

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 605**

21 Número de solicitud: 202031290

51 Int. Cl.:

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.06.2022

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

María Luisa S/N, Pabellón del Perú

41013 Sevilla (Sevilla) ES y

**FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y
SALUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

DÍAZ CORRALES, Francisco Javier;

DE LA CERDA HAYNES, Berta;

MONTERO SÁNCHEZ, Adoración;

VALDÉS SÁNCHEZ, María Lourdes;

BORREGO GONZÁLEZ, Sara y

DÍAZ CUENCA, Aránzazu

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **VECTORES NO VIRALES A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS PARA SU APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS DEGENERATIVAS DE LA RETINA**

57 Resumen:

Vectores no virales a partir de nanopartículas mesoporosas para su aplicación en terapia génica para el tratamiento de patologías degenerativas de la retina.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la nanomedicina y la terapia genética, y se refiere a sistemas que comprenden nanopartículas capaces de incorporar genes. Más concretamente, se refiere a sistemas funcionalizados con aminosilanos para terapia génica y a sus aplicaciones en enfermedades oftalmológicas.

ES 2 915 605 A1

DESCRIPCIÓN

VECTORES NO VIRALES A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS PARA SU APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS DEGENERATIVAS DE LA RETINA

5

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se encuentra dentro del campo de la nanomedicina y la terapia genética, y se refiere a sistemas que comprenden nanopartículas capaces de incorporar genes. Más concretamente, se refiere a sistemas funcionalizados con aminosilanos para terapia génica y a sus aplicaciones en enfermedades oftalmológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Dentro de los sistemas coloidales propuestos para el transporte de genes que han sido descritos en literatura destacan las micelas, micelas mixtas, emulsiones, nanopartículas y liposomas como una alternativa a vectores virales para terapia génica.

20

Sin embargo, algunos de los sistemas mencionados anteriormente tienen un serio problema en lo que respecta a su estabilidad. Los sistemas vesiculares y emulsiones son conocidos por experimentar fenómenos de agregación y la dificultad para obtener formulaciones más estables mediante procesos como la liofilización sin alterar significativamente sus características iniciales. En este sentido, no debemos olvidar que para la propia formación de tales sistemas es preciso un considerable aporte energético y/o el empleo de combinaciones específicas de agentes tensioactivos, por lo que el producto obtenido se encuentra en una situación energéticamente desfavorable o inestable. Además, se trata de sistemas especialmente sensibles a variaciones en el entorno, como la temperatura.

25

30

Las nanopartículas, en cuanto a que se trata de nanosistemas de tipo matricial, son sistemas adecuados para la liberación de fármacos, ya que son más estables que los citados anteriormente, en general presentan mayor capacidad de encapsulación, es posible prepararlas con un tamaño homogéneo. Se han descrito muchos ejemplos de transfección *in vitro* de moléculas biológicas activas asociadas a nanopartículas. Por ejemplo, WO2013068625 describe nanopartículas que comprenden ésteres de sorbitán como componente principal y asociado a pEGFP. Esos sistemas fueron capaces de transfectar

35

efectivamente células HEK, lo que se confirmó por medio de la observación de la correspondiente expresión de la proteína verde fluorescente las 48 horas y 72 horas después de la transfección.

5 Sin embargo, un experto en la materia no puede predecir que buenos resultados *in vitro* sean también obtenidos *in vivo*, y de este modo se han descrito muy pocos ejemplos *in vivo*. Por ejemplo, Mitra *et al.* han descrito nanopartículas de quitosano-glicol asociadas a DNA para la liberación de genes en la retina (DOI: 10.1002/cmdc.201300371) y Sunshine *et al.* han descrito nanopartículas de poli (beta-amino éster) para la transfección de células de
10 epitelio pigmentario de la retina *in vitro* e *in vivo* (doi:10.1371/journal.pone.0037543).

La aplicación de nanopartículas como vectores no virales para terapia génica requiere una elevada biocompatibilidad y una transfección efectiva de las células diana en el paciente. Por tanto, es necesario encontrar nanopartículas adecuadas para su uso en terapia génica.

15

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra la caracterización físico-química y de capacidad de carga de DNA de las Nanopartículas (NPs). En la imagen (a), se muestra la Microscopía electrónica de
20 transmisión (MET) de NPs mesoporosas (NPM) y NPM funcionalizadas con grupos amino (NPM-N). NPM y NPM-N presentan morfología esférica con resolución de canales nanoporosos ordenados con disposición radial. En la imagen (b) podemos ver los gráficos de distribución de tamaños (diámetro) obtenidos a partir de medidas en las micrografías MET de las NPM y NPM-N. En la imagen (c) podemos ver las Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de NPM y NPM-N. Los valores de superficie específica obtenidos por el modelo BET son $476 \pm 26 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ y $176 \pm 23 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para NPM y NPM-N respectivamente. En la imagen (d) observamos distribuciones BJH de tamaño de nanoporo para NPM y NPM-N obtenidas a partir de la isoterma de adsorción, se observa un máximo en 3.5 nm en ambos casos. En la imagen (e) observamos espectros de infrarrojo de NPM y NPM-N,
30 confirmando la existencia de bandas correspondientes a grupos amino en NPM-N. En la imagen (f) se muestra un ensayo de reacción con salicilaldehído donde las NPM-N se tornan amarillas confirmando la presencia de grupos amino. En la imagen (g) se observa fotografía del gel de electroforesis utilizado en el ensayo de carga del plásmido pEGFP en NPM-N para distintas proporciones de carga pEGFP (μg)/NPM-N (μg): 1:0, 1:300, 1:150, 1:75, 1:38
35 y 1:18 y el carril de control 1:300 pEGFP/NPM. Se observa cómo la carga completa del

plásmido se consigue para las NPM-N cuando se incubaba 1 µg de plásmido con 300 µg de NPM-N.

Fig. 2. Muestra la evaluación de la transfección del gen *PRPF31* fusionado a GFP *in vitro* en una línea celular humana mediante pEGFP-*PRPF31*/NPM-N. Imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células HEK 293 transfretadas con NPM-N cargadas con el plásmido pEGFP-*PRPF31* (A-C) y detalles (D-G); Señal fluorescente GFP (verde), señal fluorescente anti-*PRPF31* (rojo), núcleos teñidos con DAPI (azul). Las imágenes fusionadas de los diferentes canales se muestran en C y G. WB de los niveles de expresión del transgén *PRPF31* fusionado a GFP (H). Los extractos de proteínas de células HEK 293 no transfetadas se cargaron en el carril 1, de células transfetadas con pEGFP-*PRPF31* mediante lipofectamina en el carril 2, de células incubadas con NPM-N vacías en el carril 3, y de células transfetadas con NPM-N cargadas con pEGFP-*PRPF31* en el carril 4. Se realizó WB con anticuerpos anti-GFP (panel superior), anti-*PRPF31* (panel central) y anti-GAPDH como control de carga (panel inferior). El (*) en el panel central marca el peso molecular esperado de la proteína fusionada *PRPF31*-GFP.

Fig. 3. Muestra la evaluación de la salud del tejido ocular y su funcionalidad tres meses después de inyección subretiniana con PBS, con NPs vacías (NPM-N) o NPs cargadas con DNA (pEGFP/NPM-N). Imágenes del aspecto del ojo (A); Aspecto externo (fila izquierda), fondo de ojo en espectro visible (fila central) y en espectro fluorescente (fila derecha). Representación del electroretinograma (ERG) correspondiente a la actividad eléctrica de los fotorreceptores (ondas a y b) o del RPE (onda c) (B). Cuantificación de la amplitud de las ondas de ERG en condiciones escotópicas (C, actividad de conos y bastones; D, bastones) o fotópicas (E, conos). Medida del grosor de la retina por OCT (F). Agudeza visual medida por test optomotor al 100% de contraste (G) y medida del umbral de percepción de contraste (H).

Fig. 4. Evaluación de la transfección del gen *PRPF31* fusionado a GFP *in vivo* en un modelo animal y su expresión en las distintas capas de la retina un mes después de inyección subretiniana con pEGFP-*PRPF31*/NPM-N. Imágenes de fondo de ojo en espectro visible (A); en espectro de fluorescencia (B) y detalle del sitio de inyección (C), que muestra puntos fluorescentes correspondientes a la expresión de la proteína GFP. Inmunofluorescencia de secciones de retina para *PRPF31* (en rojo; E) y GFP (en verde; D) co-localizadas principalmente en células del RPE (G). Los núcleos se tiñeron con DAPI (en azul; F, G).

RPE = epitelio pigmentario de la retina, ONL = capa nuclear externa, INL = capa nuclear interna, GCL = capa de células ganglionares.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Los autores de la presente invención han desarrollado nanopartículas constituidas principalmente por sílice y calcio que son adecuadas para la transfección *in vivo*, y en particular para la liberación *in vivo* de genes en la retina. Además, estas nanopartículas se encuentran funcionalizadas con aminosilanos como el (3-aminopropil) trietoxilano, proporcionando una mayor transfección *in vivo* en las células del epitelio pigmentario de la retina y ofreciendo un mayor potencial clínico en el tratamiento de enfermedades retinianas.

10

Así, un **primer aspecto** de la invención se refiere a una nanopartícula mesoporosa de base de sílice funcionalizada con (3-aminopropil) trietoxisilano, de ahora en adelante nanopartícula de la invención, para su uso en medicina.

15

En una realización preferida de este aspecto de la invención la nanopartícula ha sido obtenida a través de un método que comprende:

20

- a. Disolver una molécula directora de estructura en agua desionizada.
- b. Proporcionar etil acetato y, a continuación, una solución de amoníaco en agua.
- c. Proporcionar tetraetoxisilano, trietil fosfato y nitrato de calcio.
- d. Agitar hasta obtener nanopartículas precipitadas.
- e. Lavar y secar las nanopartículas.
- f. Calcinar las nanopartículas mesoporosas para eliminar los componentes orgánicos y nitratos.
- g. Funcionalizar las nanopartículas mesoporosas con 3-aminopropil trietoxisilano.

25

La nanopartícula de la invención puede usarse como vector no viral capaz de vehicular genes con potencial terapéutico, por ejemplo, pero sin limitarnos, a la retina.

30

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto la nanopartícula de la invención además comprende un gen o una construcción genética.

35

En esta memoria una construcción genética de ADN o ARN, o un sistema de expresión, de ahora en adelante construcción genética de la invención, comprende uno de los siguientes tipos de secuencia:

- 5 i) secuencia nucleotídica que comprende al menos una secuencia de nucleótidos capaz de transcribir y traducir *in vitro* o *in vivo* a una proteína con actividad biológica, preferiblemente humana, y más preferiblemente una proteína codificada por un gen de la Tabla 1 y/o una variante o un fragmento biológicamente activo de la misma, o
- 10 ii) secuencia nucleotídica que corresponde a un sistema o un vector de expresión génica que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica a un gen operativamente unido a al menos un promotor que dirige la transcripción de dicha secuencia nucleotídica, y otras secuencias apropiadas, como, por ejemplo, pero sin limitarnos, reguladores de la expresión, necesarias para la transcripción y su regulación en tiempo y lugar. Preferiblemente la secuencia polinucleotídica es un
- 15 polinucleótido que codifica un gen de la Tabla 1, o cualquier secuencia capaz de transcribirse y traducirse a la proteína que codifican dichos genes, y/o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos.

