

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 222**

51 Int. Cl.:

**A61K 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2007 E 07733508 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2037962**

54 Título: **Método para introducir ARNip en células mediante internalización fotoquímica**

30 Prioridad:

**11.07.2006 GB 0613753**

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

**19.12.2014**

73 Titular/es:

**PCI BIOTECH AS (100.0%)  
Strandveien 55  
1366 Lysaker , NO**

72 Inventor/es:

**BØE, SIGURD y  
HOVIG, EIVIND, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 525 222 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

Método para introducir ARNip en células mediante internalización fotoquímica

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para introducir un ARN interferente pequeño (ARNip) en células, preferiblemente en el citosol de células, usando un agente fotosensibilizador y una molécula vehículo e irradiación de las células con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, y al uso de este método para alterar la actividad génica, p. ej., silenciamiento de genes in vitro o in vivo.

10 El proceso de interferencia del ARN se produce en muchos organismos y en este proceso ARN bicatenario no codificante silencia la expresión génica en una secuencia específica, de forma postranscripcional. En la naturaleza, el fenómeno protege el genoma de un organismo de ácidos nucleicos extraños invasores tales como transposones, transgenes y genes víricos.

15 La introducción de ARN bicatenario (ARNbc) en una célula provoca este proceso de silenciamiento de ARN y cualquier ARNm en la célula que corresponda en secuencia con el ARNbc introducido es degradado. Las rutas de silenciamiento de ARN implican la conversión de ARNbc en ARN interferentes pequeños (ARNip) que dirigen las ribonucleasas a ARNm homólogos diana. La enzima Dicer procesa el ARNbc en ARNip, que en general tienen 20-25 nucleótidos de longitud. Después los ARNip se ensamblan en complejos que contienen endorribonucleasa conocidos como complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC) que son guiados a moléculas de ARN complementario, donde escinden y destruyen el ARNm diana. Pequeñas cantidades de ARNbc pueden silenciar una gran cantidad de ARNm diana debido a un componente de amplificación del silenciamiento con ARN (revisado en Hannon y Rossi (2004), *Nature* 431, 371-378).

25 El conocimiento de que las moléculas de ARNip son componentes clave de la ruta, condujo al ensayo de moléculas de ARNip químicamente sintetizadas de aproximadamente 20 a 22 pares de bases de longitud, correspondientes a las secuencias de ARN o ADN diana. Se mostró que estas moléculas actúan para alterar la expresión de las secuencias diana en células de mamífero (Elbashir S.M. et al., (2001) *Nature* 411, 494-498). Un ARNip de 20 nucleótidos normalmente es suficientemente largo para inducir el silenciamiento específico de genes, pero suficientemente corto para eludir una respuesta del hospedante. La disminución de la expresión de los productos génicos diana puede ser extensa con 90% de silenciamiento inducido por algunas moléculas de ARNip.

30 Por lo tanto, la tecnología del ARNip se ha desarrollado como una técnica general para el silenciamiento de genes de secuencia específica. El silenciamiento de genes tiene muchas aplicaciones, tanto in vitro como in vivo, tanto como una herramienta de investigación como una estrategia terapéutica. La gran potencia y especificidad que se ve cuando se usa la tecnología del ARNip hace que esta tecnología sea particularmente atractiva.

35 En todos los casos, el suministro de moléculas de ARNip a las células representa un desafío importante, ya que para que se produzca el silenciamiento génico, es necesario que las moléculas de ARNip entren en las células en concentraciones suficientes para ser útiles. La fuerza de la respuesta del silenciamiento y su duración están afectadas por la cantidad de ARNip que es suministrado a la célula, y se ha mostrado que suministrando ARNip en concentraciones suficientemente altas, incluso una molécula de ARNip relativamente débil puede silenciar su diana. Sin embargo, esto debe estar equilibrado frente al hecho de que se sabe que la administración de cantidades grandes de ARNip en una célula puede conducir a efectos no deseados tales como efectos "inespecíficos" (es decir, cambios no deseados en los niveles de expresión de proteínas) o la activación de rutas inmunitarias innatas.

40 En general, el ARNip se ha aplicado a células usando protocolos de transfección convencionales para ácidos nucleicos, tales como usando liposomas, lípidos catiónicos, lípidos aniónicos y microinyección. El ARNip es una molécula bicatenaria y como tal, el suministro y la absorción celular de la molécula es más difícil que para la cadena no codificante, que se une a proteínas del suero que son absorbidas por las células. Se han usado varias estrategias diferentes y existen kits disponibles en el comercio para este propósito. Como se ha indicado antes, la transfección eficaz es muy conveniente, puesto que la potencia del silenciamiento génico depende al menos en parte de la concentración de ARNip en la célula, para la administración a las células en concentraciones altas puede producir efectos secundarios indeseables.

50 La administración en niveles altos a menudo requiere concentraciones altas de reactivos de transfección, y esto puede tener efectos adversos en las células incluyendo la viabilidad celular reducida y varios otros efectos secundarios, tanto fenotípicos como no fenotípicos. Además, cuando se usan concentraciones altas de reactivos, no se logra el suministro específico.

El suministro dirigido de moléculas de ácido nucleico tales como ARNip, en general, no es tampoco suficientemente fiable. Se pueden usar virus para este propósito, sin embargo, hay problemas de seguridad con este procedimiento y el suministro vírico sistémico es difícil de lograr.

55 El ARNip actúa en el citosol de las células, y es necesario que la molécula alcance el citosol para que actúe. En vista de las consideraciones anteriores, sería conveniente desarrollar un método mejorado de suministro de ARNip en

5 citosol de una célula. Las propiedades deseables de dicho método mejorado incluyen, i) la capacidad para generar el suministro específico de tiempo y de sitio de las moléculas de ARNip en su sitio de acción, ii) evitar el uso de concentraciones altas de reactivo de transfección y/o ARNip, y/o iii) ARNip potenciado de silenciamiento en líneas celulares. En particular, dichos métodos reducirían el número total de complejos de ARNip:lípido necesarios para lograr un determinado nivel de silenciamiento génico o mejorarlo. En dichos métodos, la relación de ARNip:reactivo de transfección se puede alterar mientras se mantiene una determinada cantidad de silenciamiento génico o se mejora. El aumento de la relación de ARNip:lípido es útil puesto que minimizaría los efectos inhibidores que se observan cuando se usan concentraciones altas de reactivos de transfección.

10 El objetivo general del método mejorado se puede exponer de forma alternativa como un deseo de equilibrar la necesidad del suministro de ARNip eficaz y controlable al citosol, con reducción de efectos secundarios adversos causados por concentraciones altas de reactivos de transfección, o efectos no específicos, p. ej., en tipos de células particulares. Como se ha indicado antes, la reducción del número general de complejos de ARNip:lípido y/o un aumento en la relación de ARNip:lípido, contribuirían a este objetivo.

15 Con el fin de lograr estos objetivos, los autores de la invención han combinado el uso de un vehículo (reactivo de transfección) con la técnica de la internalización fotoquímica (PCI). El vehículo particular que se elige suministra la molécula de ARNip en los compartimentos intracelulares de la célula, p. ej., vesículas endocíticas tales como el endosoma y/o el lisosoma de la célula. Los compartimentos intracelulares alternativos en los que el complejo de ARNip:lípido puede ser absorbido incluyen el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico.

20 La liberación de la molécula de ARNip de la vesícula intracelular se produce como una consecuencia de la técnica de PCI. Esto depende de la exposición de la célula a un compuesto fotosensibilizador y posterior irradiación, y se puede ver que la liberación de la molécula de ARNip solo se produce después de irradiación de la célula y como tal, esta liberación en el citosol donde sus efectos son mediados, puede ser controlada de una forma espacial o temporal. Solamente las células que i) contienen ARNip en sus vesículas intracelulares, ii) se han expuesto al internalizador fotoquímico, y iii) son expuestas a irradiación, liberarán la molécula de ARNip en el citosol de la célula para que actúe en el ARNm en esta célula.

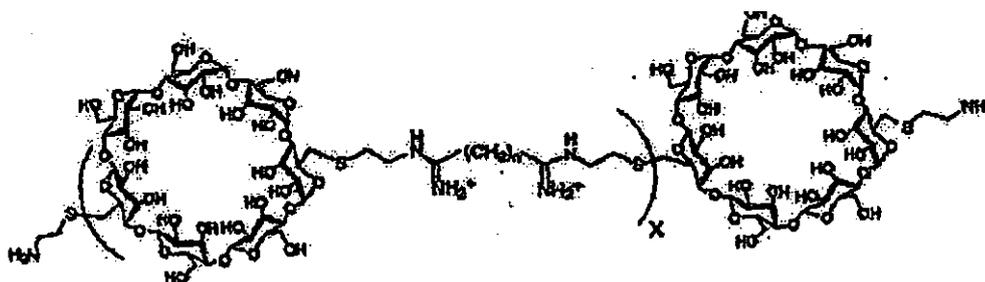
25 En general, es necesario usar reactivos de transfección con concentraciones altas para optimizar el suministro de ARNip al citosol. Los autores de la invención han observado sorprendentemente que, usando concentraciones bajas de reactivos de transfección (y un internalizador fotoquímico), la etapa de transfección se puede usar para dirigir el ARNip a vesículas intracelulares, tales como el endosoma, donde está contenido hasta que se produce su liberación por la aplicación de irradiación. El método por lo tanto permite que el ARNip llegue a su sitio de acción sin necesidad de usar concentraciones altas del reactivo de transfección o del ARNip. Además, el momento y el sitio de la liberación de la molécula de ARNip desde las vesículas intracelulares tales como el endosoma se puede controlar usando la técnica de PCI.

30 Por lo tanto, la invención se refiere a un método para introducir una molécula de ARNip en el citosol de una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con una molécula de ARNip, un vehículo y un agente fotosensibilizador, e irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador. Una vez activado, los compartimentos intracelulares dentro de dicha célula que contienen dicho agente fotosensibilizador liberan el ARNip contenido en estos compartimentos al citosol. La presente invención proporciona un método in vitro o ex vivo para introducir una molécula de ARNip en el citosol de una célula, comprendiendo dicho método:

- 35 i) poner en contacto dicha célula con una molécula de ARNip, un vehículo y un agente fotosensibilizador, y
- ii) irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador,

en donde dicho vehículo comprende una poliamina catiónica seleccionada de

- 40 (a) una lipopoliamina en una formulación no liposomal,
- (b) una polietilenimina (PEI),
- (c) un polímero de betaciclodextrina-amina de fórmula



en donde X es un número entero de 1 a 100 inclusive, y n es un número entero de 4 a 10 inclusive,

(d) un dendrímero que contiene un grupo amina, y

(e) un péptido catiónico.

