

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 764**

51 Int. Cl.:
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)
C12N 15/89 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01949436 .8**
96 Fecha de presentación: **26.06.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1297169**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Procedimiento para transfectar células usando un campo magnético**

30 Prioridad:
26.06.2000 EP 00113083
26.06.2000 US 214286 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2012

73 Titular/es:
ETHRIS GMBH (100.0%)
Lochhamerstrasse 11
82152 Martinsried , DE

72 Inventor/es:
PLANK, CHRISTIAN y
BERGEMANN, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 391 764 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para transfectar células usando un campo magnético.

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para transfectar una célula que comprende poner en contacto con una célula un complejo que comprende vector(es) que comprende(n) una o más moléculas de ácido nucleico y partícula(s) magnética(s) que están acopladas con uno o más oligo- o policationes u oligo- o polianiones mediante la aplicación de un campo magnético en el que dicha(s) partícula(s) magnética(s) y dicho(s) vector(es) se ensamblan en el complejo por agregación inducida por sal. La presente invención se refiere además a un complejo de este tipo, así como a procedimientos para prepararlo. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, usos y un kit.

La viabilidad del tratamiento génico depende en última instancia de la disponibilidad de vectores génicos eficaces. Los vectores génicos son vehículos usados para transportar una información genética deseada codificada por un ácido nucleico (ADN o ARN) a una célula diana y para que se exprese en ella. Los virus han desarrollado soluciones extraordinarias para este problema de transferencia génica. En consecuencia, los virus modificados genéticamente (recombinantes) se encuentran entre los vehículos más eficaces conocidos actualmente para la transferencia de información genética a células. Se han diseñado una multitud de especies víricas como vectores génicos, incluidos retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus herpes simplex, virus de hepatitis, virus vaccinia y lentivirus. En general, se elimina la información genética necesaria para el ciclo de duplicación natural de los virus del genoma vírico y se reemplaza con el/los gen(es) de interés que se supone que ejerce(n) algún efecto terapéutico en el caso de aplicaciones de tratamiento génico. Más recientemente, también se han usado virus capaces de duplicarse como vehículos de transferencia génica.

Como alternativa a los vectores génicos víricos, se han desarrollado vehículos para transferencia génica no víricos, sintéticos y semisintéticos durante la última década. La mayoría de estos vectores no víricos imitan características importantes de la entrada celular vírica para superar las barreras celulares frente a la infiltración de material genético exógeno. Entre estas barreras se encuentran la membrana plasmática, las membranas de las vesículas internas tales como endosomas y lisosomas y las membranas nucleares. Entre las funciones víricas imitadas en vectores no víricos están la capacidad de dirigirse a receptores, de unirse a ADN y de compactarse y de liberación intracelular desde vesículas internas. Estas funciones individuales están representadas en módulos sintéticos o semisintéticos que habitualmente se ensamblan mediante interacciones electrostáticas y/o hidrófobas para formar una partícula de vector. Con el fin de clasificar sistemáticamente los vectores génicos no víricos en función de su composición modular, se ha propuesto la nomenclatura siguiente (Feigner *et al.* 1997): Los lipoplexos son conjuntos de ácidos nucleicos con un componente lipídico, que habitualmente es catiónico. La transferencia génica por lipoplexos se llama lipofección. Los poliplexos son conjuntos de ácidos nucleicos con una entidad oligo- o policationica. Los complejos de ADN que comprenden ambas clasificaciones se llaman lipo-poliplexos o poli-lipoplexos. Se han descrito una gran variedad de combinaciones de este concepto general. Los ejemplos incluyen los complejos clásicos de lípido catiónico-ADN (Feigner y Ringold 1989), complejos de polication-ADN tales como poli(lisina)-ADN (Wu y Wu 1987), poli(etilnimina)-ADN (Boussif *et al.* 1995), dendrímero de poli(amidoamina)-ADN (Haensler y Szoka 1993), complejos de péptido catiónico-ADN (Planck *et al.* 1999), complejos de proteína catiónica-ADN (histonas, proteínas HMG) (Zenke *et al.* 1990). Frecuentemente, tales complejos de ADN se modifican adicionalmente para que contengan un resto marcador de células o marcador intracelular y/o un componente desestabilizador de la membrana tal como un virus inactivado (Curiel *et al.* 1991), una cápsida vírica o una proteína o péptido vírico (Fender *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1999) o un péptido sintético que altera la membrana (Wagner *et al.* 1992; Plank *et al.* 1994). Asimismo, se ha incluido el ácido nucleico que ha de transportarse en el lumen acuoso de liposomas (Nicolau y Cudd 1989), o se asocia el ADN condensado con policationes con una membrana lipídica (Gao y Huang 1996; Li *et al.* 1998). También se ha compuesto la membrana lipídica para que sea una quimera de membranas naturales derivadas de virus o células que contienen proteínas de membrana (por ejemplo, liposomas HVJ (Kaneda 1998)). Recientemente, también se han descrito bacterias (GrillotCourvalin *et al.* 1998) y fagos (Poul y Marks 1999) como lanzaderas para la transferencia de ácidos nucleicos a células. Aparte de estas composiciones de vector sofisticadas, también se sabe que el ADN desnudo es un agente de transfección útil en determinadas aplicaciones (Wolff *et al.* 1990). La precipitación de ADN con cationes divalentes se ha usado con éxito para la transfección de líneas celulares cultivadas durante más de 10 años (precipitación con fosfato de calcio (Chen y Okayama 1988)). Más recientemente, se ha descubierto que los protocolos de precipitación con fosfato de calcio también son útiles para potenciar la transferencia génica mediada por vectores tanto víricos como no víricos (Fasbender *et al.* 1998).

También pueden formularse vectores o ADN desnudo para lograr un efecto de liberación sostenida o liberación controlada. Con este propósito, pueden inmovilizarse ADN o vectores sobre/en o asociarse con materiales transportadores tales como colágeno (Bonadio *et al.* 1998), gelatina (Truong-Le *et al.* 1999) o adhesivo de fibrina. Asimismo, pueden incorporarse ADN o vectores en formulaciones de micro- y nanopartículas tales como en copolímeros como poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Shea *et al.* 1999) y composiciones similares o en nanopartículas preparadas a partir de quitosano (Roy *et al.* 1999).

Independientemente de lo eficaz que sea cualquiera de los procedimientos de transferencia génica en las aplicaciones seleccionadas, todos ellos padecen graves limitaciones en cuanto a su aplicabilidad general en el

tratamiento génico. Entre tales limitaciones, son llamativas las siguientes, en particular para tratamiento génico *in vivo*:

1. Especificidad de diana

a) En un extremo, posibilidad limitada de dirigir los vectores a células/órganos diana debido a la falta de un tropismo de célula diana específico y, como consecuencia, diseminación sistémica del vector, biodisponibilidad limitada en el sitio diana y la posibilidad de transfección inespecífica de células/órganos que no son diana.

b) En el otro extremo, un tropismo del huésped muy específico, que limita la posibilidad de aplicación de un vector a un espectro de dianas más amplio. Este problema prevalece para vectores víricos, en administración génica tanto *ex* como *in vivo*.

2. Inactivación rápida de vectores debida a interacciones no deseadas con componentes del medio *in vivo* antes de que el vector pueda encontrar su sitio diana. Ejemplos de interacciones no deseadas son la opsonización de vectores no víricos (Ogris *et al.* 1999) o interacciones de vectores con sistemas de defensa de los huéspedes tales como el sistema de complemento (Planck *et al.* 1996) o el sistema inmunitario (Kass-Eisler *et al.* 1996).

3. Concentración de vectores insuficiente en el sitio diana (Luo y Saltzman 2000).

Se han proporcionado soluciones parciales a estos problemas. Los tropismos de huéspedes de vectores víricos se han ampliado, reducido o redirigido mediante ingeniería genética de proteínas de superficie concretas que actúan como ligandos para receptores celulares (Kasahara *et al.* 1994; Michael *et al.* 1995), mediante el acoplamiento de ligandos dirigidos a superficies víricas (Curiel 1999), mediante coprecipitación de virus con fosfato de calcio (Fasbender *et al.* 1998) o mediante interacción electrostática con una molécula de unión a células inespecífica tal como un policatión (Fasbender *et al.* 1997). Las interacciones no deseadas con componentes del medio *in vivo* se reducen mediante la modificación del vector con moléculas tales como poli(etilenglicol) (O'Riordan *et al.* 1999; Ogris *et al.* 1999; Romanczuk *et al.* 1999; Finsinger *et al.* 2000). Se logran la mejora de la localización de la transferencia génica y una limitación de la diseminación sistémica mediante la aplicación tópica del vector en lugar de la aplicación sistémica, en último término en combinación con una formulación de liberación controlada (Rajasubramanian *et al.* 1994; Bonadio *et al.* 1998).

El documento WO9112079 describe un procedimiento para aislar macromoléculas usando perlas que pueden atraerse magnéticamente que no se unen específicamente a las macromoléculas.

El documento por Hughes C *et al.* (2001), Mol. Therap., vol. 3, n.º 4, pág. 623-630, describe que partículas paramagnéticas de estreptavidina proporcionan una opción de tres estrategias de captura basada en la afinidad y concentración magnética para vectores retrovíricos.

Sin embargo, sigue quedando un gran potencial por explotar para potenciar la especificidad de diana y/o para reducir la inactivación de vectores *in vivo*, en particular cuando debe abordarse una amplia variedad de dianas con una única técnica general.

Por tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado y medios adecuados para ello para potenciar la administración de genes a una población celular deseada. En un aspecto en particular, este problema técnico se refiere a un aumento de la concentración de un vector génico en un sitio diana por medios físicos. En otro aspecto más, el problema técnico subyacente a la presente invención se refiere a la provisión de un procedimiento de transfección con características de respuesta a dosis favorables y características cinéticas de transfección favorables para una transfección de alto rendimiento rápida.

Sumario de la invención

Este problema se ha resuelto mediante la provisión de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para transfectar una célula que comprende la etapa de poner en contacto con una célula un complejo que comprende (i) uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico y (ii) una o más partículas magnéticas que están acopladas con uno o más oligo- o policationes u oligo- o polianiones mediante la aplicación de un campo magnético adecuado en el que dicha(s) partícula(s) magnética(s) y dicho(s) vector(es) se ensamblan en el complejo por agregación inducida por sal.

La presente invención se basa en la observación de que la eficacia de la transfección de una célula se eleva significativamente cuando los vectores que se van a transfectar se enlazan a un resto sensible a la fuerza magnética de atracción y dicho vector se dirige a dicha célula mediante la aplicación de un campo magnético. El término "eficacia" se refiere a la tasa de transfección dentro de una unidad de tiempo dada. El aumento de la eficacia puede expresarse en términos de disminución del tiempo necesario para transferir una cantidad dada de vector a un número de células determinado y/o en términos de aumentar la cantidad de vector que se transfiere a un número de

células determinado en una unidad de tiempo dada. De forma ventajosa, en las reacciones de transfección que se llevan a cabo durante hasta 30 minutos, preferentemente durante hasta 20 min y lo más preferentemente durante hasta 10 min, la eficacia de la transfección aumenta en al menos dos veces, más preferido al menos 5 veces, aún más preferido al menos 10 veces, particularmente preferido al menos 20 veces y lo más particularmente preferido al menos 40 veces, cuando se aplica el procedimiento de la invención. Además, también pueden obtenerse aumentos de al menos dos veces al aplicar el procedimiento en transfecciones durante más de 30 min. De forma alternativa, puede expresarse la eficacia de la transfección en forma del perfil de dosis-respuesta de un vector dado. El término "perfil de dosis-respuesta" se refiere al grado de un efecto pretendido que puede lograrse por unidad de dosis de ácido nucleico (o virus o análogo de ácido nucleico) aplicada en un procedimiento con el fin de lograr un efecto de ese tipo. Para experimentos de transferencia génica, el término "perfil de dosis-respuesta" se refiere al nivel de expresión del gen transfectado que puede lograrse por unidad de dosis de ADN (o ARN o virus) aplicada en el experimento de transfección.

El término "vector" se refiere a entidades que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico que está(n) destinada(s) a ejercer una función deseada en una célula diana, preferentemente a expresar una información genética deseada. Tales entidades pueden ser vectores víricos o no víricos convencionales, así como bacterias o bacteriófagos. La(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) ser ADN o ARN o sus híbridos o cualquiera de sus modificaciones que se conozca en el estado de la técnica (para ejemplos de modificaciones véanse, p. ej., los documentos US 5525711, US 4711955, US 5792608 o EP 302175). Tal(es) molécula(s) de ácido nucleico es/son mono- o bicatenaria(s), lineal(es) o circular(es), natural(es) o sintética(s), y sin limitación de tamaño alguna. Por ejemplo, la(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARN antisentido, ribozimas o un ADN que codifica tales ARN o quimeroplastos (Colestraus *et al.* 1996). Preferentemente, dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico está(n) en forma de un plásmido o de ADN o ARN vírico. La(s) molécula(s) de ácido nucleico comprendida(s) en el vector también puede(n) ser oligonucleótido(s), en el/los que se incluye cualquiera de las modificaciones del estado de la técnica tales como fosfotioatos o ácidos nucleicos peptídicos (ANP).

Preferentemente, las moléculas de ácido nucleico comprendidas en los vectores son plásmidos, cósmidos, virus o bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que contienen una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, que codifica un polipéptido, que se quiere expresar en una célula diana. Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia génica o dirigido. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para la construcción de moléculas de ácido nucleico recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Además de un gen que se quiere expresar en la célula diana, las moléculas de ácido nucleico contenidas en los vectores mencionados anteriormente pueden comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula huésped adecuada y bajo condiciones adecuadas. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que se quiere expresar está enlazada de forma funcional a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procariontas o eucariotas. La expresión de dicha secuencia de nucleótidos comprende su transcripción en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que garantizan la expresión en células eucariotas, preferentemente células de mamíferos, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Habitualmente comprenden secuencias reguladoras que garantizan el inicio de la transcripción y, opcionalmente, una señal de poli-A que garantiza la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito, y/o un intrón que potencia adicionalmente la expresión de dicha secuencia nucleotídica. Elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales, y/o regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariontas comprenden, p. ej., el promotor PL, lac, trp o tac en *E. coli*, y ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 de levaduras o el promotor de CMV, SV40, RSV (virus del sarcoma de Rous), el potenciador del CMV, el potenciador del SV40 o un intrón de la globina de células de mamífero y otras células animales. Además de los elementos que son responsables de la iniciación de la transcripción, tales elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, corriente abajo de la secuencia de nucleótidos. Además, en función del sistema de expresión usado, pueden añadirse a la secuencia de nucleótidos secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo al medio y son bien conocidas en la técnica. La(s) secuencia(s) líder se ensamblan en fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción y, preferentemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de proteínas traducidas, o una de sus porciones, al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación C- o N-terminal que confiere características deseadas, p. ej., estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto, se conocen en la técnica sistemas de expresión adecuados tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), el pCDM8, el pRc/CMV, el pcDNA1, el pcDNA3, el sistema de clonación Echo™ (Invitrogen), el pSPORT1 (GIBCO BRL) o el pRevTet-On/pRevTet-Off o el pCI (Promega).

Preferentemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control

para huéspedes procariotas.

Como se menciona anteriormente, el vector usado en el procedimiento de la presente invención también puede ser un vector de transferencia génica o dirigido. El tratamiento génico, que se basa en la introducción de genes terapéuticos en células mediante técnicas *ex vivo* o *in vivo* es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia génica. En la literatura de describen vectores y procedimientos adecuados para tratamiento génico *in vitro* o *in vivo* y son conocidos por el experto en la técnica; véanse, p. ej., Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; el documento WO 94/29469; el documento WO 97/00957 o Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640, y las referencias citadas en ellos.

Por ejemplo, el vector útil en el procedimiento de la invención puede consistir en nada más que una o más de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, es decir, en el complejo usado para transfectar una célula, la(s) partícula(s) magnéticas(s) está(n) enlazadas sólo a una o más moléculas de ácido nucleico tales como, por ejemplo, ADN desnudo u oligonucleótidos. El ADN desnudo puede ser un agente de transfección útil en determinadas aplicaciones *in vivo* como describió por primera vez Wolff (1990).

Preferentemente, el vector comprende además de la(s) molécula(s) de ácido nucleico compuestos adecuados para facilitar la transfección de células y/o potenciar su eficacia. En particular, estos vectores se refieren vehículos no víricos, sintéticos o semisintéticos para transferencia génica. La mayoría de estos vectores no víricos imitan características importantes de la entrada celular vírica para superar las barreras celulares frente a la infiltración de material genético exógeno. Entre estas barreras se encuentran la membrana plasmática, las membranas de las vesículas internas tales como endosomas y lisosomas y las membranas nucleares. Entre las funciones víricas imitadas en vectores no víricos están la capacidad de dirigirse a receptores, de unirse a ADN y de compactarse, de liberación intracelular desde vesículas internas y de dirigirse al núcleo. Estas funciones individuales están representadas en módulos sintéticos o semisintéticos que habitualmente se ensamblan mediante interacciones electrostáticas y/o hidrófobas para formar una partícula de vector. En lo sucesivo, se hace referencia a los vectores génicos no víricos de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Feigner *et al.* (1997). En consecuencia, los vectores pueden contener, enlazados con la(s) molécula(s) de ácido nucleico, uno o más grupos funcionales capaces de promover la transferencia génica.

En una posibilidad y como una realización preferida de la invención, el vector puede comprender como un grupo funcional de este tipo uno o más componentes oligo- o policatiónicos para formar un poliplexo. Tales compuestos catiónicos pueden ser, por ejemplo, pero no exclusivamente, poli(lisina), poli(etilenimina) (PEI), dendrímeros de poli(amidoamina), quitosano, protamina, espermina y espermidina y sus derivados, péptidos catiónicos de unión a ADN o proteínas catiónicas tales como histonas. Otra posibilidad se refiere a un conjunto de la(s) molécula(s) de ácido nucleico con uno o más componentes lipídicos, preferentemente lipídicos catiónicos, para formar un lipoplexo. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen DOTAP, DMRIE, DOGS, DLRIE, DC-CHOL, GL-67, DOSPA por nombrar algunos, o sus formulaciones comercialmente disponibles tales como Lipofectamine, Transfectam, GenePorter o Fugene, por nombrar algunas (para revisiones, véanse (Lee y Huang 1997; Zabner 1997)). El vector también puede comprender componentes tanto oligo- o policatiónicos como lipídicos, que después forman un lipo-poliplexo o un poli-lipoplexo.

Además, el vector puede ensamblarse con una o más proteínas, preferentemente proteínas catiónicas, para formar, p. ej., complejos de proteína-ADN, por lo que la(s) proteína(s) puede(n) ser recombinante(s) o de origen natural. Los ejemplos incluyen HMG-1, histonas, protaminas y dominios de unión a gal-4. Los ejemplos de los vectores génicos no víricos identificados anteriormente incluyen complejos de lípido catiónico-ADN (Feigner y Ringold 1989), complejos de polición-ADN tales como poli(lisina)-ADN (Wu y Wu 1987), poli(etilenimina)-ADN (Boussif *et al.* 1995), dendrímero de poli(amidoamina)-ADN (Haensler y Szoka 1993), complejos de péptido catiónico-ADN (Planck *et al.* 1999), complejos de proteína catiónica-ADN (histonas, proteínas HMG) (Zenke *et al.* 1990).

Una posibilidad adicional de un vector no vírico es un liposoma, en el que se incluye(n) la(s) molécula(s) de ácido nucleico en el lumen acuoso como se describe en Nicolau (1989). Opcionalmente, puede(n) compactarse la(s) molécula(s) de ácido nucleico asociada(s) con membranas lipídicas por uno o más componentes (poli)catiónicos; véanse, por ejemplo, Gao (1996) o Li (1998), o por cationes divalentes. Opcionalmente, la membrana lipídica puede contener o estar enlazada a componentes no lipídicos tales como proteínas, hidratos de carbono o glucosaminoglucanos. Estos componentes pueden ser sintéticos o puede tomarse de fuentes naturales tales como membranas celulares o víricas, tales como por ejemplo en liposomas HVJ (Kaneda, 1998).

El vector comprendido en un complejo junto con partículas magnéticas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención también puede ser un vector vírico. Los ejemplos de tales vectores víricos incluyen, entre otros, adenovirus recombinantes, virus adenoasociados, retrovirus, virus herpes simplex, virus de hepatitis y lentivirus. La información genética necesaria para el ciclo de duplicación natural de un virus de este tipo puede eliminarse del genoma vírico y reemplazarse con el/los gen(es) de interés que, por ejemplo, ejerce(n) algún efecto terapéutico en el caso de aplicaciones de tratamiento génico. Sin embargo, el uso de virus capaces de duplicarse también se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

De forma alternativa, también pueden usarse virus o partes de ellos en asociación con cualquiera de los vectores no víricos descritos anteriormente, incluidos vectores que consisten sólo en moléculas de ácido nucleico tales como ADN desnudo. Para producir tales vectores que son una combinación de uno o más virus o parte(s) de ellos y un vector no vírico de otro modo, pueden usarse virus naturales o recombinantes, vivos o inactivados.

5 De acuerdo con la presente invención, el vector puede incluir adicionalmente moléculas efectoras que potencian la administración de genes y/o que facilitan la dirección intracelular de vectores génicos. Tales moléculas incluyen, entre otras, moléculas desestabilizadoras de la membrana o permeabilizadoras de la membrana tales como péptidos sintéticos, ligandos de receptores naturales o sintéticos, incluidos anticuerpos, o péptidos señal tales como péptidos señal de localización nuclear. Ejemplos adicionales de tales moléculas vienen dados por un virus inactivado (Curiel *et al.* 1991), una cápsida vírica o una proteína o péptido vírico (Fender *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1999) o un péptido sintético que altera la membrana (Wagner *et al.* 1992; Plank *et al.* 1994).

A cualquiera de los vectores descritos anteriormente, se le pueden añadir sales de cationes divalentes, en particular en solución, p. ej., cationes divalentes tales como cloruro de calcio o fosfato de calcio (precipitación con fosfato de calcio). Más recientemente, se ha descubierto que los protocolos de precipitación con fosfato de calcio también son
15 útiles para potenciar la transferencia génica mediada por vectores tanto víricos como no víricos (Fasbender *et al.* 1998).

Además, a cualquiera de los vectores descritos anteriormente se le pueden añadir o se le pueden enlazar covalentemente polímeros o copolímeros para la estabilización estérica y/o la minimización de la opsonización o la activación del complemento durante la fase de administración *in vivo*.

20 También pueden formularse los vectores usados en el presente documento para lograr un efecto de liberación sostenida o liberación controlada. Para este propósito, pueden incorporarse o encapsularse los vectores en formulaciones de micro- o nanopartículas tales como en copolímeros como poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Shea *et al.* 1999) (Cohen *et al.* 2000) o composiciones similares o en partículas, tales como nanopartículas, preparadas a partir de quitosano (Roy *et al.* 1999) o gelatina (Leong *et al.* 1998; TruongLe *et al.* 1998; Kalyanasundaram *et al.* 1999; Truong-Le *et al.* 1999), o alginatos (Quong y Neufeld 1999; Rowley *et al.* 1999) o biomateriales del estado de la técnica tales como los presentados en el 5th New Jersey Symposium on Biomateriales Science (Somerset, NJ, EE. UU.; 9-10 de nov. de 2000), o nanoesferas de difusión (Hirose *et al.* 2001) o en polímeros sol-gel (Gill y Ballesteros 2000) o en fases lamelares lipídicas y no lipídicas (Bailey y Sullivan 2000; Freund *et al.* 2000; Ponimaskin *et al.* 2000), o en hidrogeles (Petka *et al.* 1998). Además, los vectores descritos
30 anteriormente pueden inmovilizarse sobre/en o asociarse con materiales transportadores tales como colágeno (Bonadio *et al.* 1998), gelatina (Truong-Le *et al.* 1999) o adhesivo de fibrina, hidroxiapatitas naturales o sintéticas u otros biomateriales sintéticos. Tales partículas de liberación sostenida o liberación controlada pueden prepararse incorporando ya el/los vector(es) y/o la(s) partícula(s) magnética(s) al preparar la matriz polimérica.

También se encuentran dentro del alcance de la invención vectores que pueden ser bacterias (GrillotCourvalin *et al.* 1998) o fagos (Poul y Marks 1999), que recientemente se ha descrito que transfieren satisfactoriamente ácidos nucleicos a células.

El término "partícula magnética" se refiere a fases sólidas que responden magnéticamente que son partículas o sus agregados de tamaño en un intervalo de micro a nanómetros (preferentemente no mayores de 100 µm) que contienen uno o más metales o sus óxidos o hidróxidos, que reaccionan a fuerzas magnéticas después de la
40 influencia de un campo magnético, dando como resultado, preferentemente, una atracción hacia el origen del campo magnético o a la aceleración de la partícula en una dirección preferida del espacio. El término "magnético", como se usa en el presente documento se refiere a materiales magnéticos temporalmente, tales como materiales ferrimagnéticos o ferromagnéticos. El término, sin embargo, también engloba materiales paramagnéticos y superparamagnéticos. Algunas propiedades físicas de materiales de este tipo se han revisado en (Fahlvik *et al.* 1993).

Las partículas magnéticas son sintéticas, es decir, no pueden obtenerse a partir de una fuente biológica, lo que significa a partir de un organismo vivo. Las propiedades de las partículas magnéticas que han de usarse en el procedimiento de la presente invención deben ser tales que puedan asociarse con cualquiera de los vectores como se describe en el presente documento. Debido a que la asociación con vectores génicos puede lograrse mediante
50 una variedad de tipos de interacción o formulación galénica, no se imponen requisitos muy específicos en la composición, la forma y el tamaño de las partículas. Con respecto a la aplicación en administración de genes *in vivo*, preferentemente, las partículas y sus productos de degradación no inducen toxicidad sistémica. Las partículas de óxido de hierro están clínicamente aprobadas como agente de contraste en formación de imágenes de resonancia magnética nuclear. La farmacocinética y el perfil de toxicidad de las partículas de óxido de hierro se han descrito por (Weissieder *et al.* 1989). Además, dado que tales aplicaciones suelen requerir movilidad bajo condiciones espaciales altamente restringidas, el tamaño de partícula no debería ser mayor que un límite superior razonable.

En consecuencia, en una realización preferida del procedimiento, dichas partículas magnéticas tienen un tamaño (es decir, extensión máxima) de hasta 2000 nm, más preferido de hasta 1500 nm, incluso más preferido de hasta 1000 nm, particularmente más preferido de hasta 800 nm y lo más preferido de hasta 600 nm.

Las partículas que pueden asociarse con vectores génicos y que son útiles en la administración de genes se fabrican de uno o más materiales, incluidos compuestos ferro, ferri- o superparamagnéticos, tales como hierro, cobalto o níquel, óxidos de hierro magnéticos o hidróxidos tales como Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ u óxidos/hidróxidos dobles de hierro di- o trivalente con iones de otro metal di- o trivalente o mezclas de los óxidos o hidróxidos mencionados.

- 5 De acuerdo con el estado de la técnica (U. Schwertmann y R.M. Cornell, Iron Oxides in the Laboratory, VCH Weinheim 1991), las partículas de óxido/hidróxido de hierro coloidales magnéticas se preparan por precipitación a partir de una solución ácida de sales de hierro(II)/hierro(III) tras la adición de bases.

Las partículas magnéticas usadas en los ejemplos descritos más adelante se compraron de Chemicell, Berlín, Alemania. La preparación de tales partículas se divulga en el documento DE 196 24 426: Las partículas de óxido/hidróxido de hierro se derivan tras la adición de cantidades equivalentes de carbonatos alcalinos (hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de sodio y/o carbonato de amonio) a una solución ácida de sales de hierro(II)/hierro (III) seguido de oxidación térmica a hidróxido de hierro y posteriormente a óxido de hierro. El tamaño de partícula final puede ajustarse mediante control térmico de la velocidad de reacción y eligiendo concentraciones apropiadas de los reactivos. Así, se obtienen partículas de diámetro pequeño de 20 - 100 nm mediante la formación oportunamente separada de carbonato de hierro (II,III) a temperaturas de 1 - 50 °C, preferentemente de 5 - 10 °C y calefacción posterior. Se obtienen partículas más grandes de 100 - 1000 nm a temperaturas de reacción de 60 - 100 °C, lo que implica una transformación más rápida del carbonato de hierro (II,III) en hidróxido de hierro (II,III).

También pueden prepararse partículas magnéticas nanocrystalinas a partir de óxidos dobles o hidróxidos de hierro di- o trivalente con iones de metales di- o trivalentes distintos del hierro o mezclas de los óxidos o hidróxidos correspondientes de acuerdo con los procedimientos mencionados anteriormente usando una solución salina de los metales di- o trivalentes. Preferentemente, los óxidos dobles o hidróxidos magnéticos de hierro trivalente se preparan con iones de metales divalentes seleccionados de la primera fila de metales de transición (tales como Co(II), Mn(II), Cu(II) o Ni(II)), mientras que los óxidos dobles o hidróxidos magnéticos de hierro divalente se preparan, preferentemente, con iones de metales trivalentes tales como Cr(III), Gd(III), Dy(III) o Sm(III).

Las partículas magnéticas producidas de este modo pueden recubrirse con electrolitos cargados positivamente o negativamente, tales como fosfatos, citratos o aminas, con silanos (véanse los documentos US 4.554.088 y 4.554.089), ácidos grasos (véase el documento US 4.208.294) o polímeros, tales como polisacáridos (en el documento US 4.101.435), poliaminoácidos, proteínas o polímeros sintéticos (véase el documento DE 196 24 426). Estos compuestos de recubrimiento pueden tener grupos funcionales reactivos o derivatizables o pueden introducirse por modificación química después del procedimiento de recubrimiento. En este contexto, también se usa el término "acoplamiento" como sinónimo de "recubrimiento" con el fin de describir la presente invención.

Los grupos funcionales pueden tener propiedades de intercambio catiónico, tales como las que se encuentran los grupos xantato, xanturo, dicarboxilo, carboximetilo, sulfonato, sulfato, triacetato, fosfonato, fosfato, citrato, tartrato, carboxilato o lactato de polímeros naturales o sintéticos. De forma alternativa, pueden introducirse estos grupos funcionales en polímeros naturales y sintéticos antes de recubrir o después de recubrir partículas magnéticas. Ejemplos de polímeros naturales son polisacáridos, tales como almidón, dextrano, glucosaminoglucanos, agar, goma gatti o goma guar o sus análogos. Los derivados adecuados de polímeros sintéticos pueden ser a base de poli(alcohol vinílico) o poli(vinilpirrolidona) o poli(etilenglicol), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o poli(caprolactona). Proteínas como la caseína, el colágeno, la gelatina, la albúmina o sus derivados análogos también son compuesto de recubrimiento útiles. Otros ejemplos de polímeros adecuados con características de intercambio iónico son ácidos poliacrílicos, poli(ácido estirenosulfónico), poli(ácido vinilfosfórico) o ácido arábico polimérico, alginato, pectina o ácido poliaspártico o poliglutámico.

Los polímeros de intercambio aniónico portan en posición terminal o interna grupos de amina primaria o secundaria, imino o de amonio terciario o cuaternario, tales como grupos amino, alquilamina, dietilaminoetilo, trietilaminoetilo o trimetilbencilamonio. De nuevo, estos polímeros pueden ser de origen natural o sintético y los grupos funcionales catiónicos pueden ser inherentes o pueden injertarse mediante procedimientos sintéticos antes o después del recubrimiento de las partículas magnéticas. Los ejemplos incluyen polisacáridos, proteínas o polímeros sintéticos y sus derivados, tales como quitosano, poli(lisina), poli(etilenimina), poli(amina), poli(dialildimetilamonio) o poli(vinilpiridina).

Los grupos funcionales para acoplamiento covalente pueden ser inherentes a tales polímeros o se pueden introducir mediante procedimientos sintéticos bien conocidos para un experto en la técnica de la química sintética. Son ejemplos los grupos aldehído, diazo, carbodiimida, diclorotriazina, halogenuro de alquilo, carbonato de imino, carboxilo, amino, hidroxilo o tiol.

Las partículas magnéticas para su uso en el procedimiento de la invención se acoplan con uno o más oligo- o policationes u oligo- o polianiones.

En una realización preferida, dicho oligo- o polication u oligo- o polianión es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en poli(etilenimina) (PEI), PEI-estreptavidina, PEI-biotina, almidón-fosfato, ácido poliaspártico, ácido poliacrílico, ácido poliacrílico-co-maleico y ácido arábico. La PEI, así como otros compuestos mencionados por su

utilidad para recubrir las partículas magnéticas se pueden modificar. Los ejemplos incluyen PEI-etoxilada (siendo etoxilada una monocapa de PEI que recubre la partícula magnética), PEI-epiclorhidrina (PEI modificada con epiclorhidrina) o PEI-dodecil sulfato (PEI modificada mediante un acoplamiento covalente de dodecilsulfato de sodio (SDS) por activación de carbodiimida (N-etil-N'-(dimetilaminopropil)-carbodiimida).

5 El término "complejo" usado en el contexto del procedimiento de la presente invención se refiere a una entidad finita que comprende uno o más vectores y una o más partículas magnéticas como se define anteriormente en el presente documento, que son adecuadas para su puesta en contacto con células con el fin de transfectarlas. La proporción de vector y partículas magnéticas en un complejo puede variar y depende principalmente de las cantidades de vector y partículas magnéticas mezcladas al preparar el complejo.

10 El término "transfección" se refiere a un procedimiento de introducción de una o más moléculas de ácido nucleico en una célula. De este modo, "transfección" engloba todo tipo de técnicas para la introducción de moléculas de ácido nucleico en células conocidas en la técnica anterior, incluidas también, por ejemplo, transducción, transformación y similares. Preferentemente, dichas una o más moléculas de ácido nucleico son exógenas a la célula. El término "exógeno" puede referirse a moléculas de ácido nucleico que no forman parte del genoma de la célula ni de ninguna
15 otra molécula de ácido nucleico que esté presente en la célula antes de dicha transfección, tales como ADN extracromosómico, plásmidos, cósmidos o cromosomas artificiales. Asimismo, el término "exógeno" puede referirse a moléculas de ácido nucleico que son al menos parcialmente homólogas con respecto a la célula diana, aunque aparecen en el vector en un entorno molecular diferente de los naturales de la célula. Tales moléculas de ácido nucleico homólogas incluyen, p. ej., construcciones de sobreexpresión o antisentido. El término "magnetofección" como se usa en relación con la presente invención se refiere a la transfección usando complejos de partícula(s)
20 magnéticas(s) y vector(es) como se describe en el presente documento, preferentemente, implicando la aplicación de un campo magnético.

El término "célula" se refiere a cualquier célula procariota o eucariota, preferentemente a células de mamífero, lo más preferentemente a células humanas. Si las células se originan a partir de organismos pluricelulares, pueden transfectarse dichas células en su tejido original o la transfección tiene lugar *in vitro*, es decir, las células están fuera
25 del organismo, preferentemente fuera del tejido y lo más preferentemente en cultivo celular, tal como células primarias recién aisladas o líneas celulares inmortalizadas o tumorales. En principio, no existen limitaciones en cuanto al tamaño, la forma y la composición de dicho complejo, aparte de las características de que comprendan vector(es) y partícula(s) magnética(s) y de que sean adecuados para su puesta en contacto con las células. La expresión "poner en contacto con las células" significa que se pone un complejo tan próximo a una célula que puede tener lugar la transfección, es decir, que es posible el paso a través de la membrana plasmática. Esta expresión también significa aumentar localmente la presencia de dichos complejos dentro del alcance de las células que se van a transfectar, que de otro modo, en ausencia de un campo magnético adecuado, difundirían y, por lo tanto, tendrían una concentración notablemente más baja dentro del alcance de las células diana. El término "alcance" se refiere al espacio que rodea a las células, desde donde las células son accesibles para los vectores para la
35 transfección.

De acuerdo con el procedimiento de la invención, pueden entrar en la célula el complejo entero o sólo una parte de él, que contiene al menos la(s) molécula(s) de ácido nucleico o el vector pero que está desprovista de la(s) partícula(s) magnética(s). Por tanto, la incorporación celular de la(s) partícula(s) magnética(s) puede estar o no
40 incluida en dicho procedimiento. En el último caso, el enlace entre partícula(s) magnética(s) y vector(es) se puede diseñar reversible.

La(s) partícula(s) magnética(s) y el/los vector(es) se ensamblan en dicho complejo por agregación inducida por sal.

La preparación de los complejos que comprenden una o más partículas magnéticas y uno o más de los vectores descritos anteriormente puede lograrse mediante procedimientos de agregación inducida por sal adecuados
45 comunes para el experto en la técnica y disponibles a partir de la literatura. Preferentemente, con respecto a la preparación de algunos de los complejos posibles, puede usarse cualquiera de los siguientes procedimientos de mezcla.

Por ejemplo, puede prepararse un complejo en el que el vector es ADN desnudo mediante la adición de dicho ADN desnudo a partículas magnéticas catiónicas.

50 Puede prepararse un complejo que comprende un vector de poli- o lipoplexo mediante la adición, en primer lugar, de ADN desnudo a partículas magnéticas catiónicas o aniónicas, seguida de la adición de los policationes o polianiones o lípidos catiónicos o aniónicos adecuados. De forma alternativa, pueden obtenerse tales complejos mediante la preparación, en primer lugar, de un poli- o lipoplexo, es decir, mediante la adición de ADN desnudo a policationes o lípidos catiónicos, seguida de la adición de partículas magnéticas catiónicas o aniónicas. Otro procedimiento para
55 obtener complejos que comprenden un lipoplexo es a través de la preparación intermedia de liposomas. En consecuencia, se incorporan partículas magnéticas catiónicas o aniónicas en liposomas catiónicos, aniónicos o neutros, lo cual va seguido por la adición de ADN desnudo o cualquier tipo de vector descrito en el presente documento.