20 La construcción genética puede comprender otra u otras secuencias de nucleótidos capaces de transcribir y traducirse *in vitro* o *in vivo* a una proteína con actividad biológica de interés, por ejemplo, en los usos médicos de la invención.

En el contexto de la presente invención un sistema de expresión es un sistema específicamente diseñado para la producción de las proteínas de la Tabla 1, y más

25 preferiblemente de PRPF31. Preferiblemente, el sistema de expresión comprende el gen *PRPF31*, normalmente codificado por DNA o cDNA.

"Unido operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos están configurados de modo que realizan su función habitual. Por lo

30 tanto, los elementos de control unidos operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Los elementos de control no necesitan ser contiguos con la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de la misma. Así, por ejemplo, secuencias no traducidas pero transcritas pueden estar presentes entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia

35 promotora todavía puede considerarse "operativamente ligada" a la secuencia codificante.

“Transferencia genética” o “liberación de genes” se refiere a métodos o sistemas para introducir de manera fiable una secuencia de nucleótidos particular (por ejemplo, ADN) en las células diana. Las secuencias de nucleótidos introducidas pueden persistir *in vivo* en formas episomales o integrarse en el genoma de las células diana. La transferencia de genes proporciona un enfoque único para el tratamiento de enfermedades adquiridas y heredadas, y un número de sistemas se han desarrollado en la técnica para la transferencia génica en células de mamífero.

El término "elemento de control de expresión" o "elemento regulador" se refiere colectivamente a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores corriente arriba, orígenes de replicación, sitios internos de entrada de ribosomas ("IRES"), potenciadores, y similares, los cuales intervienen colectivamente en la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No todas estas secuencias de control necesitan estar siempre presentes que la secuencia de codificación seleccionada sea capaz de ser replicada, transcrita y traducida en una célula huésped apropiada.

En el contexto de la presente invención, el término "promotor" se refiere a un conjunto de secuencias de ácido nucleico que están controlando la transcripción de un ácido nucleico diana. Un promotor incluye secuencias de ácidos nucleicos necesarios cerca del sitio de inicio de la transcripción. Además, un promotor puede incluir opcionalmente un potenciador o elemento represor. Un "promotor constitutivo" es un promotor que está continuamente activo y no está sujeto a regulación por parte de las señales o moléculas externas. En contraste, la actividad de un "promotor inducible" es regulada por una señal externa o molécula (tal como un factor de transcripción).

Otra realización preferida de este aspecto se refiere a la nanopartícula de la invención para el tratamiento de una enfermedad ocular.

Las nanopartículas de la invención tienen un tamaño de partícula promedio de entre 90-180 nm, preferiblemente de entre 130 y 170 nm, y mucho más preferiblemente de entre 140 y 150 nm. El tamaño promedio de las partículas está influido principalmente por la composición y las condiciones de formación de partículas establecidas en el procedimiento de obtención seleccionado.

Por el término “tamaño promedio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas que se mueven juntas en un medio acuoso. El tamaño promedio de estos sistemas puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica.

5

Más preferiblemente el tamaño medio de las nanopartículas está comprendido entre 90 y 180 nm, más preferiblemente entre 130 y 170 nm, y aún más preferiblemente entre 140 y 150 nm.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención la nanopartícula posee una geometría radial de nanoporos.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la superficie específica está comprendida entre 100 y 250 cm² g⁻¹, más preferiblemente entre 120 y 220 cm² g⁻¹, y aún
15 más preferiblemente entre 150 y 200 cm² g⁻¹.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención el volumen medio de nanoporo está comprendido entre 0.10-0.50 cm³ g⁻¹, más preferiblemente entre 0.12-0.40 cm³ g⁻¹, y aún más preferiblemente entre 0.15-0.35 cm³ g⁻¹.

20

En otra realización preferida de este aspecto de la invención el tamaño de poro medio del nanoporo está comprendido entre 2 y 8 nm, más preferiblemente entre 2,5 y 6 nm, y aún más preferiblemente entre 3-4 nm.

25 En otra realización preferida de este aspecto de la invención la capacidad de carga de material genético está comprendido entre 0.0025- 0.055 µg µg⁻¹, más preferiblemente entre 0.0030-0.010 µg µg⁻¹, y aún más preferiblemente entre 0.0033-0.0066 µg µg⁻¹

Más preferiblemente la enfermedad ocular es un trastorno de la retina, y aún más
30 preferiblemente el trastorno de la retina está relacionado con anomalías o una disfunción del epitelio pigmentario de la retina.

En una realización preferida, la enfermedad degenerativa de la retina es hereditaria o compleja (compleja se refiere a otras enfermedades que, como la degeneración macular asociada a la edad, no son hereditarias). En una realización aún más preferida de este
35 aspecto de la invención, la enfermedad ocular se selecciona de la lista que consiste en:

retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), Enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, amaurosis congénita de Leber y distrofias retinianas, o combinaciones de las mismas.

- 5 Aún más preferiblemente la enfermedad ocular se selecciona de la lista que consiste en retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad y/o amaurosis congénita de Leber. Aún mucho más preferiblemente, es la retinosis pigmentaria.

10 Dependiendo de la zona de focalización seleccionada un aspecto crítico que debe considerarse es el sitio donde se realiza la inyección del vector. Para la administración al ojo o al tejido ocular del producto de la invención se puede emplear la inyección intravítrea, la inyección subretiniana, la inyección subescleral, la inyección intracoroidea, la inyección subconjuntival, o cualquiera de sus combinaciones. Se puede considerar la inyección intravítrea o la inyección subretiniana para la administración de fármacos en general a la
15 parte posterior del ojo. Preferiblemente, la administración de la composición de la invención se ha realizado mediante inyección subretiniana, que tal como muestran los ejemplos de la invención ha demostrado ser eficaz en la entrega de la composición de la invención en la retina externa, específicamente en los fotorreceptores y RPE.

20 Por tanto, en otra realización preferida, la vía de administración del producto de la invención (es decir, del polinucleótido de la invención, del sistema de expresión de la invención, y/o del sistema de nanomedicina de la invención) es la administración en el espacio subretiniano, y más preferiblemente es mediante la inyección del producto de la invención en el espacio subretiniano.

25 En una realización aún más preferida de este aspecto, el gen o la construcción genética de la invención que comprende el gen, se selecciona de la lista que consiste en los genes de la Tabla 1, o cualquiera de sus combinaciones.

30 En una realización aún más preferida de este aspecto, el gen o la construcción genética de la invención que comprende el gen, se selecciona de la lista que consiste en: *PLA2G5*, *NMNAT1*, *MERTK*, *RPE65*, *ABCA4*, *PRPF3*, *PRPF31*, *PRPF8*, *PRPH2*, *RD3*, *EFEMP1*, *KCNJ13*, *RGR*, *RBP4*, *BEST1*, *RDH5*, *RLBP1*, *CLN3*, *DJ1* o cualquiera de sus combinaciones.

35

Tabla 1. Genes y loci mapeados que pueden ser utilizadas para tratar enfermedades de la retina

Símbolo del Gen; Números OMIM	Localización Chromosomal	Gene ID
NPHP4 , SLSN4; <u>606966</u> , <u>606996</u> , <u>607215</u>	1p36.31	261734
MFN2 , CMT6, CMT2A2, MARF; <u>608507</u> , <u>609260</u> , <u>601152</u>	1p36.22	9927
NMNAT1 , LCA9, PNAT1; <u>204000</u> , <u>608553</u> , <u>608700</u>	1p36.22	64802
PLA2G5 ; <u>601192</u>	1p36.13-p36.12	5322
EMC1	1p36.13	23065
DHDDS , RP59; <u>268000</u> , <u>608172</u> , <u>613861</u>	1p36.11	79947
RPE65 , LCA2, RP20; <u>180069</u> , <u>204000</u> , <u>204100</u>	1p31.2	6121
ABCA4 , ABCR, ARMD2, CORD3, RP19, STGD1; <u>120970</u> , <u>153800</u> , <u>248200</u> , <u>601691</u> , <u>601718</u> , <u>603075</u> , <u>604116</u>	1p22.1	24
RP32 ; <u>609913</u>	1p21.2-p13.3	641433
COL11A1 , STL2; <u>120280</u> , <u>154780</u> , <u>604841</u>	1p21.1	1301
GNAT2 , ACHM4; <u>139340</u>	1p13.3	2780
PRPF3 , HPRP3, PRP3, RP18; <u>601414</u> , <u>607301</u>	1q21.2	9129
SEMA4A , CORD10, SEMAB, RP35;	1q22	64218

ES 2 915 605 A1

<u>120970</u> , <u>607292</u> , <u>610282</u> , <u>610283</u>		
CORD8 ; <u>120970</u> , <u>605549</u>	1q23.1-q23.3	54109
HMCN1 , ARMD1, FBLN6; <u>603075</u> , <u>608548</u>	1q25.3-q31.1	83872
CFH , ARMD4, ARMS1, HF1; <u>134370</u> , <u>603075</u> , <u>609814</u> , <u>610698</u>	1q31.3	3075
CRB1 , LCA8, RP12; <u>204000</u> , <u>600105</u> , <u>604210</u> , <u>613835</u>	1q31.3	23418
FLVCR1 , AXPC1; <u>609033</u> , <u>609144</u>	1q32.3	28982
NEK2 , NLK1, RP67; <u>268000</u> , <u>604043</u> , <u>615565</u>	1q32.3	4751
RD3 , C1orf36, LCA12; <u>180040</u> , <u>204000</u> , <u>610612</u>	1q32.3	343035
USH2A , RP39; <u>268000</u> , <u>276901</u> , <u>608400</u> , <u>613809</u>	1q41	7399
SDCCAG8 , BBS16, CCCAP, NPHP10, SLSN7; <u>266900</u> , <u>613524</u> , <u>613615</u>	1q43	10806
NF513 , RP58; 268000, 613598, 613617	2p23.3	130557
C2orf71 , RP54; 268000, 613425, 613428	2p23.2	388939
EFEMP1 , DHRD, MTLV, FBLN3; 126600, 601548	2p16.1	2202
FAM161A , RP28; 268000, 606068, 613596	2p15	84140
WDPCP , BBS15, FRITZ;	2p15	51057

