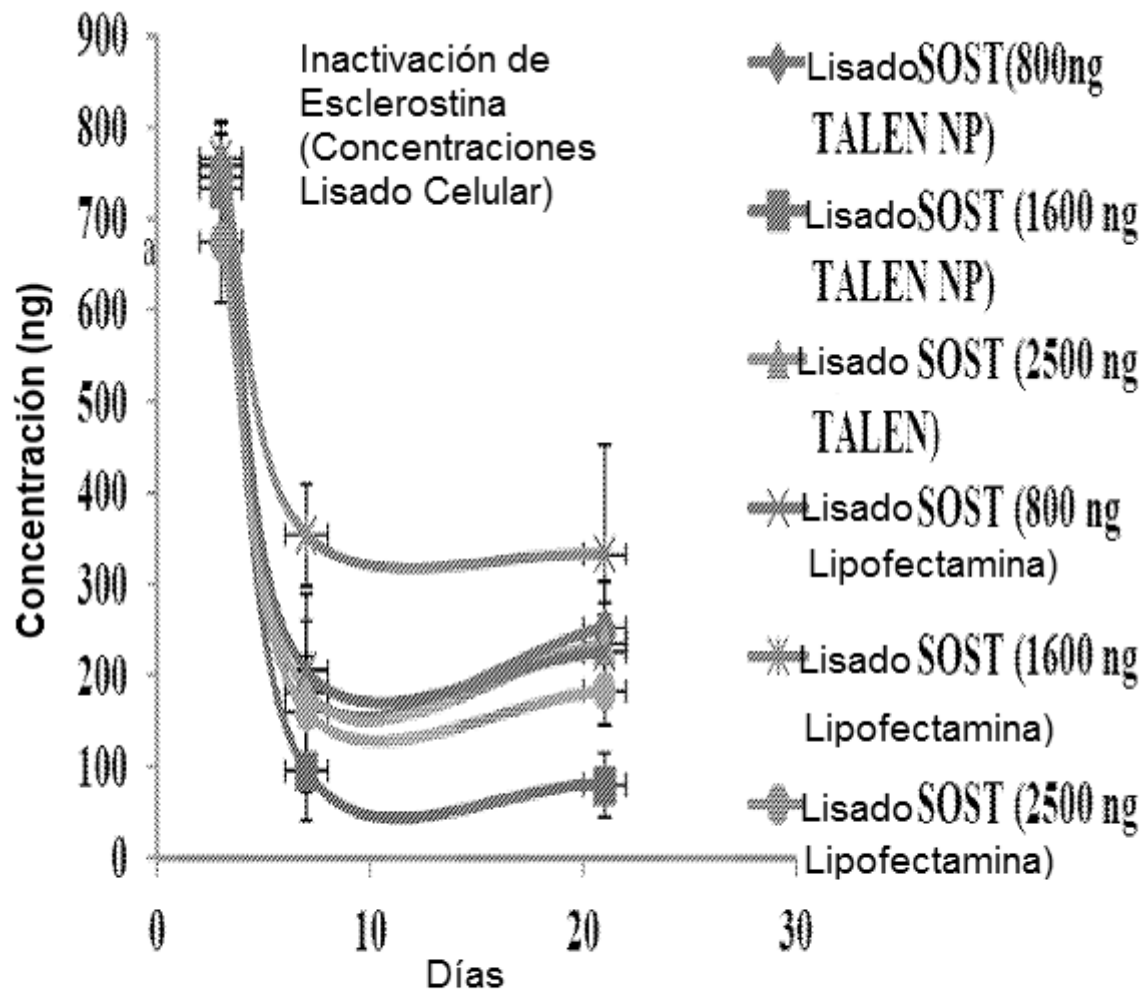


FIGURA 11A

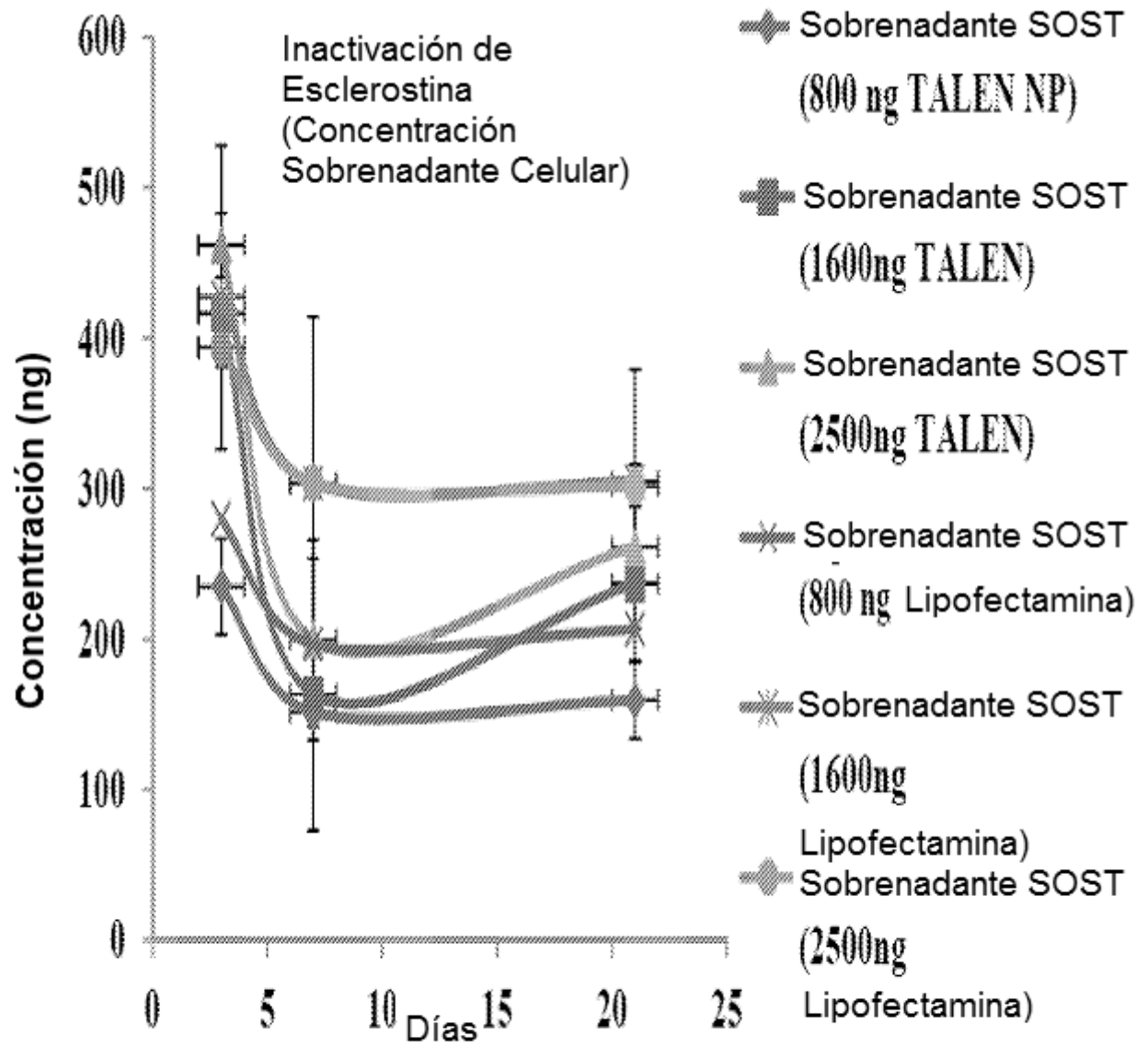


FIGURA 11B