Para el ensamblaje del vector, se aprovecha el procedimiento de agregación inducida por sal, un fenómeno bien conocido en la ciencia de coloides (Hiemenz 1986): Los sistemas coloidales con superficies cargadas tienen a agregarse (flocular) debido a la sobrecompensación de fuerzas de repulsión (electrostáticas) por fuerzas de atracción tras el aumento de la fuerza iónica. Para los vectores génicos descritos en el presente documento, esto no requiere nada más que mezclar los componentes en un disolvente que contenga sal o mezclarlos en disolventes sin sal, seguido de la adición de sal.

Preferentemente, puede aplicarse a un complejo de este tipo un componente o efector adicional, tal como mediante la incorporación de un adenovirus del que se ha eliminado E1A, biotinilado, químicamente inactivado o un péptido desestabilizador de la membrana (divulgado en el documento US 5.981.273). De forma similar, pueden conectarse las partículas magnéticas con los vectores usando interacciones antígeno-anticuerpo. El procedimiento de la presente invención comprende la aplicación de un campo magnético adecuado. La expresión "campo magnético adecuado" se refiere a campos magnéticos que, en cuanto a la forma del campo y su fuerza, son adecuados para atraer los complejos descritos anteriormente en contra de otras fuerzas que actúan sobre los complejos, tales como fuerzas de difusión o hidrodinámicas. Si, por ejemplo, se van a transfectar células en cultivo que están diseminadas por todo el fondo de una placa de cultivo, un campo magnético adecuado sería un campo que conduzca a los complejos hacia el fondo. Si, en ese caso, se aplica un campo heterogéneo, que, por ejemplo, sólo afecta a una parte de las células, sólo se transfectarán aquellas células de la placa por las que pase a través un campo de intensidad lo suficientemente alta. Los campos magnéticos adecuados, preferentemente cuando se aplican *in vivo*, tienen una intensidad de más de 0,5 Tesla, preferentemente de más de 1 Tesla. Para aplicar el procedimiento descrito en el presente documento *in vivo* a una determinada región del organismo, se dirige un campo magnético heterogéneo a dicha región, de forma que los complejos puedan aumentar su presencia allí. Para acelerar partículas superparamagnéticas, como se menciona en el presente documento, en una dirección deseada del espacio, se aplican campos magnéticos en gradiente (Zborowski *et al.* 1995). La teoría física de la actuación de la fuerza magnética sobre partículas superparamagnéticas y similares de fluidos puede encontrarse en libros de texto tales como L.D. Landau *et al.* (The Field Theory. vol 2, Moscú, Nauka (1973), 128-136) o en publicaciones tales como Zborowski *et al.* 1995.

Una realización preferida se refiere al procedimiento de la presente invención, en el que dicho campo magnético es un campo magnético permanente o un campo electromagnético.

El término "campo permanente" se refiere a campos magnéticos generados por un imán permanente. Los ejemplos de imanes permanentes adecuados incluyen imanes de alta energía, permanentes, p. ej., fabricados de materiales que contienen neodimio, o imanes como los que se usan en los ejemplos adjuntos. Con el fin de adaptar la geometría de la región diana, pueden construirse tales imanes permanentes como matrices, como yugo y trayectoria de retorno magnético o en configuraciones de apertura o sándwich. Puede controlarse la intensidad con un instrumento de medida adecuado tal como una sonda Hall.

El término "campo electromagnético" se refiere en el contexto de la presente invención a campos magnéticos generados por corriente eléctrica. Los ejemplos aplicables incluyen tomógrafos de resonancia magnética nuclear. Los dispositivos de este tipo pueden ser al mismo tiempo útiles para generar el campo y para diagnosticar, supervisar y documentar la distribución y el aumento local de la presencia de los complejos aplicados.

Una realización preferida adicional se refiere al procedimiento de la invención, en el que dicho campo electromagnético oscila.

El término "oscila" se refiere a campos magnéticos que cambian de dirección periódicamente. Tal oscilación puede inducir energía cinética en los complejos que puede ser útil en casos donde los vectores deberían liberarse del complejo y el movimiento promueve su difusión. Por ejemplo, puede usarse oscilación de alta frecuencia en el intervalo de kHz a GHz para inducir una hipertermia local con el fin de apoyar, p. ej., un tratamiento génico antitumoral. Se han usado clínicamente campos electromagnéticos pulsátiles débiles de baja frecuencia (1 - 250 Hz; 4 - 10 mT) para la curación de huesos (Gossling *et al.* 1992; Rubin *et al.* 1993). Los efectos fisiológicos a escala molecular, así como macroscópica, están bien documentados (Trock 2000). Se ha demostrado una influencia sobre los niveles de calcio intracelular en cultivo celular (Carson *et al.* 1990). Dado que el tratamiento con campo electromagnético pulsátil (CEMP) también mejora el suministro de sangre, por ejemplo, en tejido hipoxémico, puede usarse de forma ventajosa con la aplicación de dicho complejo.

El procedimiento de la presente invención como se describe anteriormente en detalle constituye una importante mejora con respecto a los procedimientos de transfección de la técnica anterior en cuanto a aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. En los experimentos que se documentan en los ejemplos adjuntos, se descubrió sorprendentemente que, bajo la influencia de un campo magnético, los vectores que están en un complejo con partículas magnéticas se transfieren a células con una eficacia significativamente potenciada. La fuerza de atracción de un campo magnético promueve al menos el enriquecimiento de la concentración de vectores en la región que rodea a las células diana, lo que por sí solo pueden contribuir a la potenciación de la eficacia de la transfección. Sin embargo, el ejemplo 20 proporciona pruebas de que el campo magnético puede promover la transfección más allá de concentrar un vector en la región que rodea a las células diana, p. ej., introduciendo a la fuerza un vector en la célula diana.

Se mostró potenciación para cada tipo de vector probado hasta ahora. Los ejemplos 2 y 24-27 describen la aplicación con éxito del procedimiento de la invención usando lipoplexos o liposomas. El ejemplo 4, muestra lo mismo para poliplexos, donde los poliplexos estaban equipados adicionalmente con un copolímero protector. Los ejemplos 5 y 6 describen experimentos con complejos a base de poliplexos que están asociados además con adenovirus inactivados.

Por ejemplo, la transfección con lipoplexos o liposomas como se muestra en el ejemplo 2, dio como resultado al menos un aumento de dos veces de la transfección mediante la aplicación de un campo magnético en comparación con la configuración experimental sin campo magnético correspondiente. En estos experimentos, se demostró que el mayor aumento fue de 43 veces y se obtuvo para la dilución más alta de liposomas que contienen ADN y partículas magnéticas. El hecho de que en el ejemplo 2 las diluciones más altas siempre produjeran el mayor aumento relativo puede interpretarse como prueba de que el efecto positivo del campo magnético se basa esencialmente en un enriquecimiento local de los vectores cerca de las células diana.

Los datos presentados en el presente documento obtenidos en experimentos de transfección *in vitro* pueden transferirse directamente a condiciones *in vivo*. Los experimentos con animales descritos en el ejemplo 17 demostraron con éxito que la magnetofección mejora la expresión génica dirigida en un sitio deseado del organismo, es decir, tejido u órgano. Como se esperaba, un enriquecimiento local de vectores de administración génica en la región deseada del organismo dará lugar a un aumento de la eficacia de la transfección en el tejido u órgano correspondiente. Además, es posible que la magnetofección no sólo potencie la transferencia de genes a células, sino que también facilite la transferencia de genes que no se produciría en ausencia de un campo magnético. Se contempla además que el uso del complejo de la invención *in vivo*, como por ejemplo en tratamiento génico, que permite la localización específica de vectores principalmente en cualquier región del organismo deseada, supera muchas de las limitaciones relacionadas con los procedimientos convencionales de tratamiento génico, analizadas anteriormente. Un obstáculo principal era la disponibilidad limitada de especificidad de diana para los vectores de tratamiento génico, p. ej., debido a la ausencia de marcadores moleculares adecuados para dirigirse a una región del organismo deseada. Con las provisiones de la presente invención, se supera este obstáculo, ya que, debido a la neutralidad de los tejidos biológicos en cuanto a los campos magnéticos, en principio, cualquier región del organismo deseada puede ser el diana de la localización específica de vectores y de la transfección en ella. Como consecuencia, el complejo de la invención es muy adecuado para reducir otra limitación que es el resultado de la inactivación rápida de vectores bajo condiciones *in vivo*. El enriquecimiento localizado específicamente en los sitios deseados reduce el periodo de tiempo promedio que, por ejemplo, debe permanecer un vector dirigido molecularmente en el aparato circulatorio sanguíneo hasta que alcanza su diana. Por consiguiente, se reduce el tiempo durante el cual un vector de este tipo es accesible a los mecanismos de inactivación. Este tiempo se reduce adicionalmente por medio de la potenciación de la eficacia de transfección, lo que se expresa, sobre todo, mediante una transferencia más rápida a la célula.

La presente invención puede considerarse en el marco de la evolución de los avances en la administración de fármacos clásica, donde un régimen de localización de fármacos recientemente redescubierto es su inmovilización sobre una partícula magnética y la concentración en un lugar en particular del organismo del "paciente" mediante un campo magnético (Lübbe *et al.* 1996; Lübbe *et al.* 1996; Babincova *et al.* 2000). A partir de la técnica anterior se conocen algunos enfoques donde se usaban partículas magnéticas en relación con procedimientos de transfección. Entre los investigadores se conocen bien las perlas "Dynabeads" (Dyna, Hamburgo, Alemania), que se usan comúnmente para la separación de biomoléculas y células basándose en interacciones de tipo receptor-ligando bajo la influencia de un campo magnético. Más recientemente, se han aprovechado tales partículas en la administración de genes, aparentemente creando orificios en membranas celulares mediante fuerzas mecánicas, facilitando así la transfección (Bildirici *et al.* 2000). En un enfoque adicional, se ha adsorbido ADN desnudo a partículas magnéticas mediante interacción electrostática y partículas magnéticas y, en consecuencia, se ha introducido por electroporación en células CIK con el diana de una separación subsiguiente de las células transfectadas y no transfectadas mediante un campo magnético (Bergemann *et al.* 1999). Está comercialmente disponible un kit para la separación de células transfectadas y no transfectadas con la ayuda de partículas magnéticas de Miltenyi, Alemania (<http://www.miltenvibiotec.com>). El principio técnico es coexpresar un antígeno de superficie celular junto con el gen de interés y después usar partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo específico que reconoce este antígeno para unir tales células y separarlas de las no transfectadas (Padmanabhan *et al.* 1993). En una reciente reunión de expertos, se informó de la incorporación de orgánulos bacterianos magnéticos, los llamados magnetosomas, en complejos de lípido catiónico-ADN y la administración génica con éxito (Reszka *et al.* 2000). Asimismo, se han asociado microesferas magnéticas con virus adenoasociados (VAA), proporcionando características de transferencia génica favorables (Mah *et al.*, resumen del póster en: Mol. Therapy 1(5) (2000), p. S239).

Sin embargo, en ninguno de los enfoques mencionados se aplicó un campo magnético durante la transfección. Por tanto, no pudieron percibirse las sorprendentes ventajas con respecto a la potenciación de la eficacia de la transfección y, opcionalmente, de la localización específica en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, de las que se informa en relación con la presente invención. Además, en cuanto al enfoque de magnetosomas, puede preverse que la aplicabilidad comercial y rutinaria de este avance se verá afectada por la difícil disponibilidad de los magnetosomas, mientras que las partículas magnéticas usadas en el procedimiento de la invención están disponibles de forma en principio ilimitada a costes de producción bajos.

El procedimiento de la invención se aplica *in vitro*.

La definición del término "*in vitro*" ya se ha dado anteriormente. La realización preferida incluye también aplicaciones "*ex vivo*" en el sentido de que las células transfectadas (transducidas) de acuerdo con el procedimiento de la invención con una molécula de ácido nucleico recombinante se (re)implantan después en dicho sujeto.

5 Otra realización preferida de la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, que se aplica *in vitro* para transfección y transducción de alto rendimiento. Por tanto, la presente invención se refiere además al uso de las partículas magnéticas y/o complejos mencionados anteriormente para la transfección de células en un ensayo de alto rendimiento. En particular, dicha transfección implica la aplicación de un campo magnético. La realización preferida incluye la automatización del procedimiento para propósitos tales como, entre otros, el rastreo de genes de alto rendimiento. El término rastreo de genes "de alto rendimiento" se refiere a procedimientos donde se llevan a cabo varias transfecciones, preferentemente en paralelo y preferentemente de manera automatizada, con el fin de identificar o asignar una función a secuencias de ácidos nucleicos conocidas o desconocidas o con el fin de seleccionar entre secuencias de ácidos nucleicos conocidas o desconocidas aquellas que ejercen una función en particular cuando se introducen en una célula. La función en particular puede ser ejercida mediante la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos en la célula transfectada, pero también mediante otros mecanismos como consecuencia de la presencia del ácido nucleico en la célula, tales como, entre otros, de ribozimas o acción antisentido. Tales secuencias de ácidos nucleicos pueden representarse, pero no exclusivamente, en colecciones de ADNc, colecciones de expresión víricas y no víricas, colecciones de fagos o colecciones bacterianas.

20 En relación con esta realización, pero también aplicable para otras realizaciones descritas en el presente documento, pueden usarse las partículas magnéticas para aislar y/o purificar y/o concentrar moléculas de ácido nucleico, vectores o complejos antes de la transfección. Un procedimiento de este tipo implica la aplicación de partículas magnéticas para unir las moléculas de ácido nucleico, vectores o complejos y separarlos del medio circundante mediante la aplicación de un campo magnético, seguido del uso de estos materiales purificados para magnetofección. Se han descrito procedimientos similares de aislamiento, purificación y concentración para el aislamiento, p. ej., de plásmidos, productos de PCR o ARNm y son conocidos por los expertos en la técnica (véase por ejemplo, la página de Internet <http://www.dynalbiotech.com>).

El complejo de la invención puede formularse para administración *in vivo*.

El término "*in vivo*" se refiere a cualquier aplicación que se efectúa en el cuerpo de un organismo vivo en el que dicho organismo es pluricelular, preferentemente un mamífero y lo más preferentemente un ser humano.

30 En consecuencia, la etapa de poner el complejo en contacto con una célula puede ir precedida de la administración de dicho complejo en forma farmacéuticamente aceptable a un sujeto.

El término "administrar" engloba cualquier procedimiento adecuado para introducir el complejo en el organismo de un sujeto de forma que el complejo sea manejable después en su interior. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse de diferentes maneras, p. ej., mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal, intrabronquial u oral.

40 El término "forma farmacéuticamente aceptable" quiere decir que el complejo se formula como una composición farmacéutica, en la que dicha composición puede comprender además un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Pueden formularse composiciones que comprenden tales vehículos por procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado y los factores clínicos. Como se conoce bien en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier sujeto dependen de muchos factores, incluidos la talla del sujeto, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto concreto que se ha de administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Una dosis típica de sustancias activas puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 ng a varios gramos. Aplicado al tratamiento génico, la dosificación de ácido nucleico para la expresión o la inhibición de la expresión debería corresponder a este intervalo; sin embargo, se contemplan dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente teniendo en cuenta los factores mencionados anteriormente. En general, el régimen como administración regular de la composición farmacéutica debería estar en el intervalo de unidades de 1 µg a 10 mg al día. Si el régimen es una infusión continua, también debería estar en el intervalo de unidades de 1 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal, respectivamente. Se puede monitorizar el progreso por una evaluación periódica. Las dosificaciones variarán, pero una dosificación preferida para la administración intravenosa de ADN es desde aproximadamente 10^6 hasta 10^{19} copias de la molécula de ADN. Las composiciones de la invención se pueden administrar localmente o sistémicamente. Preferentemente, la administración será por vía parenteral, p. ej., por vía intravenosa, aunque la formulación para otros modos de administración se encuentra dentro del alcance de la invención; también puede administrarse ADN directamente al sitio diana, p. ej., mediante un catéter a un sitio en una arteria. La administración puede producirse también, por ejemplo, mediante inyección directa en un tumor. También se encuentra dentro del alcance de la invención la formulación para administración por aerosolización o

nebulización. Las preparaciones para administración parenteral incluyen emulsiones, suspensiones y soluciones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluidos medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en la dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica puede comprender otros agentes tales como interleucinas o interferones en función del uso previsto de la composición farmacéutica.

Cuando se usa el complejo de la invención *in vivo*, puede aplicarse el campo magnético a una región del organismo donde dicho(s) vector(es) tendrán un efecto. Con ese propósito, puede usarse cualquiera de los imanes mencionados anteriormente que son adecuados para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

La presente invención se refiere además al uso del complejo de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, tratar o vacunar contra una enfermedad mediante la administración de un vector terapéuticamente útil, es decir, un vector que tiene un efecto terapéuticamente útil, que comprende una o más moléculas de ácido nucleico en un sujeto, implicando dicha prevención, tratamiento o vacunación la transfección de células con el/los vector(es) presente(s) en dicho complejo por medio de la aplicación de un campo magnético adecuado.

La expresión "vector(es) que tiene(n) un efecto terapéuticamente útil" se refiere a cualquiera de los vectores definidos anteriormente en los que la función deseada que ejercen es terapéuticamente útil. En particular, dicho efecto lo presenta(n) la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprendida(s) en dicho vector. Un efecto de este tipo lo puede llevar a cabo cualquiera de la(s) molécula(s) de ácido nucleico definida(s) anteriormente en el presente documento, tales como oligonucleótidos, ARN antisentido, ribozimas o secuencias codificantes capaces de dar lugar a la expresión de una proteína o (poli)péptido terapéuticamente útil. Los expertos en la técnica conocen las secuencias nucleotídicas correspondientes, así como medios y procedimientos para combinarlas, en caso necesario, con elementos de secuencia que permiten la transcripción y/o la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en la célula diana. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para la construcción recombinante de tales moléculas de ácido nucleico; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989). En la literatura se describen vectores y procedimientos de tratamiento génico adecuados y el experto en la técnica puede adaptarlos para aplicar el procedimiento correspondiente de la presente invención; véanse, p. ej., Giordano, Nature Medicine 2, (1996), 534-539; Schper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; el documento WO 94/29469; el documento WO 97/00957 o Scharper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640, y las referencias citadas en ellos.

Puede usarse el complejo de la invención en un procedimiento de tratamiento que comprende

- (a) la etapa del procedimiento de la presente invención, en la que dicho(s) vector(es) tiene(n) un efecto terapéuticamente útil y en la que la transfección de dichas células tiene lugar *ex vivo*; y
- (b) administrar dichas células transfectadas a un sujeto.

El término "*ex vivo*" se refiere a cualquier procedimiento de tratamiento génico en el que se transfectan células *in vitro* con la intención de administrar las células transfectadas a un sujeto. Las definiciones relativas a "vector(es) que tiene(n) un efecto terapéuticamente útil" e "*in vitro*" ya se dan anteriormente. La administración de las células transfectadas se puede lograr mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. Para este fin, pueden mezclarse las células con vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se define anteriormente.

Preferentemente, el procedimiento de tratamiento anterior comprende las etapas (a) y (b) y además la etapa

- (c) aplicar un campo magnético adecuado a la región del organismo donde tendrán un efecto dichas células transfectadas *ex vivo*; en la que se han incorporado partículas magnéticas a las células durante la transfección.

El complejo de la presente invención abre la posibilidad de aplicar el efecto de enriquecimiento local en un organismo también al tratamiento génico *ex vivo*. Con el fin de aplicar esta característica, deben incorporarse las partículas magnéticas del complejo en las células, una condición que se engloba, aunque no de forma inherente, en el procedimiento de la presente invención. Para incorporarse, las partículas magnéticas deberían tener un tamaño que no exceda del intervalo bajo de los micrómetros, preferentemente no deberían ser mayores de 1000 nm. La aplicación del campo magnético se puede llevar a cabo como se describen anteriormente para el tratamiento génico *in vivo*.

- 5 En una realización adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un complejo útil para transfectar una célula, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de enlazar uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico y una o más partículas magnéticas que se acoplan con uno o más oligo- o policationes u oligo- o polianiones, en el que los componentes de dicho complejo se ensamblan por agregación inducida por sal.
- Para llevar a cabo este procedimiento, se da anteriormente toda la información necesaria al experto en la técnica, donde se describe el complejo y, en particular, los vectores, las partículas magnéticas y los modos de enlazarlos, en relación con el procedimiento de transfección de la invención.
- 10 Además, una realización de la invención se refiere a un complejo útil para transfectar una célula, comprendiendo dicho complejo
- (a) uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico; y
- (b) una o más partículas magnéticas que se acoplan con uno o más oligo- o policationes u oligo- o polianiones;
- 15 en el que dicha(s) partícula(s) magnética(s) y dicho(s) vector(es) se ensamblan en el complejo por agregación inducida por sal o pueden obtenerse mediante el procedimiento para su preparación como se describe anteriormente.
- Dicho complejo corresponde a cualquiera de las características dadas anteriormente con respecto al complejo, así como a los vectores y partículas magnéticas comprendidos en relación con el procedimiento de transfección de la presente invención.
- 20 La invención se refiere en una realización adicional a una composición farmacéutica que comprende el complejo de la invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- Las características de la composición farmacéutica ya se dan al definir el término "forma farmacéuticamente aceptable". Además, la composición farmacéutica de la invención puede estar preferentemente en una forma liofilizada, opcionalmente mezclada con un azúcar, tal como sacarosa o dextrosa, en una cantidad que proporciona una solución lista para usar con una concentración fisiológica. La composición también puede estar en forma de un crioconcentrado o una solución enfriada.
- 25 El uso mencionado anteriormente del complejo de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica se refiere a la administración de un vector terapéuticamente útil a un sujeto.
- El término "administración" se refiere a la introducción de un vector terapéuticamente útil en un sujeto por medio de la administración del vector directamente o a través de la transfección de células *in vitro* y la aplicación de las células al sujeto, de acuerdo con la aplicación *in vivo* y *ex vivo* del complejo de la invención descrita anteriormente.
- 30 Además de la preparación de una composición farmacéutica para uso médico mencionada anteriormente, las provisiones de la invención pueden ser la preparación de una composición farmacéutica para su uso para evitar enfermedades que no se ha manifestado todavía y para vacunar, como una forma especial de prevención, para permitir que el sistema inmunitario proteja frente a determinados patógenos.
- 35 El experto en la técnica es capaz de seleccionar moléculas de ácido nucleico adecuadas que se pueden usar para aplicaciones preventivas o de vacunación o pueden tomarse de la literatura.
- La divulgación también se refiere al uso de partículas magnéticas o el complejo de la presente invención para transfectar una célula poniendo uno o más vectores enlazados a una o más de dichas partículas magnéticas o dicho complejo en contacto con una célula mediante la aplicación de un campo magnético adecuado. Preferentemente, dicho uso se realiza para procedimientos de rastreo que implican transfección de alto rendimiento como se menciona anteriormente.
- 40 Además, la invención se refiere al uso del complejo de la presente invención para transfectar una célula *in vitro*, en el que se pone en contacto el complejo con una célula mediante la aplicación de un campo magnético adecuado.
- Además de los efectos positivos sorprendentes con respecto a la eficacia de la transfección que se han logrado mediante la aplicación de un campo magnético, se pudo observar que los complejos de la presente invención dan como resultado una potenciación de la eficacia de la transfección en comparación con la misma construcción sin una partícula magnética cuando no se aplica ningún campo magnético. Tal efecto se demuestra, por ejemplo, en los ejemplos 7, 8, 9 y 10.
- 45 Otra realización de la presente invención se refiere a un kit que comprende el complejo de la presente invención y, opcionalmente, partículas magnéticas y/o vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico y/o componentes de vector adecuados para incorporar una molécula de ácido nucleico que se quiere expresar e instrucciones para la aplicación de un procedimiento de la presente invención y, opcionalmente, adyuvantes terapéuticos celulares y/o génicos e imanes útiles para aplicar los procedimientos descritos anteriormente.
- 50

En la descripción y los ejemplos de la presente invención se divulgan y se engloban estas y otras realizaciones. Se puede recuperar literatura adicional concerniente a cualquier de los procedimientos, usos y compuestos que han de emplearse de acuerdo con la presente invención de bibliotecas públicas usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, se puede utilizar la base de datos pública "Medline" que está disponible en Internet, por ejemplo en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. El experto en la técnica conoce bases de datos y direcciones adicionales, tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/> y también se pueden obtener usando, p. ej., <http://www.lycos.com>. Una visión general de la información de patentes en biotecnología y una recopilación de fuentes relevantes de información de patentes útiles para la búsqueda retrospectiva y para el conocimiento actual se dan en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

La presente invención se describe adicionalmente por referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

Las figuras muestran:

Figura 1 Capacidad de unión de ADN de partículas magnéticas recubiertas de polietilenimina (fIMAG-PEI). Se alcanza la saturación de unión por encima de proporciones en peso de partículas y ADN de 2. Sin embargo, la transfección óptima sólo se observa a proporciones superiores (véase la fig. 3).

Figura 2 Comparaciones de eficacias de transfección de diferentes complejos de la invención, llevadas a cabo con y sin aplicar un campo magnético. Los complejos usados difieren con respecto al recubrimiento de la partícula magnética (grupos fosfato en posición terminal (= PO₄) en un recubrimiento de almidón: 2.1, 2.3, 2.5 y 2.6, o PEI: 2.2 y 2.4); con respecto al orden de mezclado y la concentración de los complejos de ADN usados (en las figuras 2.1 a 2.4) o la cantidad de liposomas de fIMAG-DOCHOL a la que se añadió ADN (figura 2.5 y 2.6). La toxicidad fue alta a las concentraciones de ADN más altas. En consecuencia, los niveles de proteína fueron bajos en estos pocillos, dando lugar a una eficacia sólo aparentemente mayor de la transfección específica con mayores cantidades de ADN. Los niveles de luciferasa absolutos no se vieron prácticamente afectados por el uso de cantidades menores de ADN. Los números de color blanco sobre las barras negras indican las veces que se potencia la transfección por la acción del campo magnético, ejemplificado por la actividad luciferasa.

Figura 3 Comparaciones de eficacias de transfección obtenidas con complejos de ADN desnudo y fIMAG-PEI con y sin aplicar un campo magnético. Los números de color negro sobre las barras grises indican las veces que aumentan las transfecciones con campo magnético en comparación con aquellas sin campo magnético.

Figura 4 Comparaciones de eficacias de transfección obtenidas con complejos que comprenden PEI y el copolímero protector (PROCOP) P6YE5C (Finsinger *et al.* 2000). Los números de color blanco sobre las barras negras indican la veces que aumenta la tasa de transfección inducida por un campo magnético.

Formulaciones aplicadas:

1. PEI-ADN añadido a fIMAG-PEI, recubierto finalmente con copolímero protector P6YE5C. Complejos en glucosa al 5 %.
2. PEI-ADN añadido a fIMAG-PEI^{Estav}, recubierto finalmente con copolímero protector P6YE5C. Complejos en glucosa al 5 %.
3. PEI^{biotina}-ADN añadido a solución madre de fIMAG, recubierto finalmente con copolímero protector P6YE5C. Complejos en glucosa al 5 %.
4. PEI^{biotina}-ADN añadido a solución madre de fIMAG-PEI^{Estav}, recubierto finalmente con copolímero protector P6YE5C. Complejos en glucosa al 5 %.
5. Premezcla de PEI y fIMAG-PEI a concentración alta, adición posterior de ADN. Recubierto finalmente con copolímero protector P6YE5C. Complejos en glucosa al 5 %.
6. Premezcla de PEI y fIMAG-PEI^{Estav} a concentración alta, adición posterior de ADN. Recubierto finalmente con copolímero protector P6YE5C. Complejos en glucosa al 5 %.
7. Premezcla de PEI^{biotina} y fIMAG-PEI a concentración alta, adición posterior de ADN. Recubierto finalmente con copolímero protector P6YE5C. Complejos en glucosa al 5 %.
8. Premezcla de PEI^{biotina} y fIMAG-PEI^{Estav} a concentración alta, adición posterior de ADN. Recubierto finalmente con copolímero protector P6YE5C. Complejos en glucosa al 5 %.
9. 12: Igual que 1-4, pero los complejos se mezclan en HBS.

Con los tipos de complejos aplicados en el ejemplo 4, no se observa ninguna influencia beneficiosa de un

punto de biotina-estreptavidina entre los componentes individuales del complejo.

- Figura 5** Resultados de la transfección de células NIH3T3 obtenidas con PEI^{biotina}-ADN asociado con partículas de adenovirus inactivadas (Adv^{biotina}) y complejos con fIMAG-PEI (pocillos 2 y 3) o fIMAG-PEI^{Estav} (pocillos 4 y 5). Pocillos 2 y 5 sin imán, pocillos 3 y 4 con imán. El pocillo 6 está vacío, el pocillo 1 son células no transfectadas. La actividad β-galactosidasa (color oscuro en los pocillos 3 y 4) indica transfección eficaz. La forma rectangular oscura de los pocillos 3 y 4 muestra el área bajo la cual se situó el imán. El ejemplo demuestra que, con ayuda de un campo magnético, puede dirigirse la transfección a una zona concreta dentro de una población celular mayor.
- Figura 6** Transfección potenciada por adenovirus de células NIH3T3 con complejos de PEI^{biotina}-ADN que contienen partículas magnéticas con luciferasa como gen indicador. Los complejos de ADN se prepararon en HBS. El adenovirus usado está químicamente inactivado y biotinilado. Resulta claramente evidente un efecto de potenciación de un puente de biotina-estreptavidina entre componentes individuales del complejo. Las barras grises indican niveles de transfección bajo la influencia de un campo magnético, las barras blancas, sin campo magnético. Los números de la parte inferior de las barras grises indican las veces que se potencia por el campo magnético. Para su comparación, la transfección con PEI^{biotina}-ADN (b-PEI-DNA) o lo mismo asociado con un adenovirus pero sin partículas magnéticas, proporciona tasas significativamente más bajas (filas 5 y 6).
- Figura 7** Transfección de células NIH3T3 con complejos de PEI-ADN y pL-ADN que contienen partículas magnéticas, potenciada por el péptido endosomolítico INF7. Las barras grises indican niveles de transfección bajo la influencia de un campo magnético, las barras blancas, sin campos magnéticos. Los números de la parte inferior de las barras grises indican las veces que se potencia por el campo magnético. Aparte de una potenciación adicional por la influencia del péptido, también resulta evidente que, incluso en ausencia de un campo magnético, la incorporación de partículas magnéticas en complejos de ADN potencia la transfección (compárense la fila 4 y las filas 5-7).
- Figura 8** Transfección de células NIH3T3 y células HepG2 con complejos de PEI-ADN que contienen cantidades crecientes de partículas magnéticas cargadas negativamente. Los complejos se mezclaron en glucosa al 5 %. Las barras grises indican niveles de transfección bajo la influencia de un campo magnético, las barras blancas, sin campo magnético. Los números de la parte inferior de las barras grises indican las veces que se potencia por el campo magnético. La figura muestra que diferentes tipos de partículas pueden tener diferentes influencias sobre la transfección y esto diferir de nuevo entre líneas celulares. Con la mayoría de las composiciones se observa una potenciación mediante un campo magnético. Aparte de eso, también resulta evidente que, incluso en ausencia de un campo magnético, la incorporación de partículas magnéticas en complejos de ADN puede potenciar la transfección (las barras más a la derecha de cada gráfico muestran la transfección sin partículas magnéticas).
- Figura 9** Transfección de células NIH3T3 y células HepG2 mediante coprecipitación con fosfato de calcio en presencia y en ausencia de partículas magnéticas. Adicionalmente, se incorporó el copolímero protector P6YE5C en las partículas con el fin de estabilizar el tamaño de partícula (partes derechas de los gráficos). De nuevo, la potenciación por un campo magnético es claramente evidente para la mayoría de las composiciones, en particular si los vectores están estabilizados con P6YE5C.
- Figura 10** Transducción de células NIH3T3 con un adenovirus recombinante portador del gen lacZ. (AdLacZ)
1. Control: Tampón PBS
 - 1a Control: AdLacZ, sin partículas magnéticas
 2. AdLacZ + fIMAG-PEI, añadido a ADN plasmídico (que codifica GFP), añadido a PEI; con imán, incubación durante 20 min.
 - 2a = 2 sin imán
 3. adenovirus químicamente inactivado, biotinilado (sin lacZ) + fIMAG-PEI, añadido a ADN plasmídico (que codifica GFP), añadido a PEI; con imán, incubación durante 20 min.
 - 3a = 3 sin imán
 4. AdLacZ + 0,75 µg de fIMAG-PEI por pocillo; con imán, incubación durante 20 min.
 - 4a = 4 sin imán.
 5. AdLacZ + 1,5 µg de fIMAG-PEI por pocillo; con imán, incubación durante 20 min.
 - 5a = 5 sin imán.

6. AdLacZ + 3 µg de fIMAG-PEI por pocillo; con imán, incubación durante 20 min.

6a = 6 sin imán.

7. AdLacZ + 6 µg de fIMAG-PEI por pocillo; con imán, incubación durante 20 min.

7a = 7 sin imán.

5 8. AdLacZ + 12 µg de fIMAG-PEI por pocillo; con imán, incubación durante 20 min.

8a = 8 sin imán.

9. AdLacZ + 24 µg de fIMAG-PEI por pocillo; con imán, incubación durante 20 min.

9a = 9 sin imán.

10 La figura demuestra que también se puede potenciar la administración génica vírica con partículas magnéticas bajo la aplicación de un campo magnético. Además, demuestra que se puede dirigir la administración de genes a una zona en particular dentro de una población celular mayor. Además, también resulta evidente la potenciación de la administración génica sin la aplicación de un campo magnético (pocillos 8a y 9a, en comparación con el pocillo 1a). Lo más notable es que no se observa administración génica en absoluto sin partículas magnéticas (pocillo 1a), ya que la línea celular aplicada (NIH3T3) no se infecta por el adenovirus. Con la ayuda de partículas magnéticas, las partículas víricas se pueden unir a las células y, en consecuencia, se internalizan conduciendo a una transfección funcional.

15 **Figura 11** Isotermas de unión a ADN de complejos ternarios de transMAG-PEI/ADN/PEI y transMAG-PEI/ADN/DOCHOL

20 Los complejos ternarios se prepararon en agua. Se inició la agregación inducida por sal mezclando con un ¼ de volumen cloruro sódico 600 mM y se continuó durante 20 - 30 minutos seguido de 30 min de sedimentación magnética. Se cuantificó el ADN radiomarcado de los sobrenadantes por triplicado. La figura demuestra que a la proporción de transMAG-PEI:ADN de 2 (p/p) usada frecuentemente, aprox. el 70 - 80 % de la dosis de ADN se puede sedimentar magnéticamente, lo que significa asociar con partículas magnéticas. Los puntos de datos son promedios de triplicados ± la desviación estándar (las barras de error son demasiado pequeñas para que puedan verse).

25 **Figura 12** Agregación inducida por sal de complejos ternarios de transMAG-PEI/ADN/PEI

30 El complejo ternario se preparó en agua (10 µg de ADN/ml de concentración final) y tenía un tamaño de $217,0 \pm 2,0$ nm antes de la adición de sal. Se indujo la agregación inducida por sal mediante el ajuste de la fuerza iónica a 150 mM de cloruro sódico. El complejo ternario se agrega con una cinética aproximadamente lineal, permaneciendo en el intervalo de submicrómetros en un plazo de dos horas. Se muestra la línea de regresión lineal junto con su ecuación, lo que permite precalcular tamaños de partícula en puntos temporales dados tras la inducción de la agregación.

35 **Figura 13** Isoterma de unión de adenovirus y transMAG-PEI

40 Se mezclaron adenovirus marcados con yodo-125 y partículas magnéticas en proporciones que abarcaban el intervalo y bajo condiciones aplicadas en experimentos de transferencia génica. Después de 20 min de incubación, se sometieron las mezclas a sedimentación magnética durante 1 hora. Se determinó el virus no unido en sobrenadantes de triplicados usando un contador gamma. La figura muestra que bajo las condiciones usadas en los experimentos de transferencia génicas, el 70 por ciento y más de los virus se asocian con partículas magnéticas. Se ha aplicado un ajuste de curva logarítmica a los puntos de datos que son promedios de triplicados ± la desviación estándar (las barras de error son demasiado pequeñas para que puedan verse).

45 **Figura 14** Biobiodistribución adenovirus marcado con ^{125}I en ratones

50 Se inyectaron en ratones aprox. $6,5 \times 10^8$ partículas víricas, asociadas con 0,3 µg de transMAG-PEI (equivalente aprox. a una unión de virus del 73 % de acuerdo de con la isoterma de unión) por las venas de la cola. Un subconjunto de los animales (n = 3) tuvo un bloque de imán unido al lado derecho del pecho durante una hora después de la inyección. Se determinaron los virus en los diversos órganos usando un contador gamma. La acumulación relativa en porcentaje (eje y) que aquí se presenta es el cociente de las cuentas (CPM) por peso del órgano y la dosis recuperada total (CPM) por peso total de órgano, multiplicado por 100 (peso total de órgano = suma de los pesos todos los órganos). Aunque el mayor porcentaje de dosis absoluta se acumula en el hígado, la acumulación específica por peso de tejido es más pronunciada en el bazo. La asociación del virus con partículas magnéticas da como resultado una acumulación relativa no significativa en el bazo en comparación con el virus "desnudo" y una acumulación relativa 5 veces mayor en el pulmón. Si, además, se aplicaba el campo magnético a la zona de los

pulmones, se observaba una ligera acumulación adicional en los bazo por causas desconocidas y se observaba una acumulación 10 veces mayor en comparación con el virus "desnudo" en los pulmones. El experimento demuestra la aplicabilidad de la magnetofección *in vivo*.