ES 2 915 605 A1

209900, 613580		
ALMS1 , ALSS; 203800	2p13.1	7840
ABHD12 , PHARC; 613599, 612674	2p11.21	26090
CNGA3 , ACHM2, CNCG3, RMCH2; 216900, 600053	2q11.2	1261
CNNM4 , ACDP4, LOC619531; 217080, 607805	2q11.2	26504
SNRNP200 , ASCC3L1, BRR2, HECIC2, RP33; 601664, 610359	2q11.2	23020
MERTK , RP38; 268000, 604705, 613862	2q13	10461
NPHP1 , JBTS4, SLSN1; 256100, 266900, 607100, 609583	2q13	4867
BBS5 ; 209900, 603650	2q31.1	129880
CERKL , RP26; 608380, 608381	2q31.3	375298
(- - -)	2q33.1-q24.2	
TMEM237 , ALS2CR4, JBTS14; 213300, 614423, 614424	2q33.1	65062
KCNJ13 , LCA16, SVD; 204000, 193230, 603208, 614186	2q37.1	3769
SAG , RP47; 181031, 258100, 268000	2q37.1	6295
USH2B ; 605472	not 3p24.2-p23	7400
GNAT1 , CSNBAD3;	3p21.31	2779

ES 2 915 605 A1

139330, 310500, 610444		
LZTFL1 , BBS17; 606568	3p21.31	54585
TREX1 , AGS1, CHBL, CRV, RVCL; 192315, 225750, 606609, 610448	3p21.31	11277
ATXN7 , ADCA2, OPCA3, SCA7; 164500	3p14.1	6314
ARL6 , BBS3, RP55; 209900, 268000, 608845, 613575	3q11.2	84100
IMPG2 , RP56, SPARCAN; 268000, 607056, 613581	3q12.3	50939
IQCB1 , NPHP5, SLSN5; 609237, 609254	3q13.33	9657
NPHP3 , SLSN3; 604387, 606995, 608002	3q22.1	27031
RHO , CSNBAD1, OPN2, RP4; 180380, 268000, 310500, 610445	3q22.1	6010
RP5	3q22.1	6010
CLRN1 , RP61, USH3, USH3A; 268000, 276902, 606397, 614180	3q25.1	7401
SLC7A14 , RP68; 268000, 615720, 615725	3q26.2	57709
OPA1 ; 125250, 165500, 605290	3q29	4976
PCYT1A ; 123695	3q29	5130
PDE6B , CSNB3,	4p16.3	5158

ES 2 915 605 A1

CSNBAD2, RP40; 163500, 180072, 268000, 310500, 613801		
WFS1 , DFNA38; 222300, 598500	4p16.1	7466
CC2D2A , JBTS9, MKS6; 216360, 612013, 612284, 612285	4p15.33	57545
RAB28 ; 612994	4p15.33	9364
PROM1 , CORD12, MCDR2, PROML1, RP41, STGD4; 120970, 268000, 603786, 604365, 608051, 612095, 612657	4p15.32	8842
GPR125 , PGR21, TEM5L; 612303	4p15.2	166647
DTHD1	4p14	401124
WDR19 , ATD5, CED4, NPHP13, IFT144, PWDMP; 208500, 218330, 256100, 608151, 614376, 614378	4p14	57728
CNGA1 , CNCG, CNCG1, RP49; 123825, 268000, 613756	4p12	1259
WFS2 ; 604928	4q22-q24	54117
MTTP , ABL, MTP; 200100, 157147	4q23	4547
LRIT3 , FIGLER4; 615004	4q25	345193
BBS7 , BBS2L1; 209900, 607590	4q27	55212
BBS12 , FLJ35630; 209900, 610683	4q27	166379

ES 2 915 605 A1

RP29; 268000, 612165	4q32-q34	54110
LRAT , LCA14; 204000, 604863, 613341	4q32.1	9227
TLR3; 603029	4q35.1	7098
CYP4V2 , BCD; 210370	4q35.2	285440
MCDR3; 608850	5p15.33-p13.1	317668
GPR98 , FEB4, MASS1, USH2C, VLGR1; 602851, 604352, 605472	5q14.3	84059
VCAN , CSPG2, ERVR, WGN1; 118661, 143200	5q14.3	1462
NR2F1 , EAR3; 132890, 615722	5q15	7025
BSMD; 608970	5q21.2-q33.2	5961
HARS , HRS, USH3B; 614504, 142810	5q31.3	3035
PDE6A , RP43; 180071, 268000, 613810	5q33.1	5145
GRM6 , CSNB1B; 257270, 310500, 604096	5q35.3	2916
MAK , RP62; 154235, 268000, 614181	6p24.2	4117
C2; 217000	6p21.32	717
CFB , BF, BFD; 138470	6p21.32	629
TULP1 , LCA15, RP14; 204000, 600132, 602280, 613843	6p21.31	7287

ES 2 915 605 A1

GUCA1A , COD3, CORD14, GCAP1; 120970, 602093, 600364	6p21.1	2978
GUCA1B , GCAP2, RP48; 268000, 602275, 613827	6p21.1	2979
PRPH2 , CACD2, RDS, RP7; 169150, 179605, 608133, 608161, 613105	6p21.1	5961
BCAMD , MCDCA; 153870	6p12.3-q16	3617
EYS , RP25, SPAM; 602772	6q12	346007
COL9A1 ; 120210	6q13	1297
RIMS1 , CORD7, RIM1; 120970, 603649, 606629	6q13	22999
MCDR1 , NCMD, PBCRA1; 136550, 600790	6q14-q16.2	4167
ELOVL4 , STGD3; 600110, 605512	6q14.1	6785
IMPG1 , SPARC; 153870, 600790, 602870	6q14.1	3617
LCA5 ; 204000, 604537, 611408	6q14.1	167691
RP63 ; 268000, 614494	6q23	100862681
AHI1 , JBTS3; 608629, 608894	6q23.3	54806
PEX7 , PTS2R, RCDP1; 215100, 266500, 601757	6q23.3	5191
RCD1 ; 180020	6q25-q26	5953
MDDC , CYMD; 153880	7p21-p15	7966

ES 2 915 605 A1

KLHL7 , RP42; 268000, 611119, 612943	7p15.3	55975
BBS9 , PTHB1; 209900, 607968	7p14.3	27241
RP9 , PAP1, PIM1K; 180104, 607331	7p14.3	6100
PEX1 , IRD; 202370, 214100, 266510, 602136	7q21.2	5189
TSPAN12 , NET2; 613138	7q31.31	23554
IMPDH1 , LCA11, RP10; 146690, 204000, 180105, 613837	7q32.1	3614
OPN1SW , BCP, CBT; 190900	7q32.1	611
KIAA1549 ; 613344	7q34	57670
RP1L1 ; 608581	8p23.1	94137
ADAM9 , CORD9, MCMP, MDC9; 120970, 602713, 612775	8p11.23	8754
RP1 , ORP1; 180100, 603937	8q12.1	6101
TTPA ; 600415	8q12.3	7274
CSPP1 ; 611654, 213300, 249000	8q13.1-q13.2	79848
OPA6 , ROA1; 165500, 258500	8q21-q22	777778
PXMP3 , PAF1, PEX2, PMP35; 170993, 214100, 266510	8q21.13	5828
CNGB3 , ACHM3, RMCH1;	8q21.3	54714

ES 2 915 605 A1

216900, 248200, 262300, 605080		
C8orf37 , CORD16, RP64; 120970, 268000, 614477, 614500	8q22.1	157657
GDF6 , CDMP2, KFS1, LCA17; 204000, 601147, 613703, 613094, 615360	8q22.1	392255
VMD1 ; 153840	not 8q24	7438
KCNV2 , RCD3B; 607604, 610356	9p24.2	169522
TOPORS , LUN, P53BP3, RP31; 609507, 609923	9p21.1	10210
INVS , NPHP2; 243305, 602088	9q31.1	27130
DFNB31 , USH2D, WHRN; 607084, 607928, 611383	9q32	25861
PRPF4 ; 607795	9q32	9128
TLR4 , ARMD10; 603030, 603075, 611488	9q33.1	7099
TRIM32 , BBS11, HT2A; 209900, 254110, 602290	9q33.1	22954
RP8 , RP21; 500004	not 9q34-qter	8020
INPP5E , CORS1, JBTS1; 213300, 610156	9q34.3	56623
PHYH , PAHX, RDPA; 266500, 600964, 602026	10p13	5264
ACBD5	10p12.1	91452
USH1K	10p11.21-q21.1	101180907
RBP3 , IRBP, RP66;	10q11.22	5949

ES 2 915 605 A1

180290, 268000		
ERCC6 , ARMD5; 133540, 214150, 278800, 603075, 609413	10q11.23	2074
RNANC ; 221900	10q21	54719
PCDH15 , DFNB23, USH1F; 276900, 601067, 602083, 605514, 609533	10q21.1	65217
CDH23 , DFNB12, USH1D; 276900, 601386, 601067, 605516	10q22.1	64072
CDHR1 , CORD15, PCDH21, RP65; 120970, 268000, 609502, 613660	10q23.1	92211
RGR , RP44; 268000, 600342, 613769	10q23.1	5995
KIF11 , EG5, HK5P, KNSL1, MCLMR, TRIP5; 148760, 152950	10q23.33	3832
PDE6C , COD4, PDEA2; 600827, 613093	10q23.33	5146
RBP4 ; 180250	10q23.33	5950
PAX2 , ONCR; 120330, 167409	10q24.31	5076
PDZD7 , PDZK7; 612971	10q24.31	79955
BBIP1 , BBIP10, BBS18; 613605	10q25.2	92482
CORD17	10q26	101409267
ARMS2 , ARMD8, LOC387715; 603075, 611313	10q26.13	387715

ES 2 915 605 A1

HTRA1 , ARMD7, PRSS11; 602194, 603075, 610149	10q26.13	5654
OAT ; 258870	10q26.13	4942
TUB ; 601197	11p15.4	7275
TEAD1 , AA, TCF13, TEF1; 108985, 189967	11p15.3	7003
USH1C , DFNB18; 276900, 276904, 602092, 605242	11p15.1	10083
EVR3 ; 133780, 605750	11p13-p12	81864
CORS2 , JBTS2; 608091	11p12-q13.3	373067
BEST1 , RP50, TU15B, VMD2; 153700, 268000, 607854, 613194	11q12.3	7439
ROM1 ; 180721	11q12.3	6094
BBS1 ; 209900, 209901	11q13	582
CABP4 , CSNB2B; 310500, 608965, 610427	11q13.1	57010
LRP5 , EVR4, HBM, OPPG; 133780, 259770, 601813, 601884, 603506	11q13.2	4041
CAPN5 , ADNIV, HTRA3, VRNI; 602537, 193235	11q13.5	726
MYO7A , DFNB2, USH1B; 276900, 276903, 600060	11q13.5	4647
TMEM126A , OPA7; 165500, 612988, 612989	11q14.1	84233