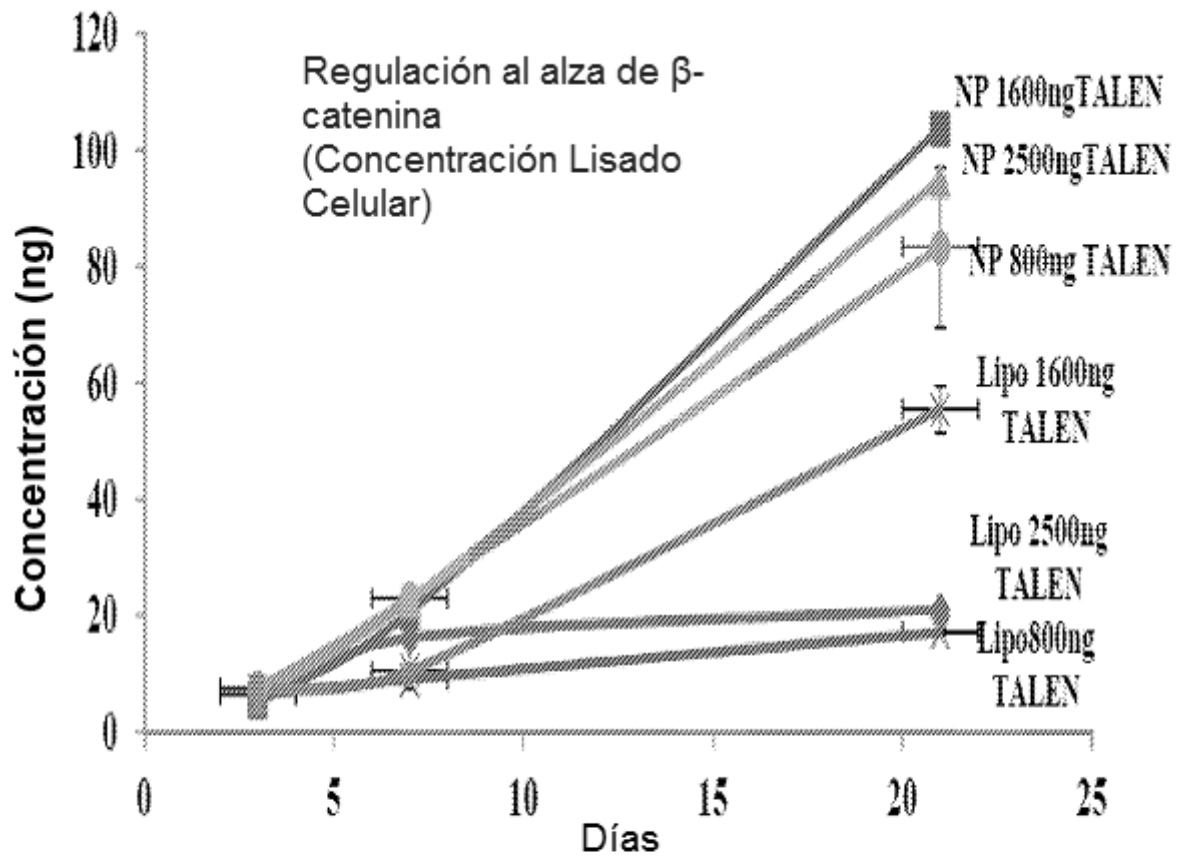


FIGURA 11C

Efectos Aguas Abajo de Inactivación de Esclerostina Mediada por Nanopartículas (qPCR) - 800 ng