Figura 15 Magnetofección en venas auriculares de cerdos

5 Una variedad de cardiovasculopatías son indicaciones prometedoras para tratamiento génico. Por lo tanto, la vasculatura es un diana importante para la administración génica localizada en lugar de sistémica. Actualmente, la transfección localizada de vasos sanguíneos se logra con cateterización y/o técnicas de pinzamiento (Isner *et al.* 1996). La magnetofección puede proporcionar una complementación útil para tales técnicas o incluso una alternativa. Esto está respaldado por los resultados obtenidos cuando se infundió transMAG^{PEI}+ADN+PEI (dosis de ADN de 500 µg) en las venas auriculares derecha e izquierda de cerdos y se unió un bloque de imán permanente de Nd-Fe-B por encima de las venas derechas, cercas de los sitios de inyección. No se observó expresión del gen indicador (luciferasa) en los vasos sanguíneos de control (orejas izquierdas) ni distal con respecto a las posiciones del imán (orejas derechas), mientras que se descubrió expresión de luciferasa reproducible, si bien variable (741,897 ± 693,298 ULR/g) en todas las muestras de venas que se encontraban bajo influencia directa del campo magnético. No se encontró señal de luciferasa (emisión de luz) en muestras de ningún otro órgano principal. La figura muestra al animal anestesiado con el sitio de inyección y el imán unido.

Figura 16 Magnetofección no vírica en el íleon de ratas

20 (A)-(B) Se aplicó ADN-transMAG-PEI al íleon de ratas en ausencia (A) y bajo la influencia de un campo magnético durante 20 min (B). La tinción con X-Gal realizada 48 horas después de la administración génica revela administración de genes eficaz sólo en presencia del imán (B), tanto a escala macroscópica (panel superior) como a escala microscópica (panel inferior). Panel superior: conductos intestinales tras tinción con X-Gal. Insertos: secciones transversales de conductos incluidos en parafina. Panel inferior: Secciones de parafina con contratinción con eosina, aumento 400 x. Se observa tinción con X-Gal en la lámina propia. L: lumen; L.P. lámina propia.

Figura 17 Magnetofección en las arterias auriculares de conejos

(A) Configuración experimental para la administración de vectores génicos. En primer plano se puede ver el sitio de inyección y más distal la ubicación del bloque de imán.

30 (B) Se inyecta una preparación de vector con 2 µg de transMAG-PEI116/1 por µg de ADN en glucosa al 5 % en la arteria auricular. Se observó una expresión de gen indicador 24 veces mayor en la sección del imán de la arteria cuando se colocó el imán en comparación con la sección análoga de la arteria de control (oreja izquierda), que recibió el mismo vector pero sin el imán colocado.

35 (C) Se inyecta una preparación de vector con 1 µg de transMAG-PEI por µg de ADN en cloruro sódico 150 mM en la arteria auricular. Se observó expresión del gen indicador en la posición del imán y en secciones distales de la arteria, mientras que se observó poco o nada de expresión (sólo en secciones distales) en la arteria de control. La expresión en las secciones distales de las orejas tanto con imán como de control pueden reflejan la influencia del tamaño de partícula del vector en la administración génica. Al contrario que en (B), se preparó el vector por agregación inducida por sal que implicaba un tamaño de partícula de varios cientos de nm en el momento de la administración del vector. Como consecuencia, estas partículas pueden quedarse atascadas en los capilares que se encuentran más adelante de los sitios de inyección.

Figura 18 Transfección de células NIH3T3 con Superfect ± transMAG-PEI (ejemplo 19)

45 Se transfectaron las células con complejos de transMAG-PEI/ADN/Superfect preparados por agregación inducida por sal. Las proporciones de Superfect:ADN (N/P) fueron de 2, 4 y 6. Las columnas etiquetadas como "Superfect" en el extremo derecho muestran los resultados de transfecciones estándar con Superfect con y sin partículas magnéticas a las proporciones N/P correspondientes y a la dosis de ADN de 1 µg/pocillo. En comparación con estos controles, la asociación con partículas magnéticas dio lugar a una disminución de las eficacias de transferencia de genes (barras blancas del extremo izquierdo de cada gráfico). Esta disminución, no obstante, se sobrecompensó mediante la aplicación de un campo magnético (barras negras). Los números sobre las columnas muestran las veces que se potencia con respecto a la transfección con complejos que contienen partículas magnéticas sin la aplicación del campo magnético. En presencia del campo magnético, existe una fuerte dependencia de dosis-respuesta.

Figura 19 Transfección de células NIH3T3 con Superfect ± transMAG-PEI para estudiar la influencia de un campo magnético aparte de su papel en la concentración de partículas en la célula diana (ejemplo 20)

55 Se transfectaron células con complejos de Superfect-ADN que contenían transMAG-PEI (N/P = 6) preparados por agregación inducida por sal. Se incubaron las células con los complejos en dos placas diferentes durante 20 min, seguido de lavado con medio. Posteriormente, se colocó una de las dos placas

sobre la placa magnética durante 40 minutos. Este procedimiento garantiza que las células de ambas placas se unen, en promedio, a la misma cantidad de vectores génicos durante los primeros 20 min de incubación. Para la placa sin influencia de un campo magnético, la incorporación de vector génico depende totalmente de los procesos naturales de transporte, mientras que en la otra placa, la entrada en la célula y la transfección se ven afectadas por el campo magnético. Los datos muestran que existe un fuerte efecto potenciador consistente del campo magnético, en particular a la dosis de ADN más baja. A las dosis de ADN más altas, parece ser necesaria una cantidad umbral de transMAG en los complejos de ADN para observar el efecto potenciador del campo magnético (0,8 µg de transMAG por µg de ADN bajo los ajustes aplicados en este caso). Las barras muestran promedios de cuadruplicados ± desviación estándar. Las barras negras muestran resultados con campo magnético aplicado, las barras blancas, sin campo magnético.

Figura 20 Transfección de células CHO-K1 con PEI-DNA+transMAG con diversos recubrimientos de superficie policatiónicos (ejemplo 21)

Se transfectaron células con complejos de ADN preparados por agregación inducida por sal que contenían PEI libre a una proporción N/P de 8 y transMAG con diversos recubrimientos de superficie. Se valoró el contenido en transMAG de los complejos. Las barras muestran promedios de cuadruplicados ± desviación estándar. Las barras negras muestran resultados con campo magnético aplicado, las barras blancas, sin campo magnético. Los números sobre las barras representan las veces que se potencia por la aplicación del campo magnético. Las cifras muestran que cualquier de estas partículas magnéticas puede mediar la magnetofección a órdenes de magnitud similares. Sin embargo, la dependencia de la eficacia de transfección del contenido en partículas magnéticas varía entre formulaciones. Para todas las formulaciones, existe una disminución de las eficacias de transfección por encima de proporciones de transMAG:ADN de 1, probablemente debido al aumento de la toxicidad para las células.

Figura 21 Transfección de células NIH3T3 con ADN+transMAG con diversos recubrimientos de superficie de PEI. Preparación del vector en glucosa y soluciones que contienen sales. Valoración de proporciones óptimas de transMAG:ADN (ejemplo 22)

(A) Complejos preparados en glucosa al 5 %; **(B)** complejos preparados en cloruro sódico 150 mM (agregación inducida por sal). Los puntos de datos muestran promedios de triplicados ± desviaciones estándar. Ambos gráficos muestran administración de genes bajo la influencia del campo magnético.

La valoración muestra que la eficacia de la transferencia génica depende drásticamente de si los vectores se preparan en solución que contiene sales o no. Pueden distinguirse dos clases de partículas: las transMAG 18/1, 19/1, 37 y 38 son mejores bajo condiciones sin sales pero comparativamente inactivas bajo condiciones que contienen sales. Las transMAG 21/1, 23/1, 24/1 y 25/1 presentan el comportamiento opuesto. Estas partículas llevan un recubrimiento de superficie de PEI de 800 kD (Fluka), mientras que la otra clase de partícula lleva recubrimiento de superficie de PEI de bajo peso molecular (2 kD; Aldrich). Las transMAG 21/1, 23/1, 24/1 y 25/1 son una buena elección para transfecciones donde no hay que aplicar un tercer componente además del ADN y las transMAG.

Figura 22 Transfección de células NIH3T3 y HepG2 con transMAG-pASP-ADN y diversas cantidades de PEI (ejemplo 23)

Se prepararon complejos de ADN que contenían una cantidad constante de transMAG-pASP (1 µg por µg de ADN) y cantidades crecientes de PEI mediante agregación inducida por sal. Las barras muestran promedios ± desviaciones estándar de cuadruplicados. Las barras negras son transfecciones bajo la influencia de un campo magnético, las barras blancas, sin campo magnético. En ambas líneas celulares, la eficacia de transfección depende del contenido en PEI de los complejos de ADN. La óptima se encuentra aproximadamente a una proporción N/P de 8. En este experimento en concreto, se observó muy poca transfección, si la hubo, sin aplicación de un campo magnético.

Figura 23 Transfección de células CHO-K1 con GenePorter-ADN ± transMAG-PEI (ejemplo 24)

Se prepararon complejos de ADN que contenían cantidades crecientes de transMAG-PEI y una cantidad constante de reactivo de transfección GenePorter esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante del reactivo de transfección con la excepción de que se preincubó el ADN con transMAG-PEI. Se realizaron diluciones seriadas de complejos de ADN con el fin de obtener un perfil de dosis-respuesta en dos dimensiones. Se incubaron células con formulaciones de vector durante 10 min o 4 h, respectivamente, en presencia y en ausencia de un campo magnético con el fin de obtener datos sobre la cinética de la transfección.

(A) Tablas que muestran las veces que se potencia la transfección mediante la aplicación del campo magnético. Los datos muestran que las potenciaciones son fuertes después de 10 min de incubación, moderadas y evidentes sólo a las dosis más bajas de vector después de la incubación de larga duración. También durante la incubación de corta duración, las potenciaciones dependen de la formulación de

vector. A las dosis de ADN más altas con alto contenido en transMAG, las formulaciones de vector fueron tóxicas para las células, en particular tras la incubación de larga duración con campo magnético.

(B) Perfiles de dosis-respuesta en términos de dosis de ADN. Los puntos de datos representan los promedios de triplicados \pm desviaciones estándar. La fuerte relación dosis-respuesta a los 10 min sólo en la presencia del campo magnético pero no en su ausencia, demuestra la gran influencia del campo sobre la cinética de la transfección.

(C) Perfiles de dosis-respuesta en términos de dosis de transMAG. La eficacia de transfección disminuye a las dosis de transMAG más altas, probablemente debido a la toxicidad. Una proporción de transMAG y ADN de 4 resulta útil a todas las dosis de ADN. Los puntos de datos representan los promedios de triplicados \pm desviaciones estándar.

Figura 24 Transfección de células CHO-K1 con Lipofectamine-ADN \pm transMAG-PEI (ejemplo 25)

El experimento se llevó a cabo de manera análoga al ejemplo 24 (figura 23) con reactivo de transfección Lipofectamine en lugar de GenePorter. Las tendencias generales son similares a las de este último experimento.

De nuevo, la toxicidad fue pronunciada a proporciones altas de transMAG:ADN a dosis de ADN altas (no mostrado). La potenciación máxima de la transfección por el campo magnético se observa a proporciones de transMAG:ADN de 1 a 4.

Figura 25 Transfección de células CHO-K1 con DOCHOL-ADN \pm transMAG-PEI (ejemplo 26)

Se llevaron a cabo transfecciones de forma análoga a la de los ejemplos 24 y 25 (figuras 23 y 24) con liposomas de DOTAP-colesterol como reactivo de transfección, aunque a proporciones menores de transMAG:ADN y con un intervalo de dosis de ADN más amplio.

A. Tabla que muestra las veces que se potencia la transfección mediante la aplicación del campo magnético. Los datos muestran que las potenciaciones son fuertes después de 10 min de incubación. Asimismo, las potenciaciones dependen de la formulación de vector. A dosis de ADN más altas, las formulaciones de vector fueron tóxicas para las células (no mostrado), aunque las mayores expresiones del gen indicador se observaron bajo estas condiciones. Las potenciaciones son particularmente pronunciadas a dosis de ADN más bajas, lo que demuestra de nuevo la fortaleza del procedimiento en la transfección rápida a una dosis baja de ADN.

B. Perfiles de dosis-respuesta en términos de dosis de ADN. Los puntos de datos representan los promedios de cuadruplicados \pm desviaciones estándar. La fuerte relación dosis-respuesta a los 10 min sólo en la presencia del campo magnético pero no en su ausencia, demuestra la gran influencia del campo magnético sobre la cinética de la transfección. La composición con la mayor proporción de transMAG-ADN (4) resultó ser la más favorable y da lugar a altos niveles de expresión aun a dosis bajas de ADN.

C. Perfiles de dosis-respuesta en términos de dosis de transMAG. El gráfico revela que la eficacia de transfección pasa por un mínimo a aproximadamente 0,8 μ g de transMAG por μ g de ADN flanqueado por un máximo a 0,6 μ g y un máximo potencial a 4 μ g en presencia del campo magnético, identificando formulaciones adecuadas para una administración génica rápida y eficaz.

Figura 26 Cinética de magnetofección con lípidos catiónicos en células NIH3T3 (ejemplo 27)

Como una extensión de los ejemplos 24 y 25, se examinó la cinética de transfección de una formulación de vector en particular con cada uno de GenePorter y Lipofectamine (dosis de ADN: 0,1 μ g/pocillo y transMAG-PEI:ADN = 2:1 p/p). Se retiraron las formulaciones de vector de las células y se lavaron las células después de 5, 10, 20, 40 y 240 minutos de incubación. Bajo las condiciones probadas, se observó la expresión máxima ya después de 5 min con Lipofectamine, mientras que con GenePorter la eficacia de transfección aumentó a lo largo del tiempo, pero con una pendiente moderada (el 40 % del nivel de expresión final del gen indicador ya se había alcanzado después de 5 min). En cualquier punto temporal, las formulaciones de GenePorter fueron más eficaces que las formulaciones de Lipofectamine.

Figura 27 Magnetofección retroviral (ejemplo 28)

Se incubaron células NIH3T3 durante 3 h con alícuotas de 1 ml de sobrenadantes de 24 h de células empaquetadoras ecotrópicas productoras de MuLV de valoración baja. Se aplicaron estos sobrenadantes tratados o no tratados con transMAG-PEI (3 μ g/ml durante 20 min) y/o polibreno (8 μ g/ml inmediatamente antes de la infección). Se aplicaron imanes a grupos específicos durante 1 h. Después de 48 h, se tiñeron las células con X-Gal y se contaron los núcleos azules. Los resultados se expresan como eficacia de transducción en relación con la eficacia de una transducción estándar (virus + polibreno). En comparación

con la transducción estándar en presencia de polibreno, la asociación con transMAG^{PEI} solo potenció dos veces la eficacia del vector. La aplicación adicional de un campo magnético dio como resultado un aumento de 7 veces de células transducidas. Cuando se omitió el polibreno de la preparación de transducción, no se observó prácticamente transducción con virus solo. En contraste, la omisión del polibreno mejoró la transducción guiada por partículas superparamagnéticas en ausencia de un campo magnético 4 veces con respecto a la transducción estándar (virus + polibreno) y culminó en una potenciación de 20 veces en presencia de un campo magnético. Estos resultados demuestran que puede aplicarse la magnetofección a la administración génica retroviral, lo que indica que las nanopartículas catiónicas son mejores mediadores de la transducción retroviral en comparación con el polibreno.

5 **Figura 28** Magnetofección retroviral - comparación con la concentración de vector en la superficie de la célula diana mediante fuerza centrífuga (ejemplo 29).

10 Se incubaron células con sobrenadantes de 24 h de una línea celular productora que genera valoraciones bajas de MuLV. Los sobrenadantes se mezclaron con 3, 9 y 15 µg de transMAG-PEI por ml de sobrenadante o con 8 µg/ml de polibreno. Se incubaron células NIH3T3 en placas de 96 pocillos durante 1 h con preparaciones que contenían transMAG al mismo tiempo que se colocaban sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos. Se incubaron dos placas durante 48 h con sobrenadantes mezclados con polibreno, donde se centrifugó una placa durante 90 min a 1330 x g. Se cuantificó la expresión de β-galactosidasa después de 48 h usando el ensayo de CPRG (Planck *et al.* 1999). Los datos confirman que la magnetofección retroviral es mejor que transducción mediada por polibreno estándar. La transfección asistida por centrifugación estándar mejora la eficacia de la transducción aproximadamente 2 veces. Sin embargo, los niveles de transducción más altos se logran por magnetofección, dependiente de la proporción de transMAG y virus.

Los ejemplos ilustran la invención:

Configuración experimental

25 1. Partículas magnéticas

Se compraron nanopartículas magnéticas con un tamaño promedio de 200 nm o 100 nm (por dispersión de luz dinámica) de Chemicell, Berlín, Alemania. De acuerdo con una nomenclatura anterior, estas partículas se han denominado partículas fluid-MAG con una extensión en su nombre tal como -PEI, que hace referencia al recubrimiento de superficie del núcleo de óxido de hierro. En lo sucesivo, estas partículas también se denominan fIMAG-*. De acuerdo con la nomenclatura actual de Chemicell, Berlín, estas partículas se denominan partículas transMAG-*, con extensiones por lo demás idénticas a las de la nomenclatura de fluidMAG. Por consiguiente, la única diferencia entre fluidMAG y transMAG es la nomenclatura. A continuación se usa la nomenclatura de transMAG empezando con el ejemplo 11 y los ejemplos siguientes. A menos que se indique lo contrario, todas las partículas son a base de magnetita (Fe₃O₄).

- 35 A. fluidMAG-PEI, HCl; (fIMAG-PEI; transMAG-PEI)
recubiertas con una monocapa de polietilenimina (Pm 800 kDa; Fluka)
- B. fluidMAG-ácido poliaspártico; (fIMAG-pASP; transMAG-pASP)
recubiertas con ácido poliaspártico, sal sódica, Pm 3000 kDa
- 40 C. fluidMAG-fosfato; (fIMAG-P04)
recubierta con fosfato de almidón, Pm 20 kDa
- D. fluidMAG-ácido poliacrílico; (fIMAG-pACRYL)
recubiertas con ácido poliacrílico, sal sódica, Pm 20 kDa
- E. fluidMAG-ácido poliacrílico-co-ácido maleico; (fIMAG-pACRYL-MAL)
recubiertas con ácido poliacrílico-co-ácido maleico, sal sódica, Pm 50 kDa
- 45 F. fluidMAG-ácido arábico; (fIMAG-ARA)
recubiertas con ácido arábico, sal sódica, Pm 250 kDa
- G. transMAG-16/1; recubiertas con una multicapa de PEI de 800 kD (Fluka)
- H. transMAG-18/1 y -19/1; recubiertas con una multicapa de PEI de 2000 kD (Aldrich). La diferencia entre las 18/1 y las 19/1 es el procedimiento de recubrimiento
- 50 I. transMAG-37 es análogo a transMAG-18/1 pero se ha autoclavado
- J. transMAG-38; igual que -37 pero con núcleo de magnetita oxidada a γ-Fe₂O₃
- K. transMAG-20/21/23/24/25; recubrimiento multicapa con PEI de 800 kD (Fluka) usando procedimientos de

recubrimiento diferentes

- L. transMAG-PEI-etoxilada; recubrimiento de monocapa con PEI de 50 kD (Aldrich) que se ha etoxilado (al 80 %)
- M. transMAG-PEI-epiclorhidrina; recubrimiento de monocapa con PEI de 20 kD (Aldrich) modificado con epiclorhidrina
- 5 N. transMAG-PEI-bajo PM, recubrimiento de monocapa con PEI, PM 1700 (Aldrich)
- O. transMAG-PEI-SDS; recubrimiento de monocapa con PEI de 800 kD (Aldrich) modificado mediante un acoplamiento covalente de dodecilsulfato de sodio (SDS) mediante activación de carbodiimida (N-etil-N'-(dimetilaminopropil)-carbodiimida)
- 10 P. transMAG-ALMIDÓN-PEI, recubrimiento multicapa con dextrina, PM 60 kD (Fluka) seguido de acoplamiento covalente de PEI a través de grupos amino a la capa de almidón peryodado-oxidado.
- Q. transMAG-DEAE; recubrimiento monocapa con dextrina, introducción de grupos DEAE en posición terminal con cloruro-clorhidrato de 2-dietilamino-etilo
- R. transMAG-DAEA; recubiertas con un polímero preparado a partir de dimetilamina, epiclorhidrina y etilendiamina.
- S. transMAG-C1/1; partículas recubiertas con PEI de tamaño de aprox. 100 nm (por dispersión de luz dinámica).

15 2. Polietilenimina (PEI)

Se disolvió la PEI (25 kD) tal como se suministra por el fabricante (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania) a 10 mg/ml en agua y se ajustó el pH a 7,4 mediante la adición de ácido clorhídrico. Se dializó el material con agua seguido de filtración estéril (0,20 μ m de membrana CA; Peske, Aindling-Pichl, Alemania). Se determinó la concentración de PEI con relación a la solución original usando el ensayo de ninhidrina.

20 3. Biotinilación de PEI (PEI^{biotina})

Se liofilizó una alícuota de solución de PEI (17,2 mg) y redisolvió en 0,5 ml de HEPES 20 mM a pH 7,4. Se añadieron dos equivalentes de NHS-LC-Biotina (Pierce, Rockford, IL, EE. UU., N.º 21226T; 68,8 μ l de una solución 20 mM en DMSO). Después de reaccionar a temperatura ambiente durante 3 h, se purificó el material por filtración en gel (columna 10/10 con relleno de Sephadex G-25, Pharmacia. Caudal de 1 ml/min con agua como eluyente). De acuerdo con un ensayo de ninhidrina, la concentración de PEI de la fracción de producto fue de 4,39 mg/ml.

25 4. Biotinilación de fIMAG-PEI (fIMAG-PEI^{biotina})

Se añadieron 8,38 μ l de una solución madre de NHS-LC-Biotina 8 mM (Pierce) a una dispersión de 2,5 mg de fIMAG-PEI en 125 μ l de agua, seguido de la adición de 250 μ l de HEPES 20 mM a pH 7,4. Después de reaccionar durante la noche, se retiró el reactivo en exceso mediante lavado exhaustivo con agua, donde se recuperó el producto fIMAG-PEI^{biotina} mediante sedimentación magnética y se desecharon los sobrenadantes.

30 5. Acoplamiento de estreptavidina a fIMAG-PEI (fIMAG-PEI^{Estav})

Estreptavidina-SPDP: Se disolvieron 5 mg de estreptavidina (Molecular Probes, S-888) en 500 μ l de HBS (HEPES 20 mM/cloruro sódico 150 mM a pH 7,4) y se purificó por filtración en gel (Sephadex G-25; columnas PD-10, Pharmacia, Suecia) usando el mismo tampón. Se concentraron las fracciones de producto agrupadas hasta 520 μ l que contenían 3,4 mg (56 nmol) de estreptavidina usando un Speed-vac. A esta solución, se le añadió un exceso de 3,5 veces de ditiopropionato de succinimidilpiridilo (SPDP; 32 mM en aus. de etanol). Después de reaccionar a temperatura ambiente durante la noche, se purificó el material por filtración en gel en HBS (en una columna 10/10 HR con relleno de Sephadex G-25; Pharmacia, Suecia; caudal de 0,5 ml/min). La concentración de ditiopropionato de piridilo acoplado fue de 75 μ M, la concentración de estreptavidina fue de 1,6 mg/ml, lo que equivale a una sustitución de aprox. 2,8 PDP por molécula de estreptavidina.

fIMAG-PEI-SH: La tiolación de fIMAG-PEI se llevó a cabo añadiendo 4 μ l de SPDP (10 mM en etanol) a 5 mg de fIMAG-PEI en 250 μ l de agua, seguido de la adición de 246 μ l de HEPES 20 mM a pH 7,4. La reacción se llevó a cabo en un tubo de microcentrífuga que se agitó durante la noche a toda velocidad a 37 °C en un agitador de Eppendorf (Thermomixer 5436). Posteriormente, se lavó el material exhaustivamente con TFA al 0,1 %. Tras la reducción mediante la adición de β -mercaptoetanol, se determinó que la cantidad total de ditiopropionato de piridilo acoplado era de aprox. 13 nmol. Se volvió a lavar el material exhaustivamente con TFA al 0,1 %.

Se añadió un exceso de 3 veces de estreptavidina-SPDP (grupos tiopiridilo sobre grupos tiol). Después de reaccionar durante la noche, habían reaccionado un tercio de los grupos tiopiridilo disponibles, lo que indica una reacción cuantitativa. Se lavó el producto exhaustivamente con agua.

50

6. Liposomas de DOTAP-colesterol

Se compró DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EE. UU.). Se prepararon liposomas de DOTAP/Colesterol (1:1 mol/mol) esencialmente como se describe (Meyer *et al.* 1995). Brevemente, se evaporaron hasta sequedad 5 ml de una solución 5 mM de DOTAP y colesterol (1:1 mol/mol) en un tubo de vidrio con tapón de rosca silanizado usando un evaporador rotatorio. Adicionalmente, se mantuvieron los tubos bajo alto vacío durante la noche. Se rehidrató la película de lípidos secada con 5 ml de glucosa al 5 % en agua agitando en vórtex durante 30 segundos. Se obtuvo una emulsión de liposomas estable por sonicación durante 30 min usando un baño de agua ultrasónico enfriado en hielo (Sonorex RK510H, Bandelin, Berlín, Alemania).

Los complejos de ADN con liposomas de DOTAP-Colesterol también se denominan complejos de DOCHOL-ADN en lo sucesivo.

7. Liposomas de DOTAP-Colesterol que contienen fIMAG-PO₄ (fIMAG-DOCHOL)

La preparación de liposomas se llevó a cabo como se describe anteriormente, excepto porque la solución de rehidratación fue de 5 ml de glucosa al 5 % en agua que contenía 825 µg de fIMAG-PO₄. El tiempo de sonicación aumentó a 60 min.

8. Células NIH3T3, células Hep G2, células CHO-K1

Se hicieron crecer fibroblastos NIH-3T3 de ratón (DSMZ N.º ACC 59) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y glutamina 2 mM (en lo sucesivo también se denomina "DMEM completo"). Las células Hep G2 (hepatoblastoma humano; ATCC N.º HB-8065) y CHO-K1 se hicieron crecer en las mismas condiciones.

9. Tipos de imán

Imán de tipo A: Imán permanente de neodimio-hierro-boro sinterizado de 30 x 10 x 6 mm (NeoDelta Magnet; IBS Magnet, Berlín, Alemania. Número de pedido NE3010). $(B \times H)_{\text{máx.}} = 220 - 245 \text{ kJ/m}^3$. $Br = 1080 - 1150 \text{ mT}$. $B_{Hc} = 795 - 860 \text{ kA/m}$. $J_{Hc} = >1300 \text{ kA/m}$.

Imán de tipo B: Mismo material que el tipo A. Cilíndrico; $d = 6 \text{ mm}$, $a = 5 \text{ mm}$ (número de pedido NE65). Se practicaron orificios de 6 mm de diámetro con un formato de 96 pocillos en una placa de vidrio acrílico de 5 mm de espesor. Se unió la placa de vidrio a una placa de acero galvanizado de 1 mm de espesor, con dimensiones por lo demás iguales a las de la placa de vidrio acrílico. Se insertaron los cilindros de imán en los orificios de la placa de vidrio acrílico alternando estrictamente la polarización. En lo sucesivo, este formato de placa magnética también se denomina "placa magnética con formato de 96 pocillos".

Imán de tipo C: MPC[®]-96 (Dynal, Hamburgo, Alemania). $(B \times H)_{\text{máx.}} = 220 - 210 \text{ kJ/m}^3$. $Br = 1100 \text{ mT}$. $B_{Hc} = 765 \text{ kA/m}$. $J_{Hc} = >900 \text{ kA/m}$.

Imán de tipo D: Construido de forma similar al imán de tipo B con imanes cilíndricos de NeoDelta ($d = 15 \text{ mm}$, $a = 5 \text{ mm}$; IBS Magnet, Berlín, Alemania). Se practicaron orificios con un formato de placa de 24 pocillos en una placa de vidrio acrílico, por lo demás la placa se fabricó de manera idéntica a la de la placa en formato de 96 pocillos. En lo sucesivo, este formato de placa magnética también se denomina "placa magnética con formato de 24 pocillos".

10. ADN plasmídico

El ADN plasmídico p55pcMV-IVS-luc+ usado, que codifica la luciferasa de luciérnaga como gen indicador, lo suministró amablemente Andrew Baker, Bayer Corp., EE. UU. En lo sucesivo, el plásmido también se denomina pCMV-Luc. El plásmido pCMV-β-gal lo suministró amablemente Walter Schmidt, Intercell, Viena, Austria. Los plásmidos se purificaron por gradiente de cloruro de cesio.

11. Adenovirus químicamente inactivado, sistema de transfección potenciada por adenovirus (AVET)

Los componentes individuales del AVET los proporcionó amablemente Ernst Wagner (Boehringer Ingelheim Austria, Viena, Austria). En este sistema, se usa un adenovirus humano de serotipo 5 del que se ha eliminado E1A, biotinilado, químicamente inactivado, que se ha tratado con psoraleno. El AVET se describe en detalle en el documento US 5.981.273. La solución madre de adenovirus contenía $2,87 \times 10^{12}$ partículas víricas por ml.

12. Ensayo de luciferasa

Veinticuatro horas después de la transfección, se lavaron las células una vez con PBS y después se incubaron con 100 µl de tampón de lisis (Tritón X-100 al 0,1 % en Tris 250 mM a pH 7,8). Se transfirieron de diez a cincuenta microlitros de cada uno de los lisados celulares a placas de 96 pocillos negras, se mezclaron con 100 µl de tampón luciferina (ditiotreitól 60 mM, sulfato de magnesio 10 mM, ATP 1 mM, D(-)-luciferina 30 µM, en glicil-glicina 25 mM a pH 7,8) y se sometieron a ensayo para evaluar la bioluminiscencia usando un instrumento TopCount (Canberra Packard). Se determinó el contenido proteico de los lisados celulares usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad.

adaptado para su uso en un formato de placa de 96 pocillos. Se calculó la actividad luciferasa específica en nanogramos de luciferasa por mg de proteína a partir de una curva de calibración que se obtuvo a partir de la luminiscencia de una dilución seriada de luciferasa (Boehringer Mannheim).

13. Tampón HBS

- 5 A menos que se indique lo contrario, tampón HBS significa HEPES 20 mM a pH 7,4/cloruro sódico 150 mM.

14. Tampón HBSa

Se ha usado en experimentos con adenovirus recombinantes. 8 g/l de cloruro sódico, 0,37 g/l de cloruro potásico, 0,27 g/l de dihidrato de hidrogenofosfato disódico, 1 g/l de dextrosa.

15. Reactivo de transfección GenePorter

- 10 Se compró el reactivo de Gene Therapy Systems, Inc. (San Diego, CA, EE. UU.) y se rehidrató de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

16. Reactivo de transfección Lipofectamine

Se compró el reactivo de Life Technologies (Karlsruhe, Alemania).

17. Reactivo de transfección Superfect

- 15 Se compró el reactivo de Qiagen (Hilden, Alemania).

18. Agregación inducida por sal

- 20 En lo sucesivo se usa este término para describir un procedimiento de ensamblaje de vectores que aprovecha la agregación/floculación coloidal tras el aumento de la fuerza iónica. Este fenómeno es particularmente pronunciado con partículas formadas a partir de polielectrolitos y se conoce desde hace mucho tiempo (Hiemenz 1986). En el ensamblaje de vectores, es suficiente con mezclar los componentes del vector en una solución que contenga sales o mezclarlos en agua, seguido de mezclarlos con una solución que contenga sales.

Ejemplo de referencia 1: Isoterma de unión de ADN de fIMAG-PEI

- 25 Marcaje de mella de ADN plasmídico: Se marcó un μg de ADN plasmídico por reacción con ^{32}P usando el kit de traducción de mella de Amersham-Pharmacia con el protocolo del proveedor modificado de forma que el tiempo de incubación fue de 15 min a 15 °C en lugar de 2 h. Se usó $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$ (Hartmann Analytic, Braunschweig, Alemania) con una actividad específica de 3.000 Ci/mmol, para la reacción de marcaje. Se purificó el plásmido marcado usando columnas MicroSpin™ (Pharmacia, Friburgo, Alemania) y el sistema de purificación de ADN PCR Preps Wizard™ de Promega (Promega, Mannheim, Alemania) para eliminar los nucleótidos y enzimas no incorporados de la mezcla de reacción. El volumen final del producto fue de 100 μl con una actividad de 234.248 CPM/ μl , determinada como se describe a continuación. El ADN producto tenía el mismo tamaño que el plásmido de partida, como se confirmó por electroforesis en gel.

- 35 A 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 microgramos de partículas magnéticas recubiertas con polietilénimina (fIMAG-PEI), suministradas por Chemicell, Berlín, Alemania, suspendidas en 40 μl de agua en tubos Eppendorf, se les añadieron a cada uno 40 μl de una solución madre de ADN plasmídico (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua) que contenía en cada caso 200.000 CPM de plásmido marcado ($< 0,1 \mu\text{g}$) y se mezclaron pipeteando. Después de 15 min de incubación, se centrifugaron las muestras a 20.000 x g durante 20 minutos. Se transfirieron cuarenta μl de cada uno de los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos blanca (Costar) y se mezclaron con 160 μl de cóctel Microscint 20 (Canberra Packard). Se determinó la radioactividad en los pocillos usando un instrumento TopCount (Canberra Packard; retardo del recuento 10 min, el tiempo de recuento fue de 3 x 5 min). Los resultados se muestran en la figura 1.

Ejemplo 2: Lipomagnetofección de células NIH3T3

Se sembraron células en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células por pocillo 7 horas antes de la transfección. Inmediatamente antes de la transfección, se cambió el medio por 150 μl de medio recién preparado. Se añadieron complejos de ADN en un volumen de 50 μl por pocillo.

- 45 Soluciones de partida para preparar complejos de ADN:

solución madre de DOTAP-Col:

90,91 μl de solución madre de liposomas (véase anteriormente) por ml de HBS

solución madre de liposomas de fIMAG-DOCHOL:

90,91 µl de solución madre (véase anteriormente) por ml de HBS

solución madre de ADN:

30 µg de plásmido p55pcMV-IVS-luc+ por ml de HBS

solución madre de DOTAP-Col-ADN:

- 5 se añadieron volúmenes iguales de solución madre de ADN a volúmenes iguales de solución madre de DOTAP-Col y se mezclaron pipeteando

dispersión de fIMAG-PO₄:

30 µg por ml de HBS

dispersión de fIMAG-PEI:

- 10 30 µg por ml de HBS

Orden de mezcla para las formulaciones probadas:

1. Se añadieron 560 µl de solución madre de DOTAP-Col-ADN a 280 µl de dispersión de fIMAG-PO₄
2. Se añadieron 280 µl de solución madre de ADN a 280 µl de dispersión de fIMAG-PO₄. La mezcla resultante se añadió a 280 µl de solución madre de DOTAP-Col.
- 15 3. Análogo a 1. con FIMAG-PEI.
4. Análogo a 2. con FIMAG-PEI.
5. Se añadieron 160 µl de solución madre de ADN a 160 µl de solución madre de liposomas de DOTAP-Col-fIMAG-PO₄.
- 20 6. Se añadieron 160 µl de solución madre de ADN a 320 µl de solución madre de liposomas de DOTAP-Col-fIMAG-PO₄.

Series de dilución

- 25 Se llevó a cabo una serie de dilución para las formulaciones 1-4. Se añadieron alícuotas de 360 µl cada una de los complejos de ADN a una fila de una placa de 96 pocillos. Las filas B - D contenían 180 µl de HBS cada una. Se transfirieron alícuotas de 180 µl de la fila A a la fila B con un pipeteador multicanal, se mezclaron pipeteando, se transfirieron 180 µl de la fila B a la fila C y así sucesivamente.

Transfección

- 30 Se añadieron cincuenta µl de cada una de las diluciones resultantes a las células por triplicado (en cuadruplicado para las formulaciones 5 y 6) en dos placas de 96 pocillos diferentes. Después de la adición de complejo de ADN, se colocó una placa sobre un imán de tipo B. Después de 10 min de incubación, se retiró el medio de transfección, se lavaron las células con 150 µl de medio recién preparado y se incubaron durante la noche en medio recién preparado. Los resultados se muestran en la figura 2.

Ejemplo de referencia 3: Magnetofección de células NIH3T3 con fIMAG-PEI y ADN desnudo

- 35 Se sembraron células en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células por pocillo 2 días antes de la transfección. En el momento de la transfección las células eran confluentes. Inmediatamente antes de la transfección, se cambió el medio por 150 µl de medio recién preparado. Se añadieron complejos de ADN en un volumen de 50 µl por pocillo.

Solución de partida para preparar complejos de ADN:

Solución madre de ADN: 25 µg de p55pcMV-IVS-luc+ en 562,5 µl de agua

- 40 Se añadió solución madre de ADN (112,5 µl en cada caso) a 112,5 µl de cada una de una serie de dilución de fIMAG-PEI en agua que contenían 20, 40, 60 o 80 µg de fIMAG-PEI. Después de 15 min de incubación, se añadieron a cada una 60 µl de glucosa al 50 % en agua. Se añadieron cincuenta µl (0,5 µg de ADN en cada caso) de la suspensión resultante a cada una de las células. Se colocó la fila H de la placa bajo imanes de tipo A. Después de 1,5 h de incubación, se cambió el medio. Se llevó a cabo el ensayo de luciferasa 24 h después de la transfección, los resultados se muestran en la figura 3.

45

Ejemplo 4: Magneto-PEI-polifeción de células NIH3T3 en presencia de copolímero protector (PROCOP) P6YE5C (Finsinger *et al.* 2000)

Se sembraron células en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células por pocillo 7 horas antes de la transfección. Inmediatamente antes de la transfección, se cambió el medio por 150 µl de medio recién preparado. Se añadieron complejos de ADN en un volumen de 50 µl por pocillo.