- 5 La PCI es una técnica que usa un agente fotosensibilizador, en combinación con una etapa de irradiación para activar a ese agente, y logra la liberación de moléculas coadministradas a la célula en el citosol de la célula. Esta técnica permite que moléculas que son absorbidas por la célula en los orgánulos, tales como endosomas, sean liberadas de estos orgánulos al citosol, después de irradiación.

10 El método básico de internalización fotoquímica (PCI) se describe en los documentos WO 96/07432 y WO 00/54802, que se incorporan en la presente memoria por referencia. Como se ha expuesto antes, la molécula que va a ser internalizada (que para el uso según la presente invención sería la molécula de ARNip), en este caso con una molécula vehículo, y un agente fotosensibilizador se ponen en contacto con una célula. El agente fotosensibilizador, la molécula vehículo y la molécula que va a ser internalizada son absorbidas en un subcompartimento unido a la membrana celular dentro de la célula. Al exponer la célula a luz de la longitud de onda adecuada, el agente fotosensibilizador es activado, lo cual genera directa o indirectamente especies reactivas que alteran las membranas del compartimento intracelular. Esto permite que la molécula internalizada sea liberada al citosol.

15 Estos métodos usan el efecto fotoquímico como un mecanismo para introducir moléculas de otra forma impermeables (o poco permeables) a la membrana en el citosol de una célula, de una forma que no produce la destrucción celular o muerte celular extendida si la metodología se ajusta de forma adecuada para evitar la producción de especies tóxicas excesivas, p. ej., disminuyendo los tiempos de iluminación o dosis de fotosensibilizador.

20 Este método es particularmente ventajoso para introducir ARNip en células porque permite el uso de concentraciones menores del vehículo o reactivo de transfección y/o del ARNip, de lo que se requiere para la transfección convencional de ARNip, mientras que se logra la inhibición eficaz de genes. Además, el momento y el sitio de irradiación para liberar la molécula de ARNip se pueden controlar, de modo que sea liberada solo en el momento y en el sitio que se desea para lograr los efectos requeridos. Como tal, se minimiza la exposición de las células al ARNip y al vehículo, y se minimizan los efectos secundarios indeseables. Esto está en contraste con las técnicas convencionales para introducir ARNip en las células, donde no se puede controlar el momento y el sitio de la liberación del ARNip y son necesarias concentraciones altas de reactivo de transfección. Al disminuir la cantidad de vehículo (cambiando la relación de ARNip:vehículo) comparado con la cantidad que se recomienda para usar, o al disminuir el número total de complejos de ARNip:vehículo que se aplican a la célula, también puede ser posible minimizar la pérdida de ARNip de los compartimentos intracelulares antes de la irradiación por PCI.

25 Se ha mostrado además, que usando los vehículos definidos en la presente memoria con PCI para suministrar ARNip, se pueden lograr efectos fuertes de silenciamiento génico sin causar también citotoxicidad. Por ejemplo, usando PEI (PM 25000) 1 µg/ml con ARNip 100 nM y dosis de luz de hasta 40 segundos, no se observaron efectos citotóxicos (véase la figura 11B). En estas condiciones, se observaron efectos fuertes de silenciamiento génico (véase la figura 10).

30 El ARN es un polímero de ribonucleótidos, que contiene cada uno el azúcar ribosa asociado con un grupo fosfato y una base nitrogenada (típicamente, adenina, guanina, citosina o uracilo). Como ocurre con el ADN, el ARN puede formar enlaces de hidrógeno complementarios, y el ARN puede ser bicatenario (ARNbc), monocatenario (ARNmc) o bicatenario con un extremo saliente monocatenario. "ARN interferente pequeño" (ARNip) se refiere a moléculas de ARN bicatenarias de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que interfieren específicamente con la expresión de proteínas al unirse a las moléculas de ARNm. Preferiblemente, las moléculas de ARNip tienen 12-28 nucleótidos de longitud, más preferiblemente 15-25 nucleótidos de longitud, todavía más preferiblemente 19-23 nucleótidos de longitud y lo más preferiblemente 21-23 nucleótidos de longitud. Por lo tanto, las moléculas de ARNip preferidas tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos de longitud.

35 La longitud de una cadena designa la longitud de una molécula de ARNip. Por ejemplo, un ARNip que se describe como de 21 ribonucleótidos de longitud (un 21-oligómero) podría comprender dos cadenas opuestas de ARN que se asocian entre sí durante 19 pares de bases contiguas. Los dos ribonucleótidos restantes en cada cadena formarían un extremo saliente. Cuando un ARNip contiene dos cadenas de diferentes longitudes, la más larga de las cadenas designa la longitud del ARNip. Por ejemplo, una ARNbc que contiene una cadena que tiene 21 nucleótidos de longitud y una segunda cadena que tiene 20 nucleótidos de longitud, constituye un 21-oligómero.

40 Son convenientes los ARNip que comprenden un extremo saliente. El extremo saliente puede estar en el extremo 5' o 3' de una cadena. Preferiblemente, está en el extremo 3' de la cadena de ARN. La longitud del extremo saliente puede variar, pero preferiblemente es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos, y más preferiblemente tiene aproximadamente 2 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, el ARNip de la presente

invención comprenderá un extremo saliente 3' de aproximadamente 2 a 4 nucleótidos. Más preferiblemente, el extremo saliente 3' tiene 2 ribonucleótidos de longitud. Incluso más preferiblemente, los 2 ribonucleótidos que comprenden el extremo saliente 3' llevan bases uracilo (U).

5 Los ARNip se diseñan para que interactúen con una secuencia de ribonucleótidos diana, en otras palabras, complementan una secuencia diana de modo que se unen a la secuencia diana, es decir, una cadena de ARNip es complementaria a una región de la secuencia diana.

10 También se han generado moléculas de ARNip que tienen cadenas principales modificadas para así aumentar su semivida (p. ej., como se describe en Chiu et al., (2003), *RNA*. 9(9), 1034-48 y Czauderna et al., (2003), *Nucleic Acids Research* 31,2705-2716). Por lo tanto, el término "ARNip" también incluye dichas moléculas modificadas. Por lo tanto, la referencia a ARNip abarca derivados y variantes de ARNip que presentan la misma función, es decir, interacción con una secuencia de ARNm diana. Las variantes preferidas incluyen aquellas en las que se ha usado una cadena principal modificada (como antes) o se usan una o más bases no naturales.

15 El método se puede usar para introducir más de un tipo de molécula de ARNip en una célula. En otras palabras, se pueden introducir moléculas de ARNip que tienen diferentes secuencias simultáneamente en una célula. Si se van a introducir múltiples moléculas de ARNip, esto se puede lograr mediante la asociación simultánea de más de una molécula de ARNip con el vehículo. Alternativamente, cada tipo de molécula de ARNip se puede asociar por separado con un vehículo.

20 Hay varios métodos para preparar ARNip, tales como la síntesis química, transcripción in vitro, vectores de expresión de ARNip, y casetes de expresión de PCR. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Pon et al., (2005) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 24(5-7): 777-81, Du et al., (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345(1):99-105 y Katoh et al., (2003), *Nucleic Acids Res Suppl.* (3): 249-50.

Igualmente, están bien documentados los métodos para diseñar moléculas de ARNip para así lograr el resultado deseado. Primero debe elegirse el sitio diana del ARNip. Esto se puede llevar a cabo usando diferentes técnicas (véase, p. ej., Jagla et al., (2005), *RNA*. 11(6):864-72 y Takasaki et al., (2006), *Comput. Biol. Chem.* 30(3): 169-78).

25 El método de la invención logra la translocación de la molécula de ARNip en el citosol. Sin embargo, se apreciará que no se puede lograr la absorción de todas y cada una de las moléculas puestas en contacto con la célula. Sin embargo, se puede lograr una absorción significativa y mejorada con respecto a los niveles anteriores en los que no se usaba PCI o vehículo.

30 Preferiblemente, los métodos de la invención permiten la absorción de las moléculas de ARNip en niveles suficientes de modo que su efecto es evidente en los productos expresados por esas células. La concentración adecuada de ARNip para poner en contacto con la célula se puede ajustar para lograr este objetivo, p. ej., lograr una reducción en la expresión de un gen diana de al menos 10%, p. ej., al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% de reducción (p. ej., en la expresión de una o más proteínas codificadas por el gen diana) después de incubación con células durante, p. ej., 24, 48, 72 o 96 horas (p. ej., de 24 a 48 h). Igualmente, el tipo y/o concentración de vehículo, el tipo y/o la concentración de agente fotosensibilizador y el tiempo de irradiación, se pueden ajustar para lograr la reducción expuesta antes.

40 Esto se puede medir determinando el nivel de proteína en la célula, usando técnicas convencionales conocidas en la materia tales como la transferencia Western. El nivel de reducción de la proteína depende de la semivida de la proteína, es decir, la proteína preexistente será eliminada de acuerdo con su semivida. Por lo tanto, se logra una reducción en la expresión de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90%, con respecto a la expresión en el mismo tiempo de medición sin el ARNip de modo que se tiene en cuenta la semivida.

45 Esto se puede medir alternativamente en términos del efecto de la molécula de ARNip en la cantidad de ARNm que está presente en la célula, p. ej., el método se puede llevar a cabo para lograr una reducción en los niveles de ARNm de al menos 10%, p. ej., al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% de reducción después de incubación con las células durante, p. ej., 24, 48, 72 o 96 horas (p. ej., de 24 a 48 h), con respecto a los niveles de ARNm de la secuencia diana en el mismo tiempo de medición sin ARNip. Esto también se puede medir usando técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como técnicas de hibridación o transferencia y RT-PCR.

50 Puesto que los presentes métodos requieren el uso de significativamente menos vehículo o agente de transfección (y/o menos ARNip, dependiendo de si se va a reducir el número total de complejos, o se va a modificar la relación de ARNip:vehículo o agente de transfección, o ambos) que los métodos convencionales para la transfección de moléculas de ARNip, también se puede expresar la mejora en la transfección usando el método de la invención, en términos de la cantidad de vehículo o agente de transfección que es necesario para lograr una determinada cantidad de reducción en la expresión de proteína o niveles de ARNm. Por ejemplo, el método de la invención preferiblemente permite una determinada reducción en la expresión de la proteína diana o los niveles de ARNm (p. ej. de al menos 10%, p. ej., al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% como se ha descrito antes) usando una concentración de vehículo y/o concentración de ARNip que es p. ej., al menos 10, 20, 30, 40, 50 o 60% menos que la cantidad de vehículo que es necesaria para lograr el mismo nivel de reducción en la expresión de la proteína diana o niveles de ARNm sin la PCI.