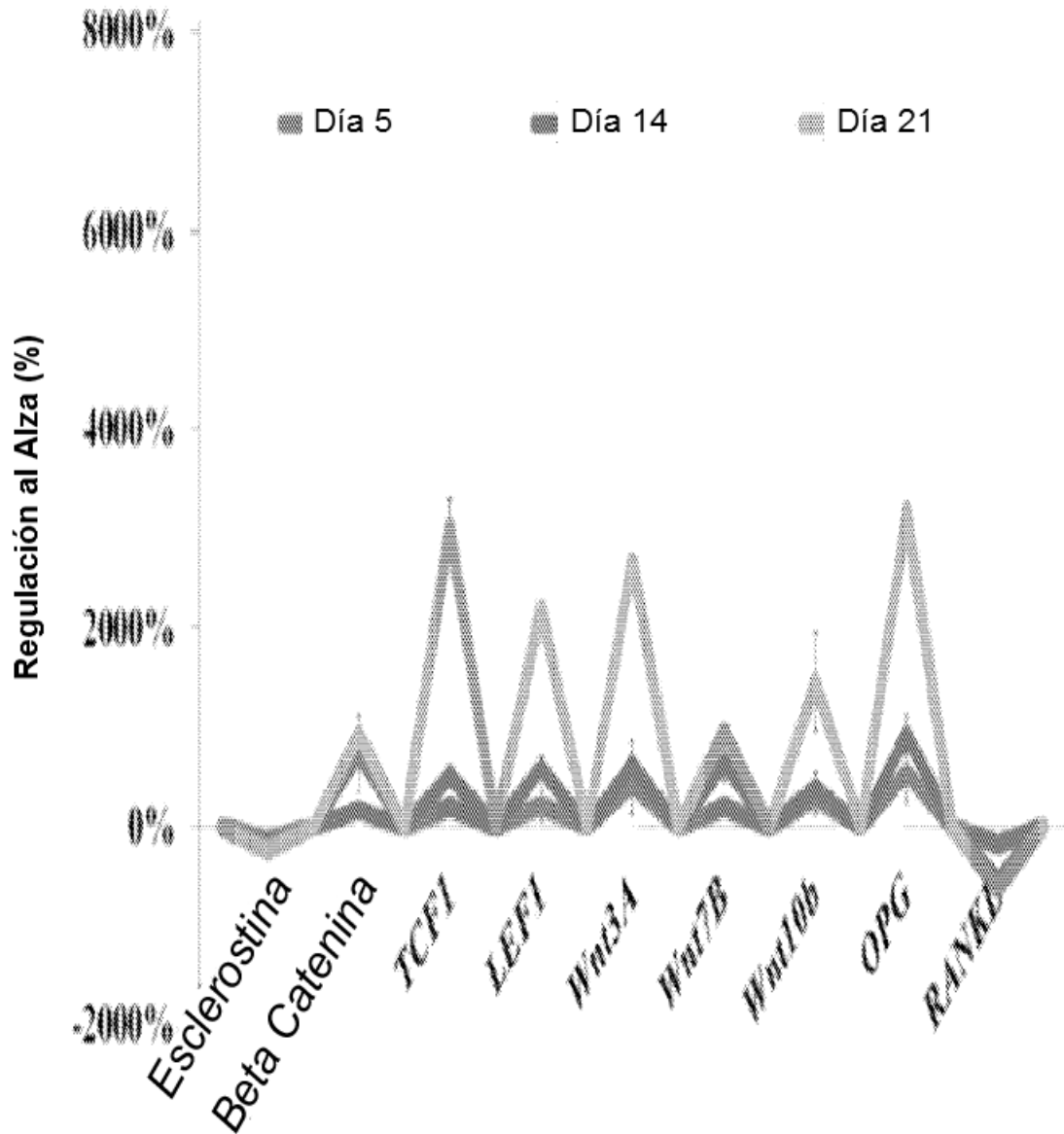


FIGURA 12A

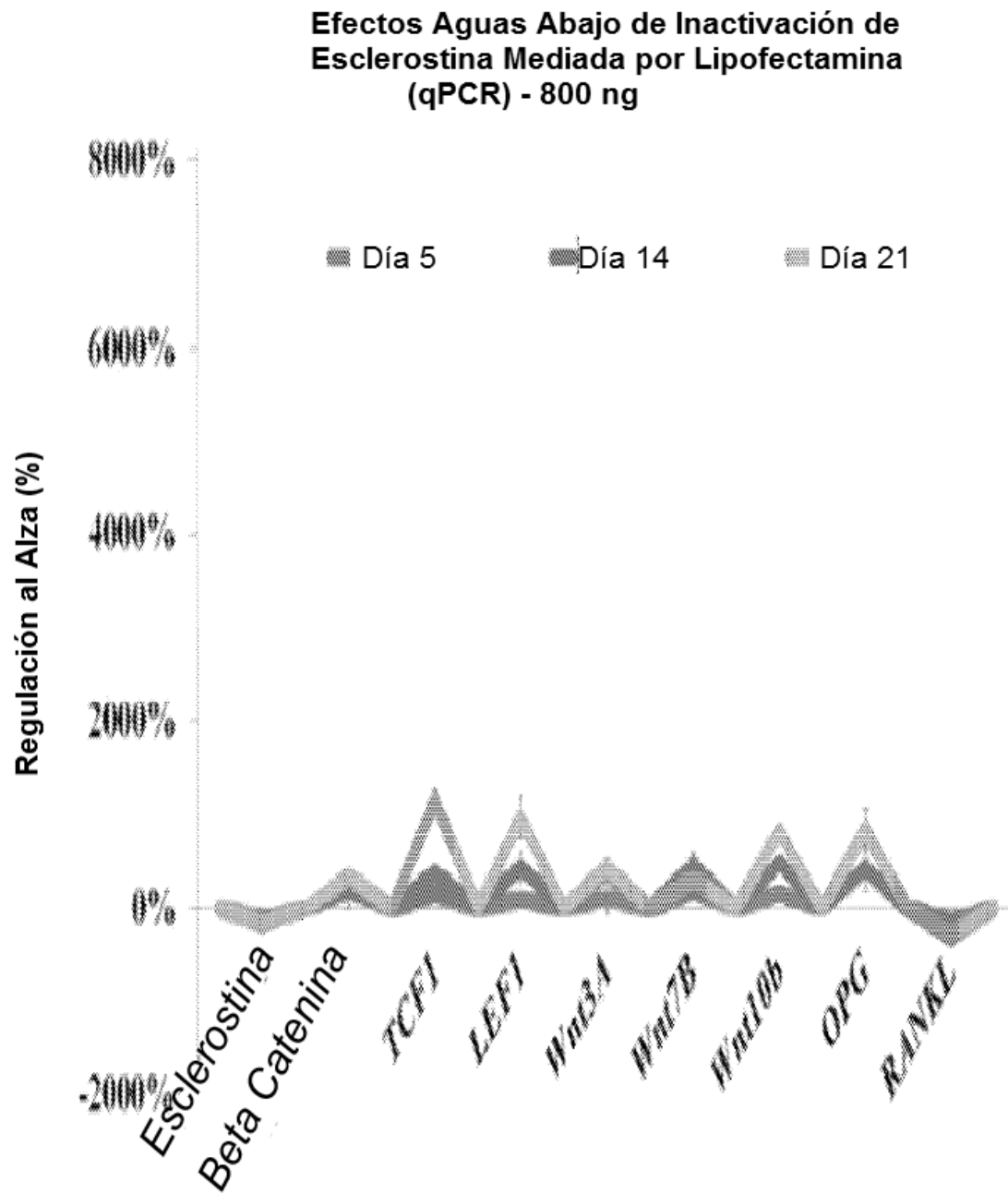


FIGURA 12B

Efectos Aguas Abajo de Inactivación de Esclerostina Mediada por Nanopartículas (qPCR) - 1600 ng