Soluciones de partida para preparar complejos de ADN:

solución madre de PEI:

46,3 µg por ml de agua o HBS, respectivamente

Variante a): 1 mg/ml en agua

10 solución madre de PEI^{biotina}:

46,3 µg por ml de agua o HBS, respectivamente

Variante a): 4,39 mg/ml en agua

solución madre de ADN:

44,4 µg de plásmido P55pcMV-IVS-luc+ por ml de agua o HBS, respectivamente

15 solución madre de PEI-ADN (PEI^{biotina}-ADN):

Se añadieron volúmenes iguales de solución madre de ADN a volúmenes iguales de solución madre de PEI-ADN (PEI^{biotina}-ADN, resp.) y se mezclaron pipeteando

solución madre de P6YE5C:

269 nmol de carga negativa por ml de agua o HBS, respectivamente

20 dispersión de fIMAG-PEI: 44,4 µg por ml de agua o HBS, respectivamente

Variante a): 1 mg/ml en agua

dispersión de fIMAG-PEI^{Estav}: 44,4 µg por ml de agua o HBS, respectivamente

Variante a): 0,9 mg/ml en agua

Orden de mezcla para las formulaciones probadas:

- 25 1. Se añadieron 216 µl de solución madre de PEI-ADN (agua) a 108 µl de solución madre de fIMAG-PEI y se mezclaron pipeteando. Después de 15 min, se añadió el complejo de ADN a 108 µl de solución madre de P6YE5C y se mezclaron pipeteando. Finalmente, se añadieron 48 µl de glucosa al 50 % en agua.
2. Se añadieron 216 µl de solución madre de PEI-ADN (agua) a 108 µl de solución madre de fIMAG-PEI^{Estav} y se mezclaron pipeteando. El resto, como en 1.
- 30 3. Se añadieron 216 µl de solución madre de PEI^{biotina}-ADN (agua) a 108 µl de solución madre de fIMAG-PEI y se mezclaron pipeteando. El resto, como en 1.
4. Se añadieron 216 µl de solución madre de PEI^{biotina}-ADN (agua) a 108 µl de solución madre de fIMAG-PEI^{Estav} y se mezclaron pipeteando. El resto, como en 1.
- 35 5. Premezcla de 5 µl de PEI y 4,8 µl de fIMAG-PEI, variantes a) de las soluciones madre, llenado con 206,2 µl de agua, adición de 108 µl de solución madre de ADN. Después de 15 min, se añadió el complejo de ADN resultante a 108 µl de solución madre de P6YE5C y se mezclaron pipeteando. Finalmente, se añadieron 48 µl de glucosa al 50 % en agua.
6. Premezcla de 5 µl de PEI y 5,33 µl de fIMAG-PEI^{Estav}, variantes a) de las soluciones madre, llenado con 205,7 µl de agua, adición de 108 µl de solución madre de ADN. El resto, como en 5.
- 40 7. Premezcla de 1,14 µl de PEI^{biotina} y 4,8 µl de fIMAG-PEI, variantes a) de las soluciones madre, llenado con 210 µl de agua, adición de 108 µl de solución madre de ADN. El resto, como en 5.
8. Premezcla de 1,14 µl de PEI^{biotina} y 5,33 µl de fIMAG-PEI^{Estav}, variantes a) de las soluciones madre, llenado con 209,5 µl de agua, adición de 108 µl de solución madre de ADN. El resto, como en 5.

9. Análogo a 1, pero llevado a cabo en HBS. En la etapa final, se añadieron 48 µl de HBS en lugar de solución de glucosa.
- 10 Análogo a 2, pero llevado a cabo en HBS. En la etapa final, se añadieron 48 µl de HBS en lugar de solución de glucosa.
- 5 11 Análogo a 3, pero llevado a cabo en HBS. En la etapa final, se añadieron 48 µl de HBS en lugar de solución de glucosa.
- 12 Análogo a 4, pero llevado a cabo en HBS. En la etapa final, se añadieron 48 µl de HBS en lugar de solución de glucosa.

Transfección

10 Se añadieron cincuenta µl (que equivalen a 0,5 µg de ADN) de cada una de las diluciones resultantes a las células por cuadruplicado en dos placas de 96 pocillos diferentes. Después de la adición de complejo de ADN, se colocó una placa sobre un imán de tipo B. Después de 10 min de incubación, se retiró el medio de transfección, se lavaron las células con 150 µl de medio recién preparado y se incubaron durante la noche en medio recién preparado. Los resultados se muestran en la figura 4.

15 **Ejemplo 5: Magnetofección potenciada por adenovirus (AVEM)-transferencia génica con fIMAG-PEI:PEI^{biotina}-ADN:Adv^{biotina} y fIMAG-PEI^{Estav}:PEI^{biotina}-ADN:Adv^{biotina} a células NIH3T3; gen indicador: β-galactosidasa**

Se sembraron células en placas de seis pocillos a una densidad de 350.000 células por pocillo el día antes de la transfección. Se cambió el medio por 1,5 ml de medio recién preparado por pocillo inmediatamente antes de la transfección. Se añadieron complejos de ADN en volúmenes totales de 500 µl.

20 Complejos de ADN:

Se añadieron treinta µg de ADN (pCMV-Bgal) en 625 µl de HBS (HEPES 20 mM a pH 7,4/cloruro sódico 150 mM) a 31,25 µg de PEI^{biotina} en el mismo volumen del mismo tampón. Se diluyeron quince microlitros de adenovirus inactivado con psoraleno, biotinilado (Adv biotina), a 625 µl con HBS y se añadieron a los complejos de ADN preformados. Se añadió la mitad del material resultante a 18 µg de fIMAG-PEI en 313 µl de HBS, se añadió la otra mitad a 18 µg de fIMAG-PEI^{Estav} en 313 µl de HBS. Se añadieron alícuotas de 500 µl por pocillo de estas preparaciones de complejo de ADN finales a las células, que equivalían a una dosis de ADN de 6 µg por pocillo (pocillos 2 y 3 con fIMAG-PEI; pocillos 4 y 5 con fIMAG-PEI^{Estav}). Se unieron imanes de tipo A bajo los pocillos 3 y 4. Después de 20 min de incubación, se lavaron las células una vez con medio recién preparado y después se incubaron durante 24 h. Se retiraron los imanes 30 min después de la adición de los vectores génicos. Después de 24 h, se lavaron las células con PBS y se incubaron con solución de sustrato X-gal (K₄Fe(CN)₆ 5 mM, K₃Fe(CN)₆ 5 mM, cloruro de magnesio 2 mM, 1 mg/ml de X-Gal en PBS). Después de 45 min de tinción, se escaneó la placa para obtener datos (figura 5).

35 **Ejemplo 6: Transferencia génica con fIMAG-PEI:PEI^{biotina}-ADN:Adv^{biotina} y fIMAG-PEI^{Estav}:PEI^{biotina}-ADN:Adv^{biotina} a células NIH3T3. Gen indicador: luciferasa**

35 Células:

Se sembraron células NIH3T3 (28.000 por pocillo) en placas de 96 pocillos el día antes de la transfección. Inmediatamente antes de añadir las soluciones de transfección (50 µl en cada caso), se cambió el medio por 150 µl de medio recién preparado.

40 Solución madre de PEI^{biotina}-ADN: Se añadieron 25 µg de ADN de p55pcMV-IVS-luc+ en 625 µl de HBS a 26,06 µg de PEI en 625 µl de HBS y se mezclaron pipeteando.

Solución madre A de fIMAG-PEI: 40 µg/ml en HBS.

Solución madre B de fIMAG-PEI: 80 µg/ml en HBS.

Solución madre A de fIMAG-PEI^{Estav}: 40 µg/ml en HBS.

Solución madre B de fIMAG-PEI^{Estav}: 80 µg/ml en HBS.

45 Adenovirus químicamente inactivado: 20 µl por ml en HBS.

Se mezclaron alícuotas de 240 µl cada una de solución madre de PEI^{biotina}-ADN con 120 µl en cada caso de solución madre A o B de fIMAG-PEI o fIMAG-PEI^{Estav}, respectivamente, se incubaron durante 15 min seguido de la adición de 120 µl de solución madre de virus.

50 AVET: Se añadió solución madre de virus (2,4 µl en 120 µl de HBS) a solución madre de Estav-pL (240 ng en 120 µl de HBS), se incubó durante 15 min, se añadió a solución madre de ADN (4,8 µg en 120 µl de HBS) seguido de la

adición de poli(lisina) (pL 170) (4,8 µg en 120 µl de HBS).

- 5 Después de una incubación final de los complejos así ensamblados durante 15 min, se añadieron alícuotas de 50 µl cada una a las células por cuadruplicado. Se incubaron las placas a 37 °C durante 5 min, se colocó una placa sobre una placa magnética de 96 pocillos (imán de tipo C), la otra placa de dejó sin imán. Se lavaron las células una vez con 150 µl de medio recién preparado y después se incubaron durante la noche en 150 µl de medio. Se llevó a cabo el ensayo de luciferasa 24 h después de la transfección. Los resultados se muestran en la figura 6.

Ejemplo 7: Incorporación adicional de un componente efector: Incorporación del péptido desestabilizador de membrana INF7 en poliplexos de polilisina (pL) y PEI junto con fIMAG-PEI

Células:

- 10 Se sembraron células NIH3T3 (28.000 por pocillo) en placas de 96 pocillos el día antes de la transfección. Inmediatamente antes de añadir las soluciones de transfección (50 µl en cada caso), se cambió el medio por 150 µl de medio recién preparado.

Solución madre de pL-ADN:

- 15 Se añadieron 28 µg de p55pcMV-IVS-luc+ en 700 µl de HBS a 141,9 µg de pL170 en 700 µl de HBS y se mezclaron pipeteando (dando lugar a una N/P = 8).

Solución madre de PEI-ADN:

Se añadieron 16,8 µg de ADN en 420 µl de HBS a 17,5 µg de PEI en 420 µl de HBS (dando lugar a una N/P = 8).

Solución madre de fIMAG-PEI:

33,6 µg de fIMAG-PEI en 840 µl de HBS.

- 20 Solución madre de INF7:

24,2 µM de péptido INF7 que tiene la secuencia de aminoácidos GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC (SEQ ID N.º: 1) en HBS (que equivalen a 121,1 µM de carga neg.).

Orden de mezcla para las formulaciones probadas:

- 25 1. PEI/ADN/fIMAG-PEI: se añadieron 240 µl de solución madre de PEI-ADN a 120 µl de solución madre de fIMAG-PEI, seguido de la adición de 120 µl de HBS después de 15 min.
2. PEI/ADN/INF7/fIMAG-PEI: se añadieron 240 µl de solución madre de PEI-ADN a 120 µl de solución madre de INF7, se incubaron durante 10 min y se añadieron a 120 µl de solución madre de fIMAG-PEI.
3. PEI/ADN/fIMAG-PEI/INF7: se añadieron 240 µl de solución madre de PEI-ADN a 120 µl de solución madre de fIMAG-PEI, se incubaron durante 10 min y se añadieron a 120 µl de solución madre de INF7.
- 30 4. pL/ADN/INF7: se añadieron 240 µl de solución madre de pL-ADN a 120 µl de solución madre de INF7, seguido de la adición de 120 µl de HBS después de 15 min.
5. pL/ADN/fIMAG-PEI: se añadieron 240 µl de solución madre de pL-ADN a 120 µl de solución madre de fIMAG-PEI, seguido de la adición de 120 µl de HBS después de 15 min.
- 35 6. pL/ADN/fIMAG-PEI/INF7: se añadieron 240 µl de solución madre de pL-ADN a 120 µl de solución madre de fIMAG-PEI, seguido de la adición de 120 µl de solución madre de INF7 después de 15 min.
7. pL/ADN/INF7/fIMAG-PEI: se añadieron 240 µl de solución madre de pL-ADN a 120 µl de solución madre de INF7, seguido de la adición de 120 µl de solución madre de fIMAG-PEI después de 15 min.

- 40 Después de 15 min de incubación, se añadieron alícuotas de 50 µl cada una a las células por cuadruplicado. Se incubaron las placas a 37 °C durante 10 min, se colocó una placa sobre una placa magnética de 96 pocillos (imán de tipo C), la otra placa de dejó sin imán. Se lavaron las células una vez con 150 µl de medio recién preparado y después se incubaron durante la noche en 150 µl de medio. Se llevó a cabo el ensayo de luciferasa 24 h después de la transfección. Los resultados se muestran en la figura 7.

Ejemplo de referencia 8: Magnetofección de células NIH3T3 y HepG2 con partículas magnéticas cargadas negativamente (fIMAG-ARA; AMAG-pACRYL; fIMAG-pACRYL-MAL; fIMAG-pASP)

- 45 Células:

Se sembraron células NIH3T3 (28.000 por pocillo) y células Hep G2 (45.000 por pocillo) en placas de 96 pocillos

el día antes de la transfección. Inmediatamente antes de añadir las soluciones de transfección (50 µl en cada caso), se cambió el medio por 150 µl de medio recién preparado.

Solución madre de PEI-ADN:

5 Se añadieron 240 µg de ADN de p55pCMV-IVS-luc+ en 7200 µl de agua a 250,2 µg de PEI en 7200 µl de agua y se mezclaron mediante agitación en vórtex.

Series de dilución de fIMAG:

10 Se añadieron alícuotas de 144 µl cada una de soluciones madre de fIMAG en agua que contenían cada una 38,4 µg de fIMAG a las columnas 1 y 7 de una placa de 96 pocillos de fondo en U por cuadruplicado. Todos los demás pocillos contenían 72 µl de agua. Se transfirieron alícuotas de 72 µl cada una de la columna 1 a la columna 2 con un pipeteador multicanal, se mezclaron pipeteando, se transfirieron 72 µl a la columna 3 y así sucesivamente hasta la columna 5. Se desechó el excedente de 72 µl de la columna 5. Se llevó a cabo el mismo procedimiento desde la columna 7 hasta la columna 11. Las columnas 6 y 12 contenían sólo agua.

15 A cada una de las diluciones resultantes se les añadieron 144 µl de solución madre de PEI-ADN y se mezclaron pipeteando. Después de 15 min de incubación, se añadieron a cada una 24 µl de glucosa al 50 % en agua (p/p). De cada una de las muestras resultantes, se añadieron 50 µl a las células por cuadruplicado. Se incubaron las placas a 37 °C durante 10 min, se colocó una placa sobre una placa magnética de 96 pocillos (imán de tipo B), la otra placa de dejó sin imán. Se lavaron las células una vez con 150 µl de medio recién preparado y después se incubaron durante la noche en 150 µl de medio. Se llevó a cabo el ensayo de luciferasa 24 h después de la transfección. Los resultados se muestran en la figura 8.

20 **Ejemplo 9: Transfección por coprecipitación con fosfato de calcio de fIMAG-PEI y ADN en presencia y en ausencia de copolímero protector P6YE5C**

25 La precipitación de ADN con fosfato de calcio se ha usado ampliamente para la transfección de líneas celulares en cultivo. Se diluye el ADN en una solución de cloruro de calcio y, posteriormente, se añade gota a gota a un volumen igual de tampón que contenga fosfato. Se forma precipitados muy grandes, de los que se añade una dispersión al cultivo celular. Si el tampón que contiene fosfato también contiene el copolímero protector P6YE5C, se forman nanopartículas que son relativamente estables. Con el fin de demostrar que pueden incorporarse las fIMAG en nanopartículas o coprecipitados de fosfato de calcio, se llevó a cabo el experimento siguiente.

Células:

30 Se sembraron células NIH3T3 (28.000 por pocillo) y células Hep G2 (45.000 por pocillo) en placas de 96 pocillos el día antes de la transfección. Inmediatamente antes de añadir las soluciones de transfección (50 µl en cada caso), se cambió el medio por 150 µl de medio recién preparado.

Solución madre de ADN: 45,6 ng/µl de p55pCMV-IVS-luc+ en agua.

35 Se añadieron en cada caso cien µl de solución madre de ADN a cada 100 µl de agua que contenían 0, 2,28, 4,56, 9,13, 18,25 y 36,5 µg de fIMAG-PEI y se mezclaron pipeteando. Se añadieron alícuotas de 28,1 µl de cloruro sódico 2,5 M cada una a estas muestras, dando lugar a una concentración de ADN de 20 µg/ml en cloruro cálcico 308 mM. Este procedimiento se lleva a cabo por duplicado. Se añadieron las muestras gota a gota al mismo tiempo que se agitaba con vórtex a volúmenes iguales (228,1 µl) de HBS 2x (HEPES 50 mM a pH 7,1, cloruro sódico 280 mM, hidrogenofosfato disódico 1,5 mM) o HBS 2x que contenía 3 equivalentes de carga de copolímero protector P6YE5C. Equivalentes de carga significa la proporción de cargas negativas del copolímero protector y de cargas negativas del ADN (Finsinger *et al.* 2000). Después de 15-30 min de incubación, se añadieron alícuotas de 50 µl cada una (que equivalen a 0,5 µg de ADN) a las células. Se incubaron las placas a 37 °C durante 10 min, se colocó una placa sobre una placa magnética de 96 pocillos (imán de tipo B), la otra placa de dejó sin imán. Se lavaron las células una vez con 150 µl de medio recién preparado y después se incubaron durante la noche en 150 µl de medio. Se llevó a cabo el ensayo de luciferasa 24 h después de la transfección. Los resultados se muestran en la figura 9.

Ejemplo 10: Magnetofección con un adenovirus recombinante portador del gen lacZ

Ad LacZ es un adenovirus de serotipo 5 humano del que se ha eliminado E1A portador del gen de la β-galactosidasa como gen indicador.

50 Se plaquearon células NIH3T3 en placas de 6 pocillos a una densidad de 500.000 células por pocillo el día antes de la transfección. Inmediatamente antes de la transfección, se añadió medio recién preparado (1,5 ml) a las células. Se añadieron cócteles de transfección (transducción) en un volumen total de 500 µl por pocillo. Después de incubarlas durante 20 min en medio de transducción, se lavaron las células con 2 ml de medio recién preparado y después se incubaron durante la noche. Veinticuatro horas después de la transducción, se llevó a cabo la tinción con X-gal. Se lavaron las células dos veces con PBS, se fijaron con 1 ml de solución fijadora (glutaraldehído al 0,2 %, para-

formaldehído al 2 %, cloruro de magnesio en PBS 2 mM) durante 1 h, se lavaron dos veces con HBS y se tiñeron durante 1 h con 0,5 ml de solución de tinción ($K_4Fe(CN)_6$ 5 mM, $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM, cloruro de magnesio 2 mM, 1 mg/ml de X-gal en PBS).

5 Controles: Se añadieron quinientos μ l de HBS a las células de un pocillo. A un segundo pocillo, se le añadieron 500 μ l de tampón HBS que contenía aprox. $7,8 \times 10^9$ partículas víricas (AdLacZ). Bajo ambos pocillos se colocó un imán de tipo A durante 20 min de incubación.

10 Transfección de tipo AVET: se añadió solución madre de virus (aprox. $1,81 \times 10^{10}$ partículas víricas, AdLacZ, en 262,5 μ l de HBS, equivalentes a $2,5 \times 10^8$ ufp) a solución madre de fIMAG-PEI (14,4 μ g en 300 μ l de HBS), se mezclaron pipeteando y se incubaron durante 10 min. A esto se le añadieron 14,4 μ g de ADN plasmídico (que codifica proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor alfa del factor de elongación) en 300 μ l de HBS, se incubaron durante 10 min seguido por la adición de 14,4 μ g de PEI en 300 μ l de HBS. Después de 10 min de incubación, se añadieron alícuotas de 500 μ l a las células de dos pocillos. Se colocó un imán de tipo A bajo un pocillo. Después 30 min, se lavaron las células con 2 ml de medio recién preparado y después se incubaron durante la noche. Veinticuatro horas después de la transducción, se llevó a cabo la tinción con X-gal (pocillos 2 y 2a de la figura 10).

Se llevó a cabo el mismo procedimiento con adenovirus químicamente inactivado, biotinilado (pocillos 3 y 3a de la figura 10).

20 La construcción del gen GFP cotransfectada se expresó en cada una de las reacciones de transfección en las que se usó (pocillos 2, 2a, 3 y 3a; datos no mostrados). En los pocillos, 2 y 3, la expresión de GFP se limitó a la zona bajo la cual se encontraba el imán, al igual que la actividad del β -galactosidasa, por ejemplo en el pocillo 2. En los pocillos 2a y 3a, también pudo observarse la tinción con GFP, aunque, en contraste con los pocillos correspondientes con el campo magnético, con una intensidad más débil y diseminada por toda la zona del fondo del pocillo. Por tanto, también pudo demostrarse el efecto positivo de potenciación y localización específica en este caso, donde se transfectó junto con un virus un segundo gen indicador presente en un plásmido.

25 Valoración de la proporción de AdLacZ/fIMAG-PEI:

Solución madre de AdLacZ:

30 Se añadieron $1,09 \times 10^{11}$ partículas de AdLacZ en alícuotas de 1575 μ l de solución madre de AdLacZ (250 μ l cada una) a cada 300 μ l de HBS que contenían 57,6, 28,8, 14,4, 7,2, 3,6 o 1,8 μ g de fIMAG-PEI cada una, respectivamente. Después de 10 min de incubación, se añadieron 250 μ l de cada una de las muestras resultantes a las células por duplicado, lo que equivale a $8,6 \times 10^9$ partículas víricas por pocillo y 24, 12, 6, 3, 1,5 y 0,75 μ g de fIMAG-PEI por pocillo. Se colocaron imanes de tipo A bajo un pocillo de cada uno de los duplicados, durante 20 min de incubación. Después de eso, se lavaron las células una vez con medio recién preparado y después se incubaron durante la noche. La tinción con X-gal se llevó a cabo como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 10 (pocillos 4 a 9a).

35 **Ejemplo 11: Isotermas de unión a ADN de complejos ternarios de transMAG-PEI/ADN/PEI y transMAG-PEI/ADN/DOCHOL**

Solución madre de ADN: 128.4 μ g de ADN plasmídico más $1,56 \times 10^7$ CPM de plásmido marcado con ^{32}P

ADN en 3120 μ l de agua.

solución madre de PEI: 65.05 μ g en 1560 μ l de agua.

40 Suspensión madre de liposomas de DOCHOL: 189,1 μ l de solución madre 5 mM en 1560 μ l de agua.

En dos configuraciones separadas, se añadieron 120 μ l en cada caso de solución madre de ADN (equivalentes a aprox. 600.000 CPM) a 120 μ l de cada una de las suspensiones que contenían las cantidades siguientes de transMAG-PEI, dando como resultado las siguientes proporciones en peso de transMAG-PEI y ADN. Se prepararon los complejos en tubos Eppendorf y se mezclaron pipeteando.

μ g de transMAG-PEI	0	0,96	1,92	2,88	3,84	4,8	9,6	19,2	28,8	38,4	48	72
Proporción p/p con ADN resultante	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	6	8	10	15

45 Después de 15 min de incubación, se añadieron las mezclas a 120 μ l en cada caso de soluciones madre de PEI o de suspensiones madre de liposomas de DOCHOL en tubos Eppendorf y se mezclaron pipeteando. Esto da como resultado proporciones de N/P de PEI:ADN de 8 o proporciones de carga de DOTAP:ADN de 5. Después de otros 15 min de incubación, se añadieron los complejos a 120 μ l en cada caso de cloruro sódico 600 mM, iniciando la

agregación inducida por sal. Después de 20 min de incubación, se transfirieron 120 µl de cada uno de los complejos resultantes a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en U por triplicado. La placa se colocó sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos. Después de 30 min de sedimentación magnética, se retiraron 80 µl de sobrenadantes y se mezclaron con 125 µl de Microscint 40 (Canberra Packard, Dreieich, Alemania) en una placa de 96 pocillos opaca. De la misma manera, se añadieron a la placa 80 µl de cada una de las muestras no sedimentadas como referencia. Se contaron las muestras usando un instrumento Topcount (Canberra Packard, se fijó el retardo del recuento en 10 min, el tiempo de recuento por triplicado fue de 5 min cada uno). Se calculó la unión de ADN como

$$\% \text{ unido} = 100 \times \frac{CPM_{\text{muestra}}}{CPM_{\text{referencia}}}$$

Ejemplo 12: Agregación inducida por sal

10 Se mezclaron diez µg de ADN plasmídico en 333 µl de agua con 10 µg de transMAG-PEI suspendidas en 333 µl de agua. Después de 10 min de incubación, se añadió el complejo resultante y se mezcló con 10,42 µg de PEI disuelta en 333 µl de agua. El tamaño de las partículas resultantes se determinó por dispersión de luz dinámica usando un Zetasizer 3000 HS de Malvern (Malvern, Herrenberg, Alemania). El promedio del tamaño de partícula medido a lo largo de 9 medida fue de 217,0 ± 2,0 y fue estable con el tiempo. Posteriormente, se añadieron 30,9 µl de cloruro

15 sódico 5 M a la cubeta y se mezclaron con la suspensión de vector. Se acumularon medidas de tamaño con un tiempo de adquisición establecido en 90 segundos, dando un resultado registrado en el instrumento cada 98 segundos de media. Se llevaron a cabo sesenta medidas durante un plazo de tiempo de 1 h 48 min 22 s con un tiempo de retardo tras la 30ª medida.

Ejemplo 13: Isoterma de unión de adenovirus y transMAG-PEI

20 Yodación de adenovirus: Se diluyeron adenovirus recombinantes (10 µl de solución madre, equivalentes a 7,2 x 10¹⁰ partículas víricas o 6,6 x 10⁸ UFP. UFP = unidades formadoras de placas) a 100 µl con tampón HBSa, se mezclaron con 7,8 MBq de ¹²⁵I (2 µl; Amersham-Pharmacia, Friburgo, Alemania) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en una tapa de iodogen (Pierce). Después de la adición de 200 µl de tampón HBSa, se separó el virus del marcador no unido por filtración en gel usando una columna PD-10 de Pharmacia. La calidad de la separación, así

25 como cuatro fracciones que contenían virus, se identificaron mediante la monitorización de la radioactividad. Se usó la fracción 1, que contenía 2,61 x 10¹⁰ partículas víricas (determinado por absorbancia UV) y una actividad de 485 kBq por ml, para estudios de unión.

Se mezclaron treinta y seis microlitros de adenovirus marcado con 18 µl de suspensiones de transMAG-PEI en HBS que contenían las cantidades siguientes de transMAG y daban lugar a las siguientes proporciones de partículas víricas (PV) por pg de transMAG:

30

ng de transMAG-PEI	0	108	216	324	432	540	648	864	1080	1296	1512	1728
Proporción resultante de PV por pg de transMAG		8700	4350	2900	2175	1740	1450	1088	870	725	621	544

Después de 20 min de incubación a temperatura ambiente, se llenaron las muestras hasta 432 µl con HBS. Se transfirieron alícuotas de 120 µl cada una a una placa de 96 pocillos de fondo en U por triplicado, que posteriormente se colocaron sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos. Después de 1 h de sedimentación magnética, se transfirieron 80 µl de cada sobrenadante y de las muestras no sedimentadas a tubos de centelleo individuales (Polyvials V, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Alemania) y se contaron usando un contador gamma (Wallac, Turku, Finlandia). Se calculó la isoterma de unión como anteriormente.

35

Ejemplo 14: Biodistribución adenovirus marcado con ¹²⁵I en ratones

Se mezclaron ochenta microlitros de virus marcado (fracción 2, equivalentes a 5,23 x 10⁹ PV y 97 kBq) con 2,4 µg de transMAG-PEI suspendidas en 20 µl de HBSa (correspondientes aprox. al 73 % de la unión del virus de acuerdo con la isoterma de unión). Después de 20 min de incubación, se llenó la mezcla hasta 800 µl con HBSa. Se inyectaron cien microlitros en cada uno de los animales a través de la vena de la cola. Se anestesió a los animales con una inyección i.p. de 100 mg/kg de peso corporal de cetamina / 8 mg/kg de xilazina. Un animal recibió virus marcado solo, que no estaba unido a transMAG-PEI. Seis animales recibieron virus unido a partículas magnéticas. A tres

45 animales (2 ratones NMRI y un ratón C57BL-6) se les unieron bloques de imán permanente de neodimio-hierro-boro (2 x 1 x 0,5 cm) en la parte derecha del pecho, mientras que a tres animales (2 ratones NMRI y un ratón C57BL-6) se les inyectó sin imán unido. Una hora después de la inyección, se abrió a los animales. Se extrajo la máxima cantidad de sangre posible del ventrículo derecho. Se añadieron la sangre, el corazón, los pulmones, el hígado, los riñones, el bazo, el tubo digestivo (estómago e intestinos), la cola, la cabeza, el tórax y el conducto abdominal, a

viales de centelleo individuales y se contaron usando un contador gamma (Wallac, Turku, Finlandia).

Ejemplo 15: Magnetofección en venas auriculares de cerdos

Preparación de vectores: Por cada animal tratado, se mezcló 1 mg de ADN (pCMV-Luc) en 2,5 ml de agua con 1 mg de transMAG-PEI en el mismo volumen de agua. Después de 15 min de incubación, se añadió la mezcla a 1,042 mg de PEI diluida a 2,5 ml con agua al mismo que se agitaba con vórtex. Después de otros 15 min, se mezcló la preparación con 2,5 ml de cloruro sódico 600 mM. Después de 30 min de incubación, se inyectaron 5 ml en cada caso de la preparación de vector a través de la vena auricular magna a una velocidad de aprox. 1 ml/min en ambas orejas de los animales anestesiados. Se unió un bloque de imán permanente de Nd-Fe-B (3 x 1 x 0,5 cm, NeoDelta, IBS Magnet, Berlín, Alemania) por encima de las venas derechas, cerca de los sitios de inyección. Se aislaron secciones de las venas después de 24 horas y se sometieron a ensayo para detectar expresión de luciferasa como se describe en el ejemplo 17. No se observó expresión del gen indicador (luciferasa) en los vasos sanguíneos de control (orejas izquierdas) ni distal de las posiciones del imán (orejas derechas), aunque se observó expresión de luciferasa reproducible, si bien variable (741,897 ± 693,298 RLU/g de tejido; promedio ± desviación estándar de 4 animales), en todas las muestras de venas que estaban bajo la influencia directa del campo magnético. No se encontró señal de luciferasa (emisión de luz) en muestras de ningún otro órgano principal. Medicación previa de los animales: Se anestesió a los animales con 2 mg/kg de peso corporal de azaperona (Stresnil[®], Janssen-Cilag, Neuss, Alemania) / 15 mg/kg de cetamina (Narketan[®], Chassot, Ravensburg, Alemania) / 0,04 mg/kg de atropina (Eifelfango, Bad Neuenahr - Ahrweiler, Alemania). La anestesia se mantuvo con propofol al 1 % (Fresenius, Bad Homburg, Alemania).

Ejemplo de referencia 16: Magnetofección no vírica en el íleon de ratas

Preparación de vectores: Se añadió una solución madre de 800 µg de transMAG-PEI 16/1 por ml de glucosa al 5 % a una solución madre de 400 µg de ADN plasmídico (pCMV-Bgal) por ml en glucosa al 5 % al mismo tiempo que se agitaba con vórtex. Se inyectaron dosis de 1 ml (equivalente 200 µg de ADN por animal) 30 min después de la preparación de vectores.

Anestesia: 75 µg/kg de peso corporal de medetomidina / 1 mg/kg midazolam / 2,5 µg/kg fentanilo 25.

Tras practicar una laparotomía a las ratas Wistar anestesiadas en la región de la línea alba, se expusieron el íleon y el ciego y se pinzaron 8 cm de intestino de la unión ileocecal en dirección oral. Se aclaró cuidadosamente el material ingerido hacia el ciego mediante la aplicación de 1 ml de solución salina isotónica. Después, se colocó una segunda pinza en posición aboral a 3 cm de la primera pinza. Se inyectó la preparación de vectores con una aguja de 20G adyacente a la primera pinza. Se cerró el sitio de inyección con sutura quirúrgica, al mismo tiempo que se colocaba un bloque de imán estéril (20 x 10 x 5 mm; NeoDelta, IBS Magnet, Berlín, Alemania) bajo la sección pinzada para su magnetofección, mientras que en animales de control, se realizó el tratamiento sin colocar un imán. Cinco minutos después de la inyección se retiraron ambas pinzas. Se dejó el imán durante un total de 20 min. Posteriormente, se devolvieron los intestinos cuidadosamente a la cavidad abdominal, que se cerró con sutura quirúrgica. Se antagonizó la anestesia con 375 µg/kg de peso corporal de atipamezol / 100 µg/kg de flumazenilo / 60 µg/kg de naloxona. Se sacrificó a los animales después de 48 h.

Se aislaron la sección tratada de los intestinos y las zonas adyacentes, se aclararon exhaustivamente con PBS y se fijaron durante 30 min con formaldehído al 2 % y glutaraldehído 0,2 % en PBS. Se aclaró el tejido de nuevo con PBS, seguido de 4 h de tinción con X-Gal a 37 °C. Posteriormente, se volvió a aclarar el tejido exhaustivamente con PBS y se almacenó durante la noche a 4 °C en formaldehído al 2 %/PBS seguido de inclusión en parafina y obtención de criosecciones. Se tiñeron las secciones con eosina (véase la figura 16).

Ejemplo de referencia 17: Magnetofección en las arterias auriculares de conejos

Preparación de vectores: Se añadió una solución madre de 800 µg de transMAG-PEI 16/1 por 750 µl de glucosa al 5 % a una solución madre de 400 µg de ADN plasmídico (pCMV-Luc) por 750 µl en glucosa al 5 % al mismo tiempo que se agitaba con vórtex. Se inyectaron dosis de 1,5 ml (equivalente 400 µg de ADN por animal) 30 min después de la preparación de vectores.

Se anestesió a los animales con una inyección i.m. de 40 mg/kg de peso corporal de cetamina / 20 mg/kg de xilazina. En una oreja, se colocó un bloque de imán (NeoDelta, 2 x 1 x 0,5 cm, IBS Magnet, Berlín, Alemania) distal del sitio de inyección por encima de la arteria auricular usando un dispositivo adaptado que evitó la obstrucción de la arteria. La dosis de vector (1,5 ml en cada caso) se infundió durante 1,5 min en ambas orejas. Una hora después de la inyección, se retiró el imán. Se sacrificó a los animales después de 42 horas y se aislaron segmentos de las arterias auriculares de posiciones anteriores al imán, de la posición del imán y de posiciones posteriores al imán. A partir de las orejas de control, se aislaron los segmentos topológicamente análogos. Se aclararon las muestras con tampón PBS y se homogeneizaron 2 veces durante 30 segundos en tubos con tapón de rosca de 2 ml (VWR scientific products, West Chester, EE. UU.) rellenos con 500 µl de tampón de lisis (Promega, Mannheim, Alemania; que contenía un comprimido de Complete Protease Inhibitor Cocktail por 50 ml, Roche, Penzberg, Alemania) y aprox. 800-850 mg de perlas de circonia (diámetro de 2,5 mm, Biospec Products, Inc., Bartlesville, EE. UU.). La homogeneización se llevó a cabo usando un Mini Bead Beater (Biospec Products, Inc., Bartlesville, EE.

UU.). Tras centrifugar a 20.000 x g a 4 °C durante 10 min, se mezclaron alícuotas de 50 µl con 100 µl de tampón de luciferasa (Promega Luciferasa Assay System, Promega Corporation, Madison, EE. UU.) en una placa de 96 pocillos negra de Costar® (placa opaca-negro sólido de 96 pocillos, Corning Costar Corporation, Cambridge, EE. UU.) y se contó la bioluminiscencia usando un instrumento TopCount (Packard Canberra, Dreieich, Alemania). Tiempo de cuenta fijado en 12 s, retardo de cuenta de 1 min). Los resultados se muestran en las Figuras 17B y C.

Ejemplo 18: Magnetofección de tráquea porcina ex vivo

Preparación de vectores:

(A) Se mezclaron doce microlitros de adenovirus químicamente inactivado (aprox. $3,4 \times 10^{10}$ partículas víricas) diluidos a 200 µl en tampón HBS con 1200 ng de estreptavidina-polilisina (también disueltos en 200 µl de HBS). Después de 15 min, esto se mezcló con 24 µg de ADN (pCMV-Luc) disueltos en 300 µl de HBS. Después de otros 15 min, se mezcló el complejo resultante con 24 µg de transferrina-polilisina disueltos en 300 µl de HBS que se habían mezclado con 48 µg de transMAG-PEI inmediatamente antes de eso. Después de 30 min, se aplicó el complejo de ADN a la muestra de tráquea como se describe a continuación.

(B) Se mezclaron veinticuatro µg de transMAG-PEI suspendidas en 250 µl de DMEM (sin aditivos) con 12 µg de ADN en el mismo volumen de DMEM seguido de la adición inmediata y la mezcla con 60 µl de GenePorter™ (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Después de 30 min, se aplicó el complejo de ADN a la muestra de tráquea como se describe a continuación.

Se aislaron secciones de tráquea inmediatamente después de sacrificar a los animales. Posteriormente, se separó por disección la capa epitelial de la mayoría del músculo y la adventicia y se colocaron los tejidos diseccionados en placas de Petri que contenía DMEM complementado con FCS al 10 % y penicilina/estreptomycin. Después, se diseccionó el tejido en trozos de aprox. 2 x 1,5 cm. Se colocó un imán Neodelta (2 x 1 x 0,5 cm; IBS Magnet, Berlín, Alemania) en un pocillo de una placa de seis pocillos que después se llenó con DMEM (que contenía FCS al 10 %, penicilina y estreptomycin) hasta el borde superior del imán. Se diseminó una muestra de tráquea directamente sobre el imán, de forma que su lado basolateral estaba en contacto con el medio, mientras que el epitelio de las vías respiratorias se expuso a la interfaz aire-líquido. Se cubrió el fondo de una segunda placa con medio y se colocó en ella una muestra de tráquea. Se añadió por goteo el complejo de ADN (250 µl en cada caso, equivalente a 6 µg de ADN) sobre las muestras de tráquea desde arriba. Después de 30 min, se retiró el imán. Se lavó la muestra de tráquea con medio recién preparado y se cultivó durante la noche. Se llevó a cabo el ensayo de luciferasa después de la homogeneización del tejido como se describe en el ejemplo 17. La expresión de luciferasa fue de 150.390 unidades lumínicas en 50 µl del homogeneizado de tejido a partir de la muestra bajo la influencia del imán y de 3785 unidades lumínicas en la muestra en la que no se aplicó ningún campo magnético.

