

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional

WO 2023/021230 A1

(43) Fecha de publicación internacional
23 de febrero de 2023 (23.02.2023)

WIPO | PCT

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01) B82Y 5/00 (2011.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2022/070528

(22) Fecha de presentación internacional:

05 de agosto de 2022 (05.08.2022)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202130804 20 de agosto de 2021 (20.08.2021) ES

(71) Solicitante: **FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA** [ES/ES]; Fundación IDIVAL, Avda. Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander (Cantabria) (ES).

(72) Inventores: **LÓPEZ FANARRAGA, Mónica**; Fundación IDIVAL, Avda. Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander (Cantabria) (ES). **MARÍN CABA, Laura**; Fundación IDIVAL, Avda. Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander (Cantabria) (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ,

DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: SILICA PARTICLES FOR ENCAPSULATING NUCLEIC ACIDS

(54) Título: PARTÍCULAS DE SÍLICE PARA ENCAPSULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

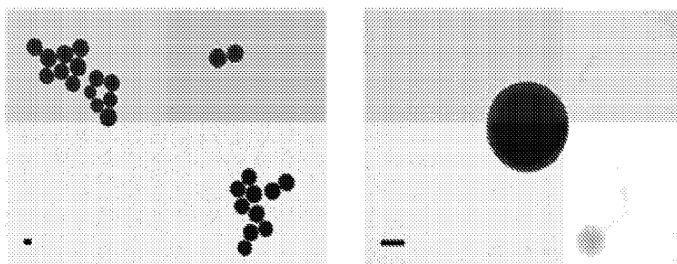


Fig. 1

(57) Abstract: The present invention relates to silica particles comprising nucleic acids encapsulated inside the same. Furthermore, the present invention relates to a method for producing said particles and the uses thereof in gene transfer or cell marking and as a medicinal product, specifically as a medicinal product for protein/enzyme replacement therapy.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a partículas de sílice que comprenden ácidos nucleicos encapsulados en su interior. Así mismo, la presente invención se refiere a un método para la producción de dichas partículas y sus usos en transferencia génica o marcaje celular y como medicamento, particularmente como medicamento de terapia de reemplazo proteico/enzimático.

WO 2023/021230 A1

DESCRIPCIÓN

PARTÍCULAS DE SÍLICE PARA ENCAPSULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo técnico de la nanomedicina y nanotecnología, particularmente a partículas para transferencia génica. La presente invención se refiere a partículas de sílice que comprenden ácidos nucleicos encapsulados en su interior. Así mismo, 10 la presente invención se refiere a un método para la producción de dichas partículas y sus usos en transferencia génica o marcaje celular y como medicamento, particularmente como medicamento de terapia de reemplazo proteico/enzimático y como sistema de inmunización.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 En la actualidad, existe un creciente interés en el desarrollo de sistemas que permiten la vectorización o distribución de ácidos nucleicos. Entre las aplicaciones de estos sistemas destacan diversas aproximaciones terapéuticas, como su uso en el tratamiento de enfermedades genéticas, en la que la transferencia genética permite corregir o reemplazar genes causantes de determinadas enfermedades en tejidos y células de los pacientes. 20

Otra aproximación terapéutica basada en la distribución de ácidos nucleicos engloba la producción de vacunas, por ejemplo, la vacuna del SARS-CoV-2 frente a la COVID19, que se basa en un sistema de transferencia genética de partículas lipídicas que encapsulan ARNm codificante para la proteína `S` de la espina del virus que resulta crítica para su unión a las 25 células humanas. Sin embargo, la distribución de agentes biológicamente activos, como los ácidos nucleicos, a células y tejidos, presenta dificultades técnicas asociadas, entre otras, su estabilidad de duración limitada.

30 En la actualidad, los métodos empleados para la distribución de ácidos nucleicos incluyen vectores virales y no virales. Los vectores virales presentan una alta eficiencia en la distribución de material genético a las células, siendo sistemas muy utilizados en biomedicina. Entre ellos, destaca especialmente el uso de vectores derivados de virus adenoasociados, que está ampliamente extendido en terapia génica por su bioseguridad, baja toxicidad y 35 tropismo selectivo. No obstante, los vectores virales tienen problemas para su aplicación clínica como limitaciones en el tamaño del gen a transducir, falta de especificidad, inmunogenicidad y posibles efectos oncogénicos.

Por su parte, el uso de vectores no virales supera muchas de estas limitaciones, existiendo un creciente interés en sistemas de transferencia genética de este tipo. Los sistemas más empleados para la distribución de ácidos nucleicos comprenden moléculas portadoras de carga positiva que neutralizan la carga negativa de los ácidos nucleicos. Entre ellos, destacan los liposomas catiónicos, que no presentan limitaciones en el tamaño del ADN a transducir y tienen una baja inmunogenicidad y toxicidad, y se pueden administrar *in vivo*, por vía intravenosa, generalmente quedando retenidas las partículas mecánicamente en los filtros naturales, como los pulmones y el hígado, o por vía intramuscular. No obstante, su baja estabilidad y rápida degradación en el cuerpo suponen barreras para su distribución logística e implementación clínica.

Se han desarrollado nuevas estrategias en campos como el de la nanomedicina para el diseño y producción de nuevos sistemas capaces de vectorizar ácidos nucleicos con mayor potencial. La nanomedicina se refiere de forma general a la aplicación médica de la nanotecnología, un campo interdisciplinar que explota las características distintivas de materiales, cuyo rango de tamaño molecular y celular, así como su versatilidad, les hacen ser sistemas de interés para la distribución de fármacos y ácidos nucleicos.

Particularmente, las partículas muestran propiedades destacadas como sistemas de transferencia genética, entre otras, la capacidad de ir dirigidas a tejidos o células específicas, protección frente a la degradación de nucleasas, mejora de la estabilidad del ADN e incremento de la eficiencia de la transformación y seguridad. De hecho, son cada vez más aceptados desde el punto de vista clínico al ser considerados como uno de los sistemas de vectorización más prometedores por su comportamiento biológico y versatilidad en formas y tamaños (*Chen et al., 2016, Molecular Therapy — Methods & Clinical Development, 3, 16023*).

Existen numerosos ejemplos de partículas capaces de vectorizar o distribuir diferentes compuestos terapéuticos y ácidos nucleicos para su uso en transferencia genética (Dizaj *et al.*, 2014). Se han desarrollado diferentes tipos de partículas para la distribución de ácidos nucleicos: poliméricos (como micelas, nanogeles, polímeros lineales, dendrímeros, polimerosomas), inorgánicos (como partículas de oro, puntos cuánticos, partículas de sílice, nanomateriales basados en carbono), liposomas, exosomas y soportes de ADN basados en nanoestructura, así como híbridos que integran las ventajas de diferentes materiales. Todos estos sistemas son estructuras primarias que pueden a su vez combinarse con ligandos de tipo orgánico o inorgánicos en su superficie para mejorar su direccionamiento o prevenir su

captura por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear.

No obstante, la mayoría de estos sistemas son muy inestables y, por ello, deben prepararse minutos antes de su uso, o conservarse en condiciones de frío extremo, lo que complica su logística a nivel industrial, así como una pérdida de fiabilidad y reproducibilidad.

Diversos estudios se están centrando en las partículas de tipo inorgánico, y más específicamente en las partículas de sílice (Li Tang and Jianjun Chen, *Nanotoday*, Vol 8, 3, 290-312 (2013)) debido a sus propiedades: superan algunas de las limitaciones de nanosistemas orgánicos, como la baja estabilidad en condiciones fisiológicas, y ofrece muchas ventajas comparadas con otros tipos de materiales inorgánicos, como un tamaño controlable, facilidad de modificación de la superficie, pueden ser producidos a gran escala y presentar gran biocompatibilidad. Entre los métodos usados para la producción de este tipo de partículas, destaca el método de Stöber (Stöber, W., *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1), 62-69 (1968)) que se basa en la hidrólisis de un precursor de sílice en solución alcohólica en presencia de amonio como catalizador, y que, a pesar de ser propuesto 40 años atrás, sigue siendo ampliamente utilizado.

En los últimos años, se han incluido modificaciones de superficie (externa o interna, en los poros) de las partículas de sílice ya formadas mediante recubrimiento con cargas positivas, y posteriormente agregando a dichas superficie de forma electrostática los ácidos nucleicos, debido a que las partículas de sílice puras tienen carga negativa y por ello, dificultades en la interacción electrostática con las moléculas de ácidos nucleicos también cargadas negativamente.

Existe por tanto una necesidad en el estado de la técnica de desarrollar sistemas de distribución de ácidos nucleicos alternativos que sean estables, reproducibles y eficientes en la transferencia genética.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han desarrollado partículas de sílice (SiO_2), estables, reproducibles y eficaces en la transferencia genética debido a que comprenden ácidos nucleicos (AANN) encapsulados en su interior.

Los métodos descritos en el estado de la técnica modifican la superficie de las partículas de

sílice ya formadas mediante recubrimiento con cargas positivas, y posteriormente agregan a dichas superficie de forma electrostática los ácidos nucleicos. Por el contrario, los inventores han introducido los AANN en la mezcla precursora de las partículas de sílice, quedando de este modo los ácidos nucleicos integrados dentro de la partícula de sílice y solo se liberan
5 cuándo ésta se disuelve, permitiendo su uso en transferencia genética, marcaje celular o su uso terapéutico, por ejemplo, en terapia de reemplazo proteico/enzimático, como transportadores de ARN (por ejemplo, ARN inhibidores o de interferencia) o en la producción de vacunas. Esto hace que los AANN estén muy protegidos y que, además, se pueda emplear la superficie de las partículas para otros fines.

10 La sílice es un compuesto completamente biocompatible que no produce ningún tipo de toxicidad a las dosis de uso incluso cuando las nanopartículas de este compuesto son capturadas y se disuelven en el interior de neuronas (*Iturrioz-Rodríguez N., et al 2020, Pharmaceutics, 28;12(6):487*). Las partículas que contienen ácidos nucleicos encapsulados
15 se pueden almacenar durante meses en etanol, debido a que la sílice y los ácidos nucleicos son muy estables en etanol. Además, la síntesis de partículas se puede escalar fácilmente, lo que permite la preparación en grandes cantidades. Esto, sumado a su gran estabilidad, permite la producción y distribución de partículas a nivel industrial sin perder efectividad, incluso a temperatura ambiente durante al menos 1 mes.

20 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una partícula de sílice que comprende al menos un ácido nucleico encapsulado en el interior de dicha partícula, de aquí en adelante la “partícula de la invención”.

25 El término “partícula de sílice” se refiere en la presente invención a partículas inorgánicas compuestas por óxido de silicio o sílice (SiO_2) y que comprenden unas dimensiones en el rango comprendido entre 1 y 5000 nm, preferiblemente con morfología esférica. Las partículas de la invención forman un sistema coloidal, suspensión coloidal o dispersión coloidal que comprende una fase fluida (líquido o gas) y otra dispersa en forma de partículas sólidas de
30 sílice. Preferiblemente la suspensión o el sistema coloidal es una suspensión uniforme o monodispersa.

Las partículas de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partícula igual o inferior a 5 μm , preferiblemente tienen un tamaño medio de diámetro comprendido
35 entre 1 y 2000 nm. Este tamaño permite a las nanopartículas penetrar en las células, disolverse y administrar la molécula biológicamente activa, es decir, los ácidos nucleicos o

AANN, términos utilizados indistintamente a lo largo del presente documento.

En una realización preferida, la partícula de la invención tiene un tamaño entre 1 nm a 1000 nm, más preferiblemente entre 200 nm y 500 nm de diámetro.

5

En otra realización aún más preferida, la partícula de la invención tiene un tamaño que se selecciona entre: 200 nm, 210 nm, 220 nm, 230 nm, 240 nm, 250 nm, 260 nm, 270 nm, 280 nm, 290 nm, 300nm, 310 nm, 320 nm, 330 nm, 340 nm, 350 nm, 360 nm, 370 nm, 380 nm, 390 nm, 400 nm, 410 nm, 420 nm, 430 nm, 440 nm, 450 nm, 460 nm, 470 nm, 480 nm, 490 nm o 500 nm de diámetro.

10

Las partículas de sílice (SiO_2) de la invención comprenden ácidos nucleicos (AANN) encapsulados en su interior, es decir, están integrados dentro de la partícula de sílice y solo se libera cuándo ésta se disuelve.