También se pueden hacer comparaciones entre los niveles de reducción en la expresión de proteína o niveles de ARNm que se ven con una determinada concentración de ARNip y vehículo, en presencia y ausencia de PCI. Por ejemplo, el método de la invención preferiblemente permite una reducción en la expresión de la proteína diana o niveles de ARNm de al menos 10%, p. ej., al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90%, como se ha descrito antes, comparado con la expresión de la proteína o niveles de ARNm logrados llevando a cabo el método en ausencia de la etapa de irradiación de la técnica de PCI.

El término "célula" se usa en la presente memoria para incluir todas las células eucariotas (incluyendo células de insectos y células fúngicas). Las "células" representativas incluyen por lo tanto todos los tipos de células animales de mamífero y no mamífero, células vegetales, células de insecto, células fúngicas y protozoos. Sin embargo, preferiblemente, las células son de mamífero, por ejemplo, células de gatos, perros, caballos, burros, ovejas, cerdos, cabras, vacas, ratones, ratas, conejos, cobayas, pero lo más preferiblemente de seres humanos.

Como se usa en la presente memoria "poner en contacto" se refiere a llevar las células y el agente fotosensibilizador y/o ARNip y vehículo en contacto físico entre sí en condiciones adecuadas para la internalización en las células, p. ej., preferiblemente a 37°C en un medio nutricional adecuado, p. ej., de 25-39°C.

El agente fotosensibilizador es un agente que es activado por iluminación a una longitud de onda e intensidad adecuadas para generar una especie activa. De modo conveniente, dicho agente puede ser uno que se sitúe en compartimentos intracelulares, en particular endosomas o lisosomas. Se conoce una variedad de dichos agentes fotosensibilizadores en la técnica y están descritos en la bibliografía, incluyendo en el documento WO96/07432, que se incorpora en la presente memoria por referencia. A este respecto se debe mencionar la ftalocianina de aluminio di y tetrasulfonada (p. ej., AIPcS<sub>2a</sub>), terafenilporfinas sulfonadas (TPPS<sub>n</sub>), azul de Nilo, derivados de clorina e<sub>6</sub>, uroporfirina I, filioeritrina, hematoporfirina y azul de metileno, que se ha mostrado que se sitúan en los endosomas y lisosomas de las células en cultivo. Esto se debe, en la mayoría de los casos, a la absorción endocítica del fotosensibilizador. Por lo tanto, el agente fotosensibilizador preferiblemente es un agente que es absorbido en los compartimentos internos de la células, p. ej., lisosomas y/o endosomas. Se describen otros fotosensibilizadores adecuados para usar en la invención en el documento WO03/020309, que también se incorpora en la presente memoria por referencia, en particular, meso-tetrafenil-clorinas sulfonadas, preferiblemente TPCS<sub>2a</sub>.

Sin embargo, también se pueden usar otros agentes fotosensibilizadores que se localizan en otros compartimentos intracelulares, por ejemplo, el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi. También es posible que puedan funcionar mecanismos en los que los efectos del tratamiento fotoquímico sean en otros componentes de la célula (es decir, componentes distintos de los compartimentos restringidos por membrana, es decir, encerrados por membrana). Por lo tanto, por ejemplo una posibilidad puede ser que el tratamiento fotoquímico destruya moléculas importantes para el transporte intracelular o fusión de vesículas. Dichas moléculas pueden no situarse necesariamente en compartimentos restringidos por membrana, pero, no obstante, el daño fotoquímico de dichas moléculas puede conducir a la internalización fotoquímica de los complejos de vehículo:ARNip, p. ej., por un mecanismo en el que los efectos fotoquímicos en dichas moléculas conducen al transporte reducido de la molécula que se va a internalizar (es decir, la molécula de ARNip) a vesículas degradativas tales como lisosomas, de modo que la molécula que se va a internalizar puede escapar al citosol antes de ser degradada.

Los ejemplos de moléculas que no se sitúan necesariamente en compartimentos restringidos por membrana son varias moléculas del sistema de transporte microtubular tal como dineína y componentes de dinactina; y por ejemplo, rab5, rab7, factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF), proteína de unión a NSF soluble (SNAP) etc.

Por lo tanto, las clases de agentes fotosensibilizadores adecuados que se pueden mencionar incluyen porfirinas, ftalocianinas, purpurinas, clorinas (en particular, derivados de clorina de las porfirinas descritas más adelante), benzoporfirinas, bases débiles lisosomotrópicas, naftalocianinas, colorantes catiónicos y tetraciclina o derivados de las mismas (Berg et al., (1997), *J. Photochemistry and Photobiology*, 65, 403-409). Otros agentes fotosensibilizadores incluyen texafirinas, feoforbidas, porfencenos, bacterioclorinas, cetoclorinas, derivados de hematoporfirina, y derivados de los mismos, fotosensibilizadores endógenos inducidos por ácido 5-aminolevulínico y derivados de los mismos, dímeros u otros conjugados entre fotosensibilizadores.

Los agentes fotosensibilizadores preferidos incluyen TPPS<sub>4</sub>, TPPS<sub>2a</sub>, AIPcS<sub>2a</sub>, TPCS<sub>2a</sub>, y otros fotosensibilizadores anfífilicos. Otros agentes fotosensibilizadores incluyen el compuesto ácido 5-aminolevulínico o ésteres de ácidos 5-aminolevulínico o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La "irradiación" de la célula para activar el agente fotosensibilizador, se refiere a la administración de luz directa o indirectamente como se describe en lo sucesivo. Por lo tanto, las células se pueden iluminar con una fuente de luz, por ejemplo, directamente (p. ej., en células solas in vitro) o indirectamente, p. ej., in vivo cuando las células están debajo de la superficie de la piel o están en forma de una capa de células, las cuales no son todas iluminadas directamente, es decir, sin el cribado de otras células.

En este método, la molécula de ARNip que se va a introducir en la célula está unida a o asociada con o conjugada con una o más moléculas vehículo o agentes de transfección que actúan para facilitar o aumentar la absorción del agente fotosensibilizador o la molécula de ARNip en la célula. Esta unión, asociación o conjugación se puede

realizar antes de poner en contacto la molécula de ARNip y su vehículo con la célula o en el momento de dicho contacto en virtud de poner en contacto estas moléculas.

Las expresiones vehículo y agente de transfección se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

5 La molécula vehículo se puede asociar, unir o conjugar con la molécula de ARNip o tanto con el ARNip como con el agente fotosensibilizador. Por lo tanto, por ejemplo, el ARNip puede estar unido al vehículo por interacciones de carga:carga. Como se ha mencionado antes, se puede usar simultáneamente más de un vehículo, y el vehículo se puede asociar, unir o conjugar con más de una molécula de ARNip, o más de un tipo de molécula de ARNip.

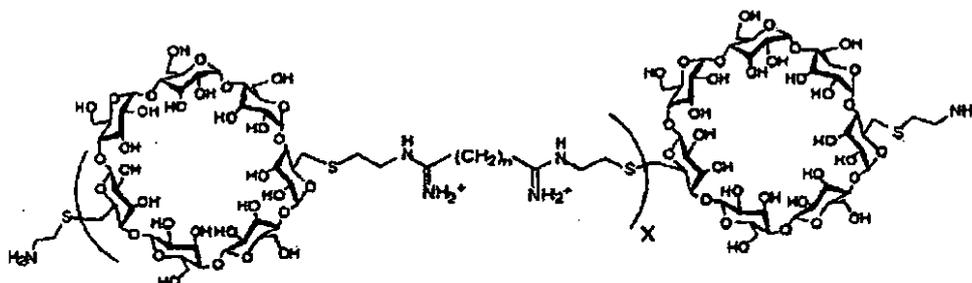
10 En un aspecto de la presente invención, el vehículo comprende un compuesto, preferiblemente en una formulación no liposomal, que contiene dos o más grupos amina, es decir es una poliamina, y el cual es catiónico y preferiblemente protonable (es decir, se puede protonar para que lleve uno o más átomos de hidrógeno adicionales en condiciones de reacción adecuadas) a valores de pH diferentes. Los diferentes valores de pH se aplican a diferentes valores para átomos protonables dentro de una sola molécula y/o dentro de diferentes moléculas.

15 El término "protonable" se usa en la presente memoria para indicar un grupo que es capaz de aceptar un átomo de hidrógeno, es decir, un grupo protonable es un grupo que acepta hidrógeno. Está claro que la capacidad de un grupo para aceptar hidrógeno depende no solo de la naturaleza del grupo, sino también del pH al que se expone el grupo. Preferiblemente, dicho grupo protonable contiene un átomo de nitrógeno, y es este átomo el que acepta el átomo de hidrógeno.

20 Como se denomina en la presente memoria, "catiónico" indica que la carga total, o neta, de la molécula es +1 o mayor. Esta se mide preferiblemente a pH fisiológico, es decir, pH de 7,2. La molécula puede tener una carga mayor, p. ej., +2 o mayor, +3 o mayor, +4 o mayor, +5 o mayor, +6 o mayor, +7 o mayor, +8 o mayor, +9 o mayor, +10 o mayor, +11 o mayor, +12 o mayor, +13 o mayor, +14 o mayor, +15 o mayor, +20 o mayor, +25 o mayor, +50 o mayor, +75 o mayor, +100 o mayor, +150 o mayor, +200 o mayor, +250 o mayor, +300 o mayor, +400 o mayor, +500 o mayor, +750 o mayor o +1000 o mayor.

25 Las poliaminas catiónicas para usar según los métodos de la invención son como se definen en lo sucesivo e incluyen

- (a) una lipopoliamina en una formulación no liposomal,
- (b) polietilenimina (PEI), que puede tener un valor de  $M_n$  de 500-20000 por GPC,
- (c) un polímero de betaciclodextrina-amina de fórmula



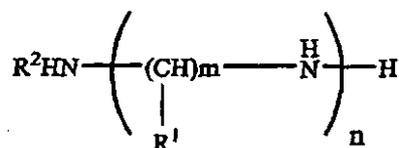
30 en donde X es un número entero de 1 a 100 inclusive, y n es un número entero de 4 a 10 inclusive,

- (d) un dendrímero que contiene grupo amina, y
- (e) un péptido catiónico.

35 Preferiblemente, la poliamina a la que se hace referencia en la presente memoria contiene grupos amina primaria y secundaria, o una mezcla de los mismo (p. ej., al menos dos grupos amina primaria). Preferiblemente, la región de poliamina tiene al menos 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de nitrógeno y una carga de al menos +1, +2, +3, +4, o +5 (o al menos +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +20, +25, +50, +75, +100, +150, +200, +250, +300, +400, +500, +750 o +1000) a pH fisiológico, p. ej., algunos o todos los grupos amina están cargados. Preferiblemente, al menos un (p. ej., al menos 2, 3 o 4) grupo que contiene nitrógeno, p. ej., NH, no está cargado a pH fisiológico. El pKa al que la última amina de la poliamina está protonada, p. ej. la lipopoliamina, es preferiblemente aproximadamente 5,5, es decir, al disminuir el pH, o añadir compuestos ácidos, la última amina a protonar se protona a un pH menor o igual a 5,5.