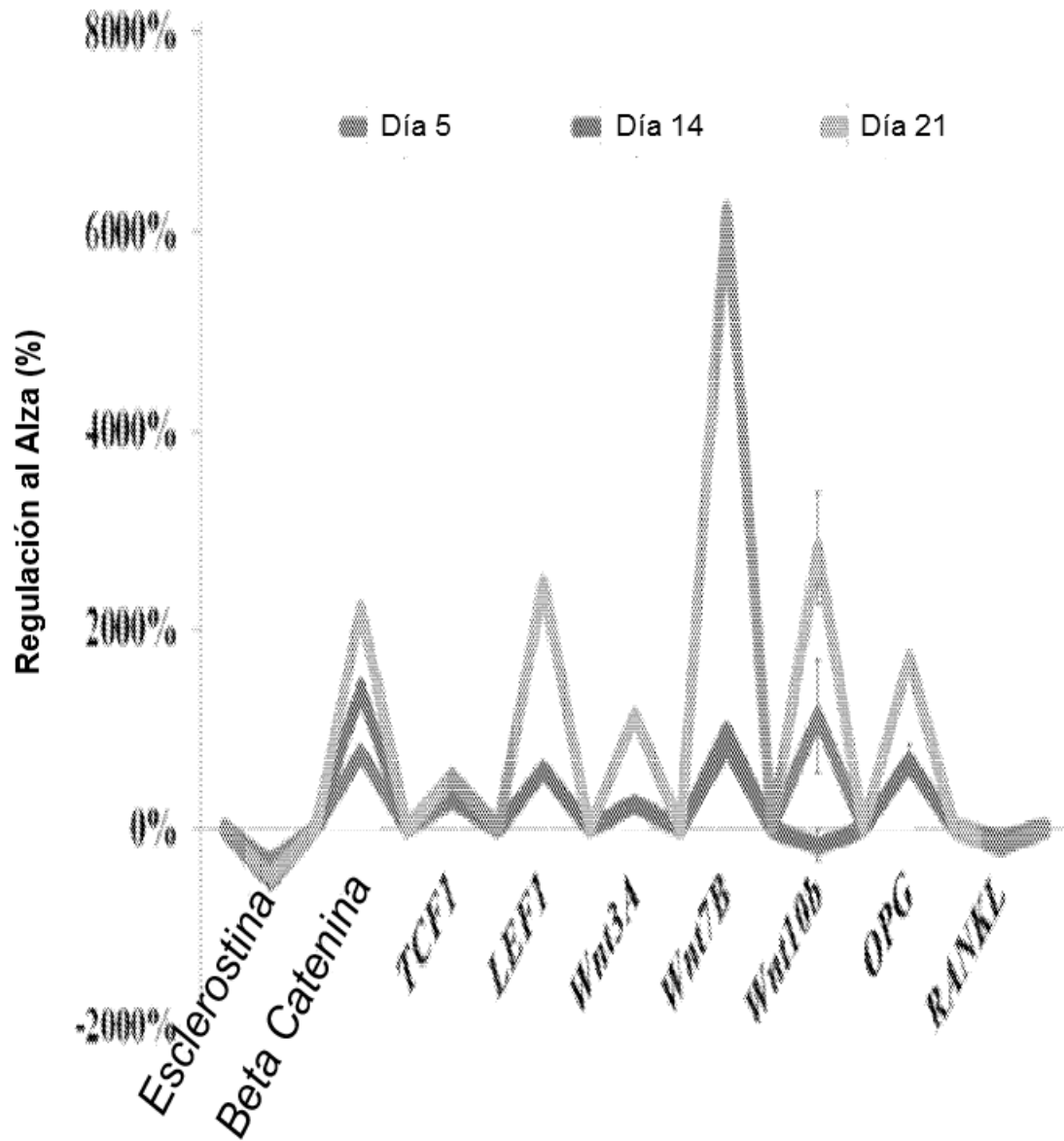


FIGURA 12C

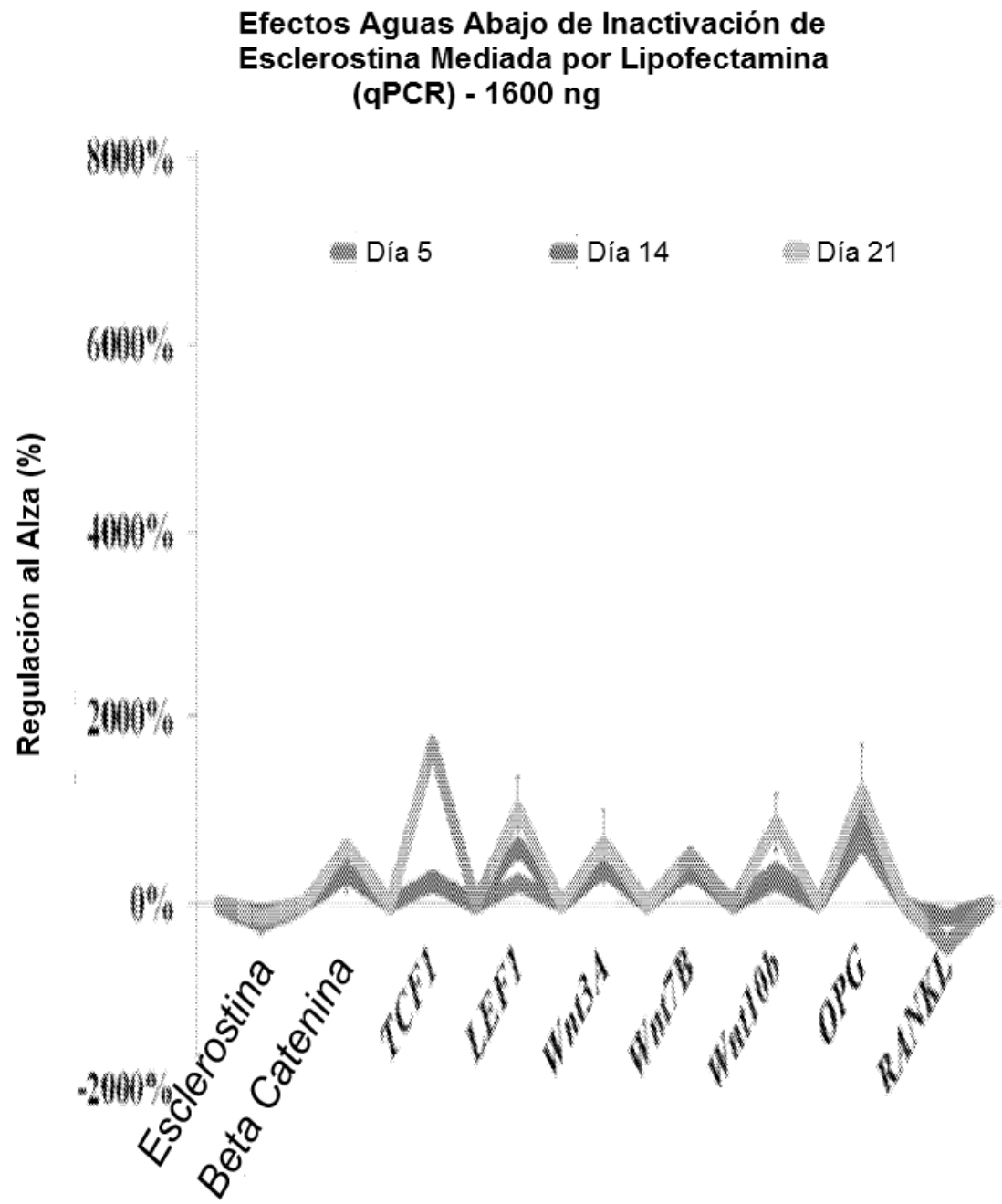


FIGURA 12D

Efectos Aguas Abajo de Inactivación de Esclerostina Mediada por