ES 2 915 605 A1

FZD4 , EVR1, FEVR; 133780, 604579	11q14.2	8322
C1QTNF5 , CTRP5; 605670, 608752	11q23.3	114902
CEP164 , NPHP15; 256100, 614845, 614848	11q23.3	22897
MFRP , NNO2; 606227, 609549	11q23.3	83552
CACNA2D4 , RCD4; 608171, 610478	12p13.33	93589
PDE6H , RCD3A; 610024, 601190	12p12.3	5149
COL2A1 , AOM, STL1; 108300, 120140, 132450, 156550, 183900, 184250, 200610, 609508	12q13.11	1280
CODA1 ; 611543	12q13.13-q14.3	
RDH5 , RDH1; 136880, 601617	12q13.2	5959
BBS10 , FLJ23560; 209900, 610148	12q21.2	79738
CEP290 , BBS14, JBTS5, LCA10, NPHP6, MKS4, SLSN6; 204000, 610142, 610188, 610189, 611134, 611755	12q21.32	80184
MVK ; 251170, 260920, 610377, 175900	12q24.11	4598
C12orf65 , COXPD7, SPG55; 613541, 613559, 615035	12q24.31	91574
ITM2B , ABRI; 117300, 176500, 603904	13q14.2	9445

ES 2 915 605 A1

RB1; 180200	13q14.2	5925
GRK1, RHOK, RK; 180381, 258100	13q34	6011
STGD2; 153900	not 13q34	6785
ACHM1, RMCH; 216900	not 14	6021
RP16	not 14	800750
MCDR4	14q11.2	619370
NRL, RP27; 162080, 613750	14q11.2	4901
RPGRIP1, CORD13, LCA6; 120970, 204000, 605446, 608194, 613826	14q11.2	57096
OTX2; 600037, 610125	14q22.3	5015
RDH12, LCA13, RP53; 204000, 268000, 608830, 612712	14q24.1	145226
TLL5, STAMP; 612268	14q24.3	23093
SPATA7, HSD3, LCA3; 204000, 268000, 604232, 609868	14q31.3	55812
USH1A, USH1; 276900	not 14q32	7393
TTC8, BBS8, RP51; 209900, 268000, 608132, 613464	14q32.11	123016
FBLN5, ARMD3; 603075, 604580, 608895	14q32.12	10516
TRPM1, CSNB1C, MLSN1; 310500, 603576, 613216	15q13.3	4308
USH1H;	15q22-q23	100271837

ES 2 915 605 A1

276900, 612632		
SLC24A1 , CSNB1D, NCKX, RODX; 310500, 603617, 613830	15q22.31	9187
NR2E3 , ESCS, PNR, RP37; 268000, 268100, 604485, 611131	15q23	10002
MRST ; 602685	15q24	8126
BBS4 ; 209900, 600374	15q24.1	585
CIB2 , DFNB48, KIP2, USH1J; 605564, 609439, 614869	15q25.1	10518
RLBP1 , CRALBP; 180090	15q26.1	6017
ARL2BP , BART, BART1	16p13.3	23568
GNPTG ; 252605, 607838	16p13.3	84572
IFT140 , MZSDS, WDTC2; 266920, 614620	16p13.3	9742
ABCC6 , ARA, MRP6, PXE; 177850, 264800, 603234	16p13.11	368
RP22 ; 602594	16p12.3-p12.1	6114
CLN3 , JNCL; 607042, 204200	16p11.2	1201
ZNF423 , NPHP14, JBTS19; 213300, 256100, 604557, 614844	16q12.1	23090
BBS2 ; 209900, 606151	16q12.2	583
RPGRIP1L , JBTS7, KIAA1005, MKS5, NPHP8; 610937, 611560, 611561	16q12.2	23322

ES 2 915 605 A1

CNGB1 , CNCG2, CNCG3L, GAR1, GARP, RP45; 268000, 600724, 613767	16q13	1258
OPA8 ; 165500	16q21-q22.3	1258
CDH3 , CDHP, PCAD; 114021, 601553	16q22.1	1001
DHX38 , PRP16; 605584	16q22.2	9785
ADAMTS18 , KNO2; 607512, 608454	16q23.1	170692
FHSD ; 609218	16q23.2-q24.2	550626
CACD , CACD1; 215500	17p13	772
RCD2 ; 601777	17p13.1	1322
PRPF8 , PRPC8, RP13; 600059, 607300	17p13.3	10594
AIPL1 , LCA4; 204000, 604392, 604393	17p13.2	23746
PITPNM3 , CORD5, NIR1; 120970, 600977, 608921	17p13.2	83394
GUCY2D , CORD6, LCA1, RETGC, RETGC1; 120970, 204000, 600179, 601777	17p13.1	3000
CORD4	17q	1321
UNC119 , HRG4; 604011	17q11.2	9094
GPR179 , CSNB1E; 310500, 614515, 614565	17q12	440435
MKS1 , BBS13; 209900, 249000, 609883	17q22	54903
CA4 , RP17;	17q23.2	762

ES 2 915 605 A1

600852, 114760		
RGS9 ; 604067	17q24.1	8787
PRCD , RP36; 268000, 610598, 610599	17q25.1	768206
USH1G , SANS; 276900, 606943, 607696	17q25.1	124590
FSCN2 , RP30; 607643, 607921	17q25.3	25794
PDE6G , RP57; 180073, 268000, 613582	17q25.3	5148
OPA4 ; 165500, 605293	18q12.2-q12.3	58156
CORD1 ; 120970, 600624	18q21.1-q21.3	1319
C3 , ARMD9, ASP; 120700, 603075, 611378	19p13.3	718
RAX2 , ARMD6, CORD11, QRX, RAXL1; 120970, 610362, 610381	19p13.3	84839
RGS9BP , R9AP, RGS9; 607814	19q13.12	388531
MCDR5	19q13.31-q13.32	
CRX , CORD2, LCA7; 120970, 204000, 268000, 602225, 613829	19q13.32	1406
OPA3 , MGA3; 165300, 165500, 258501, 606580	19q13.32	80207
PRPF31 , PRP31, RP11; 600138, 606419	19q13.42	26121
IDH3B , RP46; 268000, 604526, 612572	20p13	3420
PANK2 , HARP, PKAN; 234200, 606157, 607236	20p13	80025

ES 2 915 605 A1

JAG1 , AGS; 118450, 601920	20p12.2	182
MKKS , BBS6; 209900, 236700, 604896	20p12.2	8195
KIZ , RP69; 268000, 615757, 615780	20p11.23	55857
PRPF6 , RP60; 268000, 613979, 613983	20q13.33	24148
USH1E ; 276900, 602097	21q21	7396
C21orf2 ; 603191	21q22.3	755
OPA5 ; 165500, 610708	22q12.1-q13.1	692222
IFT27	22q12.3	11020
TIMP3 , SFD; 136900, 188826	22q12.3	7078
VRD1	22q13	
OFD1 , RP23; 300170, 300209, 300424, 300804, 311200	Xp22.2	8481
RS1 , XLRS1; 312700	Xp22.13	6247
(- - -)	Xp21-q21	
RP6 ; 312612	Xp21.3-p21.2	6104
DMD ; 310200	Xp21.2-p21.1	1756
OPA2 ; 165500, 311050	Xp11.4-p11.2	4977
NYX , CSNB1, CSNB1A, CSNB4; 300278, 310500	Xp11.4	60506
COD1 ; 304020	Xp11.4	347676

ES 2 915 605 A1

RP15; 300029	Xp11.4	6110
RPGR , CORDX1, RP3; 300029, 304020, 312610	Xp11.4	6103
PRD; 312550	Xp11.3-p11.23	5548
NDP , EVR2; 133780, 300658, 305390, 310600	Xp11.3	4693
AIED , OA2; 300600	Xp11.23	198
CACNA1F , CORDX3, CSNB2, CSNB2A, CSNBX2; 300071, 300110, 300476, 300600, 310500	Xp11.23	778
RP2; 312600	Xp11.23	6102
PGK1; 300653, 311800	Xq21.1	5230
CHM; 303100	Xq21.2	1121
TIMM8A , DDP, DDP2, DFN1; 300356, 304700, 311150	Xq22.1	1678
RP24; 300155	Xq26-q27	6116
COD2 , CORDX2; 300085	Xq27	1275
RP34; 300605	Xq28-qter	777642
OPN1LW , BCM, CBP, COD5, RCP; 303700, 303900	Xq28	5956
OPN1MW , CBD, GCP;	Xq28	2652

303700, 303800		
KSS ; 530000	mitochondrion	3894
LHON ; 535000	mitochondrion	3974
MT-TL1 , D MDF, TRNL1; 520000, 590050	mitochondrion	4567
MT-ATP6 , ATP6, NARP; 516060, 551500	mitochondrion	4508
MT-TH , TRNH; 590040	mitochondrion	4564
MT-TS2 , TRNS2; 500004, 590085	mitochondrion	4575
MT-TP , TRNP; 590075	mitochondrion	4571
DJ1	1p36.23	11315

En una realización aún mucho más preferida de este aspecto, el gen o la construcción genética de la invención que comprende el gen, es el *PRPF31*.

- 5 En el contexto de la presente invención, el gen *PRPF31* o *pre-mRNA processing factor 31* (también denominado RP11; PRP31; SNRNP61; NY-BR-99) codifica un componente del complejo espliceosoma y es uno de varios genes causantes de retinitis pigmentosa. Cuando el producto génico se añade al complejo espliceosoma, se produce su activación.
- 10 El gen *PRPF31* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína PRPF31, o una variante o fragmento del mismo biológicamente activo. Variantes de las secuencias asociadas al gen *PRPF31* comprenden:
- a) molécula de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoácidica de la SEQ ID NO: 2.
- 15 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a)
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con las SEQ ID NO:2, respectivamente, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *PRPF31*. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la SEQ ID NO :1.

El número de secuencia en el GenBank (ncbi) de la secuencia nucleotídica es el NM_015629, y de la secuencia aminoacídica es el NP_056444.3.