En una segunda configuración, se colocaron dos muestras de tráquea en dos pocillos de dos placas de 24 pocillos diferentes con el lado basolateral hacia abajo. Se colocó una placa sobre una placa magnética con formato de placa de 24 pocillos. Se distribuyó cuidadosamente el complejo de ADN (250 µl de ADN/transMAG-PEI/GenePorter en DMEM, que equivalen a 6 µg de ADN) sobre la superficie de las muestras de tráquea. Después de 20 minutos, se retiró la placa magnética, se lavaron las muestras de tráquea y se cultivaron durante la noche con DMEM completo (que contenía FCS al 10 % y penicilina/estreptomycin). El ensayo de luciferasa se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 17. La expresión de luciferasa fue de cero unidades lumínicas sin campo magnético y de 5.870 unidades lumínicas con campo magnético.

Ejemplo 19: Transfección de células NIH3T3 con Superfect ± transMAG-PEI

Células: se sembraron 18.000 células en placas de 96 pocillos 6 h antes de la transfección.

Concentración de partida: 1 µg de ADN / pocillo

Se añadieron 50 µl de cóctel de transfección por pocillo a células en 150 µl de DMEM completo.

Proporciones N/P de Superfect/ADN = 2, 4 y 6.

Proporción de transMAG-PEI:ADN (p/p) = 1:1

Solución madre de ADN: 80 µg/ml de pCMV-Luc en agua.

Solución madre de transMAG-PEI: 80 µg/ml en agua.

Soluciones madre de Superfect: 40/80/120 µg como los suministra el fabricante diluidos a 250 µl en cada caso con agua.

Preparación del complejo de ADN: Para los experimentos de control, se añadieron 4,8 µg de ADN en 80 µl de agua en cada caso y se mezclaron con 3,2, 6,4 y 9,6 µl de Superfect como lo suministra el fabricante diluido a 80 µl cada uno con agua. Después de 15 min, se añadieron los complejos resultantes y se mezclaron con 80 µl de solución de cloruro sódico 450 mM en cada caso.

- 5 **Magnetofección:** Para cada proporción N/P, se añadieron en cada caso 250 µl de solución madre de transMAG-PEI y se mezclaron con un volumen igual de solución madre de ADN. Después de 15 min de incubación, se añadió la suspensión resultante y se mezcló con soluciones madre de Superfect correspondientes. Después de otros 15 min de incubación, se añadieron los complejos resultantes y se mezclaron con 250 µl de solución de cloruro sódico 600 mM en cada caso.
- Series de dilución:** Después de 25 min de incubación, se añadieron cuatro alícuotas de 240 µl cada una de cada proporción N/P a la fila A de una placa de 96 pocillos de fondo en U. Todos los demás pocillos se llenaron con 120 µl de cloruro sódico 150 mM. Usando un pipeteador multicanal, se transfirieron 120 µl en cada caso de la fila A a la fila B, se mezclaron pipeteando, después se transfirieron 120 µl en cada caso de la fila B a la fila C, etc.
- 10 **Transfección:** Se complementaron las células con DMEM completo recién preparado antes de la transfección. Se transfirieron cincuenta microlitros en cada caso de complejos de ADN por pocillo a las células de 2 placas diferentes. Se colocó una placa sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos. Después de 15 min de incubación, se lavaron las placas una vez con 150 µl de DMEM completo recién preparado por pocillo y después se incubaron en DMEM completo hasta el ensayo de luciferasa después de 24 h. Los resultados se muestran en la figura 18.
- 15 **Ejemplo 20: Transfección de células NIH3T3 con Superfect ± transMAG-PEI para estudiar la influencia de un campo magnético aparte de su papel en la concentración de partículas en la superficie celular**
- Células:** se sembraron 18.000 células en placas de 96 pocillos 6 h antes de la transfección.
- Concentración de partida:** 0,5 µg de ADN / pocillo
- Se añadieron 50 µl de cóctel de transfección por pocillo a células en 150 µl de DMEM completo.
- 20 **Proporción N/P de Superfect/ADN = 6.**
- Proporción de transMAG-PEI:ADN (p/p) = 1:1**
- Soluciones madre de ADN:** Seis tubos que contienen 10 µg de pCMV-Luc en 250 µl de agua cada uno.
- Soluciones madre de transMAG-PEI:** Seis tubos que contienen 0, 2, 4, 6, 8, y 10 µg de transMAG-PEI en 250 µl de agua cada uno.
- 25 **Soluciones madre de Superfect:** Seis tubos que contienen 60 µg de Superfect en 250 µl de agua cada uno.
- Preparación del complejo de ADN:** se añadieron soluciones madre de transMAG-PEI y se mezclaron con soluciones madre de ADN, se incubaron durante 15 min seguido de la adición de los complejos resultantes y su mezcla con las soluciones madre de Superfect, incubación durante 15 min, seguido de la adición de los complejos resultantes y su mezcla con 250 µl de cloruro sódico 600 mM en cada caso.
- 30 **Series de dilución:** Después de 25 min de incubación, se añadieron cuatro alícuotas de 240 µl de cada una de las proporciones de transMAG-ADN a las filas A y E de una placa de 96 pocillos de fondo en U. Todos los demás pocillos se llenaron con 120 µl de cloruro sódico 150 mM. Usando un pipeteador multicanal, se transfirieron 120 µl en cada caso de la fila A a la fila B, se mezclaron pipeteando, después se transfirieron 120 µl en cada caso de la fila B a la fila C, etc., y de forma análoga de la fila E a la fila F, etc.
- 35 **Transfección:** Se complementaron las células con DMEM completo recién preparado antes de la transfección. Se transfirieron cincuenta microlitros en cada caso de complejos de ADN por pocillo a las células de 2 placas diferentes. Después de 20 min de incubación, se lavaron las células una vez con 150 µl de DMEM completo recién preparado por pocillo y después se incubaron en DMEM completo hasta el ensayo de luciferasa después de 24 h. Una de los 2 placas, sin embargo, se colocó sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos después del procedimiento de lavado durante 40 min. Los resultados se muestran en la figura 19.
- 40 **Ejemplo 21: transfección de células CHO-K1 con PEI-DNA + transMAG con diversos recubrimientos de superficie policatiónicos**
- Células:** se sembraron 19.000 células en placas de 96 pocillos el día antes de la transfección.
- Ajustes generales:** 0,5 µg de ADN / pocillo
- 45 **Se añadieron 50 µl de cóctel de transfección por pocillo a células en 150 µl de DMEM completo.**
- Proporción N/P de PEI:ADN = 8.**
- Proporciones de transMAG-PEI:ADN (p/p) = 0,4, 0,8, 0,1, 2, 4, 8.**

Solución madre de ADN: 40 µg/ml en agua.

Solución madre de PEI: 41,7 µg/ml en agua.

transMAG: transMAG-DEAE, transMAG-DAEA, transMAG-ALMIDÓN-PEI, transMAG-PEI-etoxilada, transMAG-PEI-epiclorhidrina, transMAG-PEI-SDS, transMAG-PEI-bajo PM, transMAG-PEI-C1/1.

- 5 **Preparación de vectores:** Se añadieron 125 µl de solución madre de ADN en cada caso a las cantidades siguientes de suspensiones de transMAG, cada una en 125 µl de agua, y se mezclaron pipeteando:

transMAG:ADN (p/p)	0,4	0,8	1	2	4	8
µg de transMAG en 125 µl de agua	2	4	5	10	20	30

- 10 Después de 15-30 min de incubación, se añadieron y mezclaron 125 µl de solución madre de PEI en cada caso. Después de otros 15-30 min, se añadieron 125 µl en cada caso de cloruro sódico 600 mM. Después de aprox. 45 min de incubación, se añadieron 50 µl de cada formulación de complejo de ADN a las células por cuadruplicado en dos placas diferentes. Justo antes de esto, se habían complementado las células con 150 µl de DMEM completo recién preparado. Durante los siguientes 15 min de incubación, se colocó una placa sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos. Después de eso, se lavaron las células una vez con DMEM completo seguido de incubación durante la noche hasta el ensayo de luciferasa. La figura 20 muestra que, en principio, cada tipo de partículas magnéticas usadas para la magnetofección en esos experimentos provoca un aumento de la transferencia génica en presencia de un campo magnético en comparación con su ausencia.

Ejemplo 22: Transfección de células NIH3T3 con ADN + transMAG con diversos recubrimientos de superficie de PEI. Preparación del vector en glucosa y soluciones que contienen sales. Valoración de proporciones óptimas de transMAG:ADN

- 20 Células: se sembraron 18.500 células en placas de 96 pocillos el día antes de la transfección.
Ajustes generales: 1 µg de ADN / pocillo
Se añadieron 50 µl de cóctel de transfección por pocillo a células en 150 µl de DMEM completo.
Proporciones de transMAG-PEI:ADN (p/p) = 20, 13,33, 8,89, 5,93, 3,95, 2,63, 1,76, 1,17, 0,78, 0,52, 0,35, 0.
Soluciones madre de ADN: 40 µg/ml en glucosa al 5 % y en cloruro sódico 300 mM, respectivamente.
- 25 transMAG y series de dilución: transMAG-18/1, transMAG-19/1, transMAG-PEI-21/1, transMAG-23/1, transMAG-24/1, transMAG-25/1, transMAG-37, transMAG-38.
Se llevaron a cabo dos series de dilución idénticas en glucosa al 5 % y en agua. Se añadieron por triplicado noventa µl de soluciones madre en glucosa al 5 % y agua, respectivamente, que contenían cada una 72 µg de transMAG a las primeras columnas de placas de 96 pocillos con fondo en U.
- 30 Todos los demás pocillos se llenaron con 30 µl de glucosa al 5 % y agua, respectivamente. Usando un pipeteador multicanal, se transfirieron 60 µl en cada caso de la columna 1 a la columna 2, se mezclaron pipeteando, se transfirieron 60 µl en cada caso de la columna 2 a la columna 3 y así sucesivamente.
La columna 12 se dejó con un contenido de 30 µl de glucosa al 5 % y agua, respectivamente.
- 35 Preparación de vectores: Se añadieron 30 µl en cada caso de solución madre de ADN en glucosa al 5 % o cloruro sódico 300 mM y se mezclaron con las series de dilución en glucosa al 5 % y agua, respectivamente, usando un pipeteador multicanal.
Transfección: Después de 30 min de incubación, se transfirieron 50 µl en cada caso de las formulaciones de complejo de ADN a las células en dos placas diferentes. Justo antes de esto, se habían complementado las células con 150 µl de DMEM completo recién preparado. Durante los siguientes 20 min de incubación, se colocaron las placa sobre placas magnéticas con formato de 96 pocillos. Después de eso, se lavaron las células una vez con DMEM completo seguido de incubación durante la noche hasta el ensayo de luciferasa. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 21.

Ejemplo 23: Transfección de células NIH3T3 y HepG2 con transMAG-pASP-ADN y diversas cantidades de PEI

Células: se sembraron 35.000 células NIH3T3 y 45.000 células HepG2 por pocillo en placas de 96 pocillos 5 h antes

ES 2 391 764 T3

de la transfección.

Ajustes generales: 0.5 µg de ADN / pocillo.

Se añadieron 50 µl de cóctel de transfección por pocillo a células en 150 µl de DMEM completo.

Proporciones N/P de PEI:ADN = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11.

- 5 proporción de transMAG-pASP:ADN (p/p) = 1.

Solución madre de ADN: 40 µg/ml en HEPES 20 mM a pH 7,4.

Solución madre de transMAG-pASP: 40 µg/ml en HEPES 20 mM a pH 7,4.

Soluciones madre de PEI:

PEI:ADN (proporción N/P)	0	1	2	3	4	5
PEI (µg/ml en HEPES 20 mM)	0	5,21	10,42	15,64	20,85	26,06
PEI:ADN (proporción N/P)	6	7	8	9	10	11
PEI (µg/ml en HEPES 20 mM)	31,27	36,49	41,70	46,91	52,12	57,33

- 10 Preparación de vectores: Se mezclaron las soluciones madre de ADN y transMAG-pASP a una proporción vol/vol de 1:1. De la mezcla resultante, se añadieron 430 µl en cada caso a cada 215 µl de las soluciones madre de PEI y se mezclaron. Después de 15 min de incubación, se mezclaron los complejos resultantes con 215 µl en cada caso de cloruro sódico 600 mM en HEPES 20 mM a pH 7,4.

- 15 Transfección: Después de aprox. 30 min de incubación, se añadieron 50 µl de cada formulación de complejo de ADN a las células por cuadruplicado en dos placas diferentes de cada línea celular. Justo antes de esto, se habían complementado las células con 150 µl de DMEM completo recién preparado. Durante los siguientes 10 min de incubación, se colocó una placa por línea celular sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos. Después de eso, se cambió el medio por DMEM completo recién preparado sin lavado. Se hicieron crecer las células durante 24 h hasta el ensayo de luciferasa. El resultado de estos ensayos se presenta en la figura 22.

- 20 **Ejemplo 24: Transfección de células CHO-K1 con GenePorter-ADN ± transMAG-PEI**

Células: se sembraron 19.500 células por pocillo en placas de 96 pocillos el día antes de la transfección.

Concentración de partida: 0,1 µg de ADN / pocillo

100 µl de volumen de transfección / pocillo DMEM sin suero.

5 µl de GenePorter / 1 µg de ADN.

- 25 **Solución madre de ADN:** 24 µg en 1,2 ml de DMEM.

Se añadieron 144 µl de solución madre de ADN en cada caso a las cantidades siguientes de suspensiones de transMAG-PEI en 144 µl de DMEM y se mezclaron pipeteando:

transMAG:ADN (p/p)	0	0,5	1	2	4	6	8	10
µg de transMAG-PEI en 144 µl de DMEM	0	1,44	2,88	5,76	11,52	14,4	23,03	28,8

- 30 La incubación no fue más prolongada del tiempo de manipulación necesario. Inmediatamente, se añadieron las mezclas de transMAG-ADN y se mezclaron en 8 tubos que contenían 14,4 µl de GenePorter diluido a 288 µl con DMEM. Después de 20 min de incubación, se llenaron los complejos de ADN hasta 2880 µl con DMEM. Después, se

añadieron 3 x 230 µl de cada composición (por triplicado) de forma consecutiva a las filas A y E, respectivamente, de 4 placas de 96 pocillos de fondo redondo. Todas las demás filas se llenaron con 115 µl de DMEM.

Series de dilución: Usando un pipeteador multicanal, se transfirieron 115 µl en cada caso de la fila A y E, respectivamente, a las filas B y F, respectivamente, se mezclaron pipeteando, después se transfirieron 115 µl en cada caso de la fila B y F, respectivamente, a las filas C y G, etc. El tiempo total de manipulación fue de aproximadamente 20 min.

Transfección: Se retiró medio que contenía suero de 4 placas y se reemplazó con 100 µl en cada caso de las series de dilución de complejo de ADN. Se incubaron dos placas durante 10 min, seguido de lavado con DMEM completo (FCS al 10 %, pen, estrept). Se incubaron dos placas durante 4 h, seguido de la adición de 100 µl en cada caso de DMEM que contenía FCS al 20 % (no se retiraron los complejos de las células). Para cada tiempo de incubación, se mantuvo una placa sobre la placa magnética durante todo el tiempo de incubación. Se recogieron las células para el ensayo de luciferasa 24 h después de la transfección. Los resultados se muestran en la figura 23.

Ejemplo 25: Transfección de células CHO-K1 con Lipofectamine ± transMAG-PEI

Células: se sembraron 19.500 células en placas de 96 pocillos el día antes de la transfección.

Concentración de partida: 0,1 µg de ADN / pocillo

100 µl de volumen de transfección / pocillo DMEM sin suero.

4 µl de Lipofectamine / 1 µg de ADN.

Solución madre de ADN: 24 µg en 1,2 ml de DMEM.

Se añadieron 144 µl de solución madre de ADN en cada caso a las cantidades siguientes de suspensiones de transMAG-PEI en 144 µl de DMEM y se mezclaron pipeteando:

transMAG:ADN (p/p)	0	0,5	1	2	4	6	8	10
µg de transMAG-PEI en 144 µl de DMEM	0	1,44	2,88	5,76	11,52	14,4	23,03	28,8

La incubación no fue más prolongada del tiempo de manipulación necesario. Inmediatamente, se añadieron las mezclas de transMAG-ADN y se mezclaron en 8 tubos que contenían 11,52 µl de Lipofectamine diluido a 288 µl con DMEM. Después de 20 min de incubación, se llenaron los complejos de ADN hasta 2880 µl con DMEM. Después, se añadieron 3 x 230 µl de cada composición (por triplicado) de forma consecutiva a las filas A y E, respectivamente, de 4 placas de 96 pocillos de fondo redondo. Todas las demás filas se llenaron con 115 µl de DMEM.

Series de dilución: Usando un pipeteador multicanal, se transfirieron 115 µl en cada caso de la fila A y E, respectivamente, a las filas B y F, respectivamente, se mezclaron pipeteando, después se transfirieron 115 µl en cada caso de la fila B y F, respectivamente, a las filas C y G, etc. El tiempo total de manipulación fue de aproximadamente 20 min.

Transfección: Se retiró medio que contenía suero de 4 placas y se reemplazó con 100 µl en cada caso de las series de dilución de complejo de ADN. Se incubaron dos placas durante 10 min, seguido de lavado con DMEM completo (FCS al 10 %, pen, estrept). Se incubaron dos placas durante 4 h, seguido de la adición de 100 µl en cada caso de DMEM que contenía FCS al 20 % (no se retiraron los complejos de las células). Para cada tiempo de incubación, se mantuvo una placa sobre la placa magnética durante todo el tiempo de incubación. Se recogieron las células para el ensayo de luciferasa 24 h después de la transfección (véase la figura 24).

Ejemplo 26: Transfección de células CHO-K1 con DOCHOL-ADN ± transMAG-PEI

Células: se sembraron 19.500 células en placas de 96 pocillos el día antes de la transfección.

Concentración de partida: 0,5 µg de ADN / pocillo

Se añadieron 50 µl de cóctel de transfección / pocillo a células en 150 µl de DMEM completo.

Proporción de carga de DOTAP:ADN = 5:1.

Solución madre de ADN: 92,16 µg en 2304 µl de agua

Solución madre de DOCHOL: 279,3 µl de liposomas de DOTAP-colesterol 5 mM diluidos a 2304 µl con agua.

Se añadieron 250 µl de solución madre de ADN en cada caso a las cantidades siguientes de suspensiones de transMAG-PEI en 250 µl de agua y se mezclaron pipeteando:

transMAG:ADN (p/p)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4
µg de transMAG-PEI en 250 µl de agua	0	2	4	6	8	10	20	40

5 Después de 15 min de incubación, se añadieron las mezclas resultantes a 250 µl en cada caso de solución madre de DOCHOL y se mezclaron. Después de otros 15 min, se añadieron los complejos de ADN resultantes y se mezclaron con 250 µl de solución de cloruro sódico 600 mM en cada caso, seguido de 30 min de incubación.

10 **Series de dilución:** Se añadieron cuatro veces 240 µl de cada preparación de vector por pocillo en las columnas 1 y 7, respectivamente, de dos placas de 96 pocillos con fondo en U. Todos los demás pocillos se llenaron con 120 µl de cloruro sódico 150 mM. Usando un pipeteador multicanal, se transfirieron 120 µl en cada caso de las columnas 1 y 7, respectivamente, a las columnas 2 y 8, respectivamente, se mezclaron pipeteando, después se transfirieron 120 µl en cada caso de las columnas 2 y 8, respectivamente, a las columnas 3 y 9, etc.

15 **Transfección:** Se complementaron las células con DMEM completo recién preparado antes de la transfección. Se transfirieron cincuenta microlitros en cada caso de complejos de ADN por pocillo a las células 2 veces en 2 placas diferentes. Se colocó una placa de cada una de las 2 veces 2 placas que habían recibido cócteles de transfección idénticos sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos. Después de 10 min de incubación, se lavaron todas las placas una vez con 150 µl de DMEM completo recién preparado por pocillo y después se incubaron en DMEM completo hasta el ensayo de luciferasa después de 24 h (véase la figura 25).

Ejemplo 27: Cinética de magnetofección con lípidos catiónicos en células NIH3T3

20 **Células:** se sembraron 22.000 células NIH3T3 por pocillo en dos placas de 96 pocillos diferentes el día antes de la transfección.

Dosis de ADN: 0,1 µg de pCMV-Luc por pocillo.

Proporción de TransMAG-PEI:ADN (p/p): 2:1.

Solución madre de ADN: 20 µg/ml en DMEM.

25 **Preparación de vectores:** En dos configuraciones diferentes en dos veces, se mezclaron 216 µl de solución madre de ADN (equivalentes a 4,32 µg de ADN) a) con un volumen igual de DMEM, b) con un volumen igual de DMEM que contenía 8,64 µg de transMAG-PEI. Las suspensiones de transMAG-PEI en DMEM se prepararon justo inmediatamente antes de esta etapa.

30 Inmediatamente, se mezclaron las suspensiones resultantes con a) 17,28 µl de Lipofectamine® diluido a 432 µl con DMEM, b) con 21,6 µl de GenePorter™ diluido a 432 µl con DMEM. Después de 20 min de incubación, se diluyeron los complejos resultantes a 4320 µl con DMEM. Esto dio lugar a las cuatro preparaciones de vectores siguientes: 1. Lipofectamine-ADN (4 µl de Lipofectamine por µg de ADN); 2. Lipofectamine/transMAG-PEI/ADN (4 µl de Lipofectamine y 2 µg de transMAG-PEI por µg de ADN); 3. GenePorter/ADN (5 µl de GenePorter por µg de ADN); 4. GenePorter/transMAG-PEI/ADN (5 µl de GenePorter y 2 µg de transMAG-PEI por µg de ADN).

35 **Transfección:** Se retiró el medio de cultivo de las células de dos placas de 96 pocillos diferentes. Se llenaron dieciocho pocillos de cada placa con 100 µl cada uno de las cuatro preparaciones de complejo de ADN diferentes. Se colocó una de las dos placas sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos. Cinco, 10, 20, 40 y 240 minutos después de la adición de complejo de ADN, se retiraron los cócteles de transfección de 3 pocillos de cada preparación de complejo de ADN en ambas placas, después se lavaron las células una vez con medio completo recién preparado (DMEM que contenía FCS al 10 % y penicilina/estreptomycin) y después se cultivaron en medio completo hasta que se llevó a cabo el ensayo de luciferasa aprox. 20 h después de la transfección. Se retiró la placa magnética después del último punto temporal (240 minutos). Los resultados de estos experimentos se presentan en la figura 26.

Ejemplo 28: Magnetofección retroviral

45 Se incubaron células NIH3T3 (1×10^5 células plaqueadas en placas de 35 mm 24 h antes de la infección) durante 3 h con alícuotas de 1 ml de sobrenadantes de 24 h de células empaquetadoras ecotrópicas productoras de MuLV de valoración baja (subclón A6.LT GP86-NA.6; $\sim 1-5 \times 10^3$ UFC Xgal/ml; Kruger *et al.* 1994). Se aplicaron estos sobrenadantes tratados o no tratados con transMAG^{PEI} (3 µg/ml durante 20 min) y/o polibreno (8 µg/ml inmediatamente antes de la infección). Se aplicaron imanes a grupos específicos durante 1 h. Después de 48 h, se

tiñeron las células con X-Gal y se contaron los núcleos azules (figura 27).

Ejemplo 29: Magnetofección retrovímica - acumulación de vector en células diana mediante campo magnético en comparación con acumulación de vector por fuerza centrífuga

5 Se sembraron células NIH3T3 en placas de 96 pocillos a una densidad de 7.000 células por pocillo el día antes de la transducción. Alícuotas de tres mililitros de sobrenadantes de 24 h de células empaquetadoras ecotrópicas productoras de MuLV de valoración baja (subclón A6.LT GP86-NA.6; ~ 1-5 x 10³ UFC Xgal/ml) se mezclaron y se incubaron con 9 µg, 27 µg y 45 µg de transMAG-PEI. Se añadieron alícuotas de cincuenta µl de estas preparaciones a las células NIH3T3 de las que se acababa de retirar el medio. Esta placa de 96 pocillos se colocó sobre la placa magnética con formato de 96 pocillos durante una hora. Después, se llenaron los pocillos con medio completo hasta 10 200 µl y se incubaron durante 48 h.

Para su comparación, se mezcló el sobrenadante retrovímico con 8 µg/ml de polibreno y se incubaron las células con dosis de virus idénticas a las de durante la magnetofección durante 48 h en dos placas. Se centrifugó una de las dos placas a 1330 x g a 37 °C durante 90 minutos y después se devolvió a la incubadora. Se determinó la expresión de β-galactosidasa después de 48 horas usando la tinción CPRG de lisados celulares (Planck *et al.* 1999). La figura 28 muestra los resultados de estos experimentos. Los datos confirman que la magnetofección retrovímica es mejor que la transducción mediada por polibreno estándar. La transfección asistida por centrifugación estándar mejora la eficacia de la transducción aproximadamente 2 veces. Sin embargo, los niveles de transducción más altos se logran por magnetofección, dependiente de la proporción de transMAG y virus.

Referencias

- 20 1. Babincova, M., Altanerova, V., Lampert, M., Altaner, C, Machova, E., Sramka, M. y Babinec, P. (2000). "Site-specific *in vivo* targeting of magnetoliposomes using externally applied magnetic field." *Z Naturforsch [C]* **55**(3-4): 278-81.
2. Bailey, A. L. y Sullivan, S. M. (2000). "Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium." *Biochim Biophys Acta* **1468**(1-2): 239-52.
- 25 3. Bergemann, C, Muller-Schulte, D., Oster, J., à Brassard, L. y Liibbe, A. S. (1999). "Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications." *J. Magnetism and Magnetic Materials* **194**: 45-52.
4. Bildirici, L, Smith, P., Tzavelas, C, Horefti, E. y Rickwood, D. (2000). "Transfection of cells by immunoporation." *Nature* **405**: 298.
- 30 5. Bonadio, J., Goldstein, S. A. y Levy, R. J. (1998). "Gene therapy for tissue repair and regeneration." *Advanced Drug Delivery Reviews* **33**(1-2): 53-69.
6. Boussif, O., Lezoualch, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. y Behr, J. P. (1995). "A Versatile Vector For Gene And Oligonucleotide Transfer Into Cells In Culture And *In vivo* - Polyethylenimine." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **92**(16): 7297-7301.
- 35 7. Carson, J. J., Prato, F. S., Drost, D. J., Diesbourg, L D. y Dixon, S. J. (1990). "Time-varying magnetic fields increase cytosolic free Ca²⁺ in HL-60 cells." *Am J Physiol* **259**(4 Pt 1): C687-92.
8. Chen, C. A. y Okayama, H. (1988). "Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA." *Biotechniques* **6**(7): 632-8.
9. Cohen, H., Levy, R. J., Gao, J., Fishbein, I., Kousaev, V., Sosnowski, S., Slomkowski, S. y Golomb, G. (2000). "Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles." *Gene Ther* **7**(22): 1896-905.
- 40 10. Colestrauss, A., Yoon, K. G., Xiang, Y. F., Byrne, B. C, Rice, M. C, Gryn, J., Holloman, W. K. y Kmiec, E. B. (1996). "Correction of the Mutation Responsible For Sickle Cell Anemia By an Rna-Dna Oligonucleotide." *Science* **273**(5280): 1386-1389.
11. Curiel, D. T. (1999). "Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery." *Ann N Y Acad Sci* **886**:158-71.
- 45 12. Curiel, D. T., Agarwal, S., Wagner, E. y Cotten, M. (1991). "Adenovirus Enhancement Of Transferrin Polylysine-Mediated Gene Delivery." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **88**(19):8850-8854.
13. Fahlvik, A. K., Klaveness, J. y Stark, D. D. (1993). "Iron oxides as MR imaging contrast agents." *J Magn Reson Imaging* **3**(1): 187-94.
- 50 14. Fasbender, A., Lee, J. H., Walters, R. W., Moninger, T. O., Zabner, J. y Welsh, M. J. (1998). "Incorporation of adenovirus in calcium phosphate precipitates enhances gene transfer to airway epitheia *in vitro* and *in vivo*." *J Clin*

Invest **102**(1): 184-93.

15. Fasbender, A., Zabner, J., Chillon, M., Moninger, T. O., Puga, A. P., Davidson, B. L. y Welsh, M. J. (1997). "Complexes of adenovirus with polycationic polymers and cationic lipids increase the efficiency of gene transfer *in vitro* and *in vivo*." *J Biol Chem* **272**(10): 6479-89.
- 5 16. Feigner, P. L, Barenholz, Y., Behr, J. P., Cheng, S. H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J. A., Seymour, L, Szoka, F., Thierry, A. R., Wagner, E. y Wu, G. (1997). "Nomenclature for synthetic gene delivery systems." *Hum Gene Ther* **8**(5): 511-2.
17. Feigner, P. L y Ringold, G. M. (1989). "Cationic liposome-mediated transfection." *Nature* **337**: 387-388.
18. Fender, P., Ruigrok, R. W., Gout, E., Buffet, S. y Chroboczek, J. (1997). "Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer." *Nat Biotechnol* **15**(1): 52-6.
- 10 19. Finsinger, D., Remy, J. S., Erbacher, P., Koch, C. y Plank, C. (2000). "Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery." *Gene Ther* **7**(14): 1183-92.
20. Freund, O., Mahy, P., Amedee, J., Roux, D. y Laversanne, R. (2000). "Encapsulation of DNA in new multilamellar vesicles prepared by shearing a lyotropic lamellar phase." *J Microencapsul* **17**(2): 157-68.
- 15 21. Gao, X. y Huang, L. (1996). "Potentiation Of Cationic Liposome-Mediated Gene Delivery By Polycations." *Biochemistry* **35**(3): 1027-1036.
22. Gill, I. y Ballesteros, A. (2000). "Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals." *Trends Biotechnol* **18**(7): 282-96.
23. Gosling, H. R., Bernstein, R. A. y Abbott, J. (1992). "Treatment of ununited tibial fractures: a comparison of surgery and pulsed electromagnetic fields (PEMF)." *Orthopedics* **15**(6): 711-9.
- 20 24. GrillotCourvalin, C, Goussard, S., Huetz, F., Ojcius, D. M. y Courvalin, P. (1998). "Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells." *Nature Biotechnology* **16**(9): 862-866.
25. Haensler, J. y Szoka, F. C. (1993). "Polyamidoamine Cascade Polymers Mediate Efficient Transfection Of Cells In Culture." *Bioconjugate Chemistry* **4**(5):372-379.
- 25 26. Hiemenz, P. C. (1986). Principles of Colloid and Surface Chemistry. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
27. Hirose, S., Muller, B. G., Mulligan, R. C. y Langer, R. (2001). "Plasmid DNA encapsulation and release from solvent diffusion nanospheres." *J Control Release* **70**(1-2): 231-42.
28. Isner, J. M., Walsh, K., Symes, J., Pieczek, A., Takeshita, S., Lowry, J., Rosenfield, K., Weir, L, Brogi, E. y Jurayj, D. (1996). "Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease." *Hum. Gene Ther.* **20**(7): 959-988.
- 30 29. Kalyanasundaram, S., Feinstein, S., Nicholson, J. P., Leong, K. W. y Garver, R. I., Jr. (1999). "Coacervate microspheres as carriers of recombinant adenoviruses." *Cancer Gene Ther* **6**(2): 107-12.
30. Kaneda, Y. (1998). "Fusigenic Sendai-virus liposomes: a novel hybrid type liposome for gene therapy." *Biogenic Amines* **14**(5): 553-572.
- 35 31. Kasahara, N., Dozy, A. M. y Kan, Y. W. (1994). "Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions." *Science* **266**(5189): 1373-6.
32. Kass-Eisler, A., Leinwand, L, Gall, J., Bloom, B. y Falck-Pedersen, E. (1996). "Circumventing the immune response to adenovirus-mediated gene delivery." *Gene Therapy* **3**:154-162.
33. Kruger, A., Schirmacher, V. y von Hoegen, P. (1994). "Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells." *Int J Cancer* **58**(2): 275-84.
- 40 34. Lee, R. J. y Huang, L. (1997). "Lipidic vector systems for gene transfer." *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst* **1997** **14**(2)(2): 173-206.
35. Leong, K. W., Mao, H. Q., Truong-Le, V. L, Roy, K., Walsh, S. M. y August, J. T. (1998). "DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles." *J Control Release* **53**(1-3): 183-93.
- 45 36. Li, S., Rizzo, M. A., Bhattacharya, S. y Huang, L. (1998). "Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery." *Gene Therapy* **5**(7): 930-937.
37. Liibbe, A. S., Bergemann, C, Huhnt, W., Fricke, T., Riess, H., Brock, J. W. y Huhn, D. (1996). "Preclinical

- experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy." *Cancer Res* **56**(20): 4694-701.
38. Lübbe, A. S., Bergemann, C, Riess, H., Schriever, F., Reichardt, P., Possinger, K., Matthias, M., Dorken, B., Herrmann, F., Gurtler, R., Hohenberger, P., Haas, N., Sohr, R., Sander, B., Lemke, A. J., Ohlendorf, D., Huhnt, W. y Huhn, D. (1996). "Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors." *Cancer Res* **56**(20):4686-93
- 5 39. Luo, D. y Saltzman, W. M. (2000). "Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface." *Nat Biotechnol* **18**(8): 893-5.
40. Meyer, K. B., Thompson, M. M., Levy, M. Y., Barron, L. G. y Szoka, F. C. (1995). "Intratracheal Gene Delivery To The Mouse Airway - Characterization Of Plasmid DNA Expression And Pharmacokinetics." *Gene Therapy* **2**(7): 450-460.
- 10 41. Michael, S. I., Hong, J. S., Curiel, D. T. y Engler, J. A. (1995). "Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein." *Gene Ther* **2**(9): 660-8.
42. Nicolau, C. y Cudd, A. (1989). "Liposomes As Carriers Of DNA." *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems* **6**(3): 239-271.
- 15 43. O'Riordan, C. R., Lachapelle, A, Delgado, C, Parkes, V., Wadsworth, S. C, Smith, A. E. y Francis, G. E. (1999). "PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody *in vitro* and *in vivo*." *Hum Gene Ther* **10**(8): 1349-58.
44. Ogris, M., Brunner, S., Schuiler, S., Kircheis, R. y Wagner, E. (1999). "PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery." *Gene Therapy* **6**(4): 595-605.
- 20 45. Padmanabhan, R., Howard, T., Gottesman, M. M. y Howard, B. H. (1993). "Magnetic affinity cell sorting to isolate transiently transfected cells, multidrug-resistant cells, somatic cell hybrids, and virally infected cells." *Methods Enzymol* **218**:637-51.
46. Petka, W. A., Harden, J. L., McGrath, K. P., Wirtz, D. y Tirrell, D. A. (1998). "Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins." *Science* **281**(5375): 389-92.
- 25 47. Plank, C, Mechtler, K., Szoka, F. C. y Wagner, E. (1996). "Activation of the Complement System by Synthetic DNA Complexes: A Potential Barrier for Intravenous Gene Delivery." *Hum. Gene Ther.* **7**(12): 1437-1446.
48. Plank, C, Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C. y Wagner, E. (1994). "The Influence Of Endosome-Disruptive Peptides On Gene Transfer Using Synthetic Virus-Like Gene Transfer Systems." *Journal Of Biological Chemistry* **269**(17): 12918-12924.
- 30 49. Plank, C, Tang, M., Wolfe, A. y Szoka, F. C. (1999). "Branched Cationic Peptides for Gene Delivery. Role of Type and Number of Cationic Residues in Formation and *In vitro* Activity of DNA Polyplexes." *Human Gene Therapy* **10**(2): 319-333.
50. Ponimaskin, E., Bareesel, K. K., Markgraf, K., Reszka, R., Lehmann, K., Gelderblom, H. R., Gawaz, M. y Schmidt, M. F. (2000). "Sendai virosomes revisited: reconstitution with exogenous lipids leads to potent vehicles for gene transfer." *Virology* **269**(2): 391-403.
- 35 51. Poul, M. A. y Marks, J. D. (1999). "Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage." *J Mol Biol* **288**(2): 203-11.
52. Quong, D. y Neufeld, R. J. (1999). "DNA encapsulation within co-guanidine membrane coated alginate beads and protection from extracapsular nuclease." *J Microencapsul* **16**(5): 573-85.
- 40 53. Rajasubramanian, G., Meidell, R. S., Landau, C, Dollar, M. L., Holt, D. B., Willard, J. E., Prager, M. D. y Eberhart, R. C. (1994). "Fabrication of resorbable microporous intravascular stents for gene therapy applications." *Asaio J* **40**(3): M584-9.
54. Reszka, R., Wegner, D., Richter, J., Pohl, B., Lehmann, C, Scheffel, A. y Gerbsch, N. (2000). Gene transfer using the cationic lipid-magnetosome-DNA complexes (CLMDC). Scientific and clinical applications of magnetic carriers, Rostock, May 3-6, Abstract book.
- 45 55. Romanczuk, H., Galer, C. E., Zabner, J., Barsomian, G., Wadsworth, S. C. y O'Riordan, C. R. (1999). "Modification of an adenoviral vector with biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice." *Hum Gene Ther* **10**(16): 2615-26.
- 50 56. Rowley, J. A., Madlambayan, G. y Mooney, D. J. (1999). "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix

materials." *Biomaterials* **20**(1): 45-53.

