**RESUMEN PATENTE**

U.S. Patent No. 7,514,530

Peptide carrier for delivering siRNA into mammalian cells

Portador peptídico para administrar siRNA a células de mamíferos

Resumen patente 15/03/24-19/03/24

**Campo de la invención:**

Métodos y composiciones para administrar siRNA en células de mamíferos, pudiendo dichas composiciones tratar enfermedades humanas y animales. La presente invención se refiere también a un vehículo peptídico específico (o vector peptídico de transfección).

**Péptidos MPG**: forma complejos no covalentes estables con ácidos nucleicos y promueve su administración en un gran panel de líneas celulares

MPG: es un péptido anfipático bipartito

Características:

1)Muestra una alta afinidad por los oligonucleótidos (ADN) monocatenarios y bicatenarios y es capaz de administrarlos a células de mamíferos en <1 h, independientemente de la vía del endosoma.

2) Afinidad por los oligonucleótidos monocatenarios era al menos 2 veces mayor que por los oligonucleótidos bicatenarios.

3) Alta afinidad por los ácidos nucleicos y los protege de la degradación, puede generalizarse a la administración eficaz de vectores de expresión de plásmidos y ADNc anti sentido de longitud completa.

4) Protege contra las nucleasas

5) Se ha observado un rápido autoensamblaje entre el MPG y el ADN, que implica interacciones electrostáticas, como ya se propuso para los péptidos catiónicos, y luego promueve nuevas interacciones péptido-péptido, lo que conduce a la formación de una "jaula" protectora alrededor de la molécula de ADN.

6) Puede usarse para la administración de ARN a células y, más específicamente, para la administración a células de grandes fragmentos de ARNm.

7) La secuencia de localización nuclear (NLS) de MPG es necesaria tanto para las interacciones electrostáticas con el ADN como para la focalización nuclear, y que las partículas de MPG/ADN interactúan con la maquinaria de importación nuclear.

8) Se ha demostrado inesperadamente que dicho péptido MPG y una variante caracterizada por una mutación en NLS pueden administrar siRNA a células de mamíferos.

**Aspectos:**

Complejo que comprende un portador peptídico- y un siRNA apropiado

Dicho complejo, dicho portador peptídico y dicho siRNA están preferentemente en una proporción de 1:1 a 20:1 (relación molar), preferentemente en una proporción de 10:1(carga).

1. SEQ ID NO:1 GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKR1KRKVR2

* En el que R1 representa cualquier residuo de aminoácido y más preferiblemente K o S
* R2 es nulo o representa uno de los siguientes grupos: cisteamida, cisteína, tiol, amida, lineal o ramificado alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido, amina primaria o secundaria, derivado osídico, lípido, fosfolípido o colesterol y dicho siRNA es seleccionado para silenciar un ARNm objetivo.

Resultado: Pueden administrar siRNA en células cultivadas con alta eficiencia, en todos los casos, el siRNA seleccionado, combinado con dicho péptido portador, penetra en la célula (internalización) y conserva sus propiedades biológicas.

1. En el caso en el que R1 = K, el portador peptídico es MPG (SEQ ID NO:2)

Resultado: puede usarse para administrar tanto ADN como ARN de pequeño tamaño en el citoplasma de la célula diana, con alta eficacia.

1. En el caso en que R1 = S, el portador peptídico es MPG ΔNLS (SEQ ID NO:3)
2. Un kit de transfección que comprende al menos tampones apropiados, controles positivos y negativos y al menos un complejo tal como se define anteriormente, estando dicho complejo en solución o liofilizado.
3. Método para prevenir o tratar una enfermedad de un mamífero, en el que al menos un síntoma de la enfermedad está mediado al menos en parte por la presencia de ARNm anormal en el mamífero a tratar.
4. Método para administrar un siRNA a una célula diana, comprendiendo dicho método:

Resultado: proporcionar un complejo según la invención y poner en contacto una célula diana con dicho complejo.

Resultado: Administrar al mamífero una cantidad de un complejo como se define anteriormente suficiente para silenciar dicho ARNm anormal para prevenir o tratar de ese modo la enfermedad correspondiente.

**Importante a destacar:**

* La administración de siRNA tanto por MPG como por su mutante NLS permite una regulación negativa sólida del ARNm objetivo. Sin embargo, el mutante NLS induce una liberación rápida del siRNA en el citoplasma, y ​​esto se correlaciona con una respuesta biológica más significativa.
* Los complejos y composiciones tienen aplicaciones como:
  + En terapia genética humana y animal, en particular en enfermedades hereditarias
  + como agentes antivirales
  + como agentes anticancerígenos
  + como inhibidores en condiciones donde hay una sobreexpresión de una sustancia biológica, que conduce a un estado patológico.