Nanopartículas (qPCR) - 2500 ng

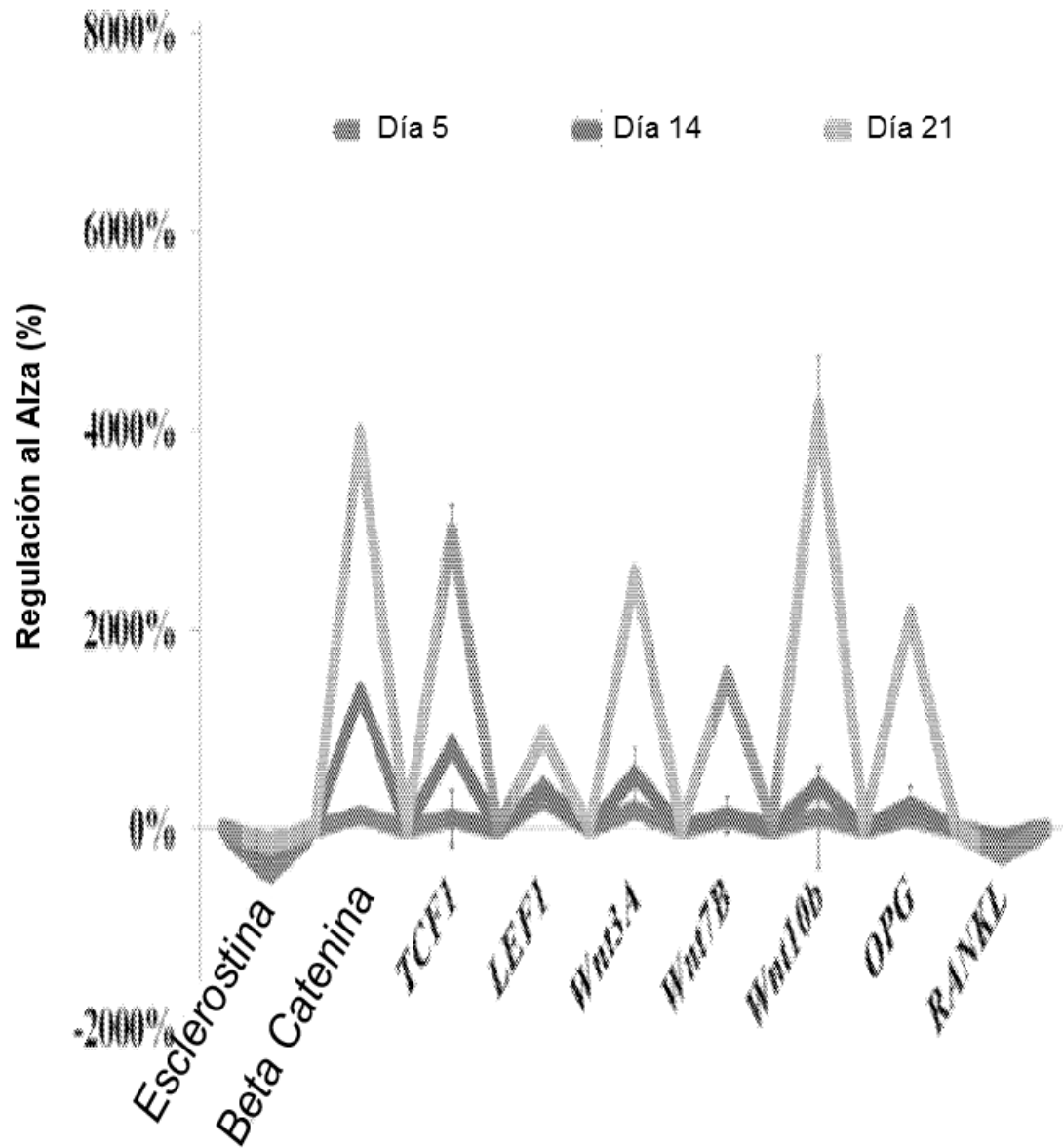


FIGURA 12E

Efectos Aguas Abajo de Inactivación de Esclerostina Mediada por Lipofectamina (qPCR) - 2500 ng