15

El término "encapsulamiento", tal como se usa en la presente invención, se refiere a la disposición, localización o integración en el interior de la partícula de los agentes biológicos, particularmente los ácidos nucleicos, de forma que se encuentran físicamente en el interior de la estructura de la partícula, quedando así la/s molécula/s de ácido nucleico encapsulado en el interior de la partícula de sílice.

20

El término "ácido nucleico" o "secuencia de nucleótidos", usados indistintamente en la presente invención, se refiere a una molécula o secuencia de ácidos nucleicos, particularmente de desoxirribonucleótidos (ADN), de ribonucleótidos (ARN) y/o versiones modificadas de los mismos, así como de sus polímeros en forma de cadena simple (monocatenarios) y/o doble (bicatenario), o sus complementos.

25

Por tanto, en otra realización preferida, el ácido nucleico encapsulado en la partícula es ADN y/o ARN.

30

Ejemplos de ácidos nucleicos incluyen, sin limitar a, ADN lineal bicatenario (ADNbc), ARN mensajero (ARNm), ADN plasmídico (ADNp), ARN de interferencia (ARNi), ARN en horquilla (ARNh), microARN (miARN), ARNguía (ARNg) o ADN superenrollado.

35

En otra realización más preferida, el ácido nucleico encapsulado en la partícula de la invención se selecciona de la lista que consiste en: ADNbc, ARNm, ADNp, ARNi, ARNh, miARN, ARNg

y ADN superenrollado.

Las partículas de sílice de la invención son eficaces en la transferencia genética debido a que, una vez penetran en el interior de la célula, se disuelven, liberando en el citoplasma celular
5 los elementos encapsulados en dichas partículas, particularmente los ácidos nucleicos (AANN).

Como entiende un experto en la materia, el ácido nucleico encapsulado en la partícula de la invención, o la proteína que codifique dicho AANN, pueden regular la expresión génica celular,
10 particularmente sobreexpresando, inhibiendo o silenciando la expresión génica celular.

Los términos “silenciamiento génico” o “inhibición génica” usados en la presente invención, se refieren indistintamente a un mecanismo celular mediante el cual, mediante AANN o proteínas codificadas por los AANN encapsulados, se inhibe la expresión de genes, controlando la
15 expresión de genes endógenos y exógenos, llevado a cabo a nivel Post-Transcripcional (PTGS) o Transcripcional (TGS). Ejemplos de proteínas o AANN que se encargan de silenciar la expresión incluyen, sin limitar a, proteínas “Dicers”, argonautas, nucleasa (ARNsa o ADNsa), miARN o siARN.

20 Por otro lado, además de regular la expresión génica, los AANN encapsulados pueden codificar para proteínas de localización o marcaje celulares, como por ejemplo proteínas fluorescentes. Esto permite que las partículas de la invención se puedan usar en la identificación de estructuras celulares, mediante la encapsulación de AANN que codifican marcadores celulares.

25 Por tanto, en otra realización preferida, el ácido nucleico encapsulado en el interior de la partícula de la invención codifica para al menos un marcador celular.

El término “marcador celular”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una
30 proteína, tal como una proteína fluorescente o luminiscente, o una enzima, o un fragmento de las mismas, o a una molécula química, cuya expresión y/o actividad puede dar lugar a una señal detectable que puede ser visualizada y que por tanto puede utilizarse en marcaje celular para identificar una célula o un componente o fracción celular (por ejemplo, superficie celular, núcleo, orgánulo, fragmento celular u otro material que se origina en una célula o que forma
35 parte de la misma), linajes o líneas celulares, tejidos u órganos, así como para caracterizar e identificar un estado particular de las células (por ejemplo, un estado de enfermedad o

fisiológico tal como apoptótico o no apoptótico, un estado de diferenciación o un estado indiferenciado). Ejemplos de marcadores celulares incluyen, sin limitar a, cromóforos, fluorocromos, fluoróforos tales como fluoresceína (FITC), *texas red*, ficoeritrina (PE), Rodamina, naranja de acridina, hoescht, DAPI, ioduro de propidio, bromuro de etidio, Dio, Dil, DiR, alofocianina, sondas de hibridación, fragmentos de anticuerpos, etiquetas de afinidad (por ejemplo, biotina o avidina), enzimas como la fosfatasa alcalina (AP) o la peroxidasa de rábano (HRP).

Es práctica de rutina para el experto en la materia, determinar la presencia, ausencia o el nivel de expresión de un marcador celular mediante técnicas estándar conocidas en el estado de la técnica. Ejemplos de técnicas de visualización o identificación de marcadores celulares incluyen, sin limitar a, *Northern blot*, hibridación *in situ*, RT-PCR, secuenciación, métodos inmunológicos (inmunotransferencia, inmunohistoquímica, detección de fluorescencia después de la tinción con anticuerpos marcados con fluorescencia) citometría, microscopía de fluorescencia, micromatrices de oligonucleótidos o ADNc, análisis de micromatrices de proteínas o espectrometría de masas.

En otra realización preferida, el ácido nucleico (AANN) encapsulado en la partícula de la invención codifica para un marcador fluorescente, preferiblemente un fluoróforo, más preferiblemente una proteína fluorescente.

Ejemplos de proteínas fluorescente incluyen, sin limitar a, proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* o *GFP*, por sus siglas en inglés), proteína roja fluorescente (*Red Fluorescent Protein* o *RFP*, por sus siglas en inglés; o también *mCherry*), proteínas fluorescentes de emisión en el rojo lejano (por ejemplo, *TagRFP657*), proteínas fluorescentes de emisión en el infrarrojo (por ejemplo, *miRFP709* o *iRFP720*), proteína azul fluorescente (*Bue Fluorescent Protein* o *BFP*, por sus siglas en inglés), proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein* o *YFP*, por sus siglas en inglés) o cualquier combinación entre ellas.

Como entiende un experto en la materia, los AANN encapsulados también pueden comprender secuencias de localización celular, como por ejemplo secuencia de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequence* o *NLS*, por sus siglas en inglés) para importar la proteína al núcleo o secuencias de localización subcelular para su importación en mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplasmático o cloroplastos, entre otros. Esto localizará la expresión de la proteína fluorescente en diferentes localizaciones subcelulares.

Así, en otra realización preferida, el ácido nucleico encapsulado codifica para proteínas o fragmentos de proteínas víricas, bacterianas o parasitarias.

- 5 El término “proteína o fragmento de proteína vírica, bacteriana, parasitaria o toxinas peptídicas de origen eucariota”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína o fragmento de una proteína que compone o es producto de un virus (por ejemplo, el SARS-CoV-2, virus de la gripe), bacteria (por ejemplo, toxinas como la Shiga o botulínica), parásito (por ejemplo, mosquitos *Anopheles* causantes de la malaria) o de organismos eucariotas (por ejemplo, toxina peptídica del pez globo, toxina de caracol, de insectos o de serpientes).

Ejemplos de proteínas víricas incluyen, sin limitar a, proteínas estructurales (proteínas de la cápside y la envoltura vírica), proteínas no estructurales, proteínas reguladoras y proteínas accesorias.

15

En una realización más preferida, dicha proteína o fragmento de proteína vírica es del SARS-CoV-2.

- 20 Ejemplos de proteínas bacterianas, incluyen sin limitar a, toxinas modificadas o toxoides, adhesinas, proteínas de la membrana externa (*outer membrane proteins*), proteínas del flagelo, proteínas periplásmicas y enzimas bacterianas intracelulares.

- 25 Ejemplos de proteínas parasitarias, incluyen sin limitar a, proteínas de la superficie, proteínas transmembrana, aquaporinas, proteínas de cutícula, glutatión S-transferasas, serín-proteasas, aminopeptidasas, proteínas de secreción, o factores que atenúan la respuesta inmune del hospedador, como la proteína PMIF (por sus siglas en inglés, *Plasmodium Macrophage Migration Inhibitory Factor*).

- 30 Como entiende un experto en la materia, los AANN encapsulados también pueden comprender secuencias génicas terapéuticas, entre otros, AANN que contengan secuencias que codifiquen genes de proteínas o ARNs reparadores del daño celular o genes “cuidadores”, genes o supresores de tumores o genes inductores de apoptosis, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer.

- 35 Así, en otra realización preferida, el ácido nucleico encapsulado codifica para al menos un gen supresor de tumores o un gen reparador del daño celular.

El término “genes supresores de tumores” tal como se usa en la presente invención se refiere a un gen que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerosa e inhiben la proliferación celular excesiva, en donde las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a un daño en el ADN o a señales de supresión del crecimiento provenientes del medio extracelular (inhibición por contacto). Ejemplos de genes supresores de tumores incluyen, sin limitar a, Retinoblastoma o RB1, gen TPP53 o Neurofibromatosis tipo 1 o 2 (NF1 o NF2), genes de HNPCC (Cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis) (MLH, MSH2 y MSH6), genes de DCC (de cáncer colorrectal), CDKN2A, ARID1A, ATM, CHK2, APC, BRCA1 y BRCA2.

El término “genes reparadores del daño celular” o “genes cuidadores” tal como se usa en la presente invención se refiere a genes implicados en la reparación de las alteraciones del ADN y en el mantenimiento de la integridad del genoma y del proteoma. Ejemplos de genes reparadores de daño celular incluyen, sin limitar a, genes de reparación por escisión de bases (BER), de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y de reparación de errores de emparejamiento (MMR), genes que codifican chaperonas moleculares (Hsp70, Hsp90, Hsp60), factores de crecimiento (NGF, EGRF, CNTF, BDNF), o reguladoras de cascadas de señalización tipo RAF–MEK–ERK.

Como entiende un experto en la materia, los AANN encapsulados también pueden comprender secuencias génicas que activen o inhiban la reparación celular en neuronas por ejemplo, inhibiendo la formación de compuestos tóxicos o proteínas defectuosas como el amiloide.

Como entiende un experto en la materia, además de AANN encapsulados, la partícula de sílice de la invención puede comprender proteínas formando sistemas de edición genética, por ejemplo, el sistema CRISPR-Cas, si bien son sistemas que comprenden fragmentos de AANN, particularmente ARN-guía, acompañados de proteínas, particularmente nucleasas.

El término “sistema de edición genética” se refiere en la presente invención a un tipo de ingeniería genética en la que se realiza la manipulación, modificación o alteración directa de una secuencia de ADN en el genoma de una célula u organismo ya sea eliminando, insertando o reemplazando alguna secuencia de interés en su genotipo, particularmente mediante el uso de enzimas llamadas nucleasas, las cuales cortan el ADN o genoma específicamente.

Ejemplos de sistemas de edición genética incluyen, sin limitar a, ZNF (dedos de cinc unidos a nucleasas o su término en inglés "*Finger Zinc Nucleases*"), TALEN (nucleasa de actividad similar a activador de transcripción o su término en inglés "*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*") y CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas o su término en inglés "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*").

En otra realización preferida, la partícula de la invención comprende un sistema de edición genética encapsulado, en donde el sistema de edición genética comprende un ácido nucleico y una nucleasa.

En otra realización más preferida, la partícula de la invención comprende un sistema de edición genética encapsulado, en donde el sistema de edición genética se selecciona de la lista que consiste en: ZNF, TALEN o CRISPR.

En otra realización aún más preferida, la partícula de la invención comprende un sistema de edición genética encapsulado, en donde el sistema de edición genética es CRISPR, más preferiblemente en donde el sistema CRISPR se selecciona de la lista que consiste en: CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas12a, CRISPR-Cas Φ , CRISPR-Cas3, CRISPR-Cas8, CRISPR-Cas10 y CRISPR-Cas4, aún más preferiblemente CRISPR-Cas9.

Como entiende un experto en la materia, además de AANN encapsulados, la partícula de sílice de la invención puede comprender otras moléculas encapsuladas en su interior (que no son codificadas por AANN), tal como nanopartículas magnéticas, moléculas terapéuticas o fármacos o marcadores celulares (no codificados por AANN, como por ejemplo marcadores radiológicos o radioisótopos) para favorecer su entrada en el citoplasma celular empleando fuerza magnética o su visualización mediante técnicas de fluorescencia, respectivamente.