**Ejemplos-Metodología-Resultados**

1. **Síntesis y análisis de péptidos.**

**Diagrama

Descripción generada automáticamente**

Entrega de genes mediada por MPG en presencia de inhibidores de la vía endosómica.

Los complejos A/MPG/ADN formados con una relación de carga de 5/1 con 100 ng de plásmido pRL-SV40 que codifica el gen indicador luciferasa(utiliza la enzima luciferasa y un sustrato para estudiar la regulación génica a nivel de transcripción) se superpusieron a fibroblastos humanos (Hs68) en presencia de bafilomicina A (Baf-A: 150 nM). , citocalasina B (Cy-B: 50 μg/ml) o cloroquina (Chl: 100 μM).

**Parte A**

Luego de 48h se midió la actividad luciferasa

Proteína total(negro).

Sistema de administración basado en lípidos, Lipofectamine™, como control (blanco).

En ausencia de inhibidores utilizando un péptido MPG que carecía de un grupo cisteamida C-terminal (gris)

**Parte B**

Luego se superpusieron los complejos sobre células Hela cultivadas en presencia de bafilomicina A (panel central) o citocalasina B (panel inferior) y se controló la localización celular del oligonucleótido mediante microscopía de fluorescencia en Células vivas1 hora después de la transfección. En el panel superior se muestra un experimento de control con oligonucleótido libre.

**Metodología**

Péptidos se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida, utilizando resina de expansina AEDI con un sintetizador Pep 9050, según el método Fmoc/tBoc y se purificaron como se describió anteriormente, MPG y MPG ΔNLS se acetilaron en su extremo N y se sintetizaron con un grupo cisteamida en su extremo C.

Texto, Carta

Descripción generada automáticamente

1. **siRNA mediado por MPG dirigido a la entrega de luciferasa**

**Diagrama

Descripción generada automáticamente**

El NLS de MPG es esencial para la translocación nuclear: A/GST-importina α y β purificadas se acoplaron a resina GST Sepharose y se incubaron en lotes con MPG/ADN o complejos MPG ΔNLS /ADN durante 1 hora, se lavaron exhaustivamente y se incubaron con 50 Glutatión nM para eluir los complejos.

**Parte A**

Luego se extrajo el ADN y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%). Carril 1: ADN de control; carril 2: el plásmido libre no se asocia con importina α; carril 3: unión de MPG/ADN a importina α; carril 4: unión de MPG/ADN a importina β; carril 5: MPG/ADN no se asocia con importina β

**Parte B**

Entrega del plásmido pRL-SV40: se superpusieron complejos MPG/ADN (cuadros negros) o MPG ΔNLS /ADN (cuadros grises) formados con una relación de carga de 5/1 con 100 ng de plásmido pRL-SV40 que codifica el gen indicador luciferasa. fibroblastos humanos sincronizados o detenidos (-FCS) (Hs68)

La actividad luciferasa se controló 12 horas y 24 horas después de la liberación de la sincronía, o después de 24 horas para las células detenidas y 48 horas para las células asincrónicas. Las transfecciones de control se realizaron con Lipofectamine™ (cuadros blancos) o plásmido desnudo (cuadros discontinuos).

¿Modelar el dna/péptidos con importinas?

GST: Glutatión Sefarosa 4 Fast Flow se utiliza para purificar proteínas marcadas con glutatión S-transferasa (GST) a partir de lisados ​​bacterianos. También es adecuado para purificar otras S-transferasas o proteínas dependientes de glutatión.

**Metodología**

* **Cultivo celular y transfección mediada por MPG.**

Para la administración de genes mediada por MPG o MPG ΔNLS, se formaron complejos de péptido portador/ARNip en DMEM o PBS, con una relación de carga de 10:1 y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Las transfecciones se realizaron durante 1 hora, después de lo cual las células se lavaron exhaustivamente y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia para determinar la localización celular del oligonucleótido marcado fluorescentemente

* **Entrega de siRNA mediada por MPG.**

Los siRNA dirigidos a la 3'UTR de GAPDH procedían del kit de siRNA Silencer™ GAPDH (Ambion). El marcaje fluorescente de siRNA se realizó utilizando el kit de marcaje Fam o Cy3 Silencer™ (Ambion) y se modificó como se describe en el protocolo del fabricante.

El gen indicador pRL-Luc era de Promega y siRNA dirigido a la luciferasa en sentido 5' CUUACGCUGAGUACUUCGATT 3' (SEQ ID NO:4) y antisentido 3' TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU 5' (SEQ ID NO:5) y sentido no coincidente 5' CGUACGCGGAAUACUUCGATT 3' (SEQ ID NO:6) y siRNA antisentido 3' TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5' (SEQ ID NO:7) se obtuvieron de Genset Oligos.

* **Northern Blotting**

Se recogieron células Hs68 o HeLa (5 x 106 células) incubadas con complejos y se aislaron los ARN totales de las células utilizando TriReagent™.