40 En una realización, el vehículo comprende una lipopoliamina en una formulación no liposomal. Por lipopoliamina se entiende una molécula anfifílica que comprende al menos una región de poliamina hidrófila (es decir, que contiene dos o más grupos amina) y una región lipófila. La región lipófila puede contener una o más cadenas lipófilas.

La región de poliamina de la lipopoliamina preferiblemente tiene la fórmula (I)

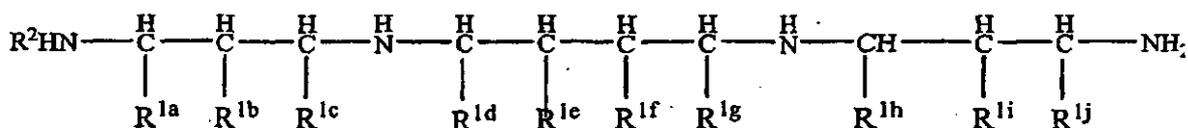


en la que m es un número entero mayor o igual que 2 y n es un número entero mayor o igual que 1, siendo posible que m varíe entre los diferentes grupos de carbonos incluidos entre dos aminas, es decir, cada grupo  $(CH)_m-NH$  puede tener un valor de m diferente, y m puede ser el mismo o diferente cuando aparece en dicha fórmula. En cada posición  $R^1$  es hidrógeno o un grupo de conexión con la parte lipo de la lipopoliamina o la propia parte lipo como se describe en lo sucesivo, y pueden ser iguales o diferentes en cada átomo de carbono.  $R^2$  es un hidrógeno o un grupo de conexión con la parte lipo de la lipopoliamina o la propia parte lipo como se describe en lo sucesivo. Preferiblemente, m es entre 2 y 6 inclusive, más preferiblemente 3 o 4, y n es entre 1 y 5 inclusive, más preferiblemente 3.

Preferiblemente, solo uno de  $R^1$  y  $R^2$  es un conector, un conector unido a la parte lipo de la poliamina, o la parte lipo de la poliamina. Preferiblemente solo un grupo  $R^1$  es un conector, el conector unido a la parte lipo de la poliamina o la parte lipo de la poliamina.  $R^2$  es preferiblemente H.

Cuando  $R^1$  o  $R^2$  es la propia parte lipo o es un conector que está unido a la parte lipo de la poliamina, la fórmula (I) es la lipopoliamina. Por lo tanto, la fórmula (I) es la región de poliamina solo cuando  $R^1$  o  $R^2$  no es la parte lipo de un grupo conector al que está unido una parte lipo.

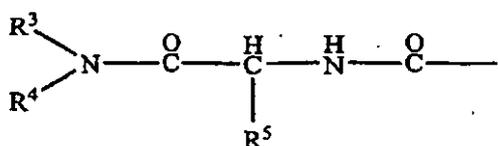
Todavía más preferiblemente, la región de poliamina está representada por la siguiente fórmula



en la que  $R^2$  y de  $R^{1a}$  a  $R^{1j}$  son como se ha definido antes  $R^1$ , y preferiblemente  $R^{1a}$  es un conector y el resto de los grupos  $R^1$  y  $R^2$  son hidrógeno.

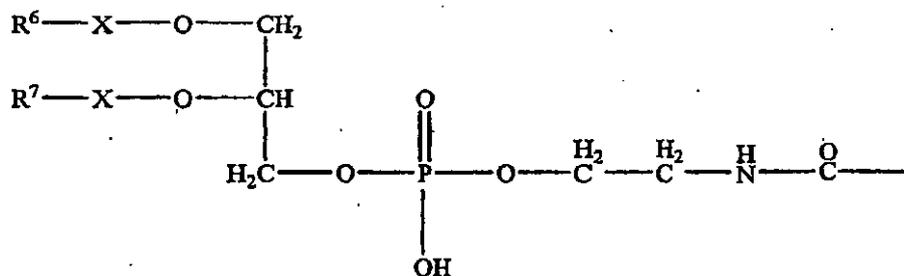
El grupo conector está compuesto de enlaces que son estables en condiciones normales.

Preferiblemente,  $R^1$  o  $R^2$  representan un átomo de hidrógeno o un radical de fórmula general II:



en la que  $R^3$  y  $R^4$ , que pueden ser iguales o diferentes, representa cada uno un radical alifático saturado  $C_pH_{2p+2}$  o radical alifático insaturado  $C_pH_{2p}$  o  $C_pH_{2p-2}$ , siendo p un número entero entre 12 y 22 inclusive, y  $R^5$  representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con un radical fenilo.

Alternativamente,  $R^1$  o  $R^2$  puede ser cada uno un radical de fórmula general III:

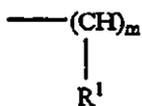


en la que X representa un grupo metileno ( $-CH_2-$ ) o un grupo carbonilo ( $-CO-$ ), y  $R^6$  y  $R^7$ , que pueden ser iguales o

diferentes, representa cada uno un radical alifático saturado  $C_pH_{2p+2}$  o radical alifático insaturado  $C_pH_{2p'}$  o  $C_pH_{2p'-2}$ , siendo  $p'$  un número entero entre 11 y 21 inclusive.

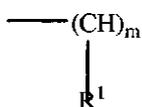
Independientemente de los valores de  $m$  y  $n$ , solo uno de los símbolos  $R^1$  y  $R^2$  puede representar un radical de fórmula general (II) o (III).

- 5 Cuando  $n$  es entre 2 y 5, los valores de  $m$  en los diferentes fragmentos



pueden ser iguales o diferentes.

En una realización preferida de la fórmula (I),  $n$  es igual a 3 y los valores de  $m$  en los fragmentos



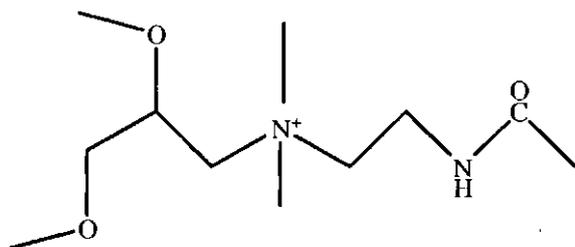
- 10 son iguales o diferentes, y representan 3 o 4, y tanto  $R^1$  como  $R^2$  representan: un radical de fórmula general (II) en el que  $R^3$  y  $R^4$  representa cada uno un radical alquilo que contiene de 12 a 22 átomos de carbono y  $R^5$  representa un átomo de hidrógeno, o  $R^1$  o  $R^2$  representa un radical de fórmula general (III) en la que  $R^6$ -X- y  $R^7$ -X- representa cada uno un radical alcanilo que contiene de 12 a 22 átomos de carbono.

- 15 Se prefiere en especial la 5-carboxiespermilglicinadioctadecilamida (DOGS) y 5-carboxiespermilamida de la dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPES).

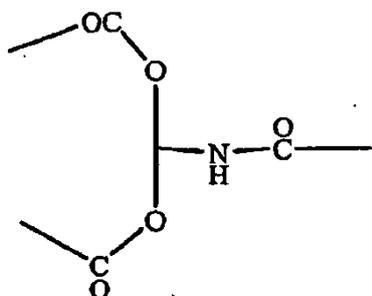
La síntesis de las lipopoliaminas anteriores se describe en el documento US 5.476.962.

- 20 Ejemplos adicionales de lipopoliaminas para usar según la invención incluye, trifluoracetato de 2,3-dioleil-oxi-N-[2-esperminacarboxil-amido]etil-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxiespermina)propilamida (DOSPER) y RPR-120535 (Ahmed et al. (2005) *Pharmaceutical Research* 22(6), 972-980). Las estructuras de las lipopoliaminas preferidas se exponen en la figura 7.

En DOSPA el grupo conector es



En DOSPER el grupo conector es



- 25 Y por lo tanto, las estructuras anteriores representan ejemplos adecuados adicionales de grupos conectores.

La región lipófila puede ser como se ha definido para  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  o  $R^6$  antes, o cualquier cadena hidrocarbonada saturada o insaturada, colesterol u otro esteroide, un lípido natural o un lípido sintético capaz de formar fases laminares o hexagonales. La longitud de la cadena hidrocarbonada puede ser de 10 a 30 carbonos de longitud, p. ej.

12-28, 14-26, 16-24, 18-22 carbonos de longitud.

El vehículo preferiblemente es JetSI™ o JetSI-ENDO™, los cuales están ambos disponibles en Polyplus transfection. Alternativamente, el vehículo puede ser Transfectam®, disponible en Promega.

5 Por formulación liposomal se entiende que el compuesto anfifílico cargado catiónico (es decir, la lipopoliamina) se combina con un lípido auxiliar neutro tal como DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), para así formar liposomas. Como tales, una formulación no liposomal de una lipopoliamina es una formulación que contiene lipopoliamina en la que la lipopoliamina no está presente en forma de un liposoma. En otras palabras, dichas formulaciones no contienen, además de la lipopoliamina, ningún lípido auxiliar neutro. Los ejemplos de lípidos auxiliares son fosfolípidos neutros, colesterol, glicerofosfoetanolaminas y diacilglicerol. Preferiblemente, la formulación de lipopoliamina contiene solo la lipopoliamina descrita en la presente memoria.

10 Se sabe que en general, la combinación de agentes de transfección con lípidos auxiliares tales como DOPE, aumentará la eficacia de la transfección, y por lo tanto es sorprendente que se pueda lograr un grado de inhibición mejorado y más selectivo omitiendo estos compuestos de la formulación cuando se usan en métodos de la invención.

15 El vehículo preferiblemente no es Lipofectamine 2000, Lipofectin, jet PEI, o un vehículo que tenga la composición de estos reactivos de transfección disponibles en el comercio. La composición de Lipofectamine 2000 es una formulación de liposomas 3:1 (p/p) del lípido policationico trifluoracetato de 2,3-dioleil-oxi-N-[2-esperminacarboxamido]etil-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), (nombre de registro en Chemical Abstracts: trifluoracetato de N-[2-(2,5-bis[(3-aminopropil)amino]-1-oxpentil-amino)etil]-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-1-propanaminio), y el lípido neutro dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE).

20 La composición de Lipofectin es una mezcla 1:1 de DOTMA (bromuro de 1,2-dioleoiloxipropil-3-trimetil-amonio) y DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina).