57. Roy, K., Mao, H. Q., Huang, S. K. y Leong, K. W. (1999). "Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy." *Nat Med* **5**(4): 387-91.
58. Rubin, C. T., Donahue, H. J., Rubin, J. E. y McLeod, K. J. (1993). "Optimization of electric field parameters for the control of bone remodeling: exploitation of an indigenous mechanism for the prevention of osteopenia." *J Bone Miner Res* **8 Supl 2**:S573-81.
59. Shea, L. D., Smiley, E., Bonadio, J. y Mooney, D. J. (1999). "DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering." *Nat Biotechnol* **17**(6): 551-4.
60. Trock, D. H. (2000). "Electromagnetic fields and magnets. Investigational treatment for musculoskeletal disorders." *Rheum Dis Clin North Am* **26**(1): 51-62, viii.
61. Truong-Le, V. L., Walsh, S. M., Schweibert, E., Mao, H. Q., Guggino, W. B., August, J. T. y Leong, K. W. (1999). "Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres." *Arch Biochem Biophys* **361**(1): 47-56.
62. Truong-Le, V. L., August, J. T. y Leong, K. W. (1998). "Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres." *Human Gene Therapy* **9**(12): 1709-1717.
63. Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M. y Birnstiel, M. L. (1992). "Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle." *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(17): 7934-8.
64. Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C, White, D. L, Jacobs, P. y Lewis, J. (1989). "Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity." *AJR Am J Roentgenol* **152**(1): 167-73.
65. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. y Feigner, P. L. (1990). "Direct Gene Transfer Into Mouse Muscle *In Vivo*." *Science* **247**(4949): 1465-1468.
66. Wu, G. Y. y Wu, C. H. (1987). "Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system." *Journal of Biological Chemistry* **262**: 4429-4432.
67. Zabner, J. (1997). "Cationic lipids used in gene transfer." *Advanced Drug Delivery Reviews* **27**(1): 17-28.
68. Zborowski, M., Fuh, C. B., Green, R., Sun, L. y Chalmers, J. J. (1995). "Analytical magnetapheresis of ferritin-labeled lymphocytes." *Anal Chem* **67**(20):3702-12.
69. Zenke, M., Steinlein, P., Wagner, E., Cotten, M., Beug, H. y Birnstiel, M. L. (1990). "Receptor-Mediated Endocytosis Of Transferrin Polycation Conjugates - An Efficient Way To Introduce DNA Into Hematopoietic Cells." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **87**(10):3655-3659.
70. Zhang, F., Andreassen, P., Fender, P., Geissler, E., Hernandez, J. F. y Chroboczek, J. (1999). "A transfecting peptide derived from adenovirus fiber protein." *Gene Ther* **6**(2): 171-81.

Listado de secuencias

<110> PLANK, Christian et al.

35 <120> Procedimiento para transfectar células usando un campo magnético

<130> E 1855 PCT

<140>

40 <141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

ES 2 391 764 T3

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: artificial

10 <400> 1

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1

5

10

15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys

15

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para transfectar una célula que comprende la etapa de poner un complejo que comprende
 - (i) uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico; y
 - (ii) una o más partículas magnéticas que se acoplan con uno o más oligo- o policationes u oligo- o polianiones
- 5 en contacto con una célula aplicando un campo magnético adecuado, en el que dicha(s) partícula(s) magnética(s) y dicho(s) vector(es) se ensamblan en el complejo por agregación inducida por sal.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas partículas magnéticas tienen un tamaño de hasta 2000 nm.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dichas partículas magnéticas se acoplan con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en poli(etilenimina) (PEI), PEI-estreptavidina, PEI-biotina, almidón-fosfato, ácido poliaspártico, ácido poliacrílico, ácido poliacrílico-co-maleico, ácido arabínico, PEI-etoxilada, PEI-epiclorhidrina y PEI-dodecilsulfato sódico.
- 15 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho campo magnético es un campo permanente o un campo electromagnético.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho campo electromagnético oscila.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula se transfecta en un ensayo de alto rendimiento.
- 20 7. Un procedimiento para la preparación de un complejo útil para transfectar una célula, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de enlazar uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico y una o más partículas magnéticas que se acoplan con uno o más oligo- o policationes u oligo- o polianiones, en el que los componentes de dicho complejo se ensamblan por agregación inducida por sal.
8. Un complejo útil para transfectar una célula que comprende
 - (i) uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico; y
 - (ii) una o más partículas magnéticas que se acoplan con uno o más oligo- o policationes u oligo- o polianiones,
- 25 en el que dicha(s) partícula(s) magnética(s) y dicho(s) vector(es) se ensamblan en el complejo por agregación inducida por sal.
9. El complejo de la reivindicación 9, en el que dichas partículas magnéticas tienen un tamaño de hasta 2000 nm.
- 30 10. El complejo de la reivindicación 8 o 9, en el que dichas partículas magnéticas se acoplan con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en poli(etilenimina) (PEI), PEI-estreptavidina, PEI-biotina, almidón-fosfato, ácido poliaspártico, ácido poliacrílico, ácido poliacrílico-co-maleico, ácido arabínico, PEI-etoxilada, PEI-epiclorhidrina y PEI-dodecilsulfato sódico.
11. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 35 12. Uso del complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, el tratamiento o la vacunación contra una enfermedad por medio de la administración de un vector terapéuticamente útil que comprende una o más moléculas de ácido nucleico a un sujeto, implicando dicha prevención, tratamiento o vacunación la transfección de células con el/los vector(es) presente(s) en dicho complejo por medio de la aplicación de un campo magnético adecuado.
- 40 13. El complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para su uso en un procedimiento de prevención, tratamiento o vacunación contra una enfermedad por medio de la administración de un vector terapéuticamente útil que comprende una o más moléculas de ácido nucleico a un sujeto, implicando dicha prevención, tratamiento o vacunación la transfección de células con el/los vector(es) presente(s) en dicho complejo por medio de la aplicación de un campo magnético adecuado.
- 45 14. Uso del complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para transfectar una célula *in vitro*, en el que se pone en contacto el complejo con una célula mediante la aplicación de un campo magnético adecuado.
15. Uso del complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para transfectar células *in vitro* en un ensayo de alto rendimiento en el que se pone en contacto el complejo con una célula mediante la aplicación de un campo magnético adecuado.

16. Un kit que comprende

(i) el complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y

(ii) opcionalmente, partículas magnéticas y/o vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico y/o componentes de vector adecuados para incorporar una molécula de ácido nucleico que se quiere expresar e instrucciones para la aplicación de un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y

(iii) opcionalmente, células y/o adyuvantes de tratamiento génico y/o uno o más imanes permanentes útiles para aplicar el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

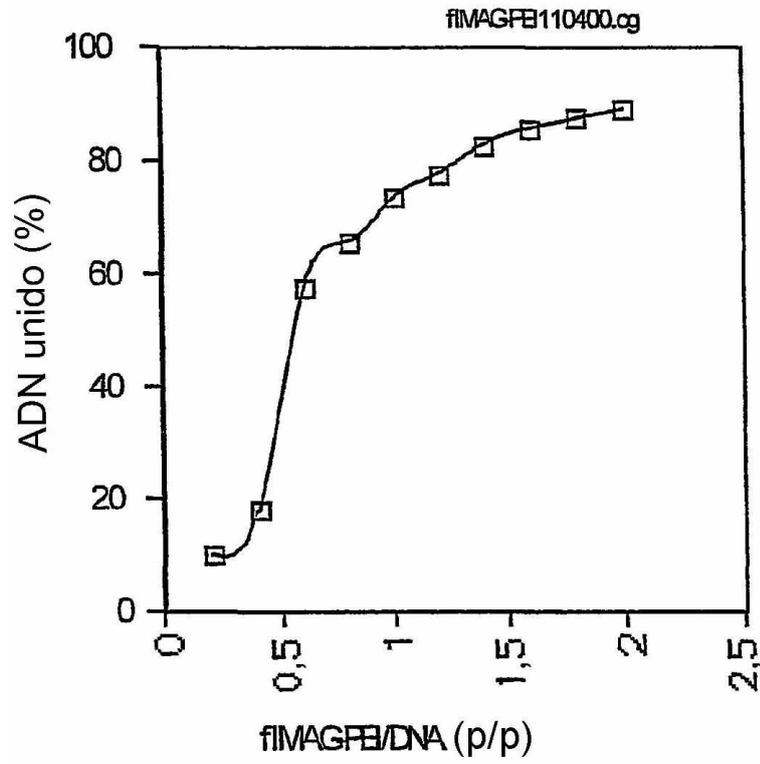


Fig. 1

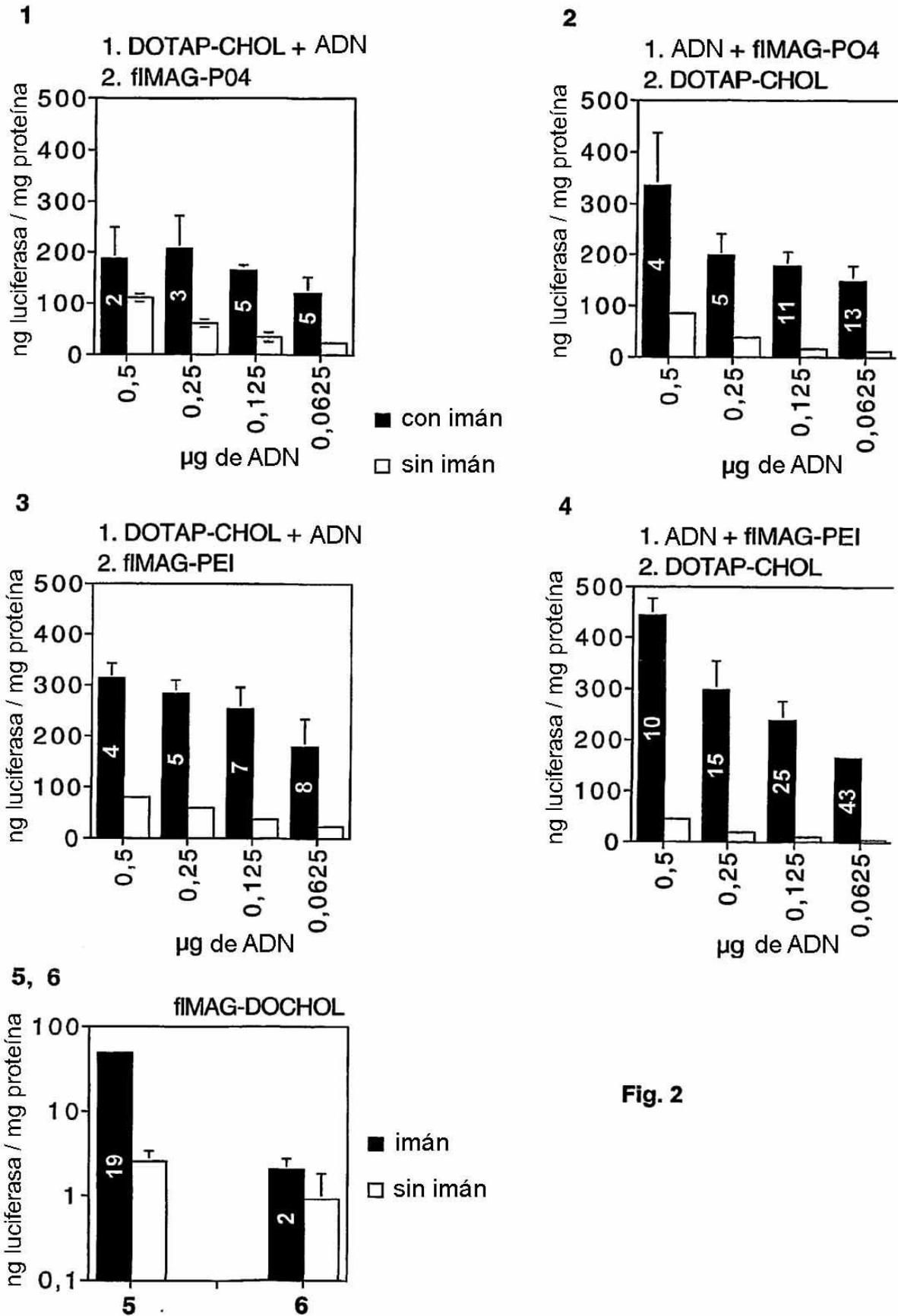


Fig. 2

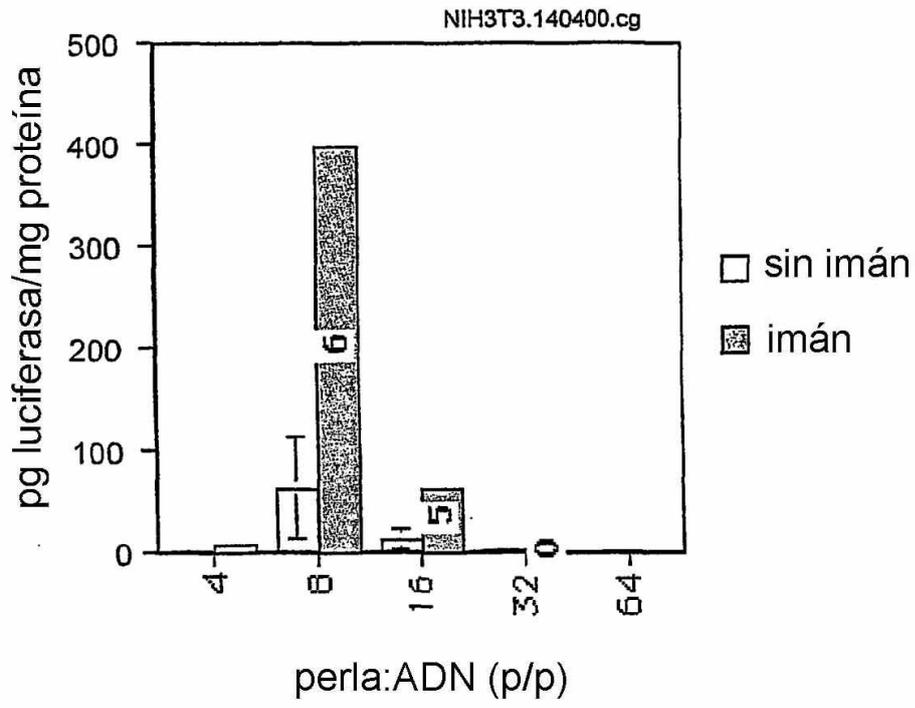


Fig. 3

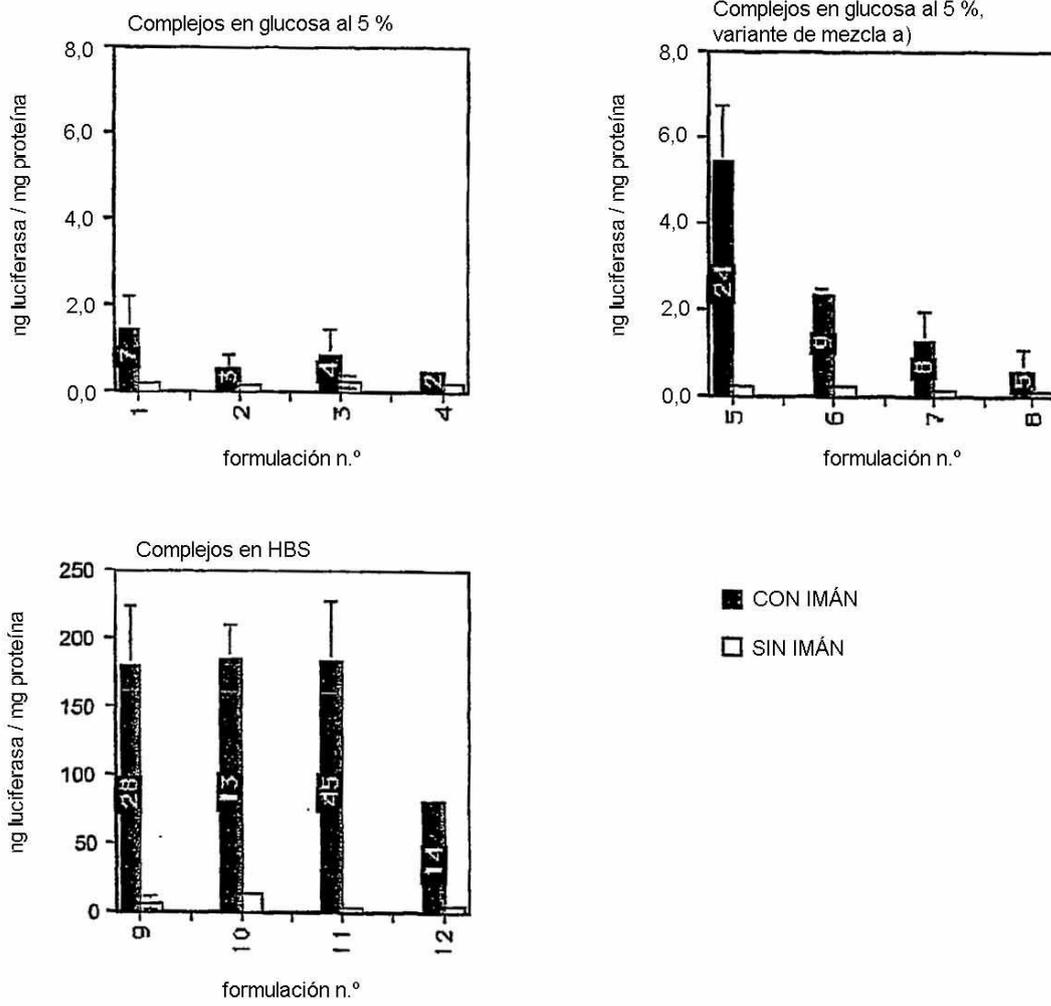


Fig. 4

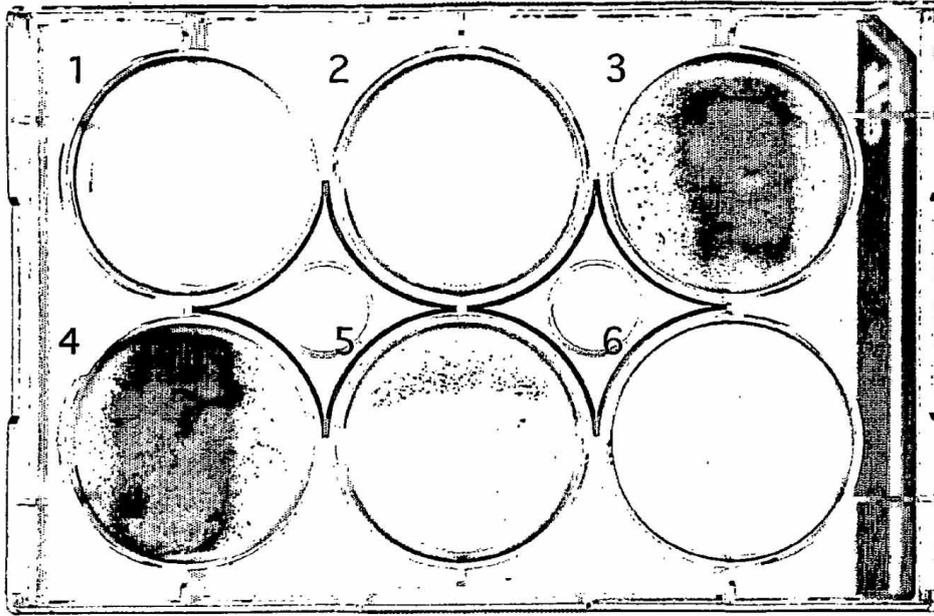


Fig. 5

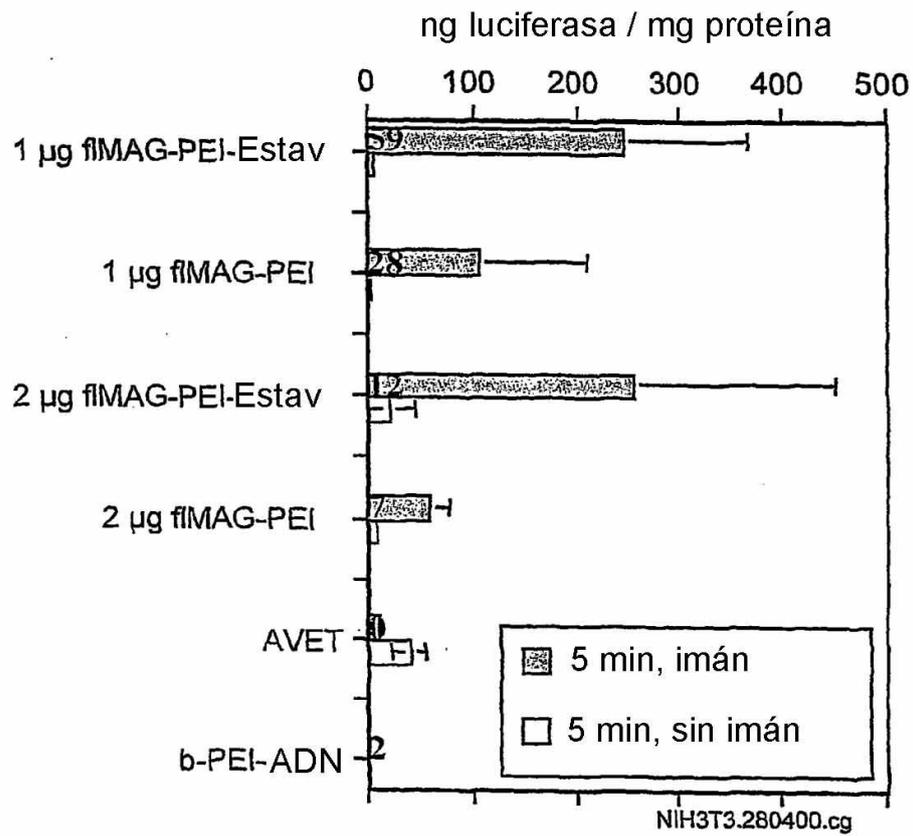


Fig. 6

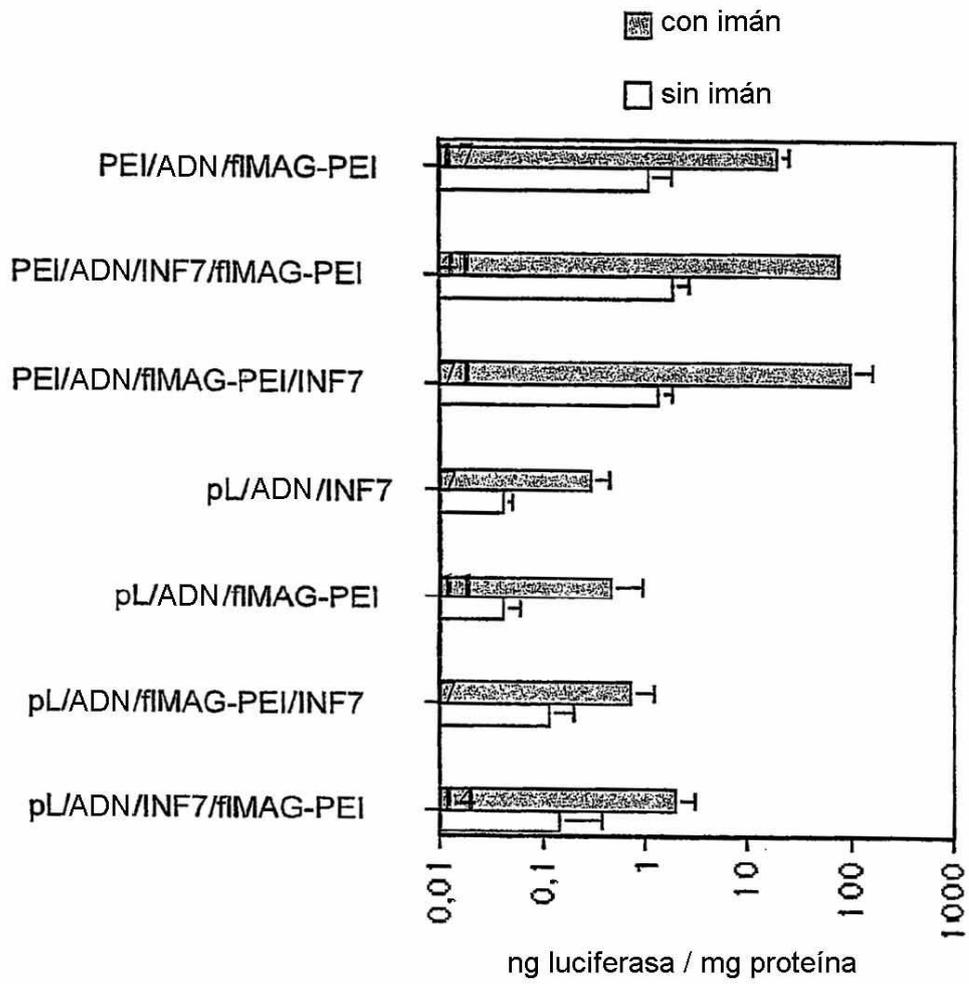


Fig. 7

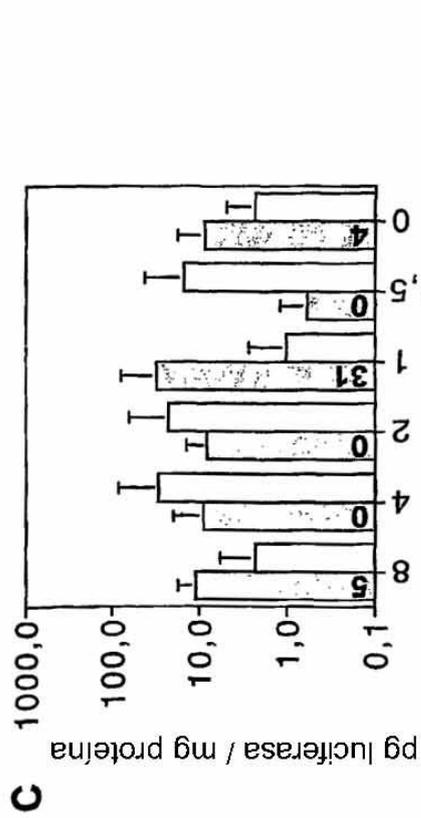
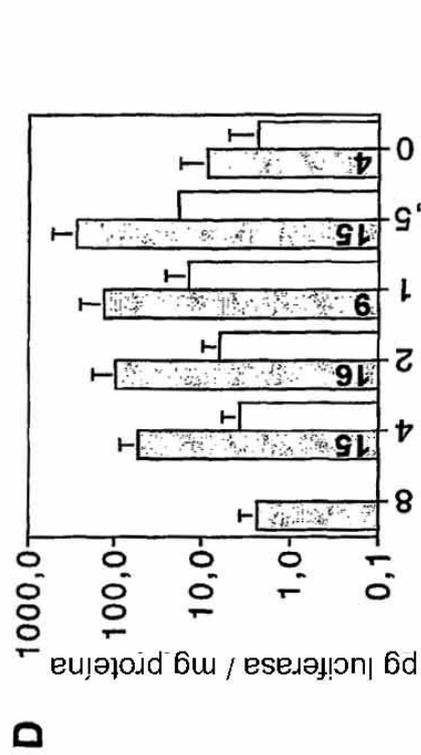
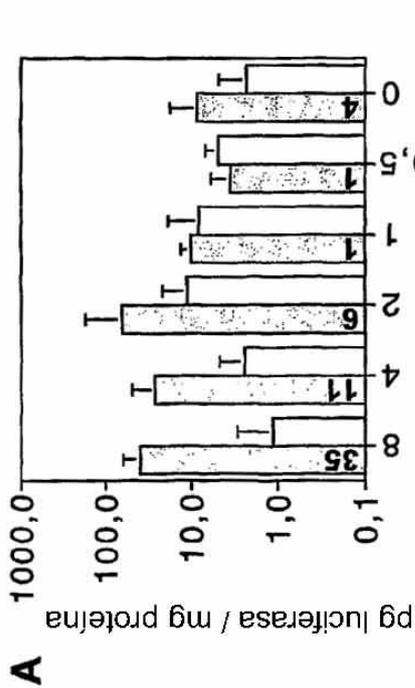
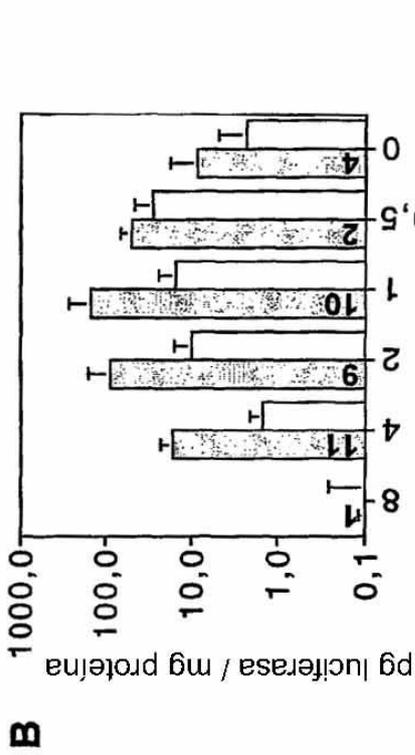


Fig. 8

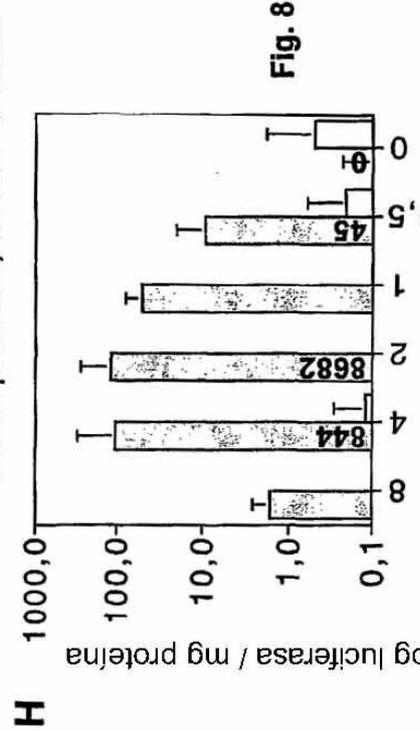
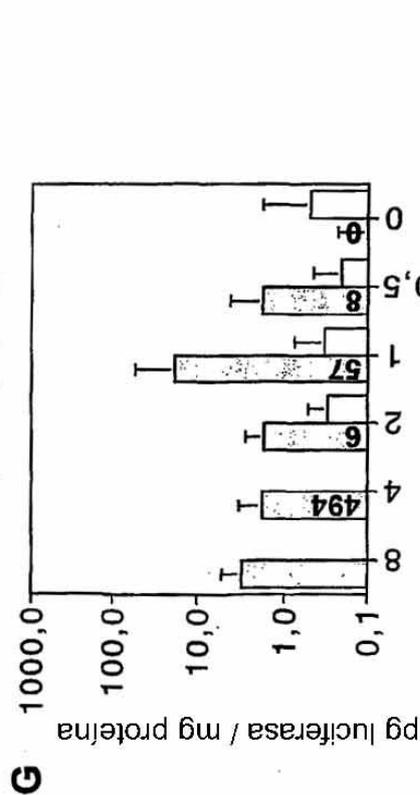
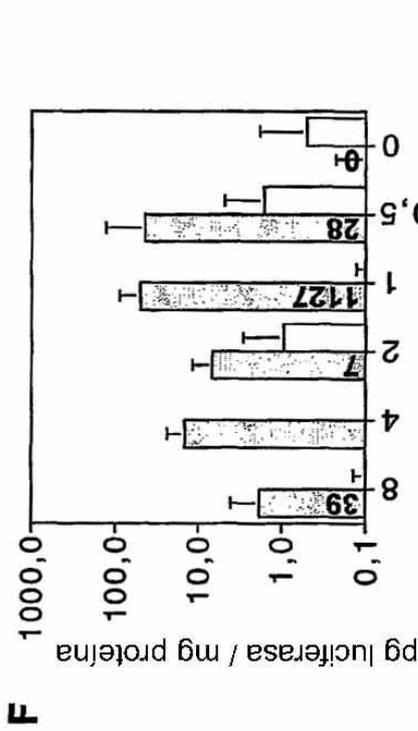
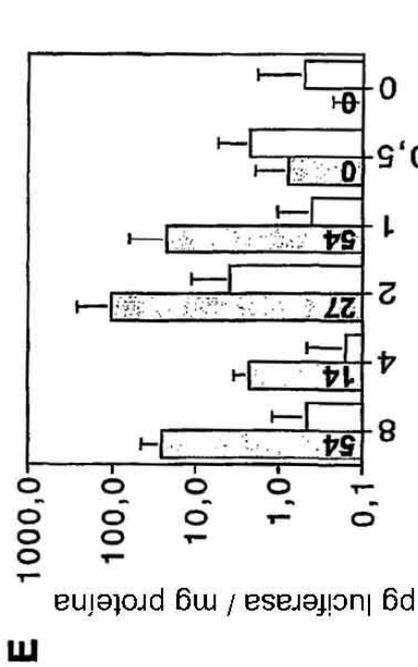