10

SEQ ID NO. 1:

tagtttctgtttccggcttcgcttcggcccacccccacgtccaccccgaaatccctgcttaaaggcctgtttcttgctaacgcccga
accagtcctctgagttgccaacgtctttcttctgtctcgacgccccgtcgtccggccacagcgattctctgcttagcaggatcgggcc
acagcgggacgtgagtccttctcctcgcggctaccgcctctcgcctagtccagggtctaataaagttgtgttcaaagtgc
15 ggccaggaacatcgcgagcggggaccaatcagagagtagctttgcctctataacggcgcgagagtgagacgtcatcggtgag
cgactaacgctagaaacagtggtgctgagagaggagggcctcgggatgtctctggcagatgagctcttagctgatctcgaag
aggcagcagaagaggaggaaggaggaagctatgggaggaagaagaggagccagcagatcgaggatgtgcaggaggag
acacagctggatcttccggggattcagtaagaccatcgccaagctatgggatagtaagatgtttgctgagattatgatgaagatt
gaggagtatatcagcaagcaagccaaagctcagaagtatgggaccagtggaggccgcgctgaataaccgcgctcatcgtgg
20 atgccaacaacctgacctggagatcgaaaacgagctgaacatcatccataagttcatccgggataagtactcaaagagattcc
ctgaactggagtcttggctcccaatgcactggattacatccgcacggtcaaggagctgggcaacagcctggacaagtgaag
aacaatgagaacctgcagcagatcctaccaatgccaccatcatggtcgtcagcgtcaccgcctccaccaccaggggcagc
agctgtcggaggaggagctggagcggctggaggaggcctgcgacatggcgtggagctgaacgcctccaagcaccgcatct
acgagtatgtggagtcccggatgtccttcatcgcacccaacctgtccatcattatcggggcatccacggccgccaagatcatgggt
25 gtggccggcggcctgaccaacctctcaagatgcccgcctgcaacatcatgctgctcggggcccagcgaagacgctgtcggg
cttctcgtctacctcagtgctgccccacaccggctacatctaccacagtgacatcgtgcagtcctgcccaccggtctgctcggcggg
aagcggcccggctggtggccgcaagtgcacactggcagcccgtgtggacagtttcacgagagcacagaaggggaaggtgg
gctacgaactgaaggatgagatcgagcgaattcgacaagtggcaggagccgcccgtgtgaagcaggtgaagccgctgc
ctgcgcccctggatggacagcgggaagaagcagggcggccgaggtaccgcaagatgaaggagcggctggggctgacgga
30 gatccggaagcaggccaacctgatgagcttcggagagatcgaggaggagcctaccaggaggacctgggattcagcctggg
ccacctgggcaagtctgggagtggtgctgctggcagacacaggtaaacgaggccaccaaggccaggatctcaagacgct
gcagcggaccctgcagaagcagagcgtcgtatattggcgggaagtccaccatccgacgacctcctgggacggcctccagc
gtggccttaccctcactccaggcctggagattgtgaaccacaggcggcagagaagaagggtggctgaggccaaccagaag
tatttctccagcatggctgagttcctcaaggtcaagggcgagaagagtgcccttatgtccacctgaatgactgcgtgtgtccaaggt
35 ggcttcccactgaagggacacagaggtccagtccttctgaagggttaggatcgggttctggcagggagaacctgcctgccact
ggccccattgctgggactgccaggaggaggccttgaagagtcggcctggcctccccaggaccgagatcaccgcccag

tatgggctagagcaggctctcatcatgcctgtcttttaactgagaaaggagatTTTTGAAAAGAGTACAATAAAAGGACATTGTC
aagatctgtcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO. 2:

5 MSLADELLADLEEAEEEEEGGSYGEEEEPAIEDVQEETQLDLSGDSVKTIAKLWDSKMFA
EIMMKIEEYISKQAKASEVMGPVEAAPEYRVIVDANNLTVEIENELNIIHKFIRDKYSKRFPELE
SLVFNALDYIRTVKELGNSLDKCKNNENLQQILT NATIMVVSVTASTTQGGQLSEEEERLEE
ACDMALELNASKHRIYEVESRMSFIAPNLSIIIGASTAAKIMGVAGGLTNLSKMPACNIMLLG
AQRKTLSGFSSTSVLPHTGYIYHSDIVQSLPDLRRKAARLVAAKCTLAARVDSFHSTEGK
10 VGYELKDEIERKFDKWQEPKQVKPLPAPLDGQRKKRGRRYRKMKERLGLTEIRKQA
NRMSFGEIEEDAYQEDLGFSLGHLGKSGSRRVQTQVNEATKARISKTLQRTLQKQSVVYG
GKSTIRDRSSGTASSVAFTPLQGLEIVNPQAAEKKVAEANQKYFSSMAEFLKVKGESGLM
ST

15 COMPOSICIONES DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende la nanopartícula de la invención.

20 En una realización preferida de este aspecto, la composición es una composición farmacéutica. En otra realización más preferida, la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición además comprende otro principio activo.

25 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LA NANOPARTÍCULA DE LA INVENCION

Otro aspecto se refiere a un método de obtención de la nanopartícula de la invención que comprende:

- 30 a. Disolver una molécula directora de estructura en agua desionizada.
b. Proporcionar etil acetato y, a continuación, una solución de amoníaco en agua.
c. Proporcionar tetraetoxisilano, trietil fosfato y nitrato de calcio.
d. Agitar hasta obtener nanopartículas precipitadas.
e. Lavar y secar las nanopartículas.
35 f. Calcinar las nanopartículas mesoporosas para eliminar los componentes orgánicos y nitratos.

- g. Funcionalizar las nanopartículas mesoporosas con 3-aminopropil trietoxisilano.

En una realización específica, el método comprende:

- 5 a) 0.7 gramos de la molécula directora de la estructura CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) disuelta en 33mL de agua desionizada tras usar un baño de aceite a 30° C durante 15 minutos a 80 rpm.
- b) Una adición de 10 mL de etil acetato con una agitación de 30 minutos.
- c) Una adición de 7 mL de una solución de amoniaco en agua con 15 minutos de agitación, una adición de 3.6 mL de ortosilicato de tetraetilo con 30 minutos de agitación, una adición de 0.36 mL de trietil fosfato con 30 minutos de agitación y 2.277 gramos de nitrato de calcio tetrahidratado.
- 10 d) Una agitación de 4 horas hasta obtener el producto de reacción en forma de precipitado.
- e) Una centrifugación y 3 lavados posteriores con etanol y dH₂O.
- 15 f) Una congelación a -20° C.
- g) Una liofilización durante 48 horas.
- h) Un calentamiento del producto a 650° C (usando una velocidad de calentamiento de 2°Cmin⁻¹) para eliminar los componentes orgánicos y nitratos.
- i) Una funcionalización de la nanopartícula con 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) el cual, le proporciona una carga superficial neta positiva necesaria para mantener el material genético.
- 20 j) Una mezcla de 0.1 gramos de nanopartícula con 50 mL de tolueno.
- k) Una adición de 1 ml de APTES con un mantenimiento de la temperatura 80° C durante 24 horas.
- 25 l) Una centrifugación de la partícula aminofuncionalizada (NPM-N) a 10000 rpm por 5 minutos con un lavado de tolueno y etanol.
- m) Un secado de las NPM-N en un horno a 80° C durante 24 horas.

El análisis composicional de 96.2 (SiO₂) / 3.8 (CaO), expresado como porcentaje en peso, se realizó mediante fluorescencia de rayos-X con el equipo Spectrometer Panalytical (AXIOS).

30

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (Figura 1a) fueron obtenidas con el microscopio JEOL 2100 Plus utilizando un voltaje de aceleración de 200 kV.

35

El tamaño de nanopartícula (Figura 1b) se midió con el software ImageJ.

Los parámetros texturales y el tamaño de nanoporo (Figura 1 c y d) se midieron por fisiorción de nitrógeno en un equipo Micromeritics Tristar 3020 a 77K, después de desgasificar la muestra a 523 K (250 °C) en corriente de nitrógeno y durante 2h.

- 5 El análisis FT-IR de los grupos funcionales (Figura 1e) se efectuó en un espectrofotómetro JASCO 6200 con la configuración en el modo de transmisión.

La funcionalización con grupos amino también se comprobó cualitativamente mediante ensayo con salicilaldehído (An et al. J.Colloid Interface Sci. 311 (2007) 507-513) (Figura 1f).

10

La capacidad de carga de ADN en forma del plásmido pEGFP-N1 (Figura 1g) se determinó mediante un ensayo en el que se mezclaron 200 μ L de solución de tampón fosfato salino al 1%, con 1 μ g de plásmido y 18, 38, 75, 150 y 300 μ g de NPM-N respectivamente. Las dispersiones se incubaron durante 1h en agitación orbital a temperatura ambiente. Para la
15 evaluación se utilizó gel de agarosa en concentración de 1% (m/v) en tampón de Tris, borato y EDTA (TBE) conteniendo 0.05 μ L/mL de RedSafe. Como controles se utilizaron el plásmido libre y una dispersión de 300 μ g de NP no funcionalizada (NPM). Se aplicaron 100V durante 30 min.

20 **DEFINICIONES**

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica
25 u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

30

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad cursa con disfunción en las células de la retina, bien en los fotorreceptores o en
35 el RPE, que evoluciona hacia una degeneración progresiva de la retina con muerte celular.

Los síntomas incluyen una variedad de dificultades relacionadas con la visión, generalmente leves en el inicio de la enfermedad y que progresan con el tiempo hacia una mayor severidad de la discapacidad visual, que puede llegar a la ceguera.

5 Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de
10 apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N⁶-metil-adenina, N⁶-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-
15 carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-
20 oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)_w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589;
25 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos
30 (ARN o RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN o DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o
35 bioquímicamente modificados.

En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden determinar mediante métodos
5 convencionales.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado
10 de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, Nucleic Acids Research 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los
15 siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.
20

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Ejemplo 1: Uso de nanopartículas mesoporosas funcionalizadas (NPM-N) para transfectar
25 células humanas in vitro.

Para evaluar la biocompatibilidad de las NMP-N y su capacidad para vehicular material genético a una célula viva de mamífero, se analizó la capacidad de transfección *in vitro* de las mismas. La secuencia del gen *PRPF31* humano se fusionó en fase con el extremo N-
30 terminal de GFP en el vector de expresión pEGFP (pEGFP-*PRPF31*). El gen *PRPF31* codifica un factor de empalme de ARNm, de localización principalmente nuclear y se eligió por ser un gen candidato a su uso en terapia génica para retinosis pigmentaria. Las células HEK-293, una línea celular humana, fueron transfectadas con cantidades equivalentes de pEGFP-*PRPF31*, bien usando lipofectamina, un sustrato estándar de transfección, o bien
35 mediante NPM-N previamente cargadas con el material genético. De manera resumida, la prueba se realizó así: La línea celular HEK-293 se mantuvo en cultivo a 37° C y 5% de CO₂

en medio DMEM-F12 suplementado con penicilina/estreptomicina al 1%, 1% glutamina y 10% de suero fetal bovino (todo de Sigma-Aldrich) con cambios de medio cada 2 días. Se sembraron $7,5 \times 10^5$ células en una placa de cultivo de 6 cm (Orange Scientific) y 24 h después de la siembra se realizaron las transfecciones. La transfección control se realizó usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con una relación 3:1 (μL de Lipofectamine 2000/ μg de DNA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En la transfección con NPMN-N cargadas con plásmido pEGFP-*PRPF31*, se dejaron las nanopartículas cargadas en contacto con las células por 24 h y se recogieron o fijaron las células a las 48 h para analizar la transfección celular tanto por inmunofluorescencia como por Western Blot (WB). Para realizar inmunofluorescencia se siguió un protocolo estándar. Brevemente, las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio, fueron fijadas con paraformaldehído y tras permeabilización y bloqueo se incubaron con los anticuerpos primarios: anti-PRPF31 (1:100; OriGene Technologies Inc., TA302582) y anti-GFP (1:200; Cellsignaling 2956) y posteriormente con anticuerpos secundarios AlexaFluor® (Molecular Probes). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories). En la figura 2 se observa cómo las NPMN-N cargadas con el plásmido son capaces de transfectar eficientemente las células *in vitro*, conduciendo a la expresión del gen exógeno y a la localización de la proteína en el compartimento celular correcto. En la imagen de inmunofluorescencia del panel superior se aprecia señal correspondiente a la expresión del gen exógeno *PRPF31* fusionado a GFP en los núcleos celulares, al coincidir a señal fluorescente correspondiente a GFP (Fig. 2A, D) y la de PRPF31 (Fig. 2E). Esto se mostró claramente en las imágenes compuestas (Fig. 2C, G).