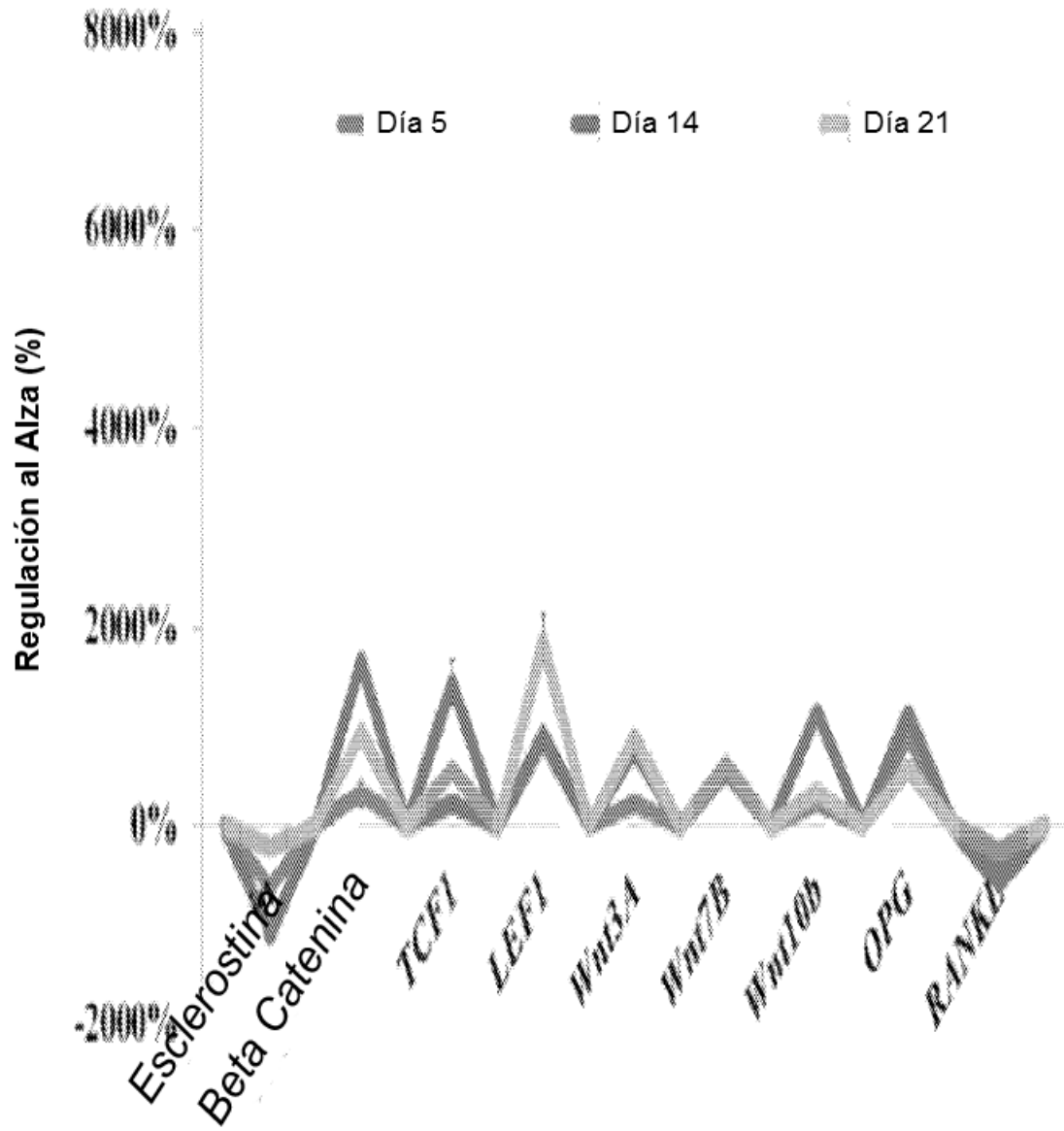


FIGURA 12F

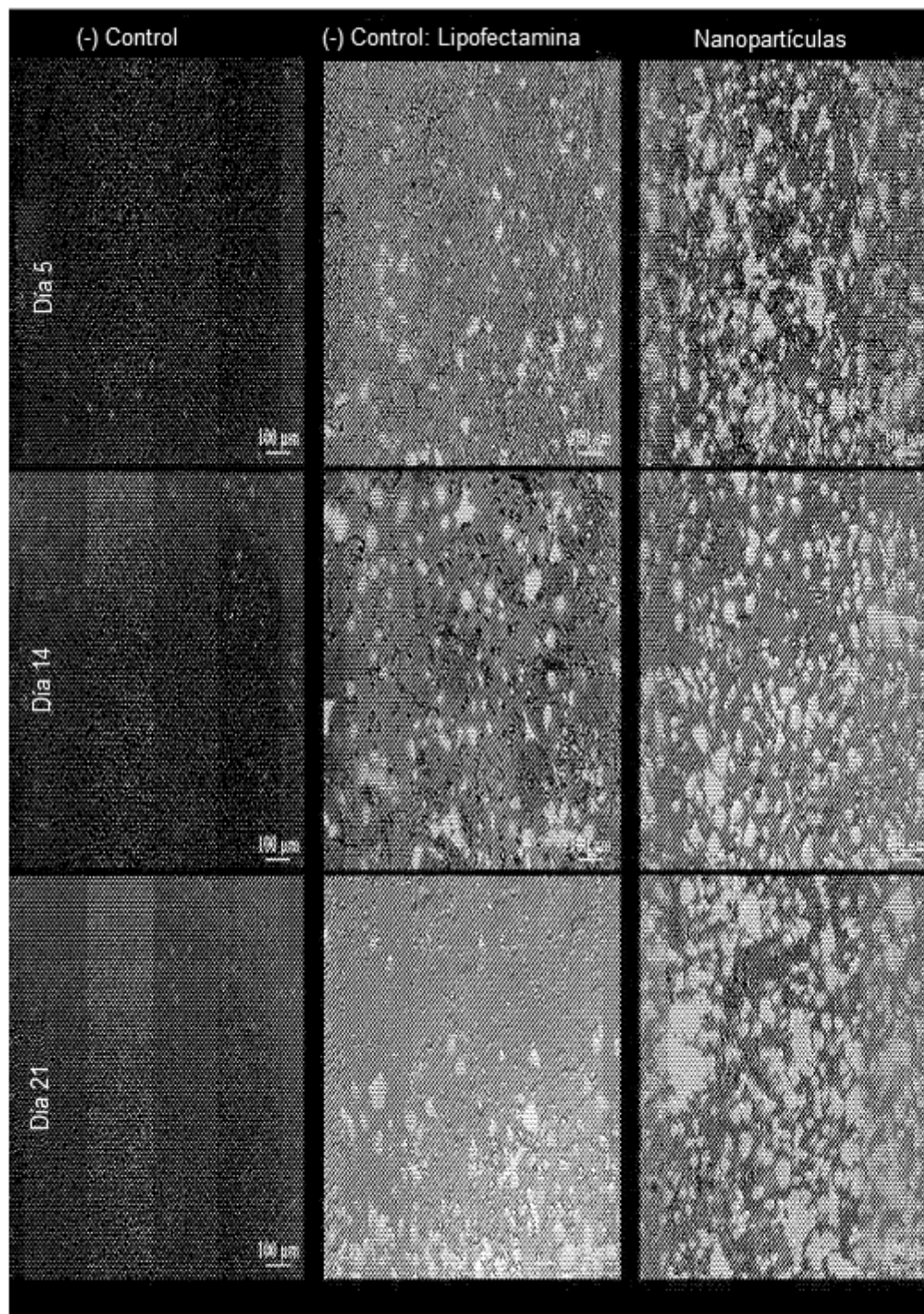


FIGURA 13