Las muestras de ARN (10 μg) se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa formaldehído (1,2%), se transfirieron a membranas de nailon (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech) y se hibridaron con con un marcaje P GAPDH y sondas de actina (estas últimas utilizadas para normalizar la carga de ARN). Las señales se detectaron mediante Phosphorimaging (Molecular Dynamics) y se cuantificaron utilizando el software ImageQuant.

**Resultados**

La interferencia de ARN (siRNA) constituye una poderosa herramienta para silenciar la expresión génica postranscripcionalmente . Para validar el potencial de los portadores similares a MPG, se investigó la capacidad de MPG y MPG ΔNLS para promover la captación celular de siRNA. Los siRNA marcados con fluorescencia diseñados para silenciar GAPDH se formaron complejos con MPG y MPG ΔNLS en una proporción molar de 10/1, se incubaron en fibroblastos humanos Hs68 cultivados en presencia de suero durante 30 minutos, después de lo cual se examinó la internalización y localización subcelular del siRNA, mediante microscopía de fluorescencia.

Imagen que contiene Calendario

Descripción generada automáticamente

Entrega de siRNA mediada por MPG. Los siRNA diseñados para apuntar a GAPDH se marcaron con fluorescencia utilizando los kits Silence™ con fluoresceína o Cy3. Los complejos siRNA/MPG (A, B) y siRNA/MPG ΔNLS (C, D) se superpusieron sobre Hs68 cultivado y la localización celular del siRNA se controló mediante microscopía de fluorescencia en células vivas 1 hora después de la transfección.

Ambos transportadores peptídicos pudieron administrar siRNA en células cultivadas con alta eficiencia (alrededor del 90 % de las células). Curiosamente, la localización subcelular final del siRNA dependía del portador MPG utilizado. El siRNA marcado con fluorescencia se localizó rápidamente en el núcleo cuando se transfectó con MPG, pero permaneció principalmente en el citoplasma cuando se transfectó con MPGΔNLS. Además, estos experimentos demuestran que la administración de siRNA mediada por MPG es independiente de la presencia de suero.

Dibujo de ingeniería

Descripción generada automáticamente con confianza media

**PARTE A**

La entrega de siRNA mediada por MPG induce una respuesta biológica sólida. Administración mediada por A/MPG de ARNip dirigido al gen de la luciferasa. La actividad luciferasa se midió 48 horas después de la transfección. Las transfecciones también se realizaron con Oligofectamine™ como estándar. Los experimentos de control se realizaron con siRNA desnudo o utilizando un siRNA no coincidente (barras discontinuas).

**PARTE B**

Entrega mediada por B/MPG de siRNA dirigido al gen GAPDH: análisis de transferencia Western. Se transfectaron diferentes concentraciones de siRNA (25, 50, 100 nM) con MPG o MPGΔNLS y los niveles de proteína GAPDH se analizaron mediante transferencia Western 30 horas después de la transfección. Se utilizó actina como control para normalizar la carga de proteínas.

**PARTE C**

Entrega mediada por C/MPG de ARNip dirigido al gen GAPDH: análisis de transferencia Northern. La cinética de la degradación inducida por ARNip (50 nM) del ARNm de GAPDH después de la transfección con MPG o MPG ΔNLS se analizó mediante transferencia Northern. Se utilizó actina como control para normalizar los niveles de ARNm en cada muestra.

**Resultados**

Se investigó la respuesta biológica de la administración de siRNA mediada por MPG. Se realizaron dos series de experimentos. Primero, el protocolo descrito por Elbashir et al. (28): se utilizaron células Hela y Cos-7 transfectadas con el plásmido que codifica el gen indicador luciferasa con complejos ΔNLS de siRNA/MPG o siRNA/MPG en los que el siRNA se diseñó para silenciar la luciferasa y se midió la actividad de la luciferasa 48 horas después. . El siRNA 50 nM se asoció con MPG o MPGΔNLS en una relación de carga de 10/1. Como control, la transfección de siRNAp se realizó con el sistema de administración basado en lípidos Oligofectamine™ disponible comercialmente. La administración de siRNA mediada por MPG produjo una disminución del 78% y 85% de la actividad de luciferasa en células Cos-7 y HeLa, respectivamente en la figura 4. Este efecto se mejoró aún más al 90% y al 95% con MPGΔNLS.

Experimentos similares realizados con un siRNA no coincidente complejado con MPG o MPG ΔNLS no dieron como resultado ningún cambio en los niveles de actividad de luciferasa, lo que sugiere que no hay efectos secundarios asociados con la presencia de MPG

Estos experimentos revelaron que la eficiencia de los péptidos similares a MPG es similar a la de Oligofectamine™, lo que sugiere que MPG es capaz de liberar el ARNip rápidamente y no afecta su efecto biológico tras la internalización celular.