Los resultados fueron confirmados por WB (Fig. 2H), que se realizó de manera estándar. Brevemente, las proteínas se extrajeron en tampón RIPA con inhibidores de proteasa.

Después de medir la cantidad de proteína de los extractos, se realizó la separación de 30 μg de cada extracto en un gel SDS-PAGE desnaturalizante en gradiente del 4 al 20% (Biorad) y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó y reveló con anticuerpos primarios: anti-PRPF31 (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, SC-68347), anti-GAPDH (1:1000, Abcam, ab9484) y anti-GFP (1:500; Cell signaling 2956), sus correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP y la detección se realizó con ECL plus (Amersham Biosciences). Se aprecia una banda de 80 kDa presente en los WB anti-PRPF31 y anti-GFP, que corresponde al peso molecular de la proteína fusionada PRPF31-GFP. La expresión dirigida por el material genético exógeno solo estaba presente en los extractos de células transfectadas con lipofectamina o bien en los de NPMN-N

cargadas con el plásmido. La expresión de la proteína fusionada PRPF31-GFP fue mayor en las células transfectadas con lipofectamina y la proteína endógena PRPF31 se detectó como una banda de 55 kDa.

5 Ejemplo 2: Evaluación de seguridad del uso de nanopartículas mesoporosas funcionalizadas (NPM-N) para transfectar *in vivo* la retina de un modelo animal

Se utilizó como animal modelo el ratón, estirpe C57BL/6J, utilizando animales adultos de entre 3 y 4 meses. Se realizó una única inyección subretiniana por ojo para evaluar la
10 seguridad de la administración de NPM en el espacio subretiniano. Brevemente, los animales fueron anestesiados antes del procedimiento y se les inyectó lentamente un volumen de 1 μ l con ayuda de una jeringa de 10 μ l (Hamilton) y una aguja de calibre 33 unida a una micro bomba (World Precision Instruments). En los animales control se inyectó el vehículo PBS; en los grupos experimentales se diluyeron en PBS cantidades equivalentes
15 de NPM-N, bien vacías o bien cargadas con pEGFP. A los tres meses de la intervención, los animales fueron sometidos a distintos tests oftalmológicos para evaluar el efecto de las inyecciones sobre la salud y funcionalidad del tejido retiniano. La integridad el tejido retiniano y la ausencia o presencia de degeneración se puede evaluar mediante imágenes de fondo de ojo. Las imágenes de fluorescencia de fondo de ojo permiten observar la
20 expresión local de la proteína GFP fluorescente. Brevemente, el fondo de ojo se visualizó mediante un microscopio para imágenes retinianas (MICRON III, Phoenix Research Laboratories) con un filtro de emisión de longitud de onda larga (banda de transmisión Tavg N 93% 504.7-900 nm) y un filtro de excitación de longitud de onda corta (banda de transmisión de 486.5 nm Tavg N 90% 451.5) para detectar la señal de fluorescencia de
25 GFP. En la Figura 3A se puede observar la inocuidad de la inyección de NPM-N tanto vacías como cargadas con material genético. El tejido retiniano no presenta diferencias en cuanto a su integridad tras la inyección de NPM-N, cargadas o no, respecto a la inyección sólo de PBS. En el mismo panel, se muestra en la primera columna las imágenes de los ojos inyectados, en la segunda columna las imágenes de fondo de ojo en el espectro visible y en
30 la tercera columna las imágenes de fondo de ojo para visualización de fluorescencia, en las que se aprecia la expresión de proteína GFP fluorescente en los ojos inyectados con p-EGFP/NPM-N. En todos los casos, la inyección de nanopartículas no afectó negativamente a la integridad del tejido retiniano.

35 La actividad fisiológica *in vivo* de los ojos tratados se evaluó también mediante la medida de actividad eléctrica de la retina (Electroretinograma, ERG), en la que se recogen las distintas

ondas eléctricas generadas por la actividad neuronal de los fotorreceptores y otras células de la retina en respuesta a estímulos lumínicos de distinta intensidad. Brevemente, los animales son anestesiados, y mediante la colocación de un electrodo de referencia subcutáneo y dos electrodos de contacto en las córneas, se registran los potenciales generados en respuesta a distintos flashes de luz. El estímulo es una fuente de luz, que según la intensidad y en las condiciones que se realicen (escotópicas o fotópicas) van a activar la retina de manera global o parcial, permitiendo el estudio de conos y bastones de forma independiente y/o conjunta. El ERG en condiciones escotópicas se realiza tras adaptación a la oscuridad durante al menos 20 minutos y según la intensidad del estímulo se va a evaluar la respuesta aislada de bastones o la combinada de bastones-conos. El ERG en condiciones fotópicas, se realiza tras adaptación a la luz durante 8-10 minutos, y nos va a dar información acerca del funcionamiento de los conos y las células bipolares de la retina, bloqueando la respuesta de bastones. En la figura 3B se muestran unas ondas representativas de la respuesta de animales tratados con inyección de vehículo (fila superior), de nanopartículas vacías, en la fila intermedia, o bien de las nanopartículas cargadas con el material genético, en la fila inferior. En ningún caso se observó una diferencia significativa en la amplitud de dichas ondas, que se analizan con más detalle en los paneles 3C, D y E. En la figura 3C se detallan las amplitudes medidas para la onda a al estimular con flashes de luz de distinta intensidad, obteniéndose un perfil de respuesta de combinada de conos y bastones en animales adaptados a la oscuridad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre animales sometidos a los distintos tratamientos. De manera paralela en la figura 3D se presentan las amplitudes de las ondas b generadas por los bastones en respuesta a distintas intensidades de luz en animales adaptados a la oscuridad. En la figura 3E se representa la amplitud de la onda b en animales adaptados a condiciones de luz, que mide la respuesta de los conos. Al igual que en las gráficas 3C y 3D, no se aprecian diferencias significativas entre las tres condiciones. En conclusión, la inyección subretiniana de NPs no produce ningún efecto negativo en cuanto a la actividad de los fotorreceptores. Otra prueba oftalmológica que refleja la salud del tejido retiniano es la medida por tomografía de coherencia óptica (OCT) del grosor de las capas de la retina, que resulta alterado en procesos inflamatorios o degenerativos. Siendo el grosor de la retina de un ratón silvestre con este mismo fondo genético de unos 220 μm , dentro de la variación que existe entre animales, se comprueba que la inyección de nanopartículas en el espacio subretiniano no produce ninguna modificación significativa en el grosor de la retina (Fig. 3F). Por último, se realizó un test sobre la función visual de los animales inyectados en los que se mide su agudeza visual. Este test, denominado test optomotor, contabiliza el porcentaje de respuesta positiva a estímulos visuales, en forma de

movimientos de la cabeza del animal para seguir el movimiento giratorio de un patrón de líneas contrastadas (franjas claras y oscuras) para determinar la agudeza visual de los animales. El contraste del patrón de bandas es modulable para poder medir el umbral de percepción de contraste. En la figura 3E se muestra la agudeza visual a un 100% de contraste con el resultado de que los distintos tratamientos no modifican la agudeza visual en el rango de frecuencias del test. Por último, se determinó el efecto de las inyecciones sobre el umbral de frecuencias que el animal es capaz de percibir, realizada la prueba a distintos contrastes, del 100%, 75% y 50%. En la figura 3H se comprueba que, en todos los casos, la inyección de NPM-N con o sin carga genética no altera de manera significativa el umbral de percepción para los animales testados. En resumen, la inyección de nanopartículas con o sin carga genética no tiene efecto perjudicial sobre la percepción de contraste o la agudeza visual de los animales examinados.

Ejemplo 3: Uso de nanopartículas mesoporosas funcionalizadas (NPM-N) para transfectar *in vivo* la retina de un modelo animal

Para evaluar la viabilidad de NMP-N como un vector para terapia génica *in vivo*, se usaron NMP-N cargados con el plásmido pEGFP-*PRPF31* que lleva el gen humano *PRPF31*, susceptible de ser usado en terapia génica para tratar retinosis pigmentaria, fusionado al gen marcador GFP y se utilizaron para transfectar células retinianas de ratones de tipo silvestre C57BL/6J adultos de 2 meses de edad mediante inyección subretiniana. El procedimiento fue idéntico al del ejemplo 2. Un mes después de la intervención, se examinó el fondo de ojo, sin encontrar signos de morfología anormal o daño (Fig. 4A). Se tomaron también imágenes de fluorescencia del fondo de ojo para evaluar la presencia de proteína fluorescente en la retina de los animales inyectados, encontrando expresión positiva de GFP en el lugar de inyección, tal como se aprecia en la Fig. 4B; con detalle ampliado en la figura 4C. Inmediatamente después, los ratones fueron sacrificados y el tejido fijado en paraformaldehído y criopreservado para obtener secciones de 18 μm y examinar la presencia de expresión génica debida al gen exógeno vehiculado por NMP-N mediante inmunofluorescencia, que se realizó de modo estándar. Brevemente, las secciones de retina se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti-*PRPF31* (1: 100; OriGene Technologies Inc., TA302582), anti-GFP (1:500 Cell signaling, 2956) y posteriormente con anticuerpos secundarios apropiados AlexaFluor® (Molecular Probes); por último, se montaron las secciones con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories). Las secciones de todos los casos analizados se procesaron en paralelo siguiendo un protocolo idéntico sin el paso de incubación con el anticuerpo primario, para

usarse como controles para la especificidad de inmunoreacción. Las imágenes confocales de secciones retinianas fueron capturadas por un microscopio confocal espectral TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Alemania) con un objetivo HCX PL APO Lambda blue 63 1.4 OIL, a 22°C. Como resultado, se observó marcaje positivo para GFP (Fig. 3D) y PRPF31 (Fig. 4E). Las 5 capas retinianas marcadas con tinción nuclear (Fig. 4F) mostraron la colocalización de ambas señales en la capa denominada epitelio pigmentado de la retina (RPE) (Fig. 4G), lo que significa que el gen exógeno ha sido efectivamente introducido en las células de la retina y expresado en esta capa celular.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula de base de sílice funcionalizada con (3-aminopropil) trietoxisilano para su uso en medicina.
- 5
2. La nanopartícula según la reivindicación anterior que además comprende un gen o una construcción génica.
3. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para el tratamiento de una enfermedad ocular.
- 10
4. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el tamaño medio de las nanopartículas está comprendido entre:
- a) 90-180 nm,
- 15 b) 130 y 170 nm,
- c) 140 y 150 nm.
5. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, con geometría radial de nanoporos.
- 20
6. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la superficie específica está comprendida entre 150 y 200 m²g⁻¹.
7. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el volumen medio de nanoporo está comprendido entre 0.15 y 0.35 cm³ g⁻¹.
- 25
8. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el tamaño de poro medio del nanoporo está comprendido entre 3 y 4 nm.
9. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la capacidad de carga de material genético está comprendida entre 0.0025-0.055 µg µg⁻¹.
- 30
10. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde la enfermedad ocular es un trastorno de la retina.
- 35
11. La nanopartícula según la reivindicación anterior, donde el trastorno de la retina está

relacionado con anomalías o una disfunción del epitelio pigmentario de la retina.

12. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 3-11, donde la enfermedad ocular se selecciona de la lista que consiste en: retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, amaurosis congénita de Leber y distrofias retinianas, o combinaciones de las mismas.

13. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 3-12, donde la enfermedad ocular se selecciona de la lista que consiste en retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad y/o amaurosis congénita de Leber.

14. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el gen se selecciona de la lista que consiste en: *PLA2G5*, *NMNAT1*, *MERTK*, *RPE65*, *ABCA4*, *PRPF3*, *PRPF31*, *PRPF8*, *PRPH2*, *RD3*, *EFEMP1*, *KCNJ13*, *RGR*, *RBP4*, *BEST1*, *RDH5*, *RLBP1*, *CLN3*, *DJ1* o cualquiera de sus combinaciones.

15. La nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el gen es *PRPF31*.

16. La nanopartícula para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque se ha obtenido por un método que comprende:

- a. Disolver una molécula directora de estructura en agua desionizada.
- b. Proporcionar etil acetato y, a continuación, una solución de amoníaco en agua.
- c. Proporcionar ortosilicato de tetraetilo, trietil fosfato y nitrato de calcio.
- d. Agitar hasta obtener nanopartículas precipitadas.
- e. Lavar y secar las nanopartículas.
- f. Calcinar las nanopartículas mesoporosas para eliminar los componentes orgánicos y nitratos.
- g. Funcionalizar las nanopartículas mesoporosas con 3-aminopropil trietoxisilano.

17.- Una composición que comprende una nanopartícula para su uso según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

18.- La composición según la reivindicación anterior, que es una composición farmacéutica.

Figura 1.

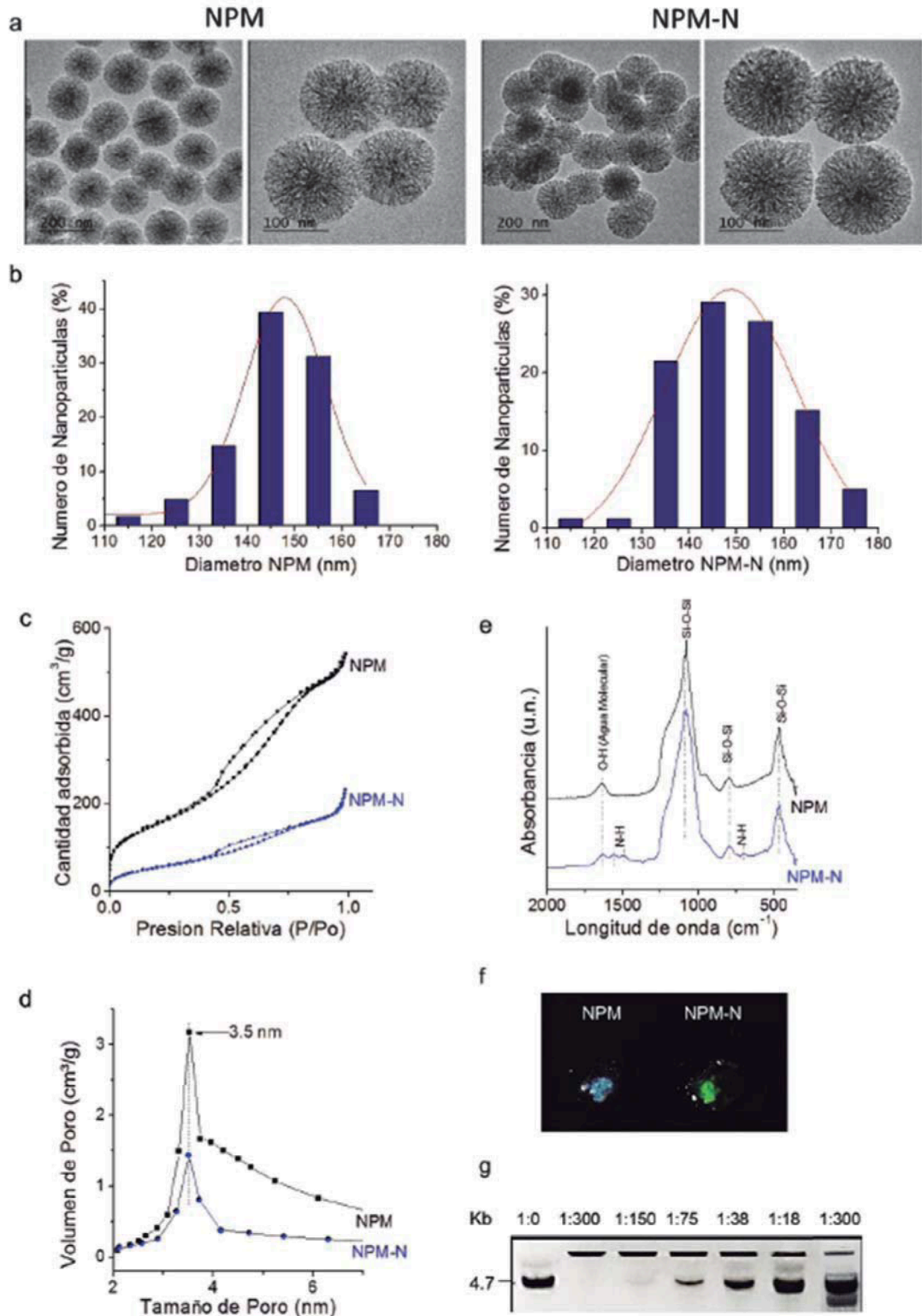


Figura 2.

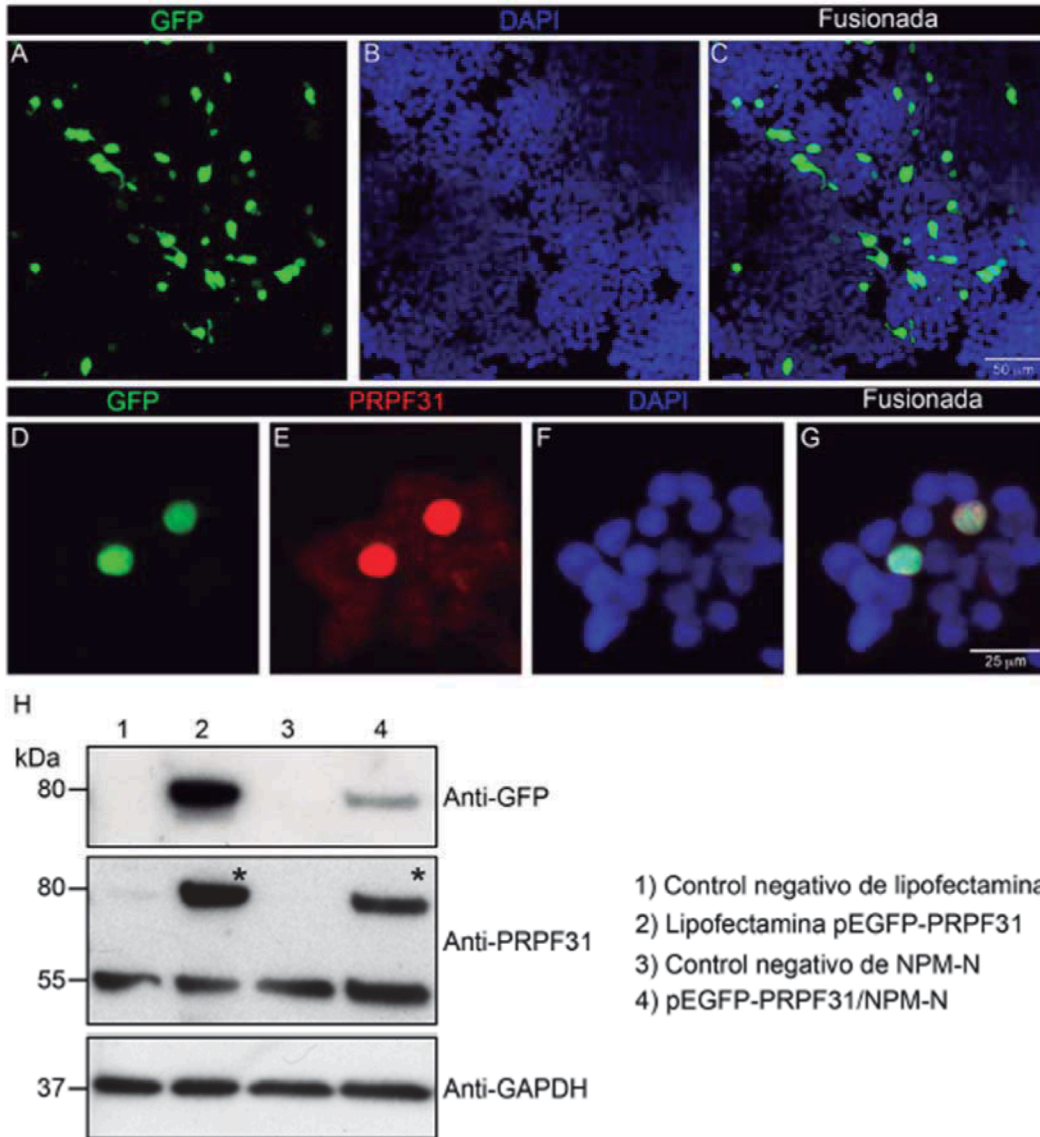


Figura 3.