El vehículo preferiblemente tampoco es siPORT o un vehículo que tenga la composición de este reactivo de transfección disponible en el comercio.

25 En una realización alternativa, el vehículo es un compuesto poliamina que es catiónico (y preferiblemente protonable) a pH fisiológico, p. ej. polietilenimina (PEI). La PEI existe en muchas variantes estructurales diferentes, sin embargo, las variantes que tienen un valor de  $M_n$  (peso molecular medio numérico) de 600 o más, por GPC (cromatografía de permeabilidad en geles) son las de más interés. Por ejemplo, la PEI puede tener un valor de  $M_n$  de 500-700, 500-750, 750-1000, 100-1250, 1000-1250, 1250-1500, 1000-20000, 1100-15000, 1200-12500, 1250-10000, 1500-7500, 1750-5000, 2000-4000 o 2500-3500.

30 El peso molecular medio numérico es un modo de determinar el peso molecular de un polímero. Las moléculas de polímero incluso las del mismo tipo, tienen diferentes tamaños (longitudes de cadena, para polímeros lineales), de modo que el peso molecular medio dependerá del método de hacer la media. El peso molecular medio numérico es el promedio, media, común de los pesos moleculares de los polímeros individuales. Se determina midiendo el peso molecular de n moléculas de polímero, sumando los pesos, y dividiendo entre n.

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

Se pueden usar formas lineales de PEI o no lineales, p. ej., PEI ramificado (que puede ser, por ejemplo, de peso molecular bajo de los valores de  $M_w$  descritos en la presente memoria).

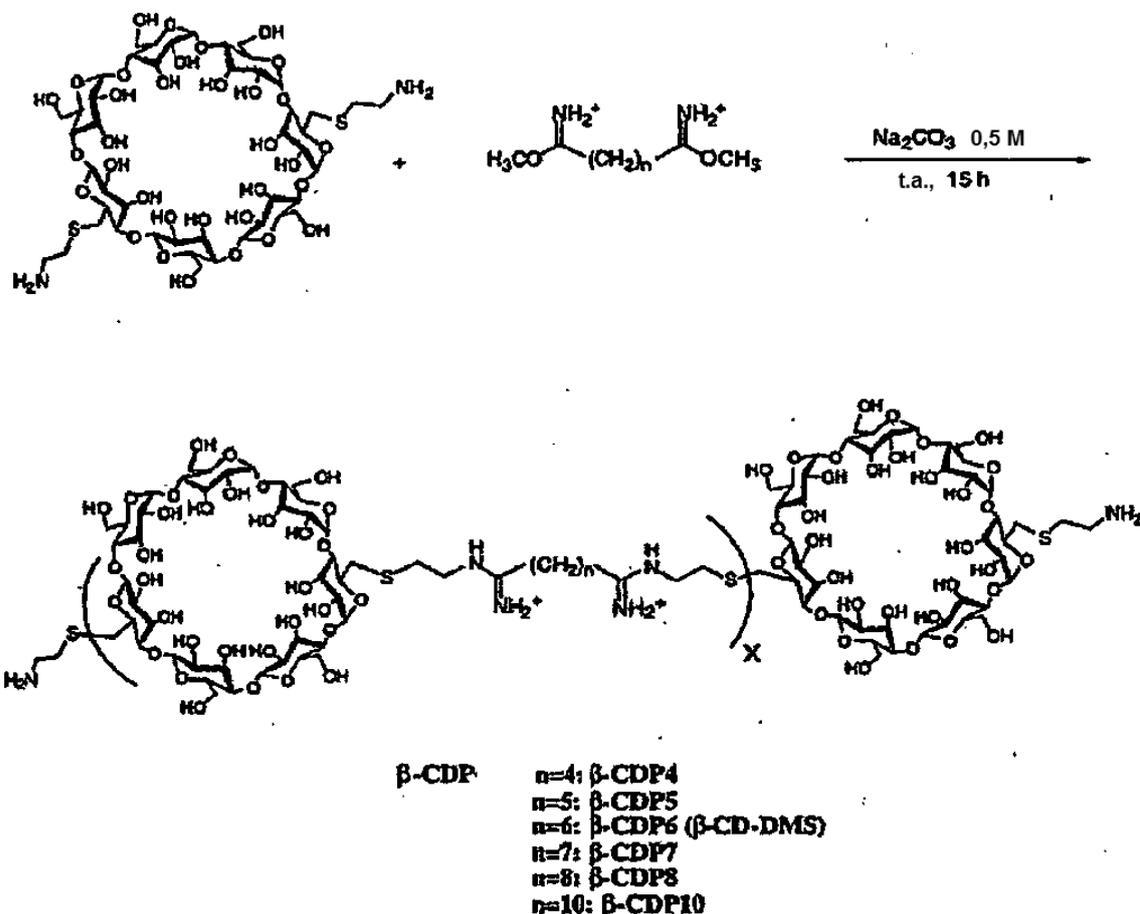
40 Por PEI ramificado, se entiende PEI que contiene grupos amina terciaria, así como grupos amina primaria y secundaria. El número de grupos amina terciaria, con respecto a los grupos amina primaria y/o secundaria es indicativo de la cantidad o grado de ramificación en el polímero. En general, la PEI ramificada contiene grupos amina primaria, secundaria y terciaria en una relación 0,5-1,5:1,5-2,5:0,5-1, p. ej. 1:2:1 (es decir, una relación de 2:1 para los grupos amina secundaria y terciaria), pero existen PEI ramificadas con una estructura ramificada que contienen relativamente más o menos grupos amina terciaria y se pueden usar en la presente invención. Los ejemplos de relaciones alternativas son de 1:1 a 3:1 (grupos amina secundaria a terciaria), p. ej. de 1,2:1 a 2,8:1, de 1,4:1 a 2,6:1, de 1,6:1 a 2,4:1, de 1,8:1 a 2,2: 1.

El peso molecular de la PEI preferiblemente es menor que 30 kDa o 25 kDa, p. ej., menor que 15, 10, 5 o 2 kDa.

50 Un ejemplo de PEI adecuada está disponible en Sigma (polietilenimina 408719 ( $M_w$  medio ~800 Da por LS,  $M_n$  medio ~600 por GPC, peso molecular bajo, exenta de agua). Otros reactivos basados en PEI disponibles en el comercio incluyen Poly Sciences, Inc PEI (ramificada,  $M_w$  10.000), US Biological Exgen 500, Polyplus transfection jetPEI™, Sigma ESCORT™V Transfection reagent, y Mirus TransIT-TKO®.

Como se ha descrito antes, en una realización preferida, se pueden usar uno o más polímeros de betaciclodextrina-amina como la molécula vehículo, es decir, el compuesto de poliamina es un polímero de betaciclodextrina-amina. Los polímeros de betaciclodextrina-amina adecuados y los métodos de síntesis de dichas moléculas se describen en Hwang et al., (2001) *Bioconjugate Chem.*, 12, 280-90.

- 5 Los polímeros de betaciclodextrina-amina adecuados y un esquema que muestra su síntesis a partir de monómero adecuados, se expone a continuación:



- 10 Como se ha expuesto antes, n puede ser un número entero de 4 a 10 inclusive, preferiblemente de 5 a 8 inclusive, o de 6 a 7 inclusive. Lo más preferiblemente es 4, 6 u 8. X puede ser cualquier número entero. X preferiblemente es de 1 a 100, de 10 a 50, de 15 a 25, de 1 a 20, p. ej. de 2 a 15, de 3 a 12, de 4 a 10, de 5 a 8 o de 6 a 7 inclusive. X es, lo más preferiblemente, 4 o 5.

- 15 En una realización preferida adicional, se pueden usar uno o más dendrímeros que contienen grupo amina (p. ej., un dendrímero de poliamidoamida (PAMAM)) como la molécula vehículo, es decir, el compuesto poliamina es un dendrímero que contiene grupo amina. Los dendrímeros representan una clase de polímeros de arquitectura macromolecular llamados "en estrella densos".

- 20 A diferencia de los polímeros clásicos, los dendrímeros tienen un grado alto de uniformidad molecular, distribuciones de peso molecular estrechas, características de tamaño y forma específicas, y una superficie terminal altamente funcionalizada. Por lo tanto, los dendrímeros son moléculas fabricadas o sintetizadas artificialmente, que se construyen a partir de unidades o monómeros ramificados para hacer una estructura monodispersa de tipo árbol o genealógica. La síntesis de polímeros monodispersos requiere un nivel alto de control sintético que se logra mediante reacciones paso a paso, construyendo el dendrímero con una capa de monómero o "generación" cada vez. Cada dendrímero consiste en una molécula núcleo multifuncional con una cuña dendrítica unida a cada sitio funcional. La molécula núcleo se denomina "generación 0". Cada unidad que se repite sucesiva a lo largo de todas las ramas forma la siguiente generación, "generación 1", "generación 2", etc., hasta la generación de terminación.

- 25 El procedimiento de fabricación es por lo tanto, una serie de etapas repetitivas que empiezan con un núcleo iniciador central. Cada etapa de crecimiento posterior representa una nueva "generación" de polímero con un diámetro molecular mayor, el doble de número de sitios reactivos en la superficie, y aproximadamente duplica el peso molecular de la generación precedente. Por ejemplo, la generación del dendrímero PAMAM se describe en Esfand

et al., (2001) *Drug Discovery Today*, 6(8), 427-36 y en Kukowska-Latallo et al., *PNAS* (1996), 93(10), 4897-902.

5 Los dendrímeros adecuados incluyen todos los dendrímeros que contienen grupos amina, p. ej., dendrímeros con núcleos de trietanolamina, NH<sub>3</sub> o etilendiamina, a los que se unen monómeros que contienen amina. Se prefieren en particular los dendrímeros PAMAM. Preferiblemente, el dendrímero está compuesto de monómeros de poliamina, que tienen, p. ej., la fórmula general H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-(CO)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub> en donde m y o son números enteros de 1 a 10, preferiblemente 1 o 2 n es 0 o 1.

Se muestran dendrímeros PAMAM en la figura 14. Cada "generación" representa la adición de dos nuevos grupos H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- a cada uno de los grupos amino terminales de la generación precedente; como se ilustra también en la figura.

10 La siguiente tabla muestra las propiedades calculadas de los dendrímeros PAMAM de superficie funcional amina por generación.

Generación	Peso molecular	Diámetro medido (Å)	Grupos de superficie
0	517	15	4
1	1.430	22	8
2	3.256	29	16
3	6.909	36	32
4	14.215	45	64
5	28.826	54	128
6	58.048	67	256
7	116.493	81	512
8	233.383	97	1024
9	467.162	114	2048
10	934.720	135	4096

Preferiblemente, el dendrímero PAMAM tiene un peso molecular de 1000-235000 o 3000-117000, p. ej. 6000-60000 o 14000-30000 Da.