Así, en otra realización preferida, la partícula de la invención además comprende marcadores celulares encapsulados no codificados por AANN. El término "marcadores celulares" se ha descrito anteriormente y se aplica de igual modo a esta realización particular. Ejemplos de marcadores celulares (no codificados por AANN) incluyen, sin limitar a, sondas fluorescentes con afinidad por estructuras subcelulares como por vesículas ácidas (endosomas y/o lisosomas, por ejemplo, Lisotracker®) o por los ácidos nucleicos (Hoescht o DAPI por el DNA, Bromuro de etidio, Ioduro de propidio, Naranja de acridina, etc), compuestos marcadores del citoplasma celular o de las mitocondrias o compuestos lipofílicos (Dil, DiO, DiR) para marcar

membranas.

Así, en otra realización preferida, la partícula de la invención además comprende nanopartículas magnéticas encapsuladas. Ejemplos de partículas magnéticas incluyen, sin
5 limitar a, partículas formadas por óxidos de hierro, níquel y cobalto; u otros elementos que combinan varios metales, como el zinc, el cobre, el estroncio o el bario.

Así, en otra realización preferida, la partícula de la invención además comprende moléculas terapéuticas o fármacos. Ejemplos de fármacos incluyen, los agentes alquilantes (Altretamina;
10 Bendamustina; Bulsufán; Carboplatino; Carmustina; Clorambucilo; Cisplatino; Ciclofosfamida; Dacarbazina; Ifosfamida; Lomustina; Mecloretamina; Melfalán; Oxaliplatino; Temozolomida; Tiotepa; Trabectedin); Nitrosoureas (Carmustina; Lomustina; Estreptozocina); los antimetabolitos (zacitidina; 5-fluorouracilo; 6-mercaptopurina; Capecitabina; Cladribina; Clofarabina; Citarabina; Decitabina; Floxiridina; Fludarabina; Gemcitabina; Hidroxiurea;
15 Metotrexato; Nelarabine; Pemetrexed; Pentostatina; Pralatrexato; Tioguanina); los antibióticos antitumorales tipo Antraciclinas (Daunorubicina, Doxorubicina; Epirubicina; Idarubicina; Valrubicina); o antibióticos no-antraciclinas (Bleomicina; Dactinomicina; Mitomicina C; Mitoxantrona). Otros compuestos comprenden los inhibidores de las topoisomerasas (Irinotecán; Topotecán; Etopósido; Mitoxantrona; Tenipósido); Inhibidores de la mitosis como
20 los taxanos (Capazitaxel; Docetaxel; Paclitaxel); alcaloides de la vinca (Vinblastina; Vincristina; Vinorelbina); corticoesteroides (Prednisona; Metilprednisolona; Dexametasona) u otros medicamentos de quimioterapia como el Ácido transretinoico; Trióxido de arsénico; Asparaginasa; Eribulina; Hidroxiurea; Ixabepilona; Mitotano; Omacetaxina; Pegasparaginasa; Procarbazina; Romidepsina o Vorinostat.

25 Los ácidos nucleicos integrados dentro de la partícula de sílice de la invención solo se liberan cuándo ésta se disuelve, permitiendo que los AANN estén muy protegidos y que, además, se pueda funcionalizar la superficie de las partículas para otros fines, como, por ejemplo, para el direccionamiento o recubrimiento de la partícula de la invención, mediante recubrimientos
30 proteicos, anticuerpos y/o la unión de ligandos de direccionamiento a la superficie de la partícula.

Así, la partícula de la invención además comprende al menos un ligando de direccionamiento y/o un recubrimiento proteico en su superficie.

35

El término “ligando de direccionamiento” tal como se usa en la presente invención se refiere

a moléculas o partículas, de origen biológico (por ejemplo, péptidos, proteínas, nucleótidos) o de origen físico-químico, que dirigen, focalizan o transportar la partícula de la invención a un determinado tipo celular, tejido u órgano.

5 Ejemplo de ligandos de direccionamiento incluyen, sin limitar a, proteínas o péptidos ligando (por ejemplo, péptidos de unión a neuronas, proteínas y/o toxinas víricas o bacterianas), anticuerpos, nanoanticuerpos, dendrímeros, moléculas dirigidas a receptores (por ejemplo, el ácido fólico) o aptámeros.

10 El término “recubrimiento proteico” tal como se usa en la presente invención se refiere a moléculas proteicas (péptidos, proteínas o fragmentos de proteínas) que al ensamblarse y/o unirse a la superficie de sílice de las partículas de la invención recubren y forman una cubierta que envuelve a la partícula de sílice de la invención en al menos un 75% de la superficie total de la partícula de sílice, más preferiblemente entre un 80 a un 100% de la superficie total.

15

Asimismo, los ligandos de direccionamiento y el recubrimiento proteico pueden estar funcionalizados con marcadores celulares, como por ejemplo moléculas fluorescentes, para permitir la visualización de dicho recubrimiento proteico.

20 En otra realización aún más preferida, el recubrimiento proteico o el ligando de direccionamiento de la superficie de partícula de la invención además comprende al menos un marcador celular.

Los términos “marcador celular”, “ligando de direccionamiento” y “recubrimiento proteico” ya
25 han sido descritos en realizaciones anteriores de la presente invención y se aplica de igual modo a esta realización preferida.

Además, la superficie de la partícula de sílice de la invención puede recubrirse a su vez con un recubrimiento compuesto de las mismas partículas de sílice de la invención, obteniendo
30 partículas con doble capa de SiO₂ y AANN encapsulados diferentes. Así, en otra realización preferida la partícula de la invención comprende un recubrimiento de sílice en su superficie donde dicho recubrimiento de sílice comprende partículas de sílice con AANN encapsulados, es decir, partículas de sílice de la invención, formado una partícula con doble capa de sílice.

35 Como entiende un experto en la materia, la partícula de sílice de la invención puede estar comprendida en una composición para su uso *in vitro*, por ejemplo, en transferencia genética

o el marcaje celular tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Por tanto, otro aspecto de la invención es una composición que comprende la partícula de sílice de la invención, de aquí en adelante la “composición de la invención”.

5

La partícula de sílice ha sido descrita anteriormente en el presente documento y se aplica de igual forma a este aspecto de la invención, así como a todas sus realizaciones preferidas (solas o en combinación).

10 Particularmente, la composición de la invención puede ser una composición farmacéutica para su uso como medicamento, por ejemplo, en terapia de reemplazo proteico/enzimático. Así, en una realización preferida, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

El término “composición farmacéutica” se refiere a un conjunto, mezcla, combinación de
15 componentes o sustancias que comprenden la partícula de sílice de la invención en cualquier concentración. La composición farmacéutica puede ser de uso humano. El término “composición farmacéutica de uso humano” se refiere a una composición, sustancia o combinación de sustancias con propiedades para su uso como medicamento, particularmente
20 como medicamento de terapia de reemplazo proteico/enzimático en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica además comprende, al menos, un
25 vehículo y/o un excipiente farmacológicamente aceptable.

El término “vehículo” o “portador”, se refiere a una sustancia, preferiblemente una sustancia inerte, que facilita la incorporación de otros compuestos, que permite una mejor dosificación y administración o mejora la consistencia y forma de la composición farmacéutica para su uso
30 como medicamento de terapia de reemplazo proteico/enzimático. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes, es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo
35 farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica, estabiliza dichos componentes, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. Así pues, los excipientes podrían tener la
5 función de mantener los componentes unidos, como por ejemplo, almidones, azúcares o celulosas; función de endulzar; función de colorante; función de protección del medicamento, como por ejemplo, para aislarlo del aire y/o la humedad; función de relleno de una pastilla, cápsula, píldora o cualquier otra forma de presentación como, por ejemplo, el fosfato de calcio dibásico; función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes; sin excluir
10 otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

Además, como entiende el experto en la materia, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que el vehículo o el excipiente deben permitir la actividad de los compuestos de la composición
15 farmacéutica, en particular de la partícula de la invención, es decir, que sea compatible con dichos componentes, de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica se puede presentar bajo cualquier forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, puede estar
20 en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, intravenosa, intraperitoneal, orogástrica, intracolónica, inhalada o parenteral.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica es una vacuna, preferiblemente una
25 vacuna frente al SARS-CoV-2.

El término "vacuna" tal como se usa en el presente documento se refiere a una partícula o composición que, cuando es administrada a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria celular y/o humoral. Esta puede incluir un antígeno o combinaciones de antígenos. En la
30 presente invención, el antígeno está codificado por el ácido nucleico encapsulado en la partícula de la invención.

Los inventores de la presente invención han desarrollado partículas de sílice, estables, reproducibles y eficaces en la transferencia genética debido a que han introducido los ácidos
35 nucleicos (AANN) dentro de la mezcla de componentes que formarán las partículas de sílice.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de la partícula de la invención, de aquí en adelante el “método de la invención”, que comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) disolver etanol (EtOH) en una concentración molar de entre 8 y 12 mol/L (M), hidróxido de amonio (NH₄OH) en una concentración molar de entre 0,1 y 3,5 M y una disolución de ácidos nucleicos (AANN) en una concentración de entre 0,01 y 0,50 µg/µL;
- (ii) añadir a la disolución obtenida en (i) tetra-etil-ortosilicato (TEOS) en una concentración molar de entre 0,10 y 0,40M; y
- 10 (iii) agitar la solución obtenida en (ii) entre 100 y 1000rpm durante 1 a 3 horas a una temperatura entre 5 y 40 °C obteniendo una suspensión coloidal de partículas de sílice que comprenden los ácidos nucleicos encapsulados en su interior.

Los términos “ácido nucleico”, “encapsulación” y “partícula de sílice” ya han sido descritos en aspectos anteriores de la presente invención y se aplica de igual modo a este aspecto inventivo, así como todas sus realizaciones preferidas (solas o en combinación).

El término “molaridad” o “mol/L” o “M”, utilizados indistintamente en la presente descripción, se refiere a la concentración molar (también llamada molaridad), es una medida de la concentración de un soluto en una disolución, ya sea alguna especie molecular, iónica o atómica, es decir, la relación entre la cantidad de soluto (expresada en moles) por litro de disolución o por unidad de volumen. Es práctica de rutina para un experto en la materia determinar las unidades de medida de volumen en función del soluto y del disolvente, y calcular la molaridad (M) del soluto y/o del disolvente de la disolución en base al volumen final.

Como entiende un experto en la materia, la disolución ácidos nucleicos comprende un soluto, los ácidos nucleicos o AANN y un disolvente. En otra realización preferida del método de la invención, el disolvente de la disolución de ácidos nucleicos de la etapa (i) es agua desionizada (dH₂O) o agua MiliQ entre 2 y 18M, o buffer Tris EDTA (TE) al 16 %v/v o etanol, preferiblemente en agua desionizada (dH₂O) o agua MiliQ.

30 En otra realización preferida, la concentración de la disolución de ácidos nucleicos de la etapa (i) es entre 0,01 y 0,50 µg/µL, preferiblemente entre 0,15 y 0,35 µg/µL. En otra realización más preferida, la concentración inicial de la disolución de ácidos nucleicos (b) de la etapa (i) es 0,16 µg/µL, 0,17 µg/µL, 0,18 µg/µL, 0,19 µg/µL, 0,20 µg/µL, 0,21 0,22 µg/µL, 0,23 µg/µL, 0,24

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,26 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,27 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,29 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,31 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o 0,34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, preferiblemente 0,225 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En la presente invención, la disolución de ácidos nucleicos del método de la invención, se
5 añade en la fase líquida pre-solidificación (etapa (i)), permitiendo que los ácidos nucleicos
queden encapsulados, una vez sintetizada la partícula de sílice, en el interior la misma. En el
presente documento, se entiende por "fase líquida pre-solidificación" la mezcla de
componentes antes de la solidificación de las partículas de sílice. Esta solidificación, en la que
la mezcla de componentes evoluciona gradualmente hacia una red de tipo gel, comienza tras
10 añadir el TEOS de la etapa (ii).

Como entiende un experto en la materia el volumen de etanol (EtOH) se calcula en función
de la concentración o volumen del resto de componentes del método de la invención, y se
añade hasta completar el volumen final deseado.

15

En otra realización preferida, la concentración molar de etanol es entre 9M y 11M, la de
 NH_4OH es entre 0,30M y 2M, la de dH_2O es entre 9M y 11M y la de TEOS es entre 0,15M y
0,35M.

20 En otra realización más preferida, la concentración molar de etanol es entre 9,5M y 10,5M, la
de NH_4OH es entre 0,3M y 1,5M, la de dH_2O es entre 9,5M y 10,5M y la de TEOS es entre
0,2M y 0,3M.