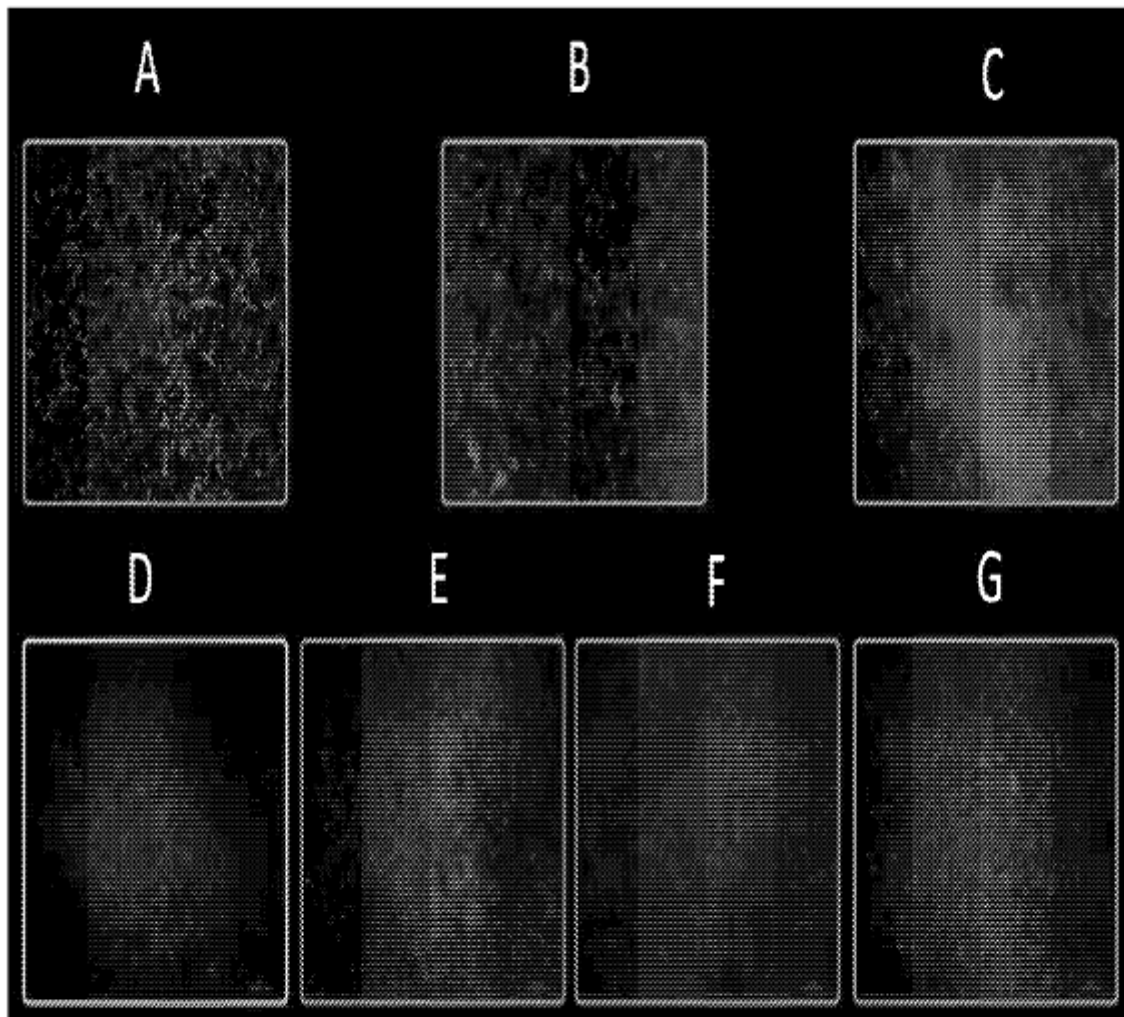


FIGURA 14A

Mineralización Células Estromales de Médula Ósea (Cuantificación de Calcio)