15 Los dendrímeros también se pueden definir con referencia a su generación, y como tal, el dendrímero (p. ej., el dendrímero PAMAM) preferiblemente es de generación 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, en particular generación 2-6.

Como se ha mencionado antes, en una realización alternativa adicional, se pueden usar uno o más polipéptidos catiónicos como la molécula vehículo, es decir, el compuesto poliamina es un polipéptido catiónico. Se conocen diferentes péptidos catiónicos en la técnica.

20 Un "péptido" como se define en la presente memoria incluye cualquier molécula que contenga cualquier número de aminoácidos, es decir, uno o más aminoácidos. Sin embargo, preferiblemente, el péptido es un polímero de aminoácidos consecutivos.

Los péptidos se pueden preparar por cualquier medio convenientes, p. ej., por síntesis química directa o por medios recombinantes expresando una molécula de ácido nucleico de la secuencia adecuada en una célula.

25 Como se denomina en la presente memoria haciendo referencia a los péptidos, "catiónico" indica que la carga total, o neta del péptido es +1 o superior a pH fisiológico, es decir, pH 7,2. Un aminoácido se considera +1 si la especie predominante a pH fisiológico está cargada positivamente cuando está presente en el contexto del péptido. Cada uno de dichos aminoácidos en un péptido contribuye a una carga positiva adicional para calcular la carga final del péptido. El péptido puede contener uno o más restos de aminoácidos con carga negativa, así como restos neutros, siempre que la carga neta del péptido (calculada sumando la carga atribuida a cada aminoácido) sea positiva.

30 Por lo tanto, la carga del péptido depende de su composición de aminoácidos. Algunos aminoácidos están cargados a pH fisiológico normal. Los aminoácidos con carga positiva son lisina (K), arginina (R) e histidina (H) y se considera que son +1 en la escala descrita antes. El ácido aspártico (D) y el ácido glutámico (E) llevan una carga negativa a la mayoría de los pH fisiológicos y se consideran -1 en la escala anterior. Otros aminoácidos naturales se considera

que no llevan carga. Puede estar presente cualquier número de aminoácidos con carga positiva o carga negativa, con la condición de que la carga total del péptido sea +1 o más.

5 Los aminoácidos usados en los péptidos para usar en la invención no tienen que ser necesariamente aminoácidos naturales. Uno o más aminoácidos en el péptido se pueden sustituir por un aminoácido no natural, p. ej., uno derivatizado. Dichos aminoácidos se evaluarán de forma similar basándose en su contribución a la carga del péptido. Por lo tanto, como con los aminoácidos naturales, si la especie predominante es positiva a pH fisiológico, el que derive o no esta carga de la parte derivatizada (p. ej., un grupo amina introducido) o una parte también presente en el aminoácido natural no es relevante con la condición de que la carga total sea +1 o más.

10 La carga del péptido es >1, preferiblemente de +1 a +1000, de +1 a +500, de +1 a 250 o de +1 a +100, p. ej., de +2 a +80, tal como de +3 a +60 o de +4 a +50, de +5 a +30, de +6 a +20, p. ej. +10 o +15.

15 Preferiblemente, el péptido catiónico comprende restos de L o D lisina, L o D arginina, L o D histidina y/u ornitina. Incluso más preferiblemente, el péptido es rico en uno o más de estos restos, p. ej., comprende 10-100%, 20-80%, 30-70%, 40-60% o 50% de restos cargados positivamente. Los ejemplos de dichos péptidos incluyen polihistidina, polilisina histidilada y poliornitina o copolímeros de restos de L o D lisina, L o D arginina, L o D histidina y/u ornitina con otros aminoácidos, p. ej., uno o más de alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

Dichos polipéptidos catiónicos se pueden definir en términos de su peso molecular. Como tal, preferiblemente tienen al menos 1000 Da, 1500 Da, 2000 Da, 2500 Da, 5000 Da, 7500 Da, 10000 Da, 15000 Da, 20000 Da, 25000 Da, 30000 Da, 40000 Da, 50000 Da, 60000 Da, 70000 Da, 80000 Da, 90000 Da o 100000 Da de peso.

20 Alternativamente, los polipéptidos catiónicos se pueden definir en términos de su longitud. Los polipéptidos catiónicos preferidos tienen al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 aminoácidos de longitud.

Un péptido catiónico muy preferido es la poliarginina, en particular poliarginina con un Mw de al menos 15000 kDa.

25 Sin querer estar ligados por la teoría, la asociación del vehículo con la molécula de ARNip se cree que se basa en la interacción del vehículo positivamente cargado con la molécula de ARNip negativamente cargada, conduciendo a la formación de un complejo de ARNip-vehículo. Los complejos de ARNip-vehículo interaccionan con proteoglicanos aniónicos en la superficie celular y son absorbidos por endocitosis.

30 En general, la asociación, unión o conjugación del vehículo con la molécula de ARNip o tanto el ARNip como el agente fotosensibilizador, se logra mediante la mezcla simple de los dos componentes en condiciones y concentraciones adecuadas y permitiendo que los componentes interaccionen. Por lo tanto, en una realización preferida, el método comprende la etapa adicional de poner en contacto dicho ARNip con dicho vehículo. Las condiciones en las que se lleva a cabo esta etapa de contacto, y las concentraciones adecuadas para cada uno del vehículo y la molécula de ARNip las puede determinar fácilmente el experto en la técnica llevando a cabo ensayos rutinarios. Los ejemplos de condiciones adecuadas se exponen en los ejemplos. Por ejemplo, la molécula de ARNip y el vehículo se pueden mezclar entre sí, por ejemplo, mediante mezcla vorticial, y dejar reposar, p. ej. a temperatura ambiente. Después, la molécula de ARNip y la molécula vehículo se pueden dejar durante aproximadamente 10-20, 10-30 o 20-40 minutos antes de ponerlos en contacto con la célula.

40 Preferiblemente, se usa ARNip 10 nM-200 nM, p. ej. 15-150 nM, 20-100 nM, 20-100 nM, 30-90 nM, 40-80 nM, o 50-70 nM para la transfección, p. ej. en un pocillo de una placa de 6 pocillos convencional, aunque se pueden ensayar concentraciones diferentes. Es una cuestión rutinaria determinar la concentración óptima de ARNip para usar en el método.

Las células a las que se aplica el ARNip y el vehículo, se preparan usando técnicas de cultivo celular convencionales. Si las células son células adherentes preferiblemente están a 50-70% o 25-50% de confluencia.

45 El vehículo y la molécula de ARNip se pueden mezclar en diferentes proporciones, basándose en protocolos convencionales. Por ejemplo, como se expone en los ejemplos 1 a 6, se pueden mezclar 8,4 µl de vehículo 2 mM preparado en una disolución acuosa con 2,8 µg de ARNip en 2 ml de medio para aplicar a una placa de 6 pocillos. Igualmente, se pueden mezclar 4,2 µl de vehículo 2 mM preparado en una disolución acuosa con 1,4 µg de ARNip en 1 ml de medio para aplicar a una placa de 6 pocillos. No es necesario que el vehículo sea siempre 2 mM, los intervalos adecuados incluyen 0,5-5 mM, 1-3 mM, 1,5-2,5 mM (p. ej., preparado en disolución acuosa). Para cada nanogramo de ARNip, se puede usar una cantidad equivalente hasta aproximadamente 6 nanomoles de vehículo (p. ej., 1-10, 2-8) total en la disolución con el fotosensibilizador.

55 Para la PEI, las concentraciones preferidas son 1 µg/ml y 10 µg/ml (p. ej., 0,5-20 o 1-15 µg/ml) con ARNip 100 nM, p. ej. en 1 ml de medio para aplicar a una placa de 6 pocillos. Se ha mostrado que esto es particularmente eficaz para PEI con un peso molecular de 1200-25000 Daltons (p. ej., 1300-2000 Daltons) como se expone en el ejemplo 9. La concentración de PEI usada se puede modificar para lograr la relación de carga y/o relación N/P que se logra usando las condiciones expuestas en el ejemplo 9.