En otra realización aún más preferida, en la etapa (i) del método de la invención la
25 concentración molar de EtOH es entre 9,7 y 10 M, la de NH_4OH es 0,34M o 1,06M o 2,2M y
la de dH_2O es de 9,77M y/o en la etapa (ii) la concentración molar de TEOS es 0,25M.

En la etapa (iii) del método de la invención, la agitación permite completar la solidificación de
las partículas de sílice que encapsulan en su interior los ácidos nucleicos, obteniendo una
30 suspensión coloidal de partículas de sílice que comprenden los ácidos nucleicos
encapsulados. Los términos "suspensión coloidal", "sistema coloidal" o "dispersión coloidal",
usados indistintamente en el presente documento, se refiere a un sistema conformado por
dos o más fases, normalmente una fluida (líquido o gas) y otra dispersa en forma de partículas
generalmente sólidas, particularmente las partículas de la invención.

35

Es práctica de rutina para un experto en la materia determinar la agitación en función del

volumen total de la disolución y otros factores como, por ejemplo, densidad, viscosidad, dimensiones tanque o biorreactor, entre otros. Ejemplos de tipo agitación incluyen, sin limitar a, agitación magnética o agitación mecánica.

- 5 El término “agitación magnética” usado en el presente documento se refiere a la agitación basada en la rotación de un campo magnético externo variable que induce a girar un imán introducido en la solución de reacción, particularmente para volúmenes menores de 1 litro (1L). Existen diferentes tipos de sistemas de agitación magnética tal como agitadores vórtex o agitadores magnéticos.

10

El término “agitación mecánica” usado en el presente documento se refiere a la agitación basada en la rotación o movimiento de un fluido en el interior de un recipiente, tanque o reactor forzado o llevado a cabo por medios mecánicos para que adquiriera un movimiento circulatorio en el interior de un recipiente, particularmente con el uso de motores. Existen diferentes tipos de sistemas de agitación mecánica tal como agitadores de palas, orbitales, oscilantes, rotativos, vibradores, entre otros.

15

En una realización preferida, la etapa (iii) se realiza por agitación magnética con agitador vórtex o agitador magnético entre 100 y 300 rpm, preferiblemente entre 150 a 200 rpm.

20

En otra realización preferida, la etapa (iii) se realiza durante 1,5 a 2,5 horas, más preferiblemente durante 2 horas.

En otra realización más preferida, la etapa (iii) del método de la invención se realiza a 15°C-30°C. En otra realización más preferida, la etapa (iii) se realiza entre 18 a 27°C, preferiblemente entre 20 a 25°C, más preferiblemente a 22°C o 23°C.

25

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende una etapa adicional, la etapa (iv), donde se lavan las partículas obtenidas en la etapa (iii) con etanol durante 1 a 5 ciclos en donde cada ciclo comprende (i) centrifugación entre 3500 rpm a 8000 rpm durante 1 a 15 minutos y (ii) redispersión con etanol y agitación durante 20 a 80 segundos entre 100 a 300 rpm.

30

En otra realización más preferida, la etapa (iv) del método de la invención comprende 3 ciclos en donde cada ciclo comprende (i) centrifugación entre 5000 rpm a 65000 rpm durante 3 a 10 minutos y (ii) redispersión con etanol y agitación durante 30 a 60 segundos entre 150 a 200

35

rpm.

Particularmente, las partículas de la invención se pueden almacenar en etanol, preferiblemente en una solución de etanol de entre 80 a 100 %v/v, preferiblemente al 99 %v/v,

5

Mediante el método de la invención, los ácidos nucleicos quedan integrados o encapsulados dentro de la partícula de sílice de la invención permitiendo funcionalizar la superficie de las partículas para otros fines, como, por ejemplo, para el direccionamiento o recubrimiento proteico de la partícula de la invención.

10

El término “funcionalización de la superficie” usado en el presente documento se refiere al proceso de adherir, combinar, unir o insertar grupos funcionales creando una unión estable entre estos y la superficie de la partícula de sílice de la invención, para focalizar o dirigir las partículas a un determinado tipo celular, tejido u órgano, facilitar la incorporación celular de las partículas o para sintetizar un recubrimiento proteico. Ejemplos de grupos funcionales incluyen, sin limitar a, péptidos, proteínas, fragmentos de proteínas, nucleótidos, enzimas, anticuerpos, nanoanticuerpos, dendrímeros, moléculas dirigidas a receptores (por ejemplo, el ácido fólico, la capsaicina, mentol) o aptámeros, entre otros. La unión entre el grupo funcional y la superficie de la partícula de sílice se establece por interacciones electrostáticas, enlaces covalentes o interacciones de Van der Waals o enlaces de hidrógeno.

15
20

Así, en otra realización preferida, el método de la invención además comprende una etapa adicional, la etapa (v), en donde se funcionaliza la superficie de la partícula de sílice, obtenida por el método de la invención.

25

En otra realización más preferida, se funcionaliza la superficie de la partícula con al menos un grupo funcional que se selecciona de la lista que consiste en: péptidos, proteínas o fragmentos de proteínas, nucleótidos, enzimas, anticuerpos, dendrímeros, moléculas dirigidas a receptores y aptámeros.

30

Es practica de rutina para un experto en la materia las técnicas y métodos de funcionalización de superficies con grupos funcionales. Ejemplos de técnicas o métodos de funcionalización incluyen, sin limitar, a: adsorción física, interacciones electrostáticas, o interacciones hidrofóbicas.

35

Asimismo, los grupos funcionales pueden comprender marcadores celulares para permitir la

visualización de la partícula de la invención. En otra realización aún más preferida, los grupos funcionales además comprenden al menos un marcador celular, preferiblemente un marcador fluorescente.

- 5 El término “marcador celular” ya ha sido descrito en aspectos anteriores de la presente invención y se aplica de igual modo a este aspecto inventivo, así como todas sus realizaciones preferidas (solas o en combinación).

- 10 Los inventores, mediante el método de la invención descrito anteriormente, han desarrollado partículas de sílice que comprenden ácidos nucleicos (AANN) encapsulados en el interior de la partícula de sílice.

- 15 Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una partícula de sílice obtenida por el método de la invención, donde dicha partícula comprende al menos un ácido nucleico encapsulado en su interior.

- 20 Las partículas de la invención, así como las partículas obtenidas por el método de la invención, son estables y eficaces en la transferencia genética, debido a que los ácidos nucleicos (AANN) están encapsulados en el interior de la partícula de sílice y solo se liberan cuándo la partícula de la invención se disuelve.

- 25 Así, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de la partícula (o de la partícula obtenida por el método de la invención) o de la composición de la invención en transferencia genética.

- 30 En la presente invención, el término “transferencia genética” o “transducción genética” se refiere al proceso por el que se transfieren ácidos nucleicos exógenos a las células huésped, en donde dichos ácidos nucleicos se estabilizan, se incorporan y/o se expresan en la célula huésped. En la presente invención, el sistema de transferencia genética es la partícula de sílice de la invención que encapsula en su interior el ácido nucleico y que es liberado en el interior de la célula huésped. El término “uso *in vitro*” se refiere al uso en un cultivo celular o en una muestra biológica aislada, es decir, se refiere al uso fuera del cuerpo humano o animal.

- 35 Los ácidos nucleicos encapsulados y liberados en el interior de la célula huésped, pueden ser usados en aplicaciones de biología molecular, como por ejemplo en ingeniería genética, para manipular los genes ya sea eliminando, sustituyendo, duplicando, inhibiendo, silenciando o

insertando material genético por medio de tecnologías de edición genética.

Particularmente, mediante el uso de AANN o proteínas codificadas por los AANN encapsulados, tal como proteínas "Dicers", argonautas, ARNsa, miARN o siARN, se inhibe la expresión génica tras la transferencia genética mediada por las partículas de la invención, tal como se ha descrito anteriormente.

Así, una realización preferida de la invención se refiere al uso *in vitro* de la partícula (o de la partícula obtenida por el método de la invención) o de la composición de la invención en silenciamiento génico. El término "silenciamiento génico" ya ha sido descrito en aspectos anteriores de la presente invención y se aplica de igual modo a este aspecto inventivo, así como todas sus realizaciones preferidas (solas o en combinación).

Además, como se ha descrito anteriormente, además de AANN encapsulados, la partícula de sílice de la invención puede comprender proteínas formando sistemas de edición genética como, por ejemplo, los sistemas CRISPR-Cas.

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de la partícula (o de la partícula obtenida por el método de la invención) o de la composición de la invención en edición genética. El término "sistema de edición genética" ya ha sido descrito en aspectos anteriores de la presente invención y se aplica de igual modo a este aspecto inventivo, así como todas sus realizaciones preferidas (solas o en combinación).

Tal como se ha descrito anteriormente, las partículas de la invención se pueden usar en marcaje celular.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de la partícula (o de la partícula obtenida por el método de la invención) o de la composición de la invención en marcaje celular, preferiblemente marcaje del núcleo de la célula.

Tal y como se utiliza aquí, el término "marcaje celular" se refiere a la explotación de propiedades luminiscentes (por ejemplo, fluorescentes) de determinadas moléculas que son ampliamente empleadas en biología molecular para actuar como señales lumínicas que permiten la visualización de células o regiones de las mismas empleando técnicas de imagen, particularmente con marcadores celulares tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento y que aplican de igual modo en este aspecto inventivo.

Tal como se ha descrito anteriormente, la partícula de la invención puede usarse como medicamento. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a la partícula o la composición de la invención, o la partícula obtenida por el método de la invención, para su uso como medicamento.

5

El término "medicamento", tal y como se usa en el presente documento, hace referencia a cualquier sustancia usada para la prevención, el diagnóstico, el alivio, el tratamiento o la curación de enfermedades en un sujeto o que pueda administrarse al sujeto con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica. En el contexto de la presente invención el medicamento comprende la partícula de sílice de la invención o alternativamente a una composición que comprenda al menos, la partícula de sílice de la invención. A efectos de la presente invención, los términos "medicamento" y "composición farmacéutica" se emplean como sinónimos.

10

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la partícula de la invención, de la partícula obtenida mediante el método de la invención o de la composición de la invención, para la fabricación de un medicamento.

20 En una realización preferida, el medicamento es una vacuna. Preferiblemente, la vacuna es frente al SARS-CoV-2. El término "vacuna" ya ha sido descrito en aspectos anteriores de la presente invención y se aplica de igual modo a este aspecto inventivo, así como todas sus realizaciones preferidas (solas o en combinación).

25 Como entiende un experto en la materia, la particular de sílice de la invención (o la partícula obtenida por el método de la invención), se puede usar en la terapia de reemplazo proteico/enzimático.

30 Por tanto, otra realización preferida se refiere a la partícula de la invención (o la partícula obtenida por el método de la invención) o la composición de la invención para su uso como medicamento de terapia de reemplazo proteico/enzimático.

35 El término "terapia de reemplazo proteico/enzimático", se refiere en la presente invención a un tipo de terapia biológica que consiste en suministrar al paciente una proteína exógena que reemplaza a la misma proteína en su organismo, el cual presenta una disfunción o deficiencia de la misma. En la presente invención, la proteína exógena está codificada por el ácido

nucleico encapsulado.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la partícula de la invención, de la partícula obtenida mediante el método de la invención o de la composición de la invención, para la
5 fabricación de un medicamento de terapia de reemplazo proteico/enzimático.

Además, como sabe un experto en la materia, tanto la partícula de la invención (o la partícula obtenida mediante el método de la invención) que comprende un ácido nucleico que codifica para un marcador celular (o que comprende un marcador celular no codificado por un ácido
10 nucleico), así como la composición de la invención, pueden usarse como agente de contraste para la observación de células. Así, otro aspecto de la presente invención es el uso de la partícula de la invención como agente de contraste para la observación de células.

El término “agente de contraste para la observación de células” se refiere a un compuesto,
15 elemento, composición, disolución, mezcla, sustancia biocompatible (no tóxico) que produce una señal detectable, capaz de ser monitorizado durante la inyección en un sujeto, mediante, por ejemplo, radiografía o fluoroscopia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20

Figura 1. Imágenes de TEM de las nanopartículas de ADN. Escala: 100 nm. Media y desviación estándar del diámetro: 388 ± 36 nm.