Fig. 8 continuación

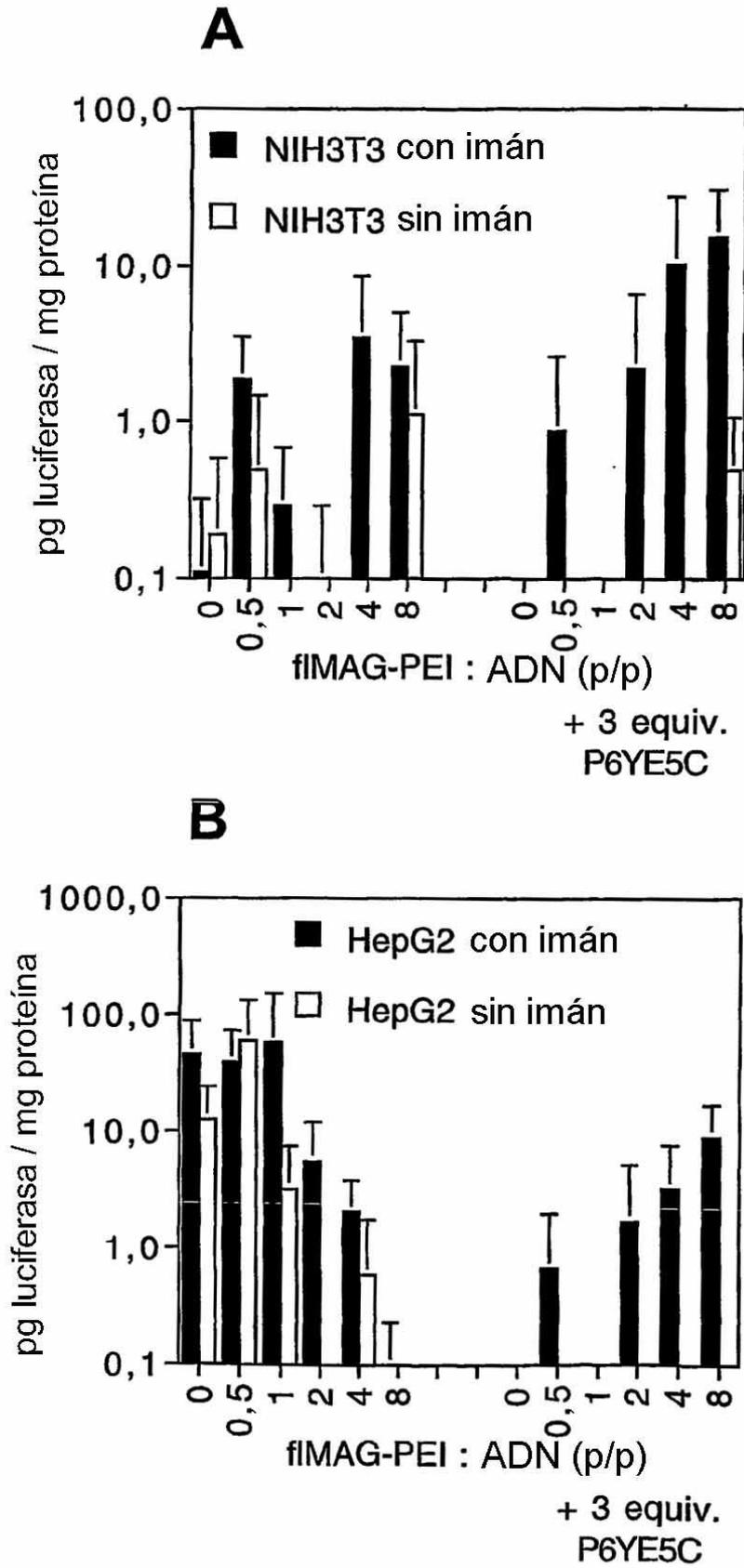


Fig. 9

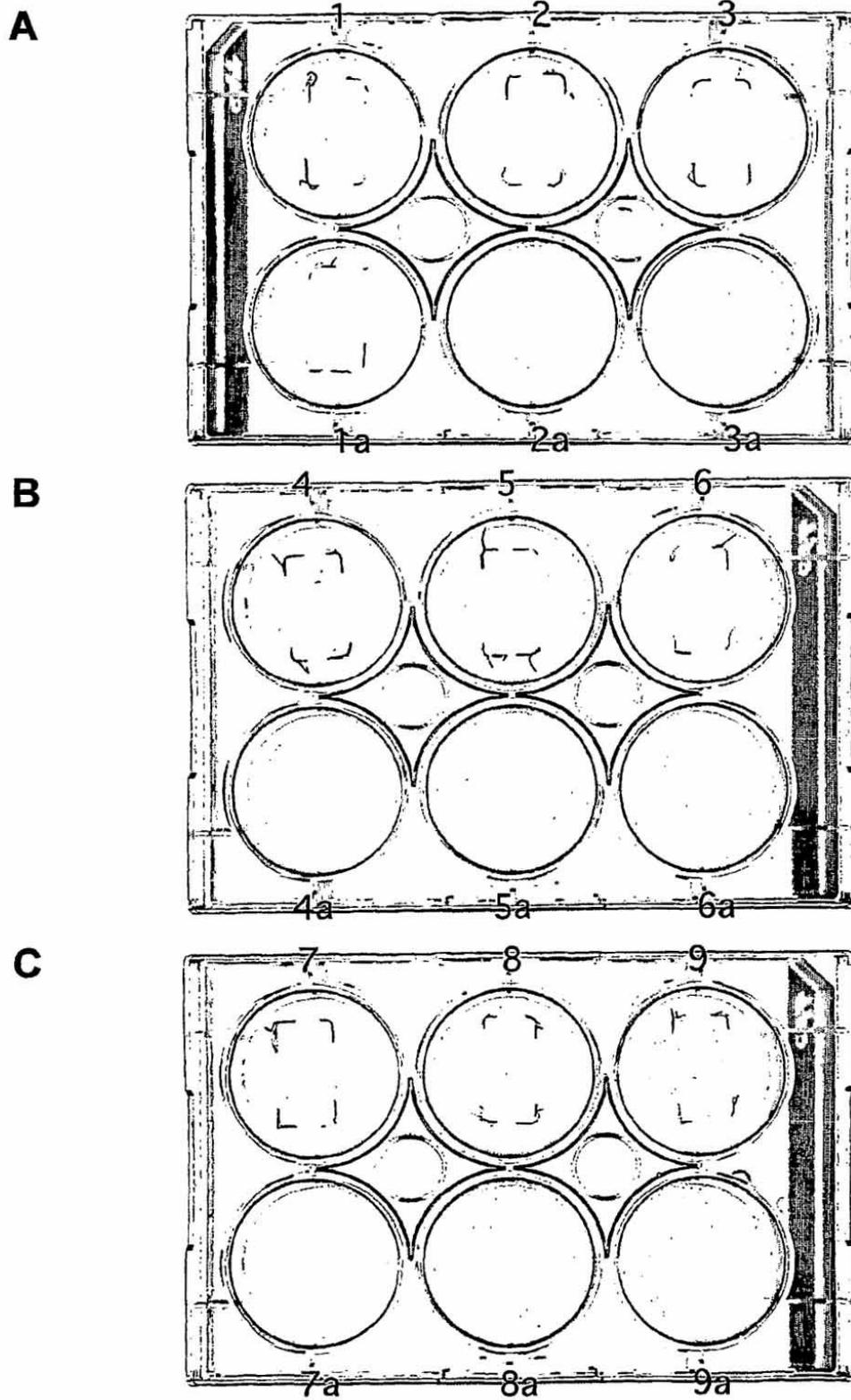


Fig. 10

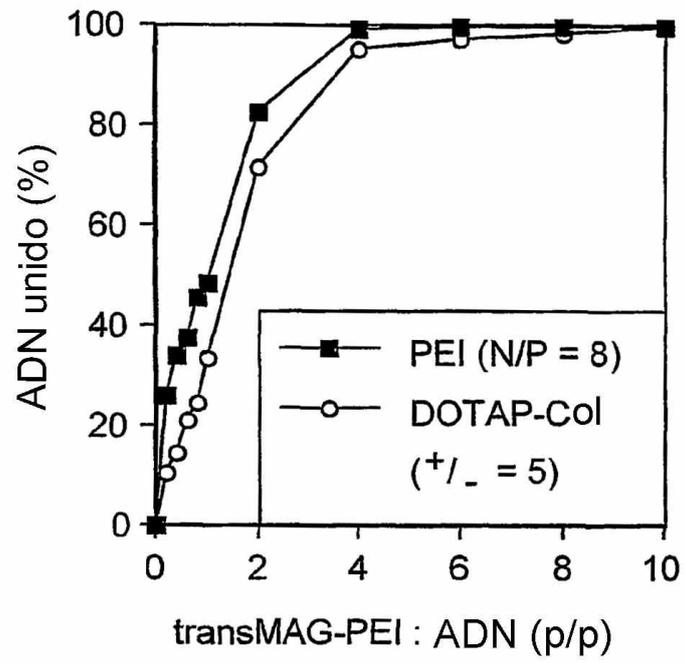


Fig. 11

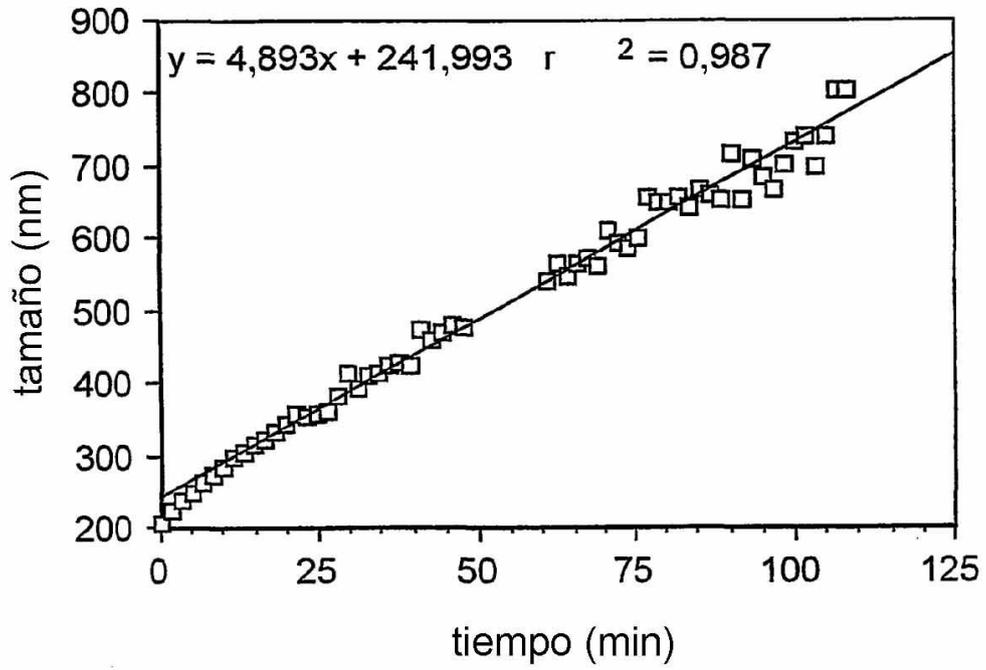


Fig. 12

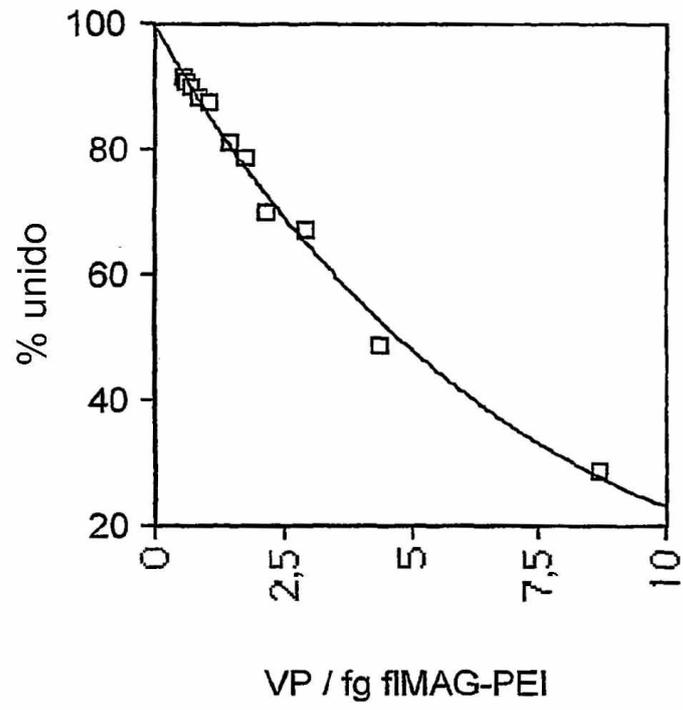


Fig. 13

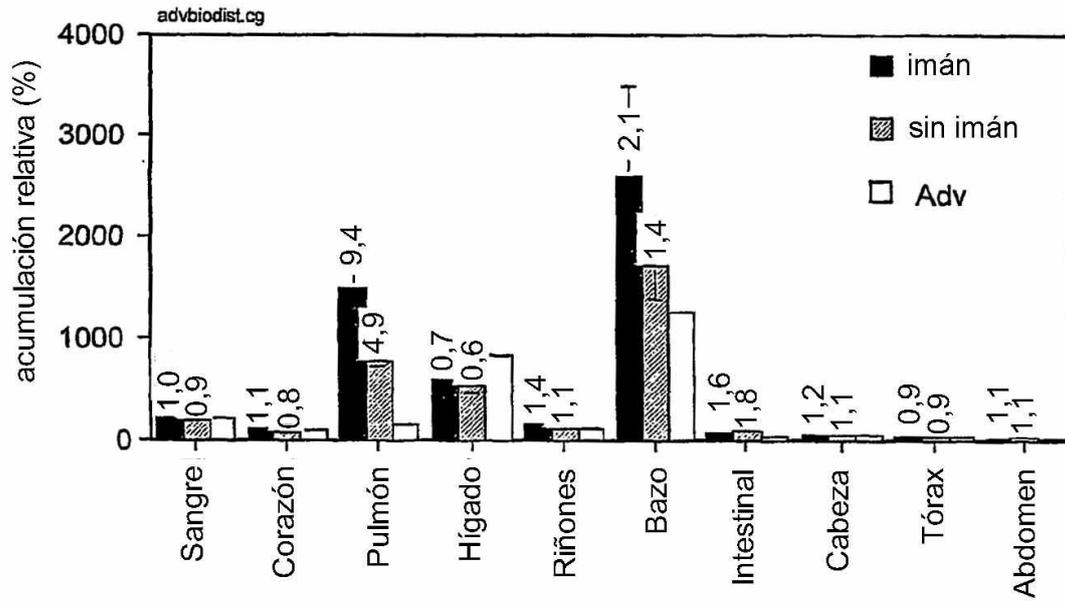


Fig. 14

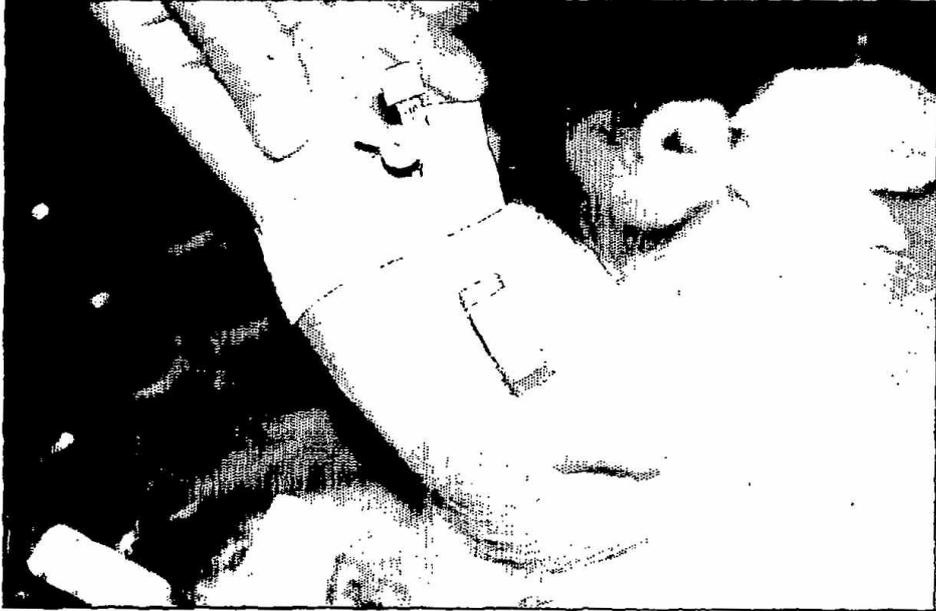


Fig. 15

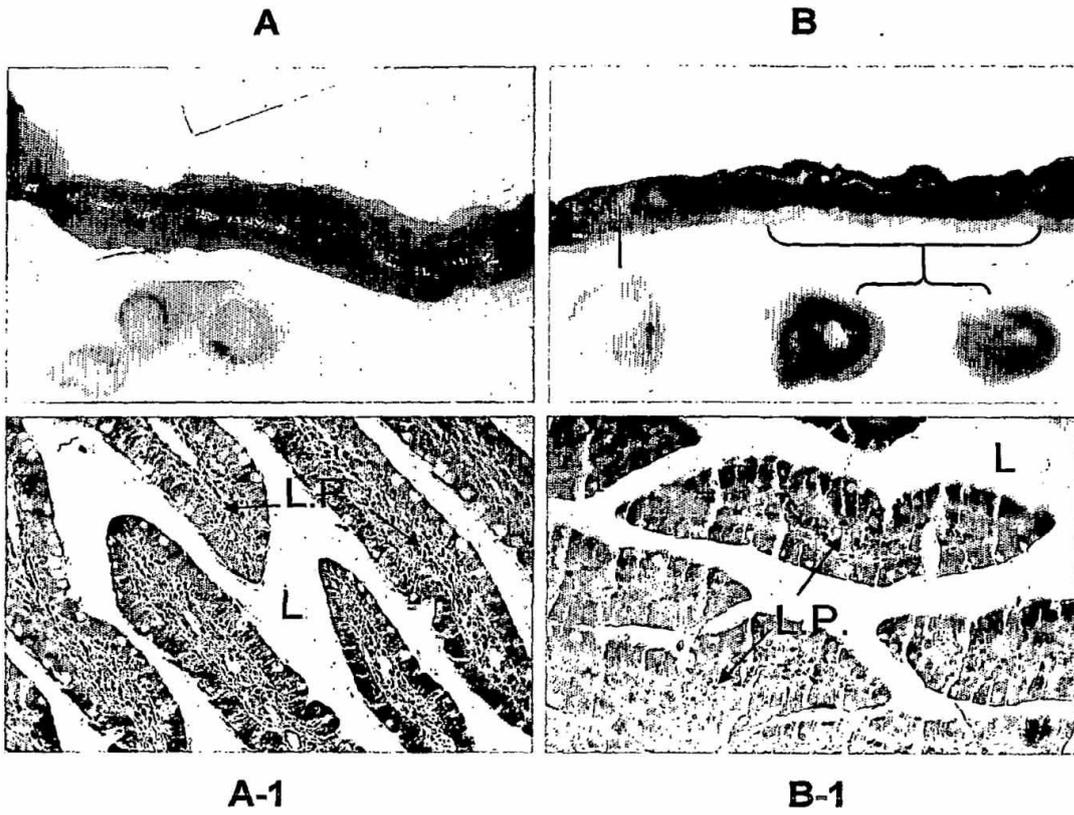


Fig. 16

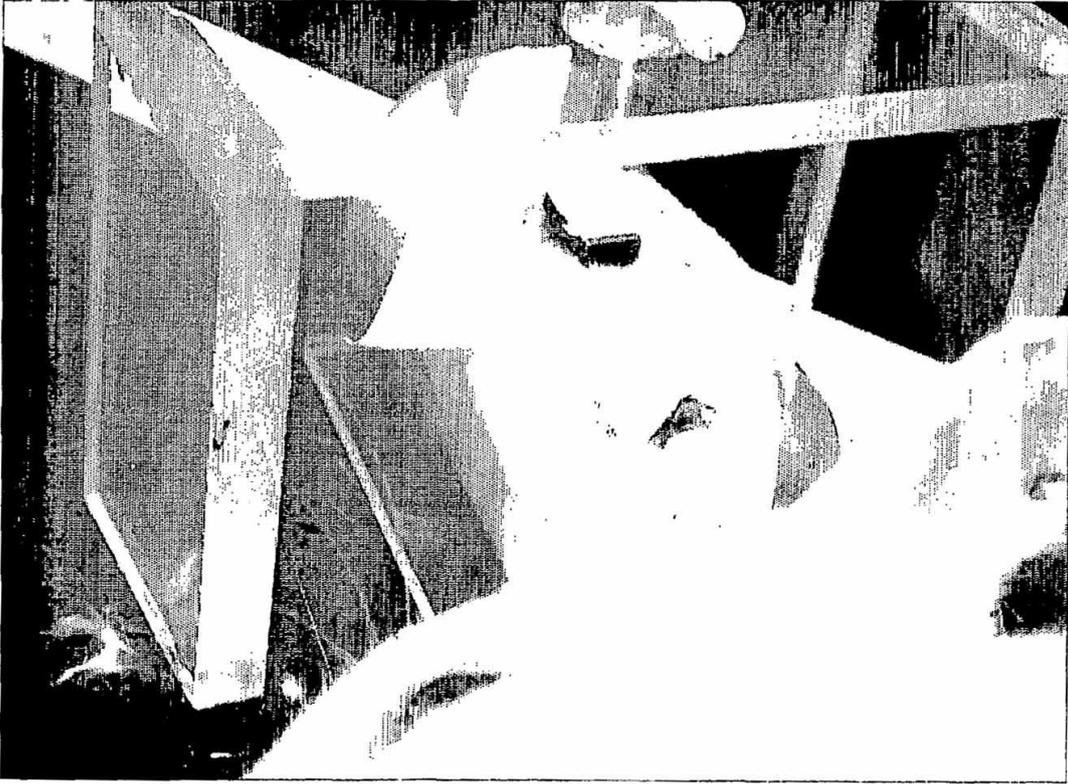


Fig. 17A

Fig. 17B

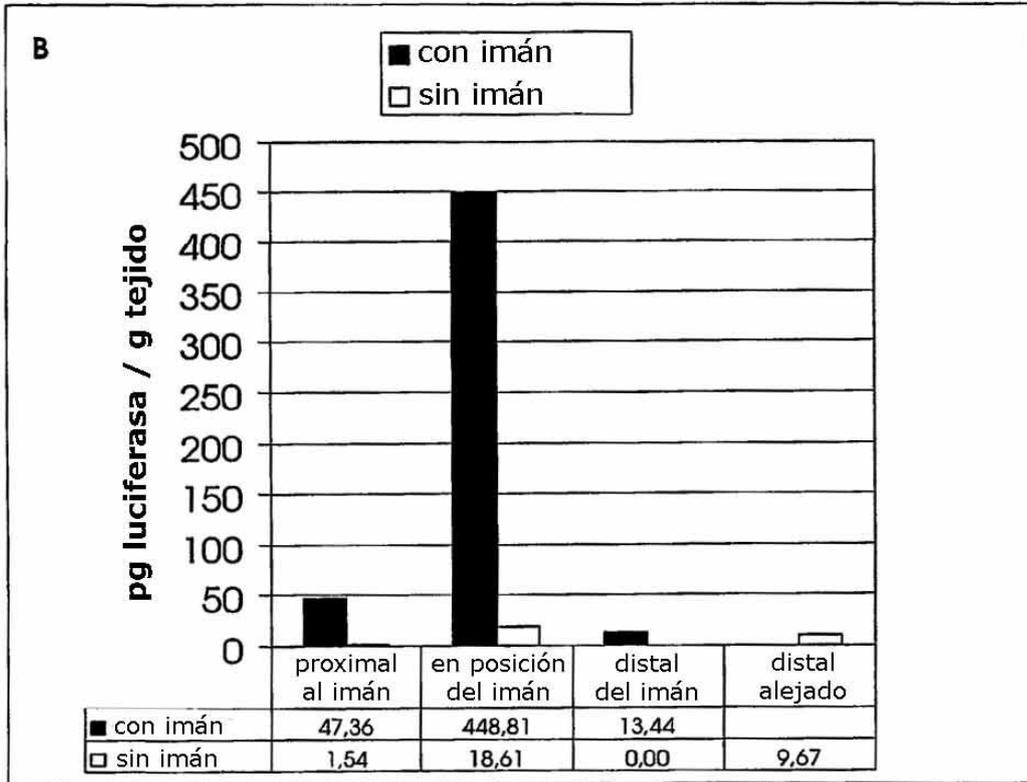
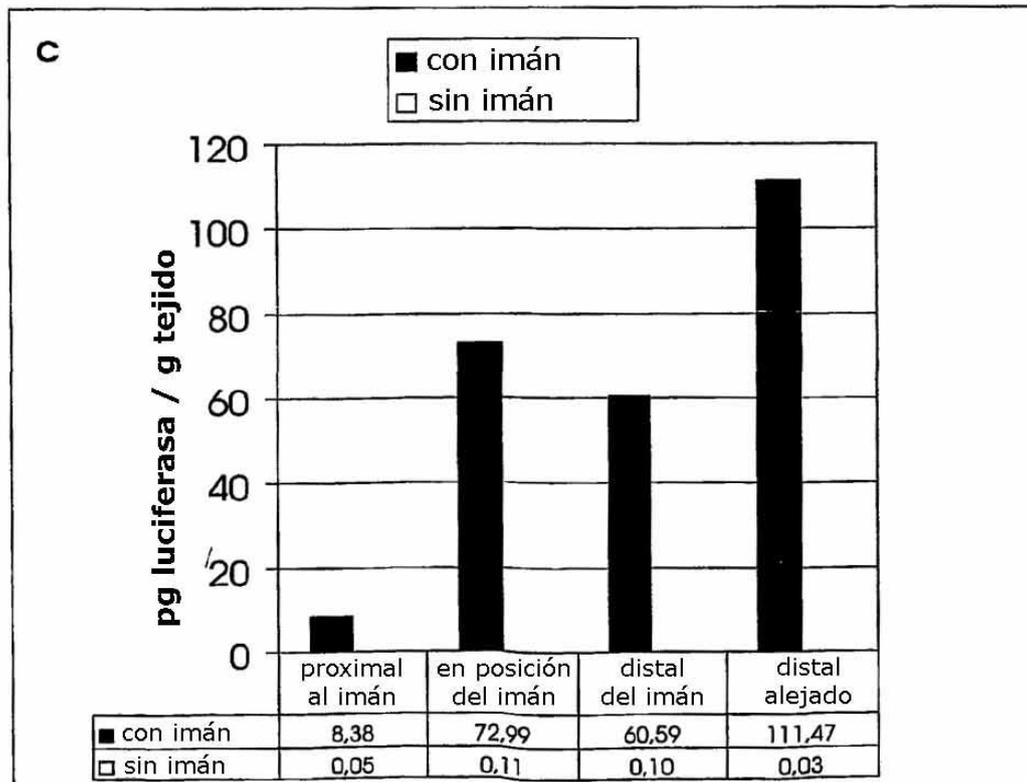


Fig. 17C



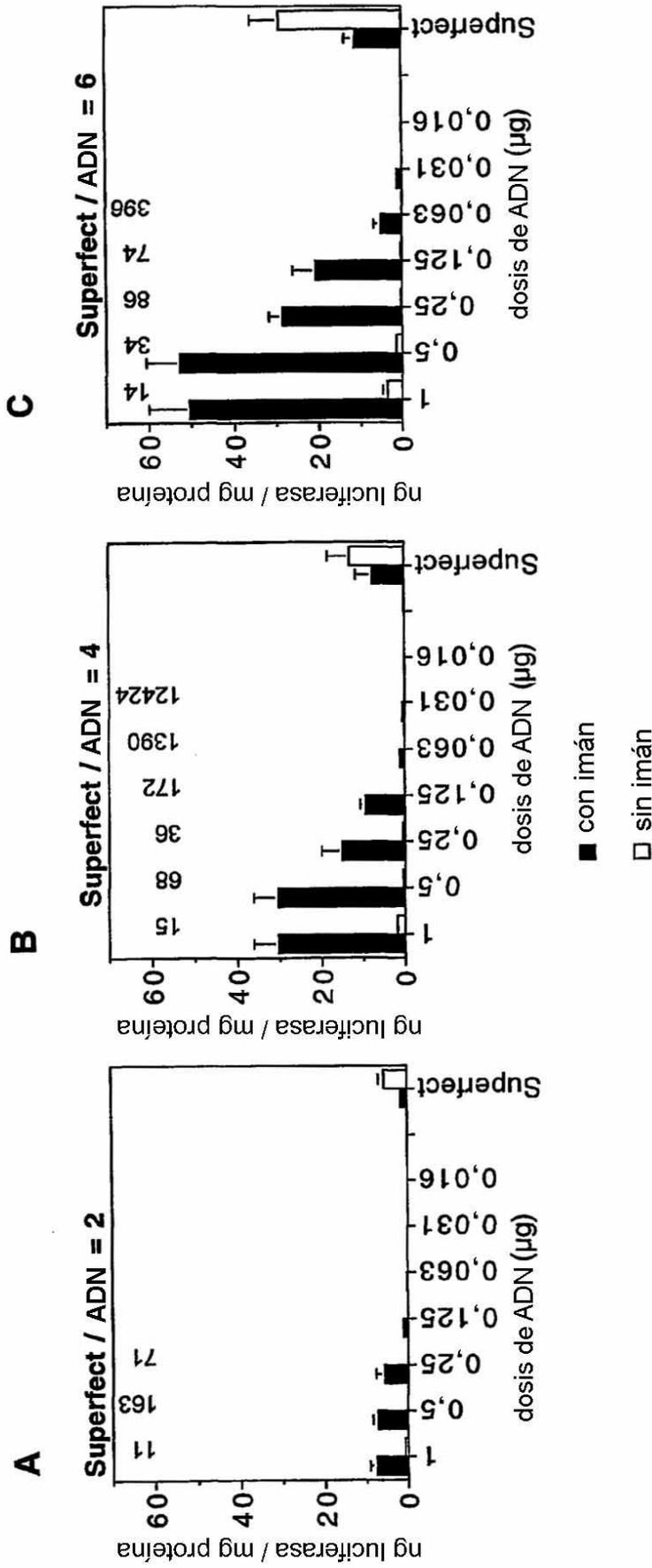


Fig. 18

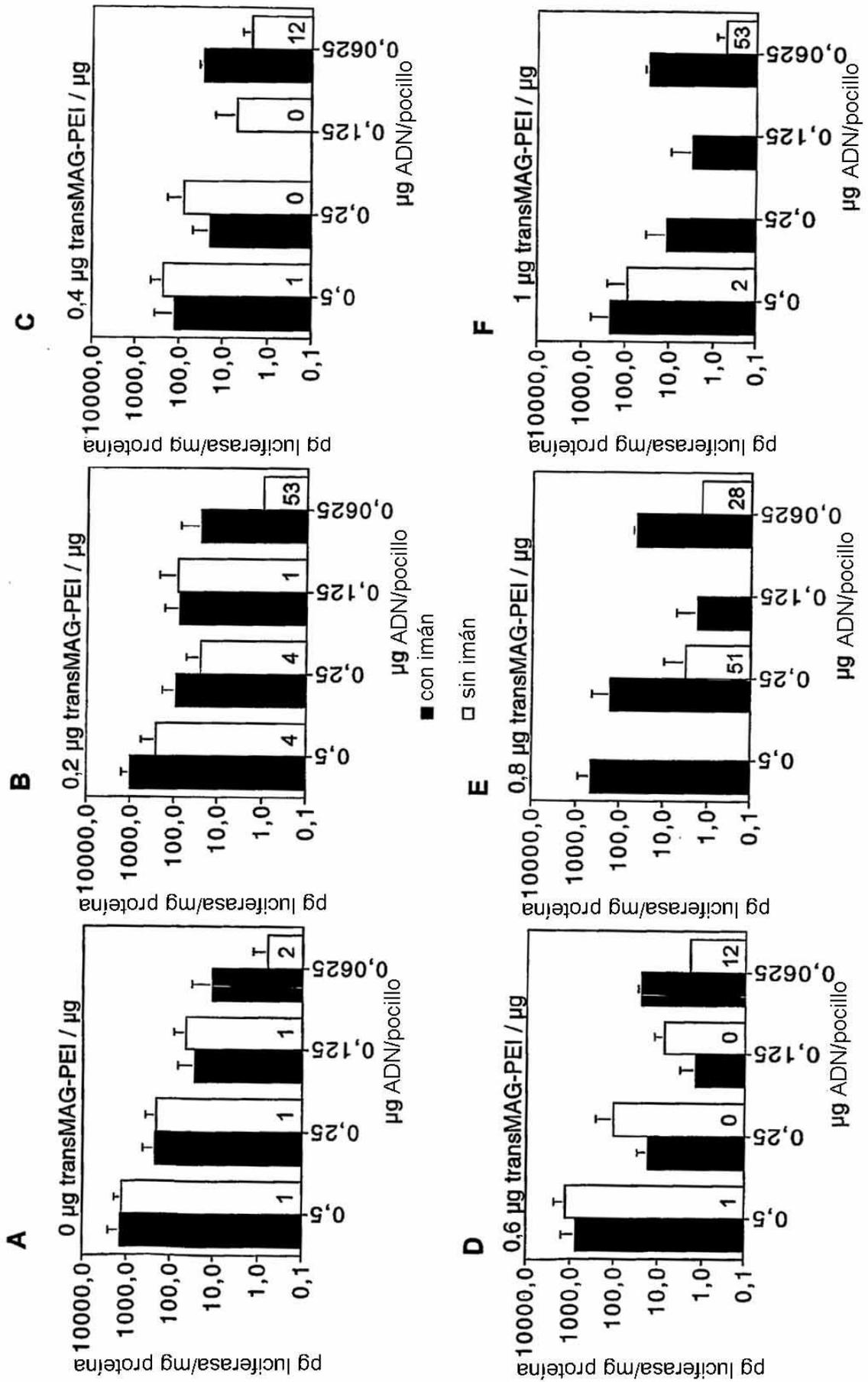


Fig. 19

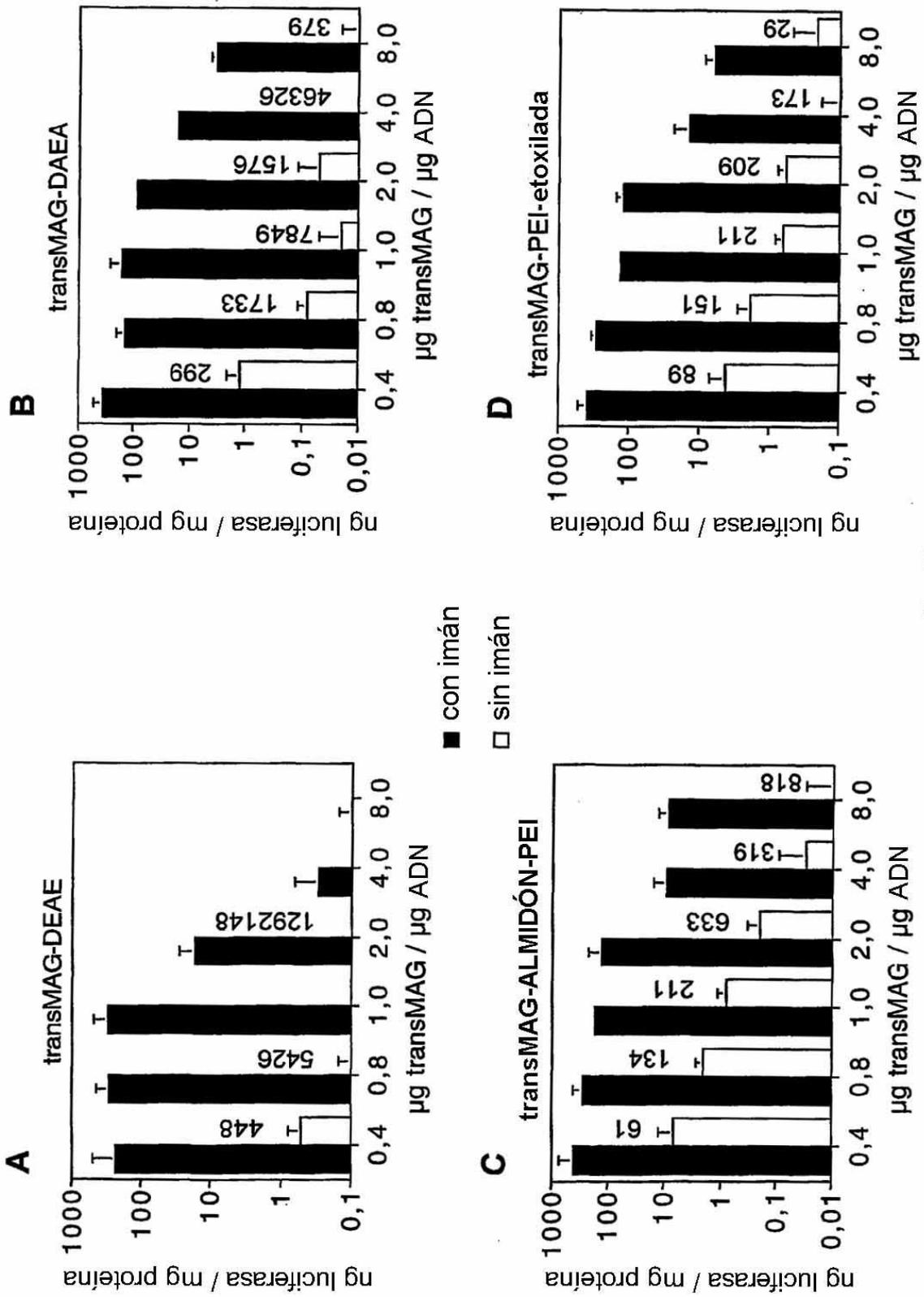


Fig. 20

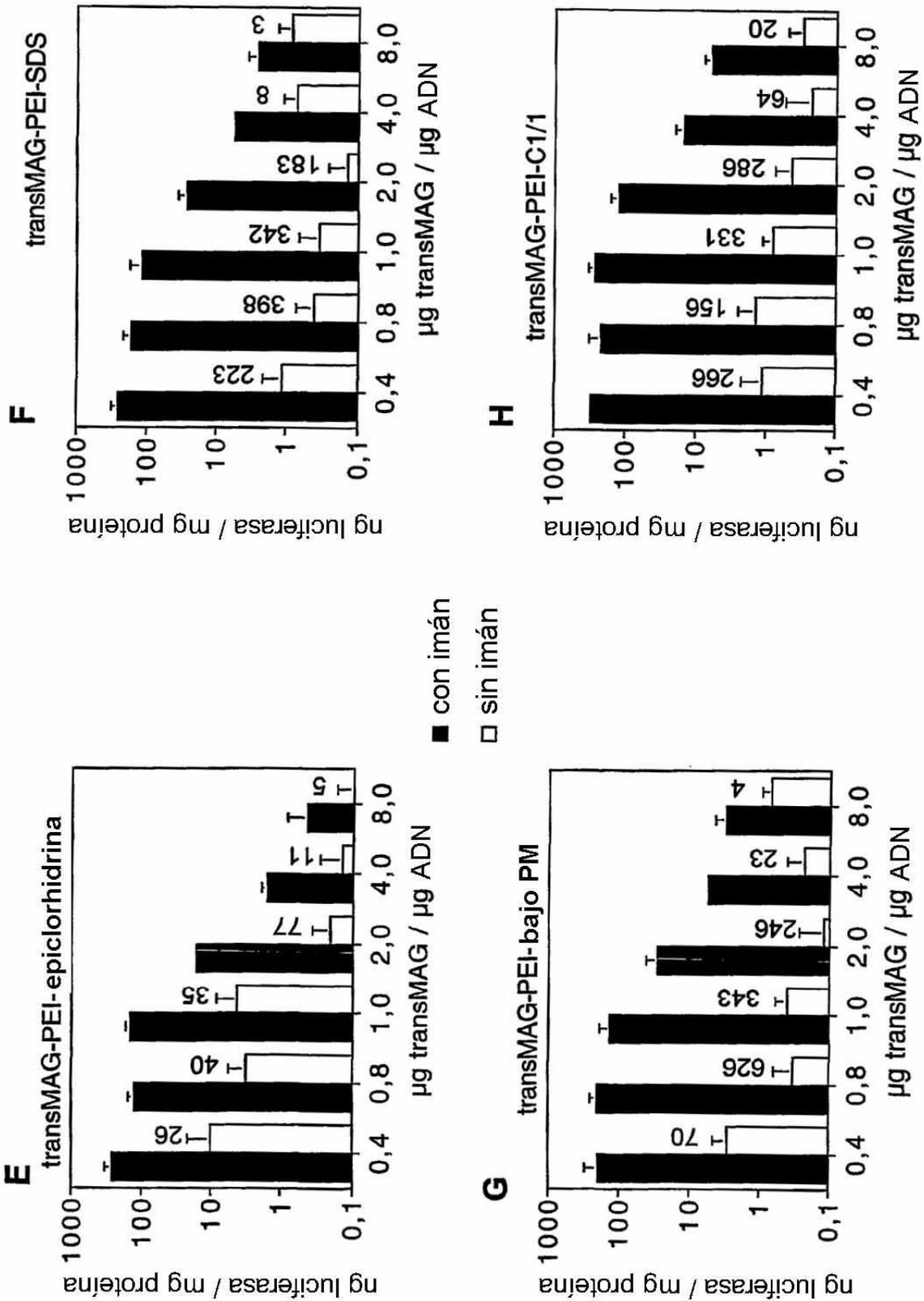


Fig. 20 continuación

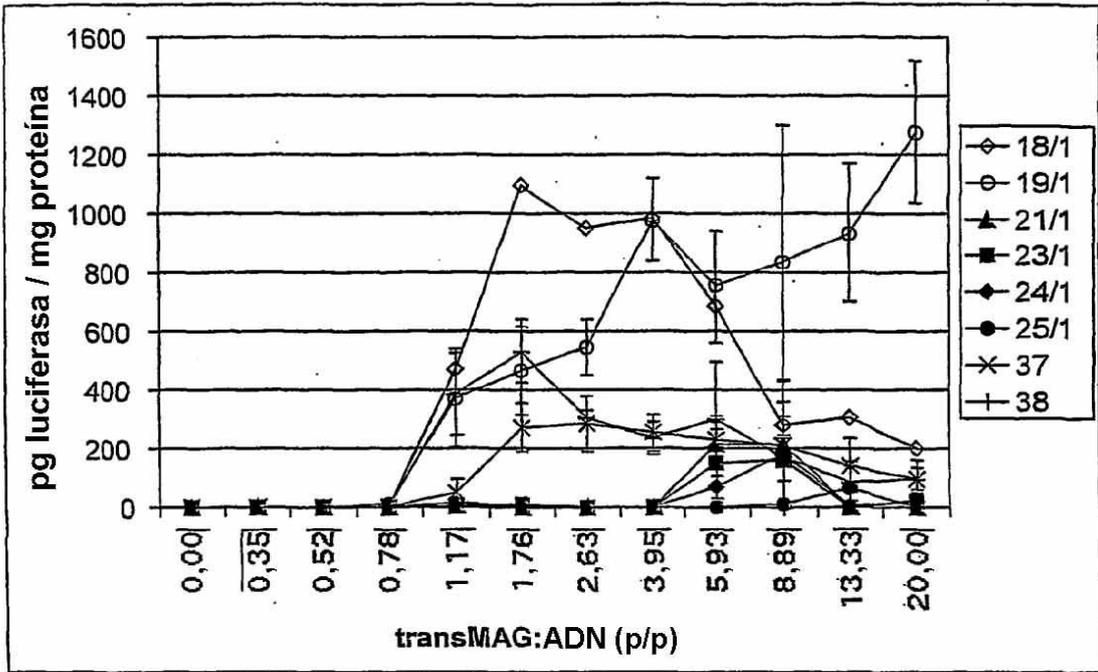
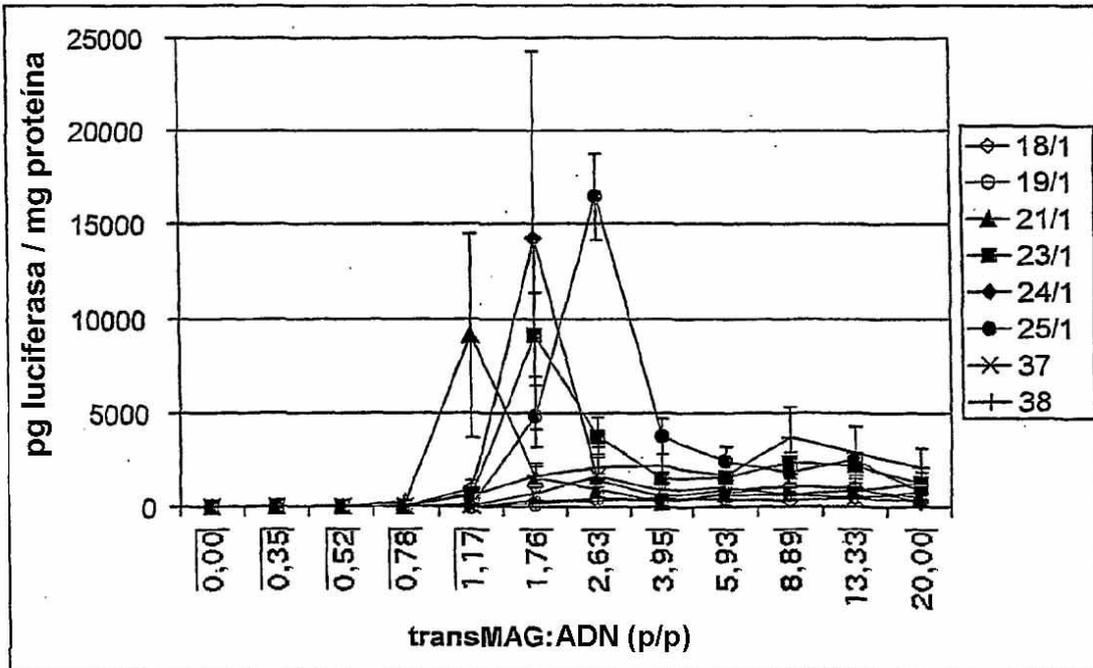