- 5 Para los polímeros de betaciclodextrina-amina, una concentración adecuada es 100 µg/ml (p. ej. 10-1000, 20-800, 30-600, 40-400, 50-200 µg/ml) con ARNip 50 nM, p. ej. en 1 ml de medio para aplicar a una placa de 6 pocillos. Esto se basa en el uso del polímero descrito en el ejemplo 11. Los valores de n y X influirán en la carga de la molécula y como tal, pueden ser adecuadas diferentes concentraciones. La concentración de polímero de betaciclodextrina-amina usada se puede modificar para lograr la relación de carga y/o relación N/P que se logra usando las condiciones expuestas en el ejemplo 11.
- 10 Para dendrímeros que contienen grupos amina, una concentración adecuada es 100 µg/ml (p. ej. 10-1000, 20-800, 30-600, 40-400, 50-200 µg/ml) con ARNip 100 nM, p. ej. en 1 ml de medio para aplicar a una placa de 6 pocillos. La concentración de dendrímero que contiene grupos amina usada se puede modificar para lograr la relación de carga y/o relación N/P que se logra usando las condiciones expuestas en el ejemplo 12.
- 15 Para los péptidos catiónicos, una concentración adecuada es 0,35 µg/ml o 0,7 µg/ml (p. ej. 0,1-20, 0,2-15, 0,3-10 µg/ml) con ARNip 100 nM, p. ej. en 1 ml de medio para aplicar a una placa de 6 pocillos. Como se expone en el ejemplo 13, estas concentraciones se usaron con éxito con el vehículo poliarginina de peso molecular 15000-70000 y >70000. El peso molecular y la composición de aminoácidos del péptido influirán en la carga de la molécula y como tal, pueden ser adecuadas diferentes concentraciones. La concentración del péptido catiónico usada se puede modificar para lograr la relación de carga y/o relación N/P que se logra usando las condiciones expuestas en el ejemplo 13.
- 20 La relación de los dos componentes se puede expresar como la relación de cargas, y esto también se debe tener en cuenta. Preferiblemente, la relación de cargas entre el vehículo y el ARNip es al menos 1+/- (es decir, 1 carga positiva por carga negativa), 5+/-, 10+/, 20+/-, 30+/-, 40+/-, 50+/-, 60+/-, 70+/-, 80+/-, 90+/-, 100+/-, 200+/-, 300+/-, 400+/- o 500+/-.
- La relación de cargas depende de la carga de cada componente (es decir, el ARNip y el vehículo) y de la cantidad de cada componente que está presente.
- 25 Alternativamente, la relación de los dos componentes se puede expresar como la relación N/P, es decir, la relación de restos de nitrógeno a fosfato de oligonucleótido. Puesto que no cada átomo de nitrógeno de un vehículo es siempre un catión, la relación N/P no es la misma que la relación de cargas. La relación N/P depende de la composición química de cada compuesto y de la cantidad de cada compuesto que está presente. Los valores adecuados para la relación N/P incluyen 1-500, p. ej. 2-450, 3-400, 4-350, 5-300, 6-250, 7-200, 8-150, 9-100, 10-80, 15-60, 20-50, 30-40, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5.
- 30 Preferiblemente, el vehículo es tal que a la concentración que se elige para usar, no hay liberación de los compartimentos intracelulares sin la etapa de irradiación de la PCI, y la liberación desde los compartimentos intracelulares se ve siguiendo la etapa de irradiación de la PCI. Las concentraciones y relaciones adecuadas de ARNip y vehículo se han mencionado antes.
- 35 El vehículo, en general, se formula para fines de transfección en una disolución acuosa (p. ej., en agua). La disolución madre (p. ej. 20 mM en etanol) después se puede diluir (p. ej. en agua) a una concentración adecuada para usar. El documento US 5.476.962 describe la formulación de lipopoliaminas.
- 40 Como se ha mencionado antes, el vehículo del ARNip también se puede usar como un vehículo para el agente fotosensibilizador. Alternativamente, sin embargo, el fotosensibilizador se puede usar sin un vehículo o con un vehículo alternativo no usado según la invención para el ARNip. Dichos vehículos alternativos se denominan en la presente memoria vehículos del fotosensibilizador e incluyen policaciones tales como polilisina (p. ej. poli-L-lisina o poli-D-lisina), polietilenimina o dendrímeros (p. ej. dendrímeros catiónicos tales como SuperFect7); lípidos catiónicos tales como DOTAP o Lipofectin y péptidos.
- 45 Con el fin de dirigir la molécula de ARNip y/o el agente fotosensibilizador a células (p. ej., células de cáncer) o tejidos específicos, la molécula de ARNip y/o el fotosensibilizador y/o el vehículo se pueden asociar o conjugar a moléculas directoras específicas que promoverán la absorción celular específica de la molécula de ARNip en las células o tejidos deseados.
- Se pueden usar muchas moléculas directoras diferentes, p. ej., como se describe en Curiel (1999), *Ann. New York Acad. Sci.* 886, 158-171; Bilbao et al., (1998), en *Gene Therapy of Cancer* (Walden et al., eds., Plenum Press, New York); Peng y Russell (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 454-457; Wickham (2000), *Gene Ther.* 7, 110-114.
- 50 La molécula directora se puede asociar, unir o conjugar a la molécula de ARNip, al vehículo, al agente fotosensibilizador o a dos (p. ej., el ARNip y el vehículo, o el ARNip y el agente fotosensibilizador, o el vehículo y el agente fotosensibilizador) o a los tres restos, y se pueden usar moléculas directoras iguales o diferentes. Como se ha mencionado antes, se puede usar simultáneamente más de una molécula directora.
- 55 El método de la invención se puede poner en práctica como se describe más adelante. En el método de la invención, la molécula de ARNip junto con su vehículo y un compuesto fotosensibilizador (opcionalmente con el mismo vehículo o con un vehículo del fotosensibilizador) se aplican simultáneamente o en secuencia a las células, mediante lo cual

se produce la endocitosis del compuesto fotosensibilizador, vehículo y la molécula de ARNip o son translocados de otra forma dentro de los endosomas, lisosomas u otros compartimentos restringidos por membrana intracelular.

El ARNip, vehículo y compuesto fotosensibilizador se pueden aplicar a las células juntos o de forma secuencial. En general el ARNip se mezcla con el vehículo como se ha descrito antes, para así formar un complejo, que luego se administra a la célula simultáneamente con el compuesto fotosensibilizador. Alternativamente, el complejo de ARNip:vehículo y el compuesto fotosensibilizador se pueden administrar de forma secuencial. El complejo de ARNip-vehículo y el compuesto fotosensibilizador pueden ser absorbidos por la célula en los mismos o distintos compartimentos intracelulares (p. ej., se pueden cotranslocar).

Después, el ARNip es liberado por exposición de las células a luz de longitudes de onda adecuadas para activar el compuesto fotosensibilizador, lo que a su vez conduce a la alteración de las membranas de los compartimentos intracelulares y la posterior liberación del ARNip, que puede estar situado en el mismo compartimento que el agente fotosensibilizador, en el citosol. Por lo tanto, en estos métodos la etapa final de exposición de las células a la luz produce la liberación del ARNip del mismo compartimento intracelular que el agente fotosensibilizador y haciéndose presente en el citosol.

El documento WO 02/44396 (que se incorpora en la presente memoria por referencia) describe un método en el que el orden de las etapas se podía cambiar de modo que, por ejemplo, el agente fotosensibilizador se pone en contacto con las células y se activa por irradiación antes de que la molécula que se va a internalizar (y el vehículo) se ponga en contacto con las células. Este método adaptado aprovecha el hecho de que no es necesario que la molécula sea internalizada para estar presente en el mismo subcompartimento celular que el agente fotosensibilizador en el momento de la irradiación.

Por lo tanto, en una realización preferida, dicho agente fotosensibilizador, dicho vehículo y dicha molécula de ARNip (p. ej. como complejo de vehículo:ARNip) se aplican juntos a la célula, o dicho agente fotosensibilizador se aplica por separado con respecto a dicho vehículo y dicha molécula de ARNip. Como consecuencia, pueden ser absorbidos por la célula en el mismo compartimento intracelular y entonces se puede llevar a cabo dicha irradiación. El agente fotosensibilizador, vehículo y molécula de ARNip pueden estar separados, o se pueden formular como una molécula dendrímica (véase, p. ej., Nishiyama N et al., (2005) *Nat Mater.* 4(12):934-41).

En una realización alternativa, dicho método se puede llevar a cabo poniendo en contacto dicha célula con un agente fotosensibilizador, poniendo en contacto dicha célula con el vehículo y la molécula de ARNip que se va a introducir, e irradiar dicha célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, en donde dicha irradiación se lleva a cabo antes de la absorción celular de dicha molécula de ARNip y dicho vehículo en un compartimento intracelular que contiene dicho agente fotosensibilizador, preferiblemente antes de la absorción celular de dicha molécula y dicho vehículo en cualquier compartimento intracelular.

Dicha irradiación se puede llevar a cabo después de la absorción celular de la molécula y la molécula vehículo en un compartimento intracelular, estén o no situados dicha molécula de ARNip y el agente fotosensibilizador en el mismo compartimento intracelular en el momento de la exposición a la luz. Sin embargo, en una realización preferida, se lleva a cabo la irradiación antes de la absorción celular de la molécula que se va a internalizar.

“Internalización” como se usa en la presente memoria, se refiere al suministro citosólico de moléculas. En el presente caso “internalización” incluye por lo tanto, la etapa de liberación de moléculas de los compartimentos intracelulares/unidos a membrana en el citosol de las células.

Como se usa en la presente memoria, “absorción celular” o “translocación” se refiere a una de las etapas de la internalización, en la que las moléculas externas a la membrana celular son absorbidas en la célula de modo que se encuentran en el interior de la membrana celular que está en el exterior, p. ej., por endocitosis u otros mecanismos de absorción adecuados, por ejemplo, en o asociado con compartimentos restringidos por membranas intracelulares, por ejemplo, el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, endosomas, etc.

La etapa de poner en contacto las células con un agente fotosensibilizador y con una molécula de ARNip y vehículo se puede llevar a cabo de cualquier forma conveniente y deseada. Por lo tanto, si la etapa de contacto se va a llevar a cabo in vitro, las células se pueden mantener convenientemente en un medio acuoso tal como, por ejemplo, un medio de cultivo celular adecuado y en el punto de tiempo adecuado se puede simplemente añadir el agente fotosensibilizador y/o molécula de ARNip y el vehículo al medio en condiciones adecuadas, por ejemplo, con una concentración adecuada y durante un periodo de tiempo adecuado. Por ejemplo, las células se pueden poner en contacto con la molécula de ARNip y el vehículo en presencia de medio exento de suero.

El agente fotosensibilizador se pone en contacto con las células en una concentración adecuada y durante un periodo de tiempo adecuado, que puede determinar fácilmente un experto usando técnicas rutinarias y dependerá de factores tales como el agente fotosensibilizador particular usado y el tipo de célula diana y el sitio. La concentración del agente fotosensibilizador debe ser tal que una vez absorbido en la célula, p. ej., dentro de, o asociado con uno o más de sus compartimentos intracelulares y activado por irradiación, se alteran una o más estructuras celulares, p. ej. sufren lisis o se alteran uno o más compartimentos intracelulares. Por ejemplo, los agentes fotosensibilizadores como se describen en la presente memoria, se puede usar en una concentración, por

ejemplo de 10 a 50 µg/ml. Para el uso in vitro, el intervalo puede ser mucho más amplio, p. ej., 0,05-500 µg/ml. Para tratamientos humanos in vivo, el agente fotosensibilizador se puede usar en el intervalo de 0,05-20 mg/kg de peso corporal cuando se administra sistémicamente o 0,1-20% en un disolvente para aplicación tópica. En animales más pequeños, el intervalo de concentración puede ser diferente y se puede ajustar en consecuencia.

- 5 El tiempo de incubación de las células con el agente fotosensibilizador (es decir, el tiempo de “contacto”) puede variar de unos minutos a varias horas, p. ej., incluso hasta 48 horas o más, p. ej. de 12 a 20 o 24 h. El tiempo de incubación debe ser tal que el agente fotosensibilizador sea absorbido por las células adecuadas, p. ej., en los compartimentos intracelulares en dichas células.

- 10 A la incubación de las células con el agente fotosensibilizador le puede seguir opcionalmente, un periodo de incubación con medio exento de fotosensibilizador antes de exponer las células a la luz o de añadir la molécula de ARNip y el vehículo, p. ej., durante 10 min a 8 h, en especial de 1 a 4 h.

La molécula de ARNip y el vehículo (p. ej., en forma de un complejo de ARNip:vehículo preformado) se ponen en contacto con las células en una concentración adecuada y durante un periodo de tiempo adecuado.

- 15 La determinación de las dosis adecuadas de moléculas de ARNip para usar en los métodos de la presente invención es práctica rutinaria para un experto en la técnica. Para aplicaciones in vitro, una dosis de ejemplo de las moléculas de ARNip sería ARNip aproximadamente 1-100 nM y para aplicaciones in vivo ARNip aproximadamente  $10^6$ -1 g de ARNip por inyección en seres humanos. Por ejemplo, las moléculas de ARNip se pueden administrar en niveles menores que 500 nM, p. ej., menores que 300 nM, en especial preferiblemente menores que 100 nM o 50 nM, por ejemplo de 1 a 100 nM, o de 5 a 50 nM, donde la concentración indicada refleja los niveles en contacto con la célula.