Figura 2. Imágenes de TEM de la disolución de las partículas de sílice *in vitro* en condiciones
25 salinas fisiológicas equivalentes al interior celular a tiempos 4h, 24h, 48h y 72h en PBS1X y en el buffer solución salina Hank's (HBSS). Barra de escala: 100 nm.

Figura 3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células humanas (HeLa) transfectadas con partícula de sílice conteniendo AANN codificantes para GFP:NLS. Se
30 observa núcleos fluorescentes como resultado de la expresión del gen de la proteína nuclear fluorescente H2B:YFP (indicados por flechas blancas) codificado por el AANN que ha sido portado por las partículas. Señalización con flechas de los núcleos que emiten fluorescencia.

Figura 4. Imágenes de microscopía confocal de células humanas (HeLa) incubadas con las
35 nanopartículas de ADN después de 72 h transfectadas con partículas portadoras de 2 genes que codifican 2 proteínas nucleares fluorescentes diferentes. Se observa núcleos de todas las

células del cultivo teñidos (con Hoescht), y solo algunos que núcleos expresan el gen de la proteína nuclear H2B:YFP (figura 4A, indicados por flechas blancas). Como resultado de la transcripción y traducción correcta de esta proteína se observan núcleos mostrando la proteína nuclear. También se observa la expresión de otra proteína nuclear fluorescente, la H2B:mCherry (figura 4B; indicados por flechas blancas) codificada en el ADN portado por el segundo tipo de partículas.

Figura 5. Estabilidad de las nanopartículas y de su capacidad de transferencia genética después de 1 mes de almacenamiento en etanol a temperatura ambiente. A, Se observa los cultivos celulares en campo claro; B; la expresión de la proteína fluorescente en los núcleos de las células transfectadas. y C, las imágenes A y B combinadas. D: Imagen de microscopía de transmisión mostrando la integridad de las partículas tras un mes de su almacenamiento.

Figura 6. (a) Gel SDS-PAGE de dos péptidos pertenecientes a la proteína 10xHis:GFP:RVG-330-337. **(b)** Imagen de microscopía de fluorescencia combinada (canal 10 His-GFP + campo claro) de las neuronas motoras de la línea NSC34 incubadas con las nanopartículas de sílice funcionalizadas con 10xHis:GFP:RVG-330-337 después de 24 h. La fluorescencia que se observa resulta del recubrimiento de las partículas con la proteína fluorescente. Barra de escala =100 micrómetros.

Figura 7. Imagen confocal en 3D de una matriz de celulosa donde se han cultivado células HeLa y neuronas motoras de la línea NSC34. Los núcleos se tiñeron en Hoescht. Estas células fueron incubadas con las nanopartículas de ADN funcionalizadas en su superficie con la proteína de direccionamiento a neuronas 10xHis:GFP:RVG-330-337. A las 24 h, las células NSC34 muestran la expresión génica de la proteína fluorescente H2B:mCherry codificada por el ADN encapsulado en las partículas de sílice. Barra de escala =100 micrómetros.

Figura 8. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células transfectadas con NPs de sílice con ADN recombinante codificante para H2B:GFP. **(a)** Células incubadas con NPs originales sin tratar con ADNsa. **(b)** Células incubadas con NPs tratadas previamente con ADNsa. La emisión de fluorescencia procedente de los núcleos celulares en ambos casos, asociada a la transferencia genética y expresión funcional de H2B:GFP, indica que el ADN está intacto después del tratamiento con la nucleasa, por lo que se deduce que se encuentra encapsulado en el interior de las NPs.

Figura 9. Gel de agarosa que muestra los marcadores de tamaño para el ADN del gel (calle

1); En la calle 2 el ADN recombinante codificante para H2B:GFP empleado en la encapsulación: En la Calle 3, ese mismo ADN sin encapsular tratado con la ADNsa ; En las calle 4, el ADN extraído de las nanopartículas tras su incubación en buffer PBS, Y en la Calle 5 en ADN extraído de las nanopartículas tratadas con ADNsa. La inexistencia de banda alguna en el pocillo del ADN tratado con ADNsa (calle 3) indica su degradación y, por tanto, correcto funcionamiento de la ADNsa empleada en los ensayos. Las flechas muestran como la cantidad de ADN extraída de las NP sin tratar y tratadas con ADNasa es muy similar, lo que sugiere que protegen al ADN encapsulado en su interior.

10 **Figura 10.** Imágenes de TEM de la síntesis de partículas de sílice ADN en su interior producidas empleando diferentes molaridades de los elementos precursores y los plásmidos: A) H2B:YFP, B) H2B:YFP, C) H2B:mCherry y D) H2B-YFP.

EJEMPLOS

15

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la invención.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

20

1.1. Obtención de partículas de sílice con ácidos nucleicos encapsulados.

Para elaborar las partículas o esferas de sílice (SiO₂), los inventores emplearon etanol (EtOH, 99%), agua MiliQ, disolución de ácidos nucleicos (AANN), particularmente de ADN recombinante, en una concentración de ADN en la síntesis de entre 0,075 a 3 µgr/µL), hidróxido de amonio (NH₄OH) y tetra-etil-ortosilicato (TEOS 98%, un precursor de la sílice convencional). Los AANN extraídos fueron disueltos al 100% en agua MiliQ, o alternativamente pueden ser disueltos en buffer Tris-EDTA (buffer TE) al 16% final en agua MiliQ o en etanol, para que no afecte a la síntesis de las partículas de sílice. Algunas de las

30 proporciones de AANN utilizadas se muestran en la Tabla 1.

Síntesis número	EtOH (µL)	NH ₄ OH (µL)	TEOS (µL)	H ₂ O (µL)	ADN total µg (2.25 µg/µL en ddH ₂ O)	Tiempo reacción (h)	Diámetro (DLS) (nm)
1	56	19,4	5,6		18	2	189

2	56	19,4	5,6		36	2	189
3	56	19,4	5,6		45	2	350
4	56	19,4	5,6		22,5	2	350
5	56	19,4	5,6		5,6	2	575
6	56	19,4	5,6		104,4	2	575
7	56	19,4	5,6		129,6	2	575
8	56	19,4	5,6	16	4,5	2	610
9	56	19,4	5,6	16	4,5	3	456
10	56	19,4	5,6	16	4,5	4	575

Tabla 1. Obtención de partículas de sílice de diferentes tamaños con diferentes concentraciones de AANN.

La síntesis de las esferas de sílice se realiza siguiendo el método Stöber (Stöber, W., *et al.*,
 5 *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1), 62-69 (1968)). Para ello se emplea una solución de EtOH:H₂O-
 ADN:NH₄OH (59:18:19,4 μ L), correspondiente a una concentración molar de EtOH es 9,91M,
 la de NH₄OH es 2,02M y la de dH₂O es de 9,77M y/o en la etapa (ii) la concentración molar
 de TEOS es 0,25M, en un eppendorf cerrado a la que se le añadió 5,6 μ L de TEOS, que se
 10 agitó vigorosamente en vórtex a 150-200 rpm a temperatura ambiente a unos 22°C durante 2
 horas, obteniendo una suspensión turbia blanca. El TEOS se debe añadir rápido a la reacción
 para evitar la evaporación del NH₄OH (reacción cerrada).

Las esferas monodispersas se lavaron con etanol mediante 3 ciclos de
 redispersión/centrifugación (entre 5000 y 6500 rpm durante 3 a 10 minutos, preferiblemente a
 15 6500 rpm durante 3 min o bien a 5000 rpm durante 10 min), y finalmente se volvieron a
 dispersar en 100 μ L de EtOH. La concentración de disolución de partículas fue de 0,0174
 g/mL aproximadamente. Las nanopartículas de sílice (NPs) se examinaron mediante
 microscopía electrónica obteniéndose esferas de sílice de aproximadamente de entre 300 y
 500 nm de diámetro.

20

Los inventores utilizaron como AANN para su encapsulación en las NPs de sílice, ADN
 codificante para una proteína reportera, particularmente para proteínas fluorescentes.

Los inventores sintetizaron la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* o GFP en inglés), dirigida al núcleo mediante su unión a una secuencia de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequence* o NLS en inglés), dando lugar al ADN recombinante GFP:NLS.

5

Además, los inventores también utilizaron ADN recombinantes que expresaban la proteína recombinante H2B:YFP y la proteína H2B:mCherry con diferentes molaridades testadas de los elementos precursores de las partículas de sílice de la invención, en donde el tiempo de reacción y la temperatura no se modifican en este tipo de reacción, solo se modifica el ratio NH₄OH:H₂O:TEOS para cambiar los diferentes tamaños (Tabla 2). Estos cambios no son

10

proporcionales, es decir, el hecho de que se aumenta la concentración de uno de ellos, no quiere decir que vaya a aumentar el tamaño de las partículas.

	Muestra con H2B:YFP	Muestra con H2B:YFP	Muestra con H2B:mCherry	Muestra con H2B:YFP
H ₂ O [M]	17.4	3.32	5.4	4.71
NH ₄ OH (NH ₃ acuoso) [M]	0.34	1.06	0.35	1.06
TEOS [M]	0.25	0.25	0.25	0.25
Plásmido	H2B:YFP	H2B:YFP	H2B:mCherry	H2B:YFP
[ADN] final [pmol]	2.1	1.7	7	13.7
Volumen total de la síntesis (μL)	100	100	100	1000
Tamaño (nm)	200	500-700 (polidispersas)	284	300-500 (polidispersas)

Tabla 2. Diferentes muestras sintetizadas. Notas: el ADN estaba disuelto en H₂O; y el EtOH se completa hasta el volumen final deseado.

15

1.2. Obtención de partículas de sílice funcionalizadas en la superficie

Los inventores usaron una proteína recombinante, 10xHis:GFP:RVG-330-337 como ligando para recubrir la superficie estas partículas y dirigir las partículas a las neuronas, mediante el péptido de unión a los receptores neuronales RVG-330-337.

20

El ADN recombinante encapsulado que contenía el inserto codificante para las proteínas

verde fluorescente GFP con una secuencia de localización nuclear (GFP:NLS), fue amplificado en bacterias recombinantes. Tras la lisis bacteriana, se purificó el ADN usando una columna comercial de purificación de ADN. Este se eluyó de la columna en agua destilada. Se calculó su concentración siguiendo métodos estándar de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260). El ADN se resuspendió finalmente a una concentración de 2,5 µg/µL en agua.

Dicha proteína recombinante fue purificada mediante técnicas de purificación por afinidad empleando columnas de nmicale siguiendo el protocolo estándar de Padín-González, et al., sobreexpresándose durante 112-16 horas (O/N).

1.3. Caracterización de las nanopartículas de sílice

Las muestras obtenidas de la síntesis de nanopartículas se depositaron (diluidas en etanol) sobre rejillas de cobre recubiertas con carbono para observarlas al microscopio electrónico de transmisión (TEM). También se utilizó microscopía de fluorescencia para observar las células, a través de un microscopio de epifluorescencia.

Para evaluar la capacidad de las partículas de sílice como vectores de agentes biológicos, como los ácidos nucleicos, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de disolución de las mismas en PBS 1X y HBSS. Se incubaron las partículas obtenidas diluidas en PBS 1X y HBSS a 37°C durante 72 h a distintos tiempos (4, 24, 48 y 72 horas) mediante centrifugación de las nanopartículas y posterior visualización en el TEM.

1.4. Transferencia genética de las partículas en cultivos celulares

Para evaluar la capacidad de transferencia genética de las NPs, se incubaron las partículas de sílice con el ADN recombinante encapsulado (GFP:NLS, H2B:YFP y H2B:mCherry) sobre con células HeLa (células cancerosas humanas de cérvix) y/o células neuronales NSC34 ambas crecidas en medio MEM (Biowhittaker™) con 10% FBS (suero fetal bovino) en condiciones estándar.

Estas líneas celulares se plaquearon 50.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos) a una densidad del 60% y se incubaron durante 8 h para permitir la adherencia. Después, se añadieron las partículas de sílice que contenían el ADN recombinante a una concentración de 0,348 µg/µL en el medio de cultivo. Posteriormente, se centrifugaron las placas de cultivo

(4000 g, 6 min) para forzar la entrada de las partículas de sílice con el ADN encapsulado al citoplasma celular. En el caso de la línea neuronal NSC34 cuando las partículas añadidas estaban recubiertas de ligando 10xHis:GFP:RVG-330-337, no fue necesario centrifugar porque las partículas entran por un mecanismo mediado por receptor direccionadas a las neuronas.