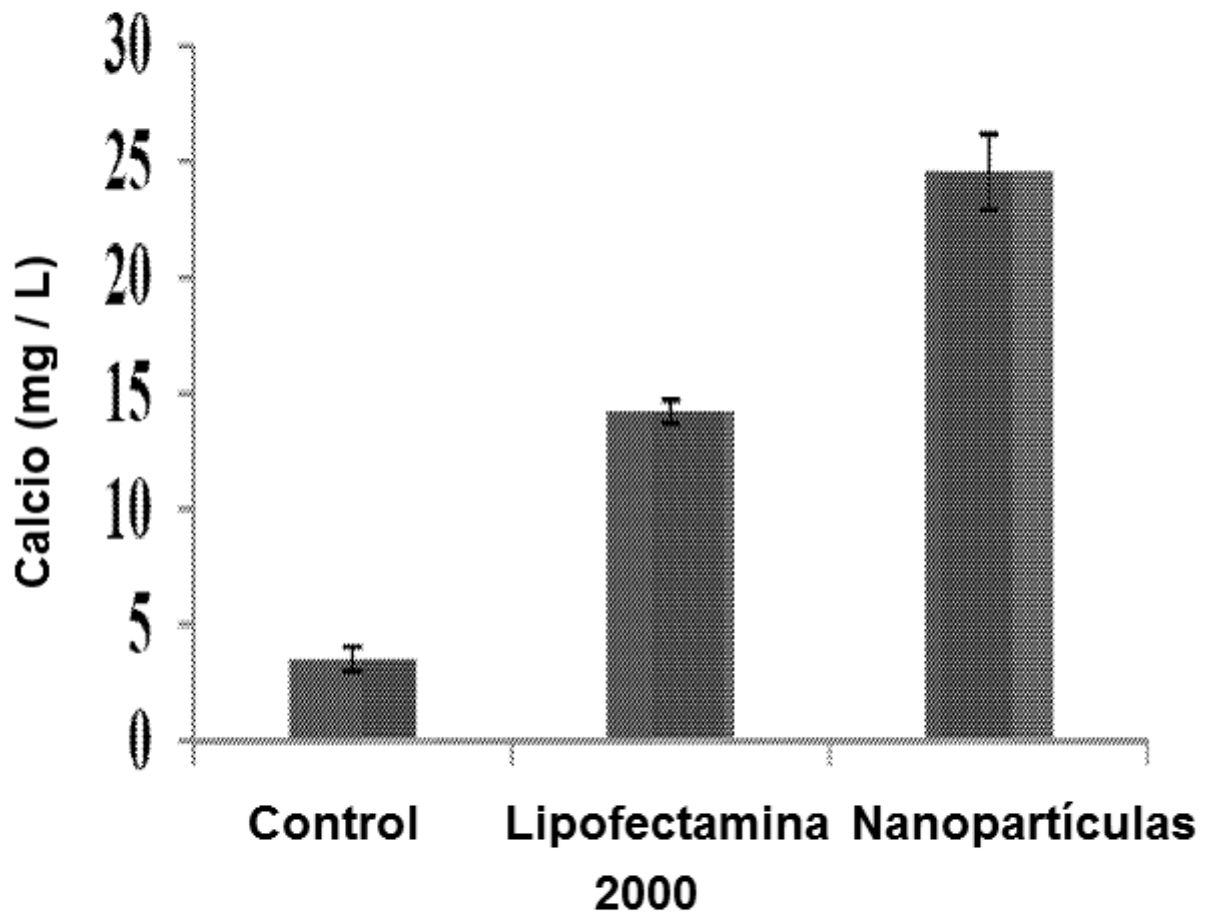


FIGURA 14B

Cuantificación Mineralización de Osteoblastos (Concentración de Calcio)

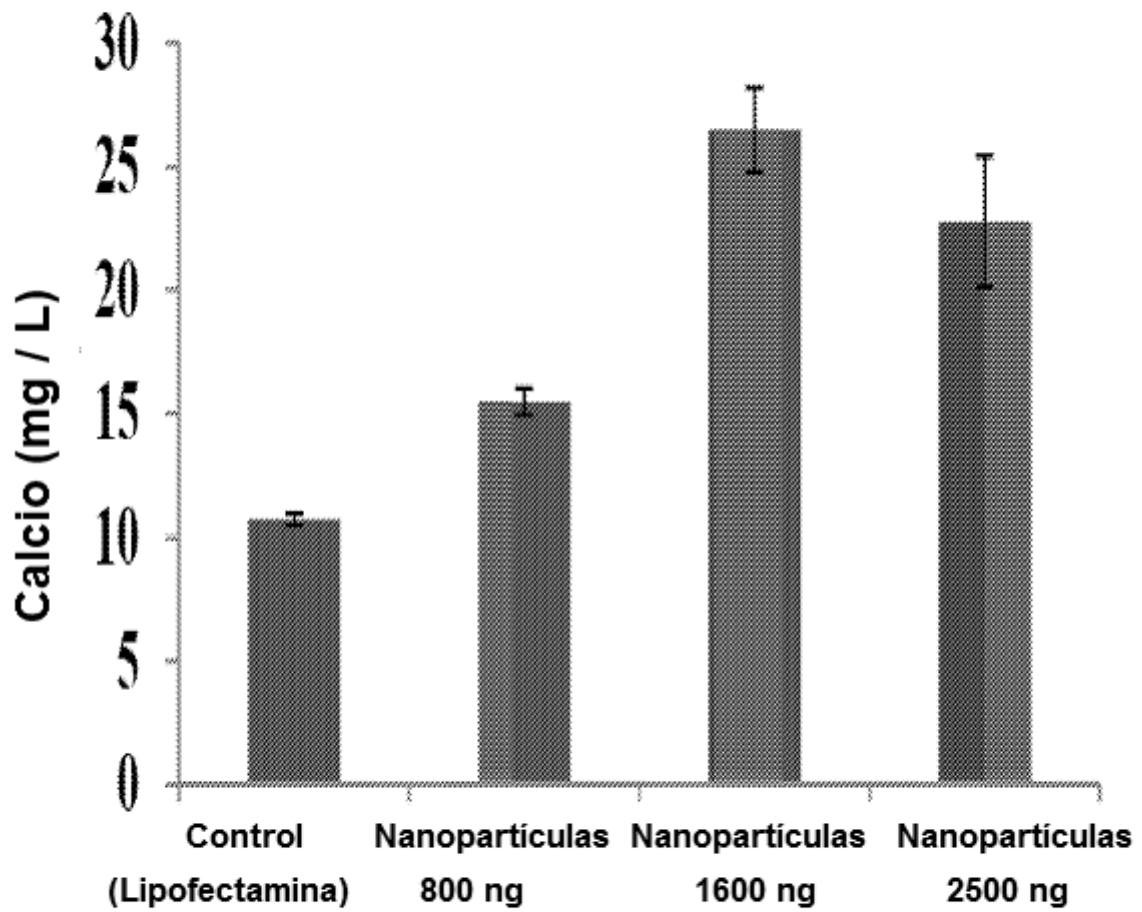


FIGURA 14C