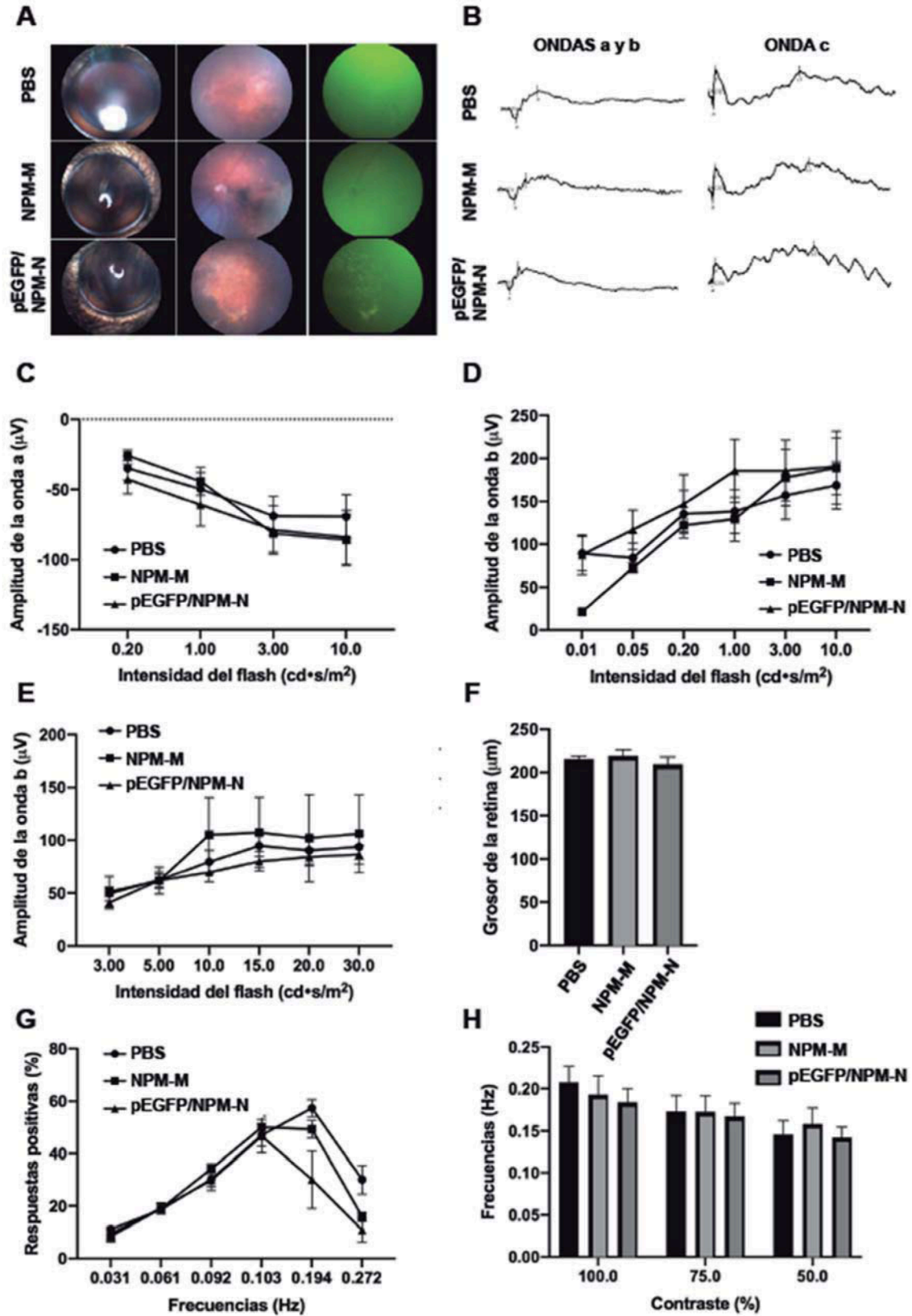
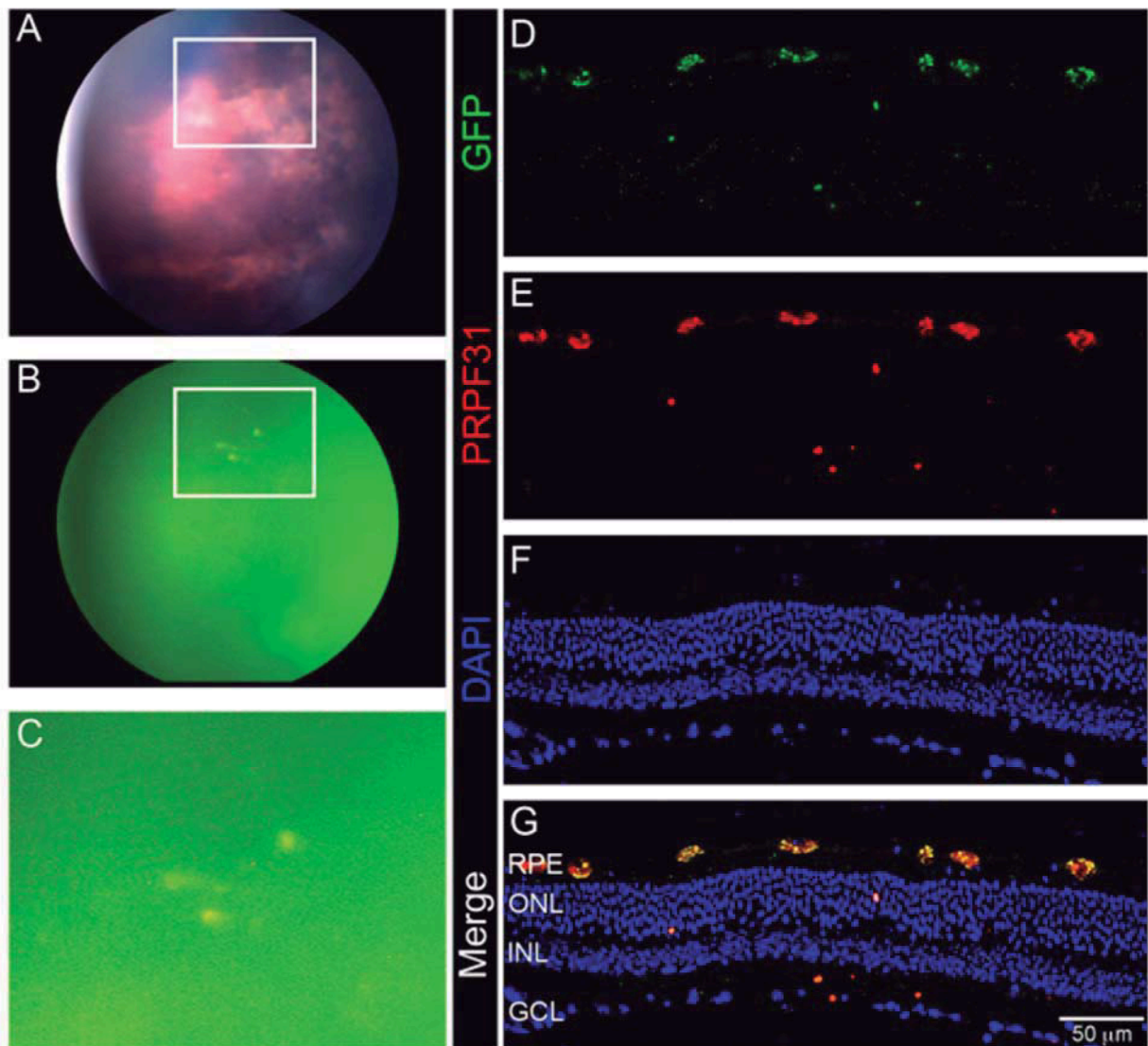


Figura 4.





- ②1 N.º solicitud: 202031290
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2020
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CHEANG TUCK-YUN <i>et al.</i> Promising plasmid DNA vector based on APTES-modified silica nanoparticles. Int. J. Nanomed. 2012, 30/11/2011, Vol. 7, Páginas 1061-1067, ISSN 1178-2013(print) ISSN 1176-9114(electronic), <DOI: doi:10.2147/IJN.S28267>. resumen; página 1062, columna izquierda, cuarto párrafo; página 1063, columna derecha, segundo párrafo; página 1064, columna derecha, segundo párrafo.	1, 2, 4-9, 14, 17-18
X	LI LI WENYI GU. <i>et al.</i> Amine functionalized SiO ₂ nanodot coated layered double hydroxide nanocomposites for enhanced gene delivery, Nano Research, 2014, Páginas 1-13 Recuperado de Internet <URL: www.theNanoResearch.com?www.Springer.com/journal/12274>, ISSN 1998-0124, <DOI: DOI 10.1007/s12274-014-0552-6>. resumen; página 2, columna derecha, segundo párrafo; página 3, columna izquierda.	1, 2, 4-9, 14, 17-18
X	SUN JIAN-GUO <i>et al.</i> Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for improving antiangiogenic therapy. International Journal of Nanomedicine 2019, 30/11/2018, Vol. 14, Páginas 1489-1501, ISSN 1178-2013(print) ISSN 1178-2013(electronic), <DOI: doi:10.2147/IJN.S195504>. página 1489; página 1490, columna derecha, tercer párrafo; página 1493, columna izquierda, primer párrafo; página 1494, columna izquierda último párrafo-columna derecha, primer párrafo; página 1496, columna izquierda, último párrafo; página 1496, columna derecha, último párrafo.	1, 4-9, 14, 17-18
X	CN 109044993 A (UNIV SOUTH CHINA TECH) 21/12/2018, (resumen) (en línea) (recuperado el 14/10/2021) recuperado de EPO EPDOC Database.	1, 16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.10.2021

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/3



- 21 N.º solicitud: 202031290
22 Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2020
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PARK JOO-HEE <i>et al.</i> The Effect of Silica Nanoparticles on Human Corneal Epithelial Cells. Scientific Reports NOV 23 2016, 23/11/2016, Vol. 6, Páginas Article No.: 37762, ISSN 2045-2322(print) ISSN 2045-2322(electronic), <DOI: doi:10.1038/srep37762>. resumen; páginas 1 y 5 a 7.	1-18
A	DE LA CERDA BERTA <i>et al.</i> PRPF31 delivery onto the retina using a nanoparticle system improves the visual acuity in a mouse model of retinal degeneration caused by A216P mutation in PRPF31 gene. IOVS JUN 2015, 31/05/2015, Vol. 56, Páginas 5412, ISSN 0146-0404(print) ISSN 1552-5783(electronic). Resumen.	1-18
A	PENSADO ANDREA <i>et al.</i> Span poly-L-arginine nanoparticles are efficient non-viral vectors for PRPF31 gene delivery: An approach of gene therapy to treat retinitis pigmentosa. Nanomedicine, Nanotechnology, Biology and Medicine ELSEVIER, NL. , 30/11/0002, Vol. 12, Páginas 2251 - 2260, ISSN 1549-9634, <DOI: doi:10.1016/j.nano.2016.06.007>. página 2252, columna derecha, tercer párrafo.	1-18

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.10.2021

Examinador
S. González Peñalba

Página
2/3



CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/88 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61K47/00 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

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

C12N, A61K, A61P

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

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