Se incubaron durante 16 h, posteriormente se lavaron con HBSS y se añadió medio fresco. Esto se realizó de nuevo a las 24 y 36 h. Estos lavados se ejecutaron para disminuir la cantidad de silicio en el medio de cultivo y favorecer la disolución de las partículas en menos tiempo.

Una vez alcanzado el nivel de expresión deseado, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído y se tiñeron con Hoescht 33258, ambos procedentes de Sigma Aldrich. Los inventores comprobaron mediante microscopía de fluorescencia, la presencia de núcleos fluorescentes que demostraron la correcta expresión génica a nivel de proteína a partir del ADN encapsulado en las NPs. Las imágenes de microscopía confocal se tomaron con un microscopio Nikon A1R.

Además, los inventores encapsularon en las nanopartículas el ADN recombinante H2B:mCherry que a su vez fueron recubiertas con la proteína de direccionamiento 10xHis:GFP:RVG-330-337 y se añadieron a un cocultivo de HeLa y neuronas NSC34, incubadas previamente en una matriz de celulosa en una placa de 6 pocillos.

1.5. Ensayos con ADNsa

Para comprobar la encapsulación de los ácidos nucleicos en el interior de las partículas de sílice, los inventores llevaron a cabo ensayos con ADNsa. Para ello, sometieron partículas de sílice que contenían ADN recombinante codificante para H2B:GFP con 5,4 μ L de ADNsa, 5 μ L PBS y 1 μ L ADN (2 μ g) durante 1h 20 min. Posteriormente, los inventores incubaron células de tipo HeLa con las partículas tras su tratamiento con ADNsa, con partículas sin tratamiento (control negativo) y con partículas control (sin tratar con ADNsa) siguiendo el protocolo descrito la sección anterior 1.3. Los resultados de la expresión génica se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia.

Además, como control del funcionamiento de la ADNsa empleada, los inventores trataron el mismo ADN recombinante sin encapsular con ADNsa siguiendo el mismo procedimiento. Parala visualización del resultado de los AANN se realizó una electroforesis en gel de agarosa

al 1% con bromuro de etidio, a un voltaje de 100 voltios durante 20 minutos. Se añadieron en diferentes pocillos las siguientes muestras: 10 μ L de un marcador, ADN recombinante no encapsulado (2 μ g) y ADN recombinante no encapsulado (2 μ g) incubado con ADNsa; y el ADN extraído mediante disolución de las partículas, sin tratar y tratadas con ADNasa. En
5 ambos casos se detecta una banda casi idéntica de ADN. Esto indica que las partículas tratadas son ADNsa protegen los AANN encapsulados en su interior

2. RESULTADOS

10 **2.1. Caracterización de las nanopartículas y disolución de la sílice**

Mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM), se determinó que la estructura de estas es esférica y monodispersas, como se observa en la Figura 1.

15 Las partículas diluidas en PBS1X y HBSS fueron incubadas durante distintos tiempos (4, 24, 48 y 72 horas). Mediante visualización en el TEM (Figura 2), se observa cómo a lo largo del tiempo las partículas de sílice se empiezan a disolver en medios celulares. La comparación de la morfología de las partículas en los diferentes tiempos, mostró una progresiva
20 disminución y pérdida de forma esférica (Figura 2) lo que demostró que las partículas de sílice no solo son capaces de penetrar en las células, sino que se disuelven en condiciones químicas fisiológicas similares a las del citoplasma celular liberando localmente los ácidos nucleicos introducidos en la mezcla.

Además mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM), se determinó la estructura
25 de las partículas de sílice con diferentes molaridades testadas de los elementos precursores y los plásmidos, tal como se muestra en la figura 10, A)H2B:YFP, B) H2B:YFP, C) H2B:mCherry y D) H2B-YFP.

2.2 Transferencia genética en células HeLa con GFP:NLS, H2B:YFP y H2B:mCherry

30 Para evaluar la capacidad de transferencia genética de las nanopartículas, se plaquearon células HeLa con las NP que contenían el ADN recombinante con el inserto GFP:NLS. A las 36/48h se comprobó mediante microscopía de fluorescencia la presencia de núcleos fluorescentes que demostraron la correcta expresión génica a nivel de proteína a partir del
35 ADN encapsulado en las NP (Figura 3).

Se comprobó mediante microscopía de fluorescencia la presencia de núcleos fluorescentes de células HeLa incubadas con las NPs con H2B:mCherry y con H2B:YFP, demostrando la correcta expresión génica a nivel de proteína a partir del ADN encapsulado en las NP después de 72 h. En la Figura 4 se observa núcleos teñidos de Hoescht, núcleos expresan el gen de la proteína H2B:YFP (figura A, flechas), núcleos que expresan el gen de la proteína de la H2B:mCherry (figura B, flechas).

2.3. Estabilidad de las nanopartículas a lo largo del tiempo

Las nanopartículas de sílice con el ADN encapsulado se almacenaron durante 1 mes a temperatura ambiente en etanol. A continuación, se añadieron a células HeLa como anteriormente descrito, para comprobar la efectividad de la expresión génica (Figura 5). Se puede observar, a través de imágenes de microscopía de fluorescencia, la expresión génica después de un mes de que las nanopartículas fueran sintetizadas. Las nanopartículas siguen siendo estables en etanol a temperatura ambiente, como se puede observar en la imagen de TEM de la Figura 5.

2.4. Transferencia genética en células neuronales NSC34 con partículas funcionalizadas con la proteína recombinante ligando 10xHis:GFP:RVG-330-337

La proteína recombinante fue purificada mediante técnicas de purificación por afinidad empleando columnas de nmicale (Figura 6a), sobreexpresándose durante 112-16 horas (O/N). Tal como se muestra en la Figura 6b, mediante microscopía de fluorescencia combinada (canal 10 His-GFP + campo claro) de las NSC34 incubadas con las nanopartículas funcionalizadas con el ligando neuronal (10xHis:GFP:RVG-330-337@SiO2NP) después de 24 h, se observa la expresión del péptido RVG-330-337 en las NSC34.

En la Figura 7, se puede observar la expresión de la proteína H2B:mCherry (flecha) en el núcleo de neuronas, mostrando la capacidad de encapsular en estas nanopartículas de sílice y de dirigirse con este ligando específicamente a neuronas para, por ejemplo realizar terapia dirigida, manteniendo la expresión génica.

2.5. Encapsulación del ADN en el interior de las partículas de sílice

Para evaluar la encapsulación de los ácidos nucleicos en el interior de las partículas de sílice los inventores llevaron a cabo ensayos con ADNsa.

En la Figura 8 se muestra mediante microscopia de fluorescencia, la expresión de la proteína H2B:GFP, tanto en las células transfectadas con partículas de sílice sin tratamiento con ADNsa (Figura 8a) como en las células transfectadas con partículas tratadas con ADNsa (Figura 8b).

En la figura 9 se demuestra la efectividad de la ADNsa empleada en el ensayo. El ADN recombinante H2B:GFP tratado con ADNsa se degrada correctamente, tal como se observa en el tercer pocillo del gel (2 µg ADN + ADNsa), al contrario que el mismo ADN recombinante sin tratar con ADNsa, como se observa en el segundo pocillo (2 µg ADN) donde aparece la banda correspondiente al peso molecular del ADN recombinante H2B:GFP. En las siguientes calles se observa que el ADN extraído de partículas no tratadas y tratadas con ADNasa es similar, lo que confirma que el ADN está protegido por la partícula.

Con este ensayo, los inventores demostraron que los ácidos nucleicos están encapsulados en el interior de las partículas de sílice de la invención quedando protegidos (por ejemplo, de enzimas que degradan los AANN como las ADNsa), y que sólo se liberan cuando dichas partículas se disuelven en el interior celular. Esto demuestra su efectividad en la transferencia genética, permitiendo su uso en marcaje celular o su uso terapéutico, por ejemplo, en terapia de reemplazo proteico/enzimático o en la administración de vacunas.

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de sílice caracterizada porque comprende al menos un ácido nucleico encapsulado en el interior de dicha partícula.
5
2. La partícula según la reivindicación 1 donde el ácido nucleico es ADN y/o ARN.
3. La partícula según la reivindicación 2 donde el ácido nucleico se selecciona de la lista que consiste en: ADN lineal bicatenario (ADNbc), ARN mensajero (ARNm),
10 ADN plasmídico (ADNp), ARN de interferencia (ARNi), ARN en horquilla (ARNh), microARN (miARN), ARNguía (ARNg) y ADN superenrollado.
4. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la partícula tiene un tamaño entre 1 y 2000nm de diámetro, preferiblemente entre 1 y 1000 nm
15 de diámetro.
5. La partícula según la reivindicación 4 en donde la partícula tiene un tamaño entre 200 y 500 nm de diámetro.
- 20 6. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el ácido nucleico encapsulado codifica para al menos un marcador celular.
7. La partícula según la reivindicación 6 en donde el marcador celular es un marcador fluorescente, preferiblemente una proteína fluorescente.
25
8. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el ácido nucleico codifica para una proteína o fragmento de proteína vírica, bacteriana o parasitaria.
- 30 9. La partícula según la reivindicación 8 en donde el ácido nucleico codifica para una proteína o fragmento de proteína vírica del SARS-CoV-2.
10. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el ácido nucleico codifica para al menos una proteína supresora de tumores o reparadora del
35 daño celular.

11. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende un sistema de edición genética, en donde el sistema de edición genética comprende un ácido nucleico y una nucleasa.
- 5 12. La partícula según la reivindicación 11 en donde el sistema de edición genética es el sistema CRISPR, preferiblemente el sistema CRISPR-Cas9.
13. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que además comprende nanopartículas magnéticas.
- 10 14. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que además comprende al menos un ligando de direccionamiento, un recubrimiento proteico y/o un marcador celular en su superficie.
- 15 15. Una composición que comprende la partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. La composición según la reivindicación 15 donde la composición es una composición farmacéutica.
- 20 17. La composición según la reivindicación 16 que además comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
18. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17 donde la
- 25 composición es una vacuna.
19. Un método para la producción de la partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende las siguientes etapas:
- 30 (i) disolver etanol (EtOH) en una concentración molar de entre 8 y 12 mol/L (M), hidróxido de amonio (NH₄OH) en una concentración molar de entre 0,1 y 3,5 M y una disolución de ácidos nucleicos (AANN) en una concentración de entre 0,01 y 0,50 µg/µL;
- (ii) añadir a la disolución obtenida en (i) tetra-etil-ortosilicato (TEOS) en una concentración molar de entre 0,10 y 0,40M; y
- 35 (iii) agitar la solución obtenida en (ii) entre 100 y 1000rpm durante 1 a 3 horas a una temperatura entre 5 y 40 °C obteniendo una suspensión coloidal de

partículas de sílice que comprenden los ácidos nucleicos encapsulados en su interior.

20. El método según la reivindicación 19 en donde el disolvente de la disolución de ácidos nucleicos de la etapa (i) es agua desionizada (dH₂O) entre 2 y 18M, agua MiliQ, buffer Tris EDTA (TE) al 16%v/v o etanol, preferiblemente dH₂O o agua MiliQ.
21. El método según la reivindicación 19 o 20 en donde la concentración de la disolución de ácidos nucleicos de la etapa (i) es entre 0,15 y 0,35 µg/µL, preferiblemente 0,225 µg/µL.
22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 en donde en la etapa (i) la concentración molar de EtOH es entre 9,7M y 10M, la de NH₄OH es 0,34 o 1.06 o 2,02M y la de dH₂O es de 9,77M y/o en la etapa (ii) la concentración molar de TEOS es 0,25M.
23. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 que además comprende una etapa (iv) en donde se lavan las partículas obtenidas en la etapa (iii) con etanol durante 1 a 5 ciclos en donde cada ciclo comprende (i) centrifugación entre 3500rpm a 8000rpm durante 1 a 15 minutos y (ii) redispersión con etanol y agitación durante 20 a 80 segundos entre 100 a 300rpm.
24. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 en donde la etapa (iii) se realiza durante 2 horas.
25. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24 en donde la etapa (iii) se realiza a entre 15°C y 30°C, preferiblemente a 22°C.
26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25 que además comprende una etapa (v) en donde se funcionaliza la superficie de la partícula de sílice con al menos un grupo funcional que se selecciona de la lista que consiste en: péptidos, proteínas o fragmentos de proteínas, nucleótidos, enzimas, anticuerpos, nanoanticuerpos dendrímeros, moléculas dirigidas a receptores y aptámeros.
27. Uso *in vitro* de la partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o de

la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en transferencia genética.