Fig. 21A

Fig. 21B



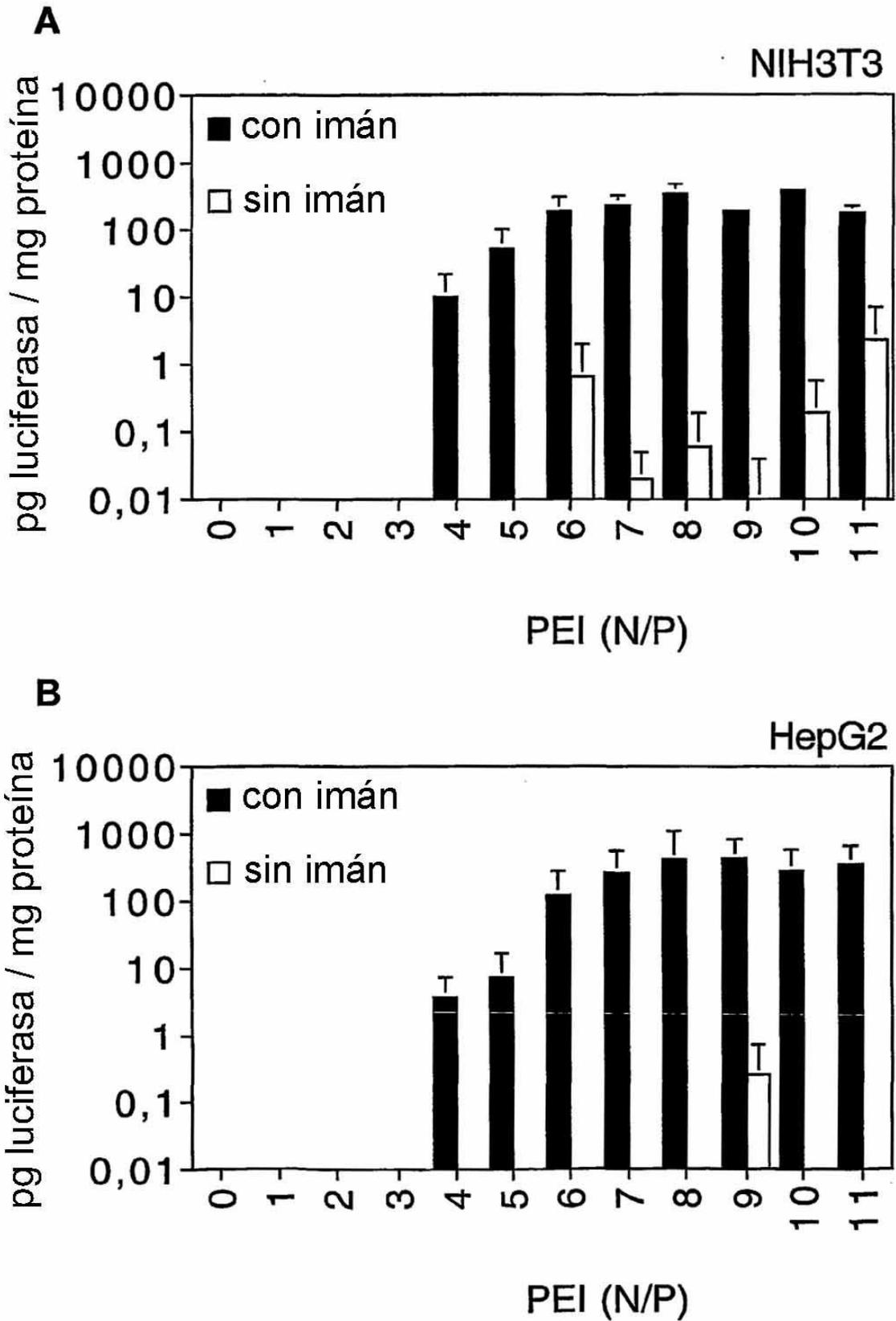


Fig. 22

Fig. 23-A1 GenePorter 10 min.

transMAG:ADN →	0	0,5	1	2	4	6	8	10
dosis de ADN ($\mu\text{g/pocillo}$)↓								
0,1	1	21	15	13	38	68	36	11
0,05	0	30	26	48	38	73	170	33
0,025	1	132	76	27	49	74	55	46
0,0125	0	123	40	99	73	50	48	29

Fig. 23-A2 GenePorter 4h.

transMAG:ADN →	0	0,5	1	2	4	6	8	10
dosis de ADN ($\mu\text{g/pocillo}$)↓								
0,1	1	1	1	0	1	1	1	1
0,05	1	1	1	0	1	1	1	1
0,025	1	2	2	1	2	1	1	1
0,0125	1	3	3	2	4	3	3	1

Fig. 23A Tabla

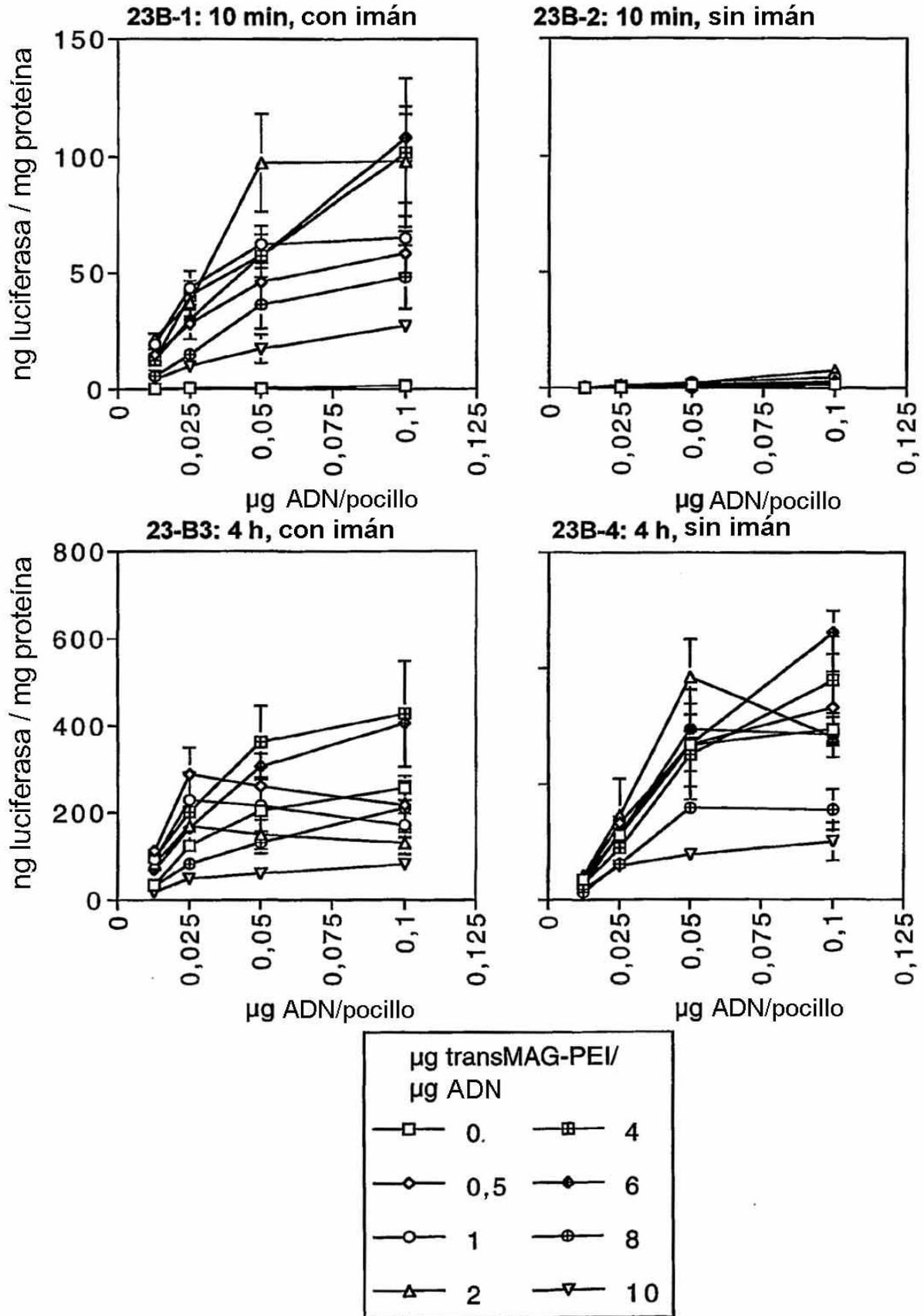


Fig. 23B

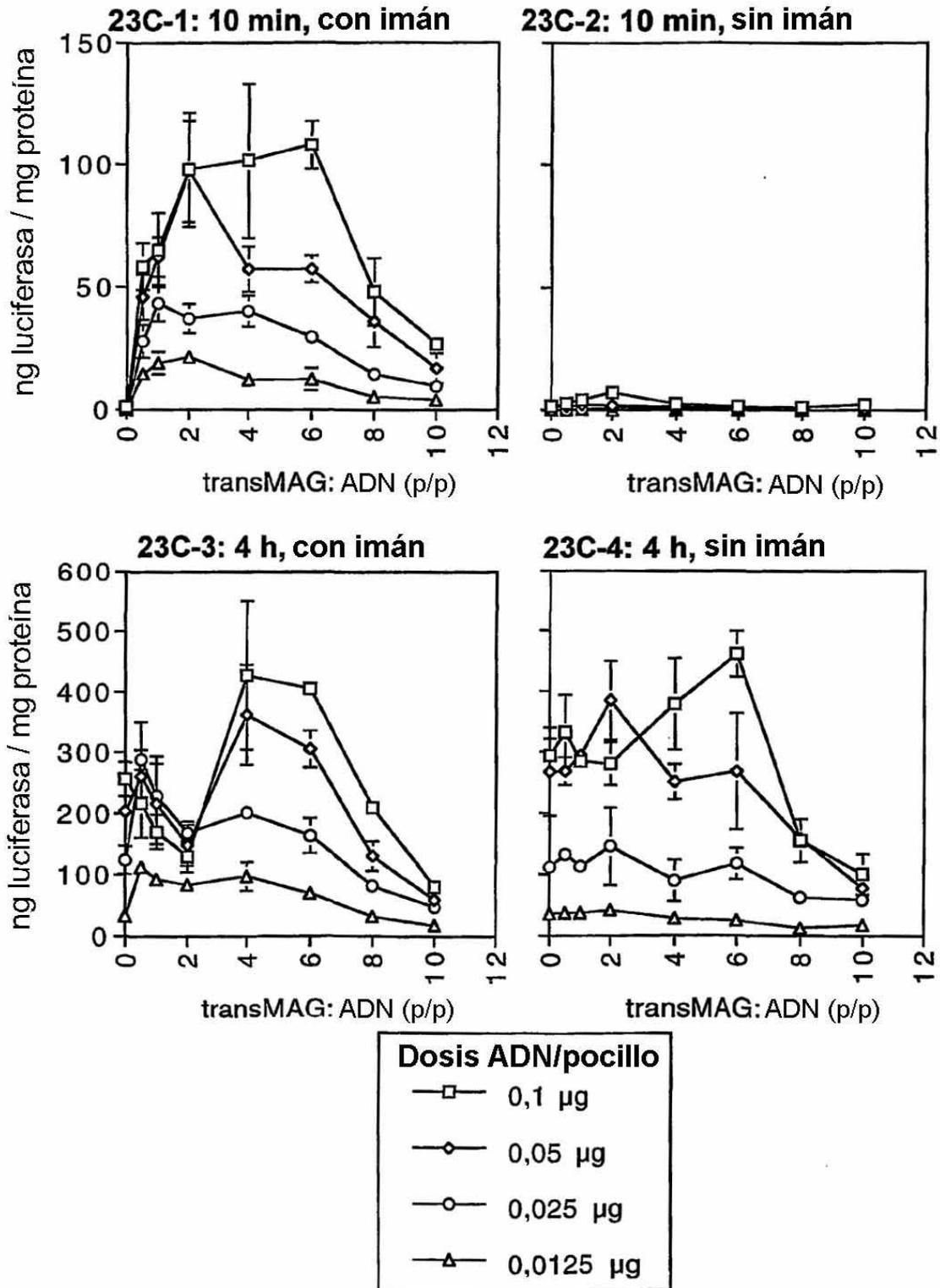


Fig. 23C

Fig. 24-A1 Lipofectamine 10 min.

transMAG:ADN →	0	0,5	1	2	4	6	8	10
dosis de ADN (µg/pocillo)↓								
0,1	1	19	37	147	9	5	5	4
0,05	1	0	15	506	43	19	20	6
0,025	1	0	79	22	30	12	18	6
0,0125	1	0	23	42	9	5	17	6

Fig. 24-A2 Lipofectamine 4 h.

transMAG:ADN →	0	0,5	1	2	4	6	8	10
dosis de ADN (µg/pocillo)↓								
0,1	0	8	2	2	0	0	0	0
0,05	0	2	1	2	1	0	0	0
0,025	1	3	1	3	2	1	1	0
0,0125	1	2	1	1	1	1	1	1

Fig. 24A Tabla

ES 2 391 764 T3

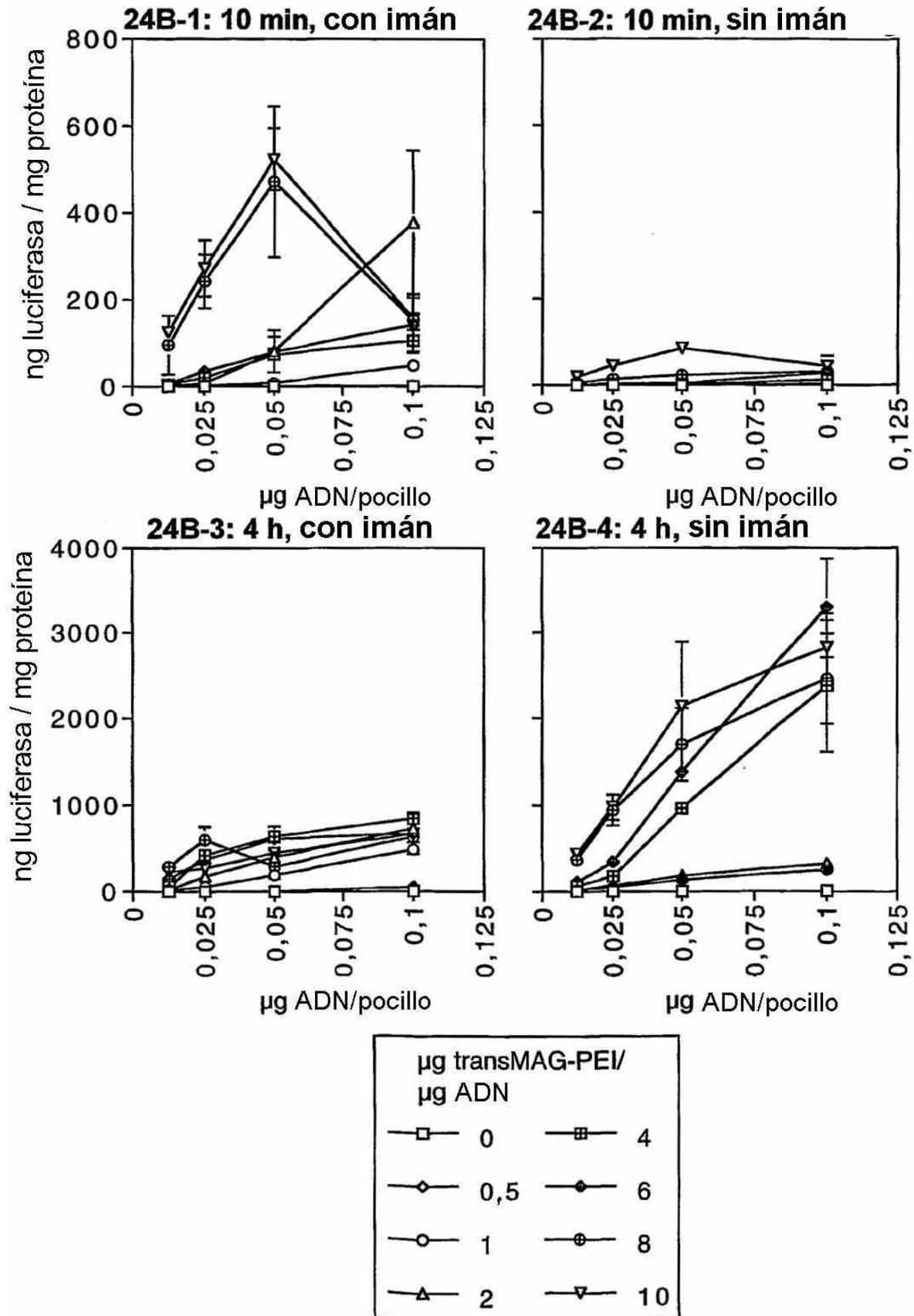


Fig. 24B

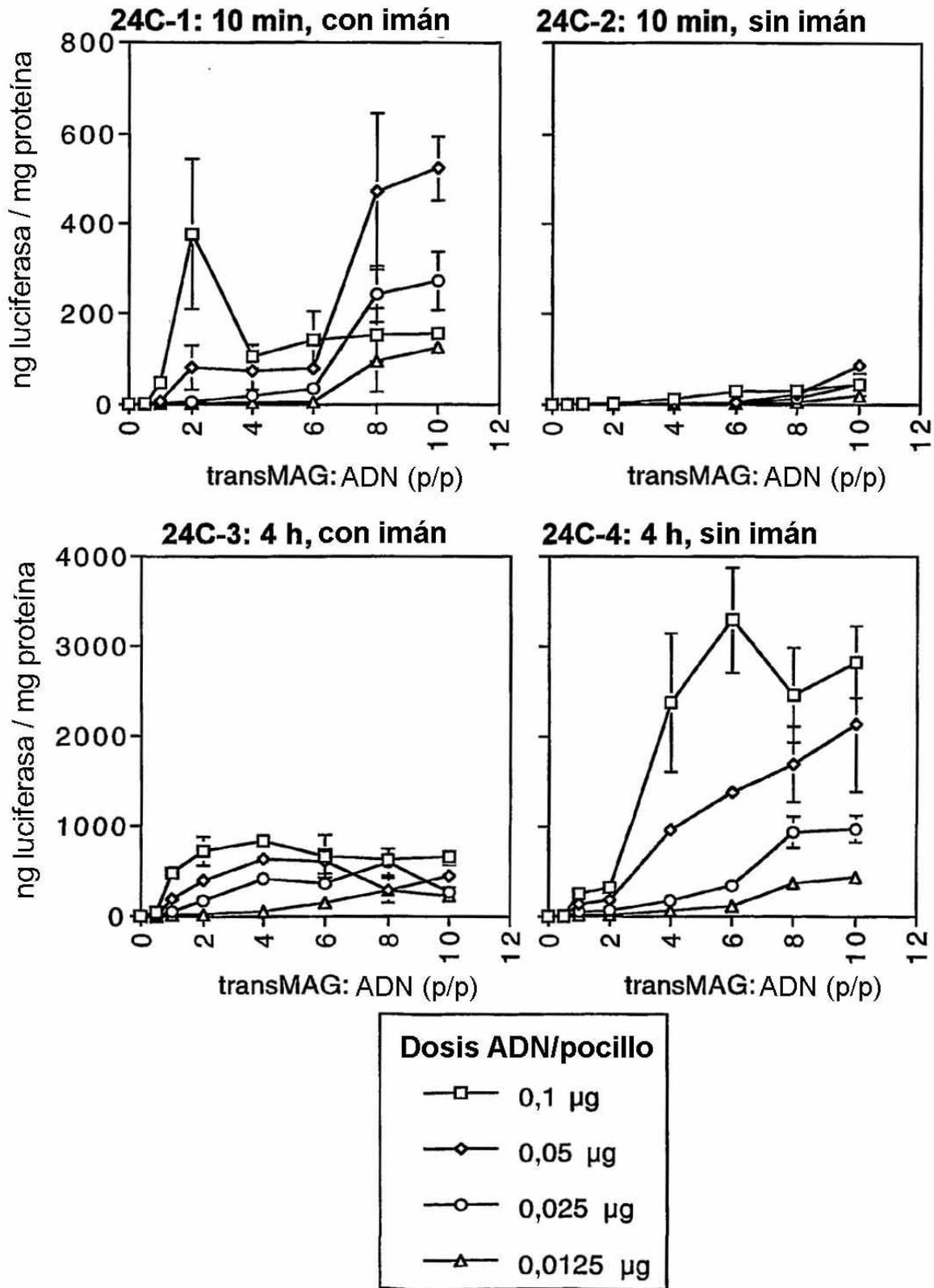


Fig. 24C

DOCHOL 10 min.

transMAG:ADN →	0	0,2	0,5	0,6	0,8	1	2	4
dosis de ADN (µg/pocillo)↓								
0,5	0	3	2	6	3	3	12	11
0,25	0	10	4	14	8	8	33	19
0,125	0	1	13	29	48	4	14	54
0,0625	1	5	5	18	4	8	16	100
0,03125	0	9	40	3	2	6	76	93
0,015625	1	4	56	414	10	2	112	4300

Fig. 25A Tabla

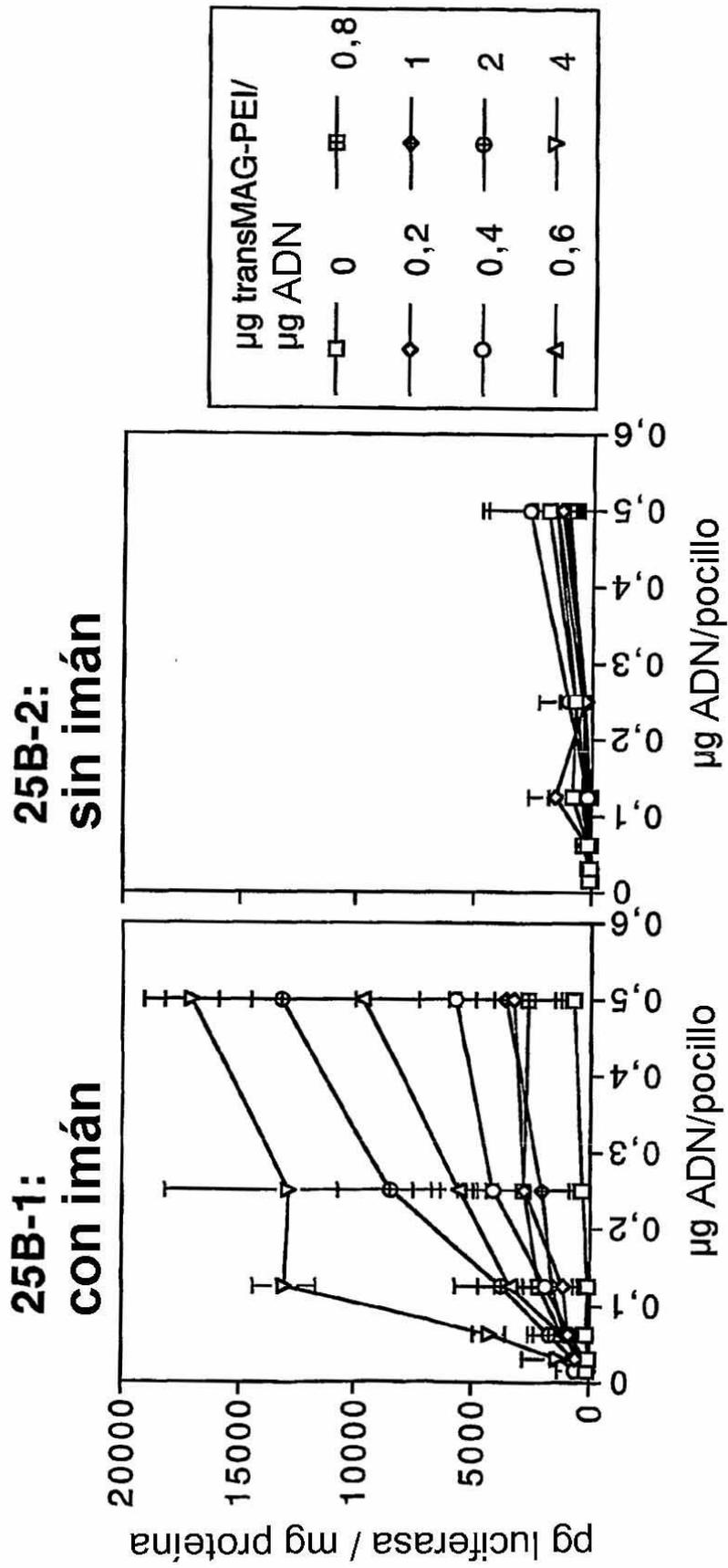


Fig. 25B

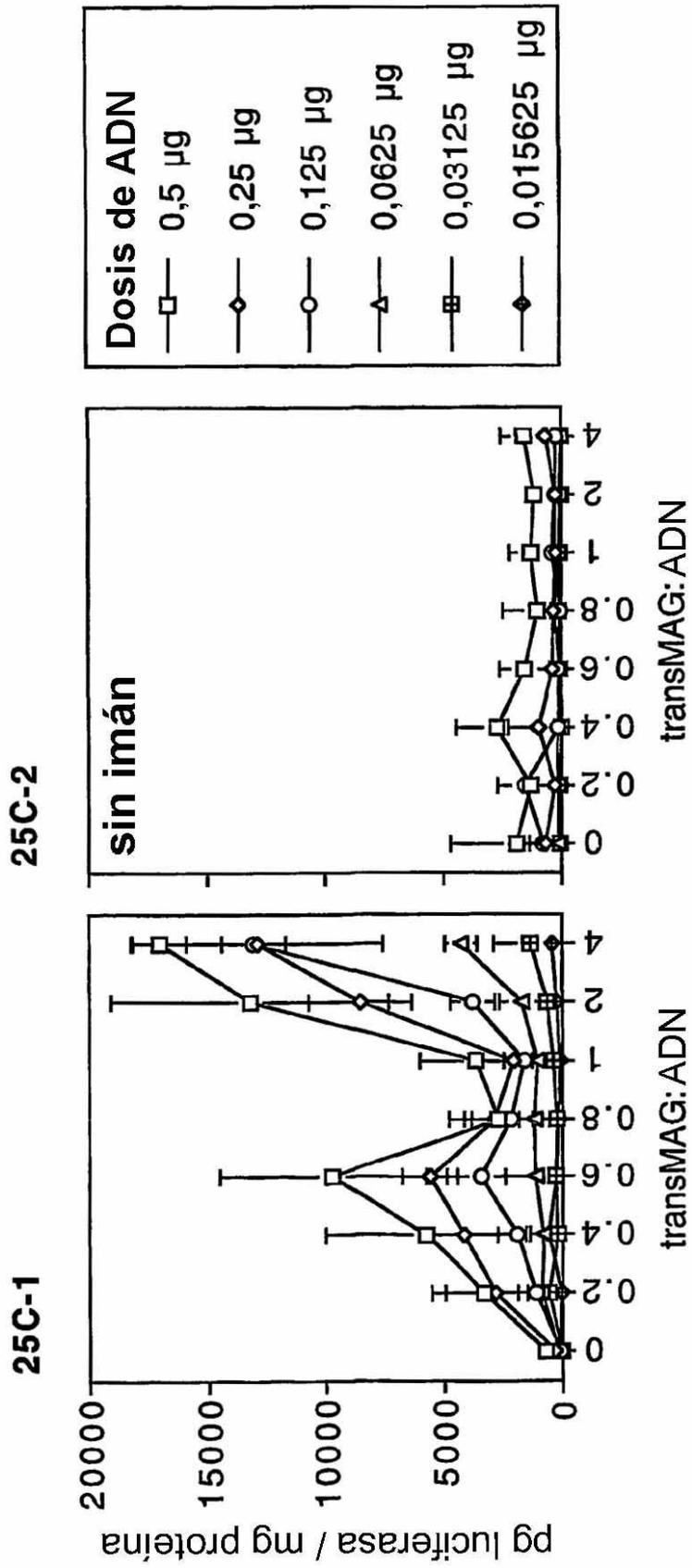


Fig. 25C

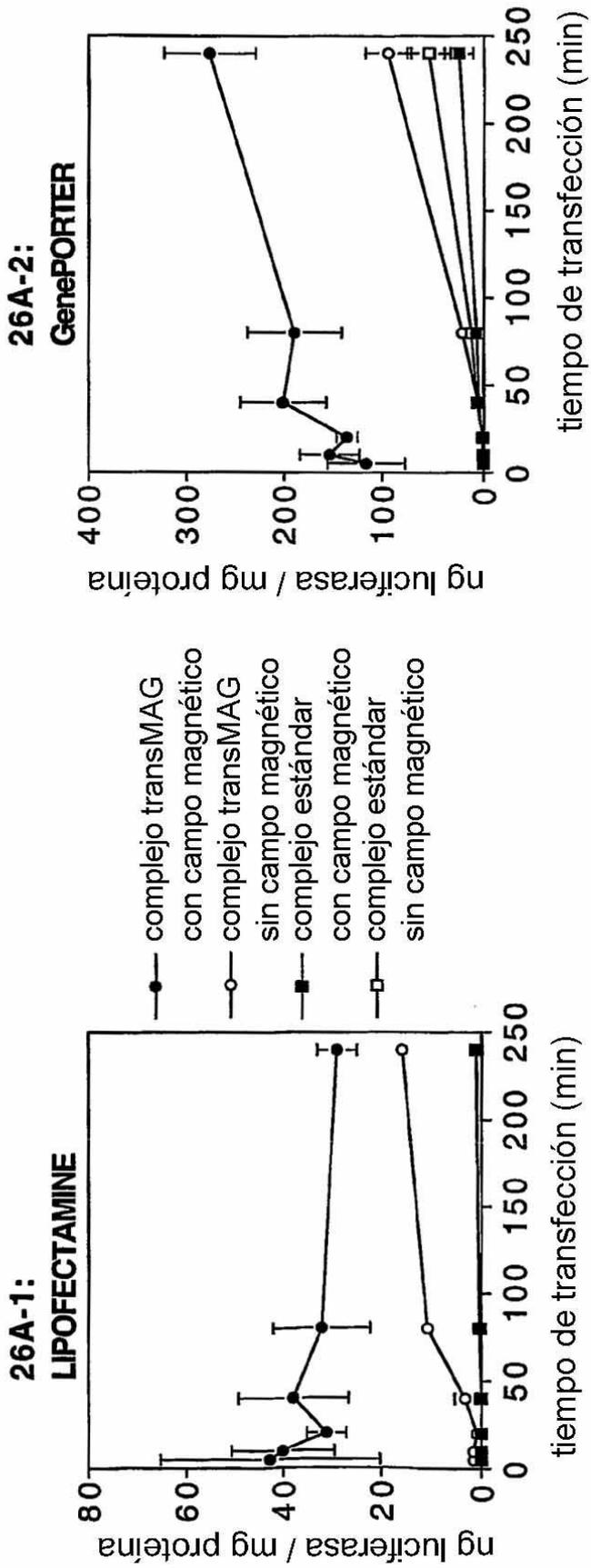


Fig. 26

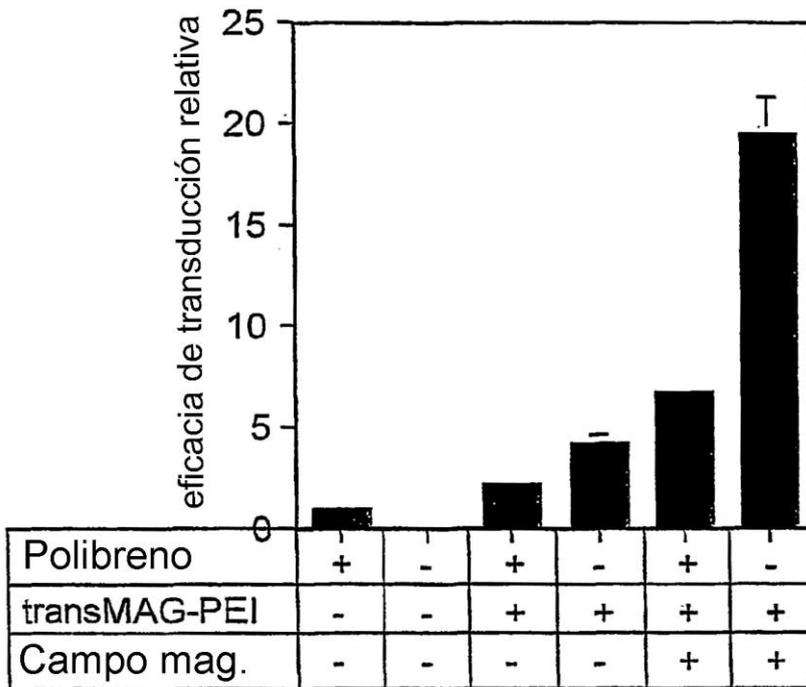


Fig. 27

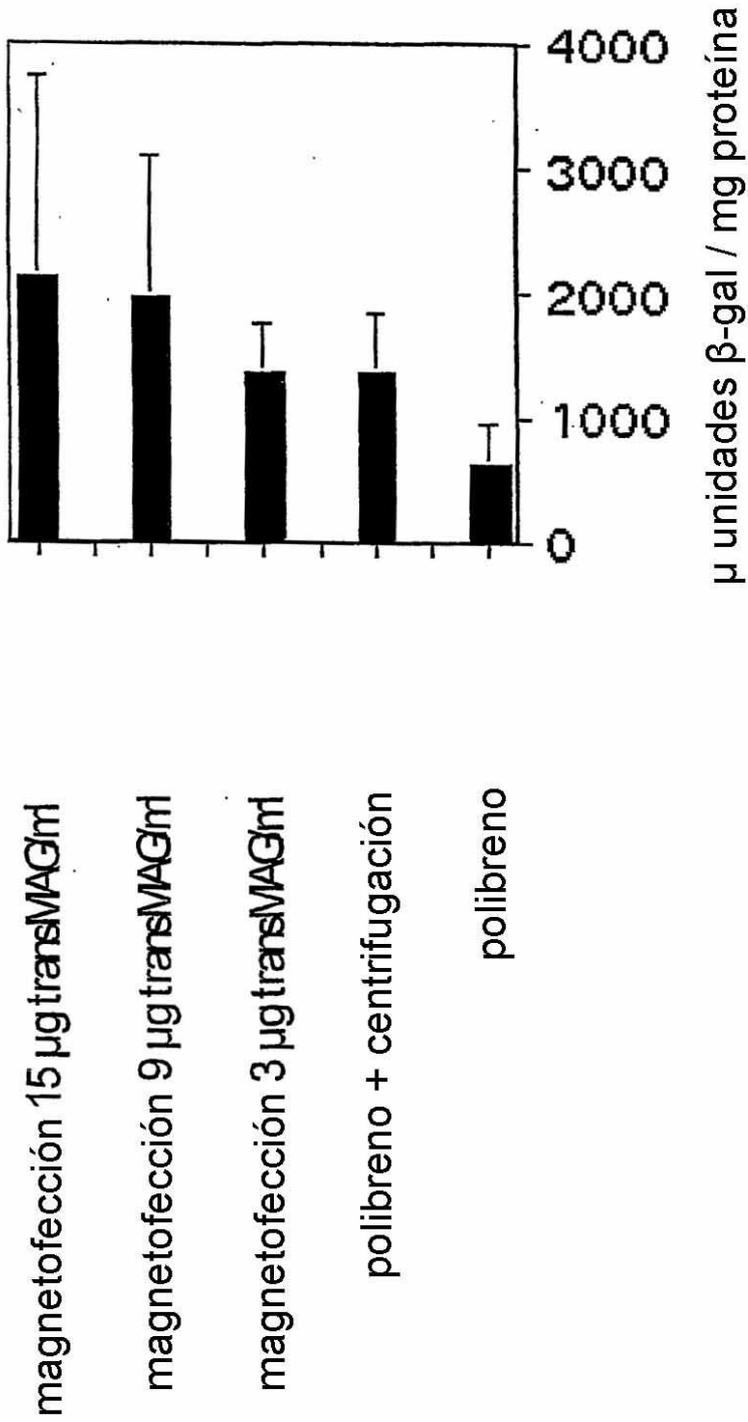


Fig. 28