- 5 28. Uso *in vitro* de la partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 o de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en edición genética.
- 10 29. Uso *in vitro* de la partícula según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 o 14 para marcaje celular.
30. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 para su uso como medicamento.
- 15 31. La partícula o la composición para su uso según la reivindicación 30 en donde el medicamento es una vacuna.
- 20 32. La partícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 para su uso como medicamento de terapia de reemplazo proteico/enzimático.
33. Uso de la partícula según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 o 14 como agente de contraste para la observación de células.

1/6

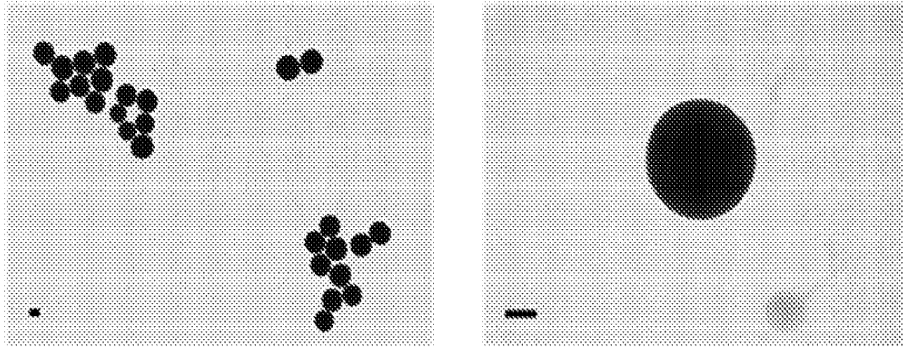
DIBUJOS

Fig. 1

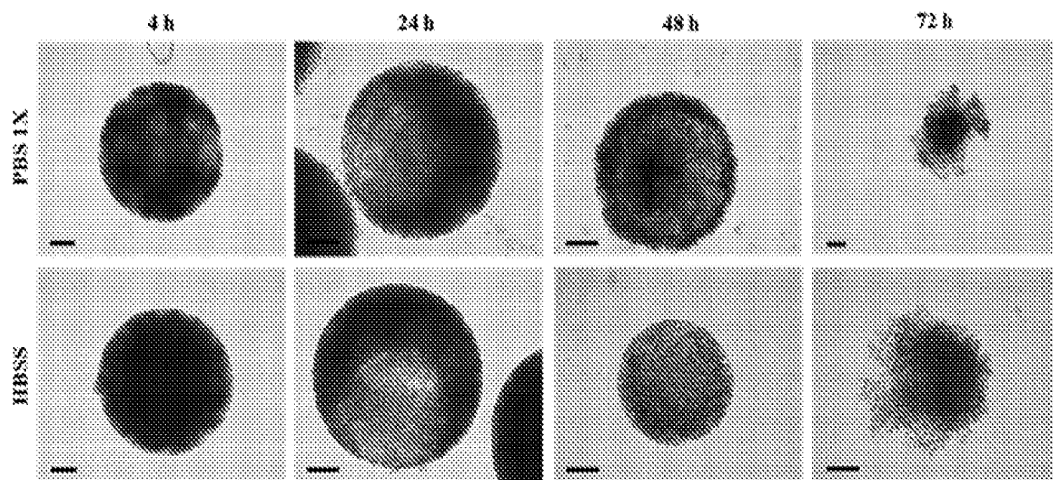


Fig. 2

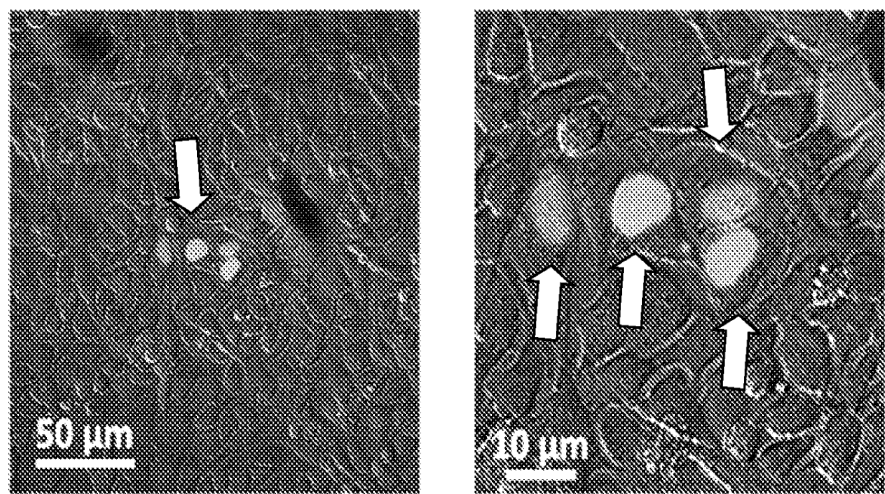


Fig. 3

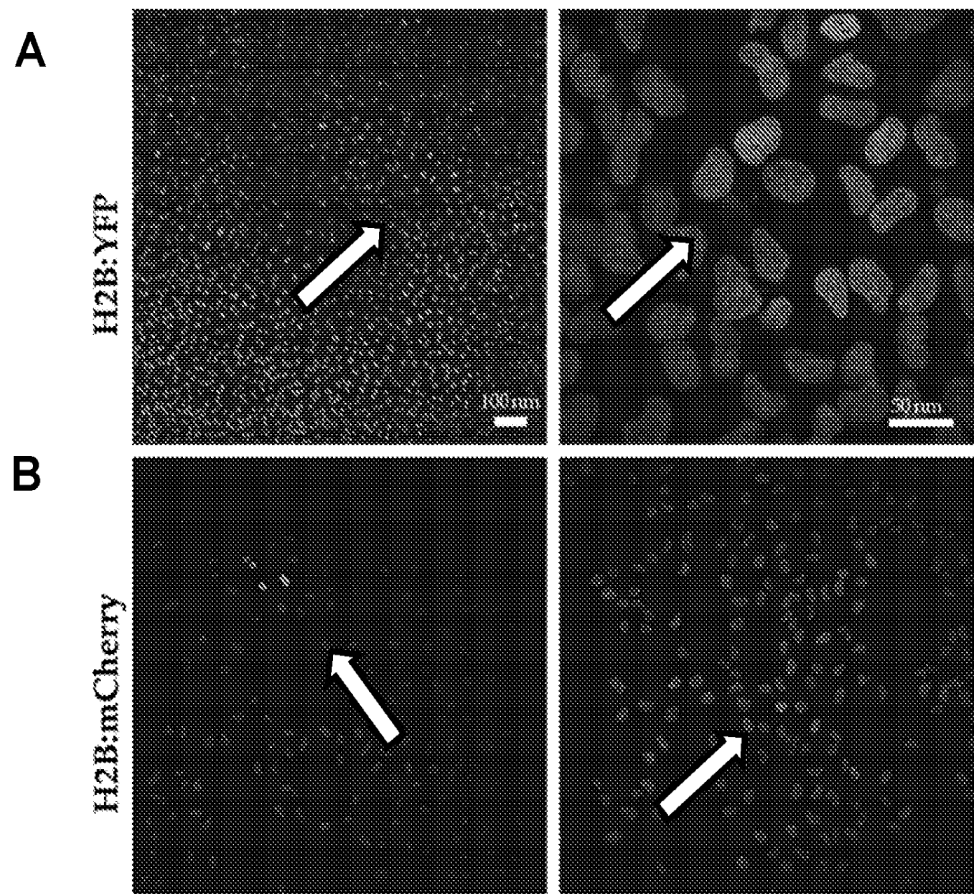


Fig. 4

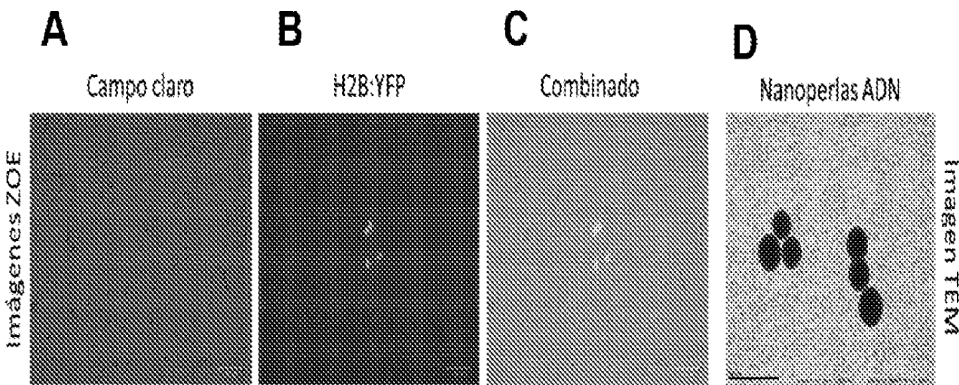


Fig. 5

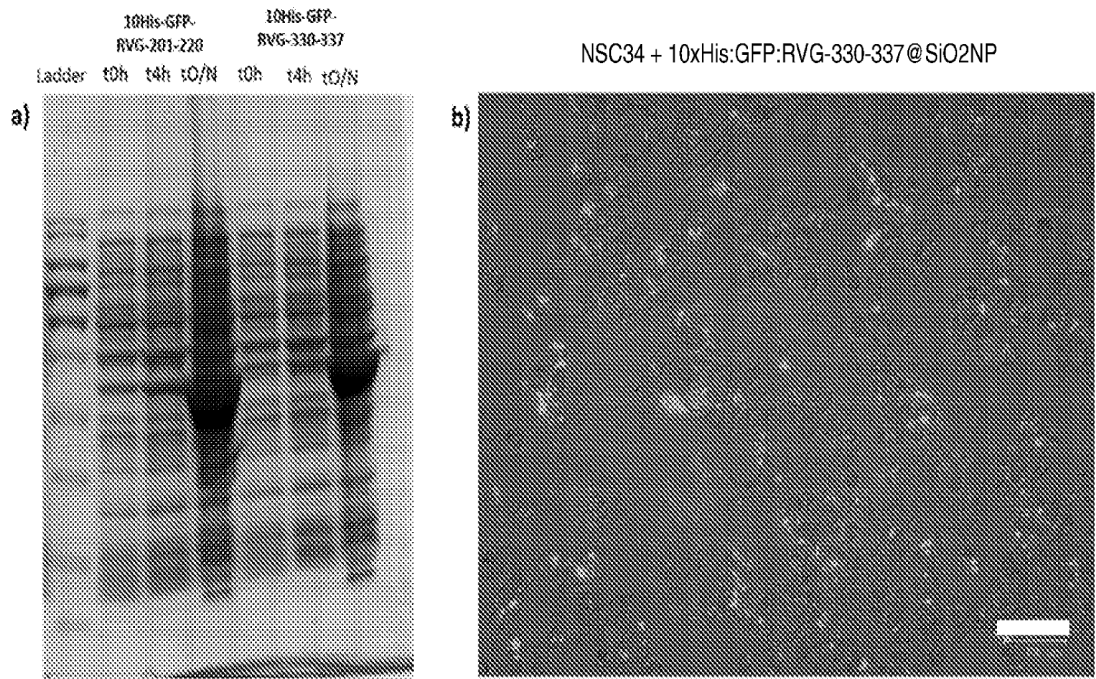


Fig. 6

4/6

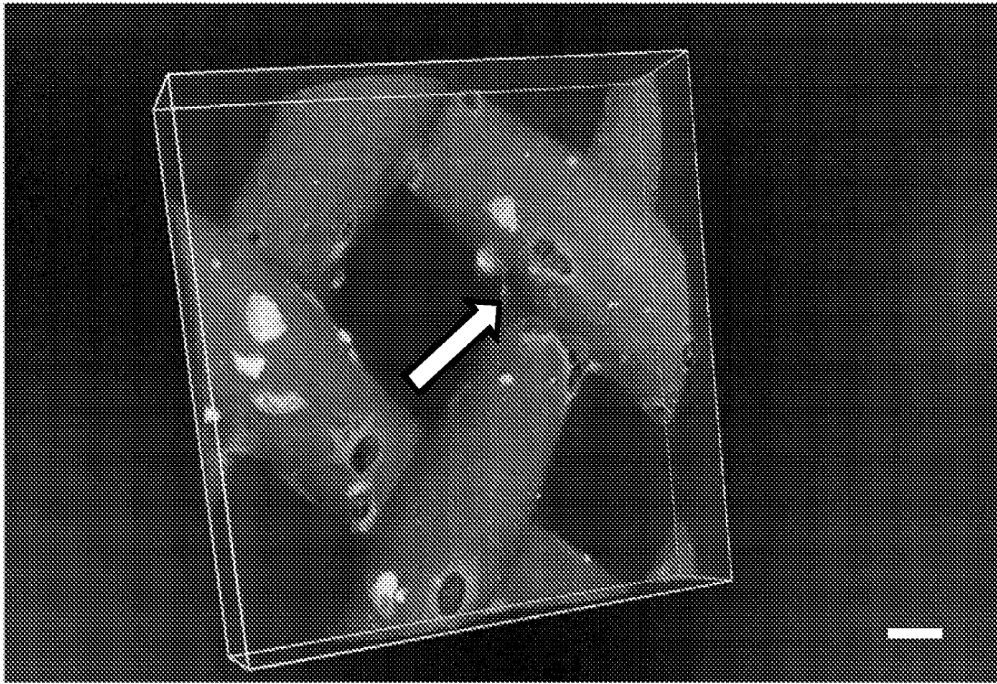


Fig. 7

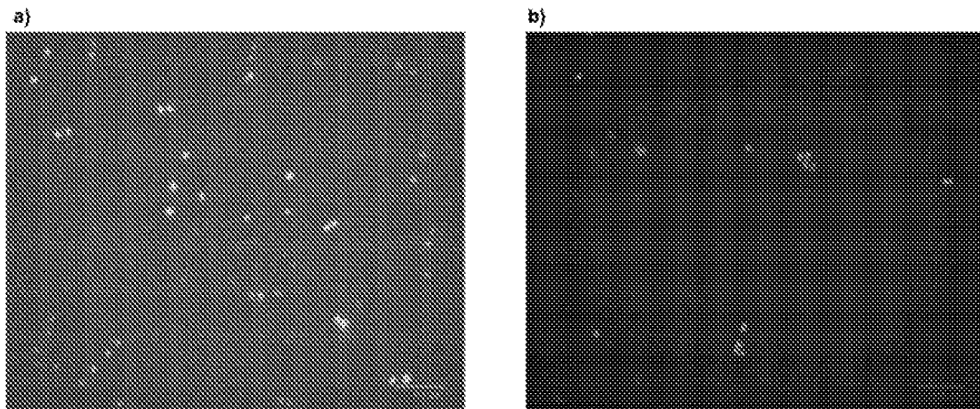


Fig. 8

5/6

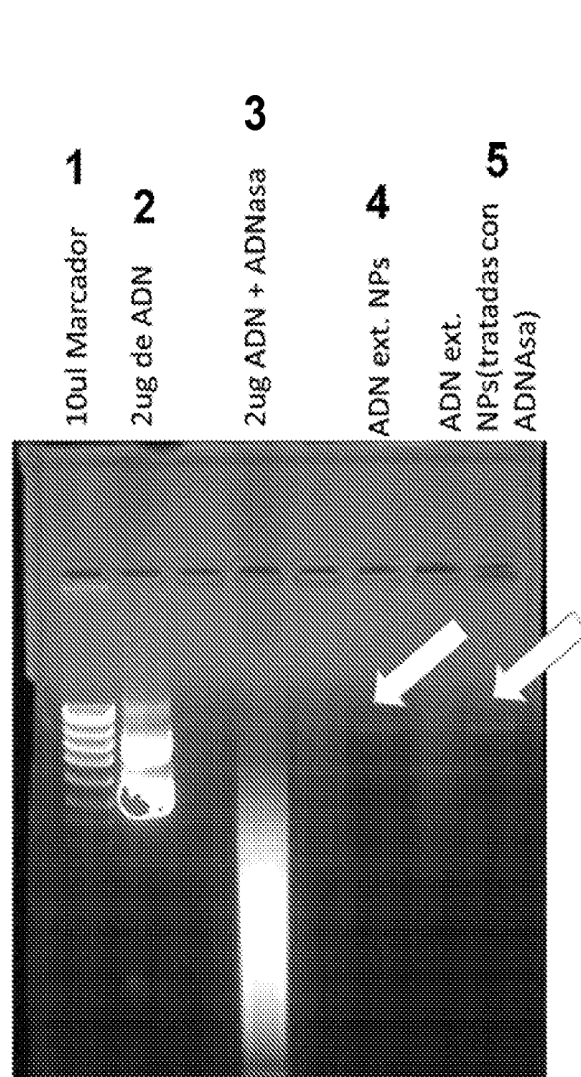


Fig. 9

6/6

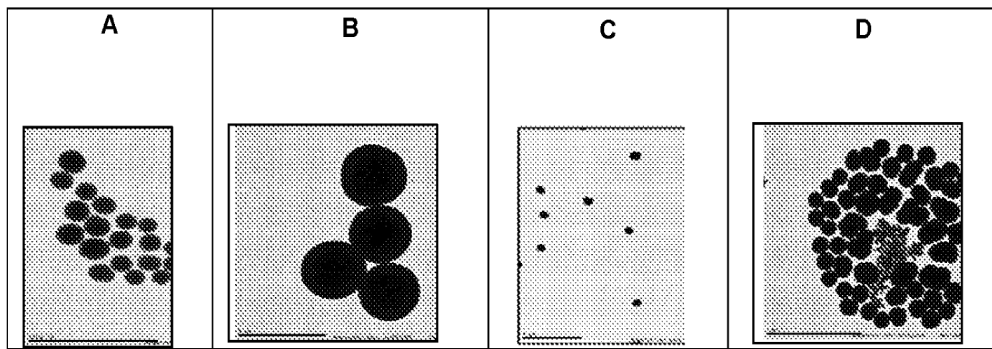


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2022/070528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, B82Y

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG Y <i>et al.</i> DNA-Encapsulated silica nanoparticle tracers for fracture characterization. Transactions - Geothermal Resources Council - Geothermal Resources Council Annual Meeting, Grc 2015 - Geothermal: Always On 2015 Geothermal Resources Council Usa., 30/11/2014, Vol. 39, pages 967 - 974, ISSN 0193-5933 (print) ISBN 978-1-5108-1724-1 (electronic) chapter 2, page 5, first, third and last paragraph; chapter 2, page 6, third paragraph; chapter 2, page 7, fourth paragraph; chapter 2, page 11, last paragraph; chapter 2, page 12, first, second and last paragraph; figure 2-1; Table 2-1.	1-18, 27-33
A		19-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11/11/2022

Date of mailing of the international search report
(14/11/2022)

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer
S. González Peñalba

Telephone No. 91 3493025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2022/070528

C (continuation).			DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	PAUNESCU D <i>et al.</i> Reversible DNA encapsulation in silica to produce ROS-resistant and heat-resistant synthetic DNA 'fossils'. Nature Protocols 2013 Nature Publishing Group Gbr., 30/11/2012, Vol. 8, N° 12, pages 2440 - 2448, ISSN 1754-2189 (print) ISSN 1750-2799 (electronic), <DOI: 10.1038/nprot.2013.154> page 2441, right column, third paragraph; page 2442, left column; page 2447, left column, first paragraph; abstract.	1-18, 27-33	
A		19-26	
X	PARIS JUAN L <i>et al.</i> Mesoporous Silica Nanoparticles for Co-Delivery of Drugs and Nucleic Acids in Oncology: A Review. Pharmaceutics Jun 2020., 31/05/2020, Vol. 12, N° 6, pages Article No.: 526, ISSN 1999-4923(electronic), <DOI: 10.3390/pharmaceutics12060526> page 2, último paragraph; page 6, last paragraph; page 7; figures 2 and 3.	1-18, 27-33	
A		19-26	
A	KANJIRO MIYATA <i>et al.</i> Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. page 4765, left column, first and third paragraphs; page 4766, left column, first paragraph; page 4766, left column, fifth paragraph; page 4466, right column, second paragraph; figure 1.	1-33	
A	US 2016067191 A1 (ORTAC INANC <i>et al.</i>) 10/03/2016, paragraphs [0005], [0006], [0008], [0031], [0053].	1-33	
A	WERNER STÓBER <i>et al.</i> Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. the whole document.	1-33	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2022/070528

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2016067191 A1	10.03.2016	US2021093580 A1	01.04.2021
		ES2805802T T3	15.02.2021
		EP3718539 A1	07.10.2020
		US2019151253 A1	23.05.2019
		US10869841 B2	22.12.2020
		JP2016520567 A	14.07.2016
		JP6525959B B2	05.06.2019
		WO2014172685 A1	23.10.2014
		EP2986282 A1	24.02.2016
		EP2986282 A4	11.01.2017
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2022/070528

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K48/00 (2006.01)

A61K9/50 (2006.01)

A61K9/51 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2022/070528

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, B82Y

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

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ZHANG Y <i>et al.</i> DNA-Encapsulated silica nanoparticle tracers for fracture characterization. Transactions - Geothermal Resources Council - Geothermal Resources Council Annual Meeting, Grc 2015 - Geothermal: Always On 2015 Geothermal Resources Council Usa., 30/11/2014, Vol. 39, páginas 967 - 974, ISSN 0193-5933 (print) ISBN 978-1-5108-1724-1 (electronic) capítulo 2, página 5, primer, tercer y último párrafo; capítulo 2, página 6, tercer párrafo; capítulo 2, página 7, cuarto párrafo; capítulo 2, página 11, último párrafo; capítulo 2, página 12, primer, segundo y último párrafo; Figura 2-1; Tabla 2-1.	1-18, 27-33
A		19-26

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

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
11/11/2022

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
14 de noviembre de 2022 (14/11/2022)

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

Funcionario autorizado
S. González Peñalba
Nº de teléfono 91 3493025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2022/070528

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ La reivindicación n°: 33
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
La reivindicación 33 se refiere a una materia que esta Administración considera que está afectada por las disposiciones de la Regla 67. 1 (iv) PCT, relativas a un método de diagnóstico aplicado al cuerpo humano o animal. A pesar de ello, se ha efectuado una búsqueda para esta reivindicación basada en los efectos atribuidos al compuesto.
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2022/070528

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	PAUNESCU D <i>et al.</i> Reversible DNA encapsulation in silica to produce ROS-resistant and heat-resistant synthetic DNA 'fossils'. Nature Protocols 2013 Nature Publishing Group Gbr., 30/11/2012, Vol. 8, Nº 12, páginas 2440 - 2448, ISSN 1754-2189 (print) ISSN 1750-2799 (electronic), <DOI: 10.1038/nprot.2013.154> página 2441, columna derecha, tercer párrafo; página 2442, columna izquierda; página 2447, columna izquierda, primer párrafo; resumen.	1-18, 27-33
A		19-26
X	PARIS JUAN L <i>et al.</i> Mesoporous Silica Nanoparticles for Co-Delivery of Drugs and Nucleic Acids in Oncology: A Review. Pharmaceutics Jun 2020., 31/05/2020, Vol. 12, Nº 6, páginas Article No.: 526, ISSN 1999-4923(electronic), <DOI: 10.3390/pharmaceutics12060526> página 2, último párrafo; página 6, último párrafo; página 7; figuras 2 y 3.	1-18, 27-33
A		19-26
A	KANJIRO MIYATA <i>et al.</i> Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. página 4765, columna izquierda, primer y tercer párrafos; página 4766, columna izquierda, primer párrafo; página 4766, columna izquierda, quinto párrafo; página 4466, columna derecha, segundo párrafo; figura 1.	1-33
A	US 2016067191 A1 (ORTAC INANC <i>et al.</i>) 10/03/2016, párrafos [0005], [0006], [0008], [0031], [0053].	1-33
A	WERNER STÓBER <i>et al.</i> Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. Todo el documento.	1-33

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2022/070528

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2016067191 A1	10.03.2016	US2021093580 A1	01.04.2021
		ES2805802T T3	15.02.2021
		EP3718539 A1	07.10.2020
		US2019151253 A1	23.05.2019
		US10869841 B2	22.12.2020
		JP2016520567 A	14.07.2016
		JP6525959B B2	05.06.2019
		WO2014172685 A1	23.10.2014
		EP2986282 A1	24.02.2016
		EP2986282 A4	11.01.2017
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K48/00 (2006.01)
A61K9/50 (2006.01)
A61K9/51 (2006.01)
B82Y5/00 (2011.01)