- 20 Como se ha mencionado antes, se ha encontrado que el contacto se puede iniciar incluso varias horas después de haber añadido el agente fotosensibilizador y que haya tenido lugar la irradiación.

- 25 Una concentración adecuada se puede determinar dependiendo de la eficacia de la absorción de la molécula de ARNip en cuestión en las células en cuestión y la concentración final que se desea conseguir en las células. Por lo tanto, el “tiempo de transfección” o el “tiempo de absorción celular”, es decir, el tiempo durante el cual las moléculas están en contacto con las células, puede ser unos minutos o hasta unas horas, por ejemplo, se puede usar un tiempo de transfección desde 10 min hasta 24 h, por ejemplo de 30 min hasta 10 h o, por ejemplo, de 30 min hasta 2 h o 6 h. También se pueden usar tiempos de incubación más largos, p. ej., de 24 a 96 h o más tiempo, p. ej., 5-10 días.

- 30 Un tiempo de transfección mayor normalmente produce una mayor absorción de la molécula en cuestión. Sin embargo, tiempos de incubación más cortos, por ejemplo de 30 min a 1 h, también pueden producir una especificidad mejorada de la absorción de la molécula. Por lo tanto, al seleccionar un tiempo de transfección por cualquier método, se debe buscar un equilibrio adecuado entre obtener una absorción suficiente de la molécula mientras que se mantiene la suficiente especificidad del tratamiento de PCI.

- 35 In vivo, un método y tiempo de incubación adecuados por el cual la molécula de ARNip, vehículo y agentes fotosensibilizadores se ponen en contacto con las células diana, dependerá de factores tales como el modo de administración y el tipo de molécula de ARNip, vehículo y agentes fotosensibilizadores. Por ejemplo, si se inyectan la molécula de ARNip y el vehículo en un tumor, tejido u órgano que se va a tratar, las células cercanas al punto de inyección se pondrán en contacto con estos y por lo tanto tienden a absorber la molécula de ARNip más rápidamente que las células situadas a una distancia mayor del punto de inyección, que es probable que se pongan en contacto con la molécula de ARNip en un tiempo posterior y en concentración menor.

- 40 Además, una molécula de ARNip administrada por inyección intravenosa puede tardar algún tiempo en llegar a las células diana y por lo tanto, puede tardar más tiempo después de administración, p. ej. varios días, con el fin de que se acumule una cantidad suficiente u óptima de la molécula de ARNip en una célula o tejido diana. Se aplican las mismas consideraciones, por supuesto, al tiempo de administración necesario para la absorción del agente fotosensibilizador en las células. Por lo tanto, es probable que el tiempo de administración requerido por las células individuales in vivo varíe dependiendo de estos y otros parámetros.

- 45 No obstante, aunque la situación in vivo es más complicada que in vitro, el concepto subyacente de la presente invención sigue siendo el mismo, es decir, el momento en el que las moléculas se ponen en contacto con las células diana debe ser tal que, antes de que se produzca la irradiación, las células diana hayan absorbido una cantidad adecuada del agente fotosensibilizador y o bien: (i) antes o durante la irradiación, la molécula de ARNip haya sido absorbida, o será absorbida después de contacto suficiente con las células diana, en el mismo o diferentes compartimentos intracelulares, o (ii) después de la irradiación, la molécula de ARNip se pone en contacto con las células durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su absorción en las células. Con la condición de que la molécula de ARNip sea absorbida en compartimentos intracelulares afectados por la activación del agente fotosensibilizador (p. ej., compartimentos en los que está presente el agente), la molécula de ARNip puede ser absorbida antes o después de irradiación.

La etapa de irradiación con luz para activar el agente fotosensibilizador puede tener lugar de acuerdo con técnicas y

procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la longitud de onda y la intensidad de la luz se pueden seleccionar de acuerdo con el agente fotosensibilizador usado. Las fuentes de luz adecuadas son bien conocidas en la técnica.

5 El tiempo durante el cual las células son expuestas a la luz en los métodos de la presente invención puede variar. La eficacia de la internalización de la molécula de ARNip en el citosol aumenta con la mayor exposición a la luz hasta un máximo más allá del cual aumenta el daño celular y por lo tanto la muerte celular.

10 Un periodo de tiempo preferido para la etapa de irradiación depende de factores tales como la diana, el fotosensibilizador, la cantidad de fotosensibilizador acumulada en las células o tejido diana y la superposición entre el espectro de absorción del fotosensibilizador y el espectro de emisión de la fuente de luz. En general, el periodo de tiempo para la etapa de irradiación es del orden de minutos a varias horas, p. ej., preferiblemente hasta 60 minutos p. ej. de 0,5 o 1 a 30 minutos, p. ej. de 0,5 a 3 minutos o de 1 a 5 minutos o de 1 a 10 minutos p. ej. de 3 a 7 minutos, y preferiblemente aproximadamente 3 minutos, p. ej. de 2,5 a 3,5 minutos. También se pueden usar tiempos de irradiación más cortos, por ejemplo 1 a 60 segundos, p. ej. 10-50, 20-40 o 25-35 segundos.

15 Las dosis de luz adecuadas las puede seleccionar el experto en la técnica y de nuevo dependerán del fotosensibilizador y la cantidad de fotosensibilizador acumulada en las células o tejidos diana. Por ejemplo, la dosis de luz usada típicamente para el tratamiento fotodinámico de cánceres con el fotosensibilizador Photofrin y el precursor de protoporfirina ácido 5-aminolevulínico está en el intervalo de 50-150 J/cm<sup>2</sup> a una densidad de potencia menor que 200 mW/cm<sup>2</sup> con el fin de evitar la hipertermia. Las dosis de luz normalmente son más bajas cuando se usan fotosensibilizadores con coeficientes de extinción mayores en la zona roja del espectro visible. Sin embargo, para el tratamiento de tejidos no cancerosos con menos fotosensibilizador acumulado, la cantidad total de luz necesaria puede ser sustancialmente más alta que para el tratamiento de cánceres. Además, si debe mantenerse la viabilidad de la célula, la generación de niveles excesivos de especies tóxicas debe evitarse y se pueden ajustar los parámetros relevantes en consecuencia.

25 Los métodos de la invención pueden dar lugar inevitablemente a algo de muerte celular en virtud del tratamiento fotoquímico, es decir, por la generación de especies tóxicas en la activación del agente fotosensibilizador. Dependiendo del uso propuesto, esta muerte celular puede no tener repercusión y puede, de hecho, ser ventajosa para algunas aplicaciones (p. ej., tratamiento del cáncer). Sin embargo, preferiblemente, se evita la muerte celular y como se ha indicado en otra parte en la presente memoria, el método se puede llevar a cabo de modo que cause una fuerte inhibición de la expresión (es decir un efecto fuerte del ARNip) en ausencia de la toxicidad celular. Es altamente ventajoso lograr una fuerte inhibición de la expresión en ausencia de toxicidad celular general o un efecto en la viabilidad celular. Los métodos de la invención se pueden modificar de modo que la fracción o proporción de las células que sobreviven sea regulada seleccionando la dosis de luz en relación con la concentración del agente fotosensibilizador. De nuevo, dichas técnicas son conocidas en la materia.

35 En aplicaciones en las que son deseables células viables, sustancialmente todas las células, o una mayoría significativa (p. ej., al menos 50%, más preferiblemente al menos 60, 70, 80 o 90% de las células) no mueren. La viabilidad celular después de tratamiento de PCI se puede medir por técnicas convencionales conocidas en la materia tales como el ensayo MTS (véase los ejemplos).

40 Independientemente de la cantidad de muerte celular por la activación del fotosensibilizador, para que el ARNip tenga un efecto en las células, es importante que la dosis de luz sea regulada de modo que algunas de las células individuales en las que se manifiesta el efecto de la PCI no mueran solo por el tratamiento fotoquímico (aunque posteriormente las pueden matar moléculas introducidas en las células, si esas moléculas tienen un efecto citotóxico).

Los efectos citotóxicos se pueden lograr usando por ejemplo terapia génica en la que una molécula de ARNip se internaliza en una célula tumoral por el método de la invención, p. ej., para regular por disminución un gen.

45 Los métodos de la invención se pueden usar in vitro o in vivo, por ejemplo, para el tratamiento in situ o para el tratamiento ex vivo, seguido de la administración al cuerpo de las células tratadas, para diferentes fines incluyendo inhibición de la expresión de productos génicos específicos, p. ej., en métodos de terapia génica y la generación de ensayos de cribado.

50 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método in vivo o ex vivo de inhibición de la expresión de un gen diana, introduciendo una molécula de ARNip en una célula que contiene dicho gen diana por un método descrito en lo que antecede, en donde dicha molécula de ARNip inhibe específicamente la expresión de dicho gen diana.

55 “Inhibición específica” se refiere a la inhibición dependiente de la secuencia del gen diana. La expresión de genes que contienen una secuencia que es suficientemente idéntica a nivel del ácido nucleico a la molécula de ARNip usada, será afectada por la molécula de ARNip. Como se ha indicado antes, se han desarrollado técnicas convencionales que permiten al experto en la técnica diseñar moléculas de ARNip de secuencia adecuada para producir la inhibición de la expresión específica de secuencia.

“Gen diana” se refiere a un gen cuya expresión se va a regular por disminución y que va a ser el objetivo de la

investigación o manipulación.

Estos métodos se pueden usar para alterar el perfil de expresión de células, p. ej., para investigar rutas celulares, o para determinar la influencia de la expresión de un gen particular o para propósitos terapéuticos.

5 Los métodos de la invención también se pueden usar para tratar cualquier enfermedad que se beneficie de la regulación por disminución, reparación o mutación de uno o más genes. Por ejemplo, los genes que son expresados en exceso en el cáncer se pueden regular por disminución mediante la administración de la molécula de ARNip adecuada (Lage (2005) *Future Oncol* 1(1):103-13). Enfermedades alternativas que se pueden tratar incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer e infecciones víricas tales como la hepatitis (p. ej., B y C) y VIH.

10 Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona una composición que contiene una molécula de ARNip, una molécula vehículo (preferiblemente en forma de un complejo con dicha molécula de ARNip) y un agente fotosensibilizador como se describe en la presente memoria. En un aspecto adicional, la invención proporciona dicha composición para usar en terapia.

15 Alternativamente, la presente invención proporciona un kit que comprende una molécula de ARNip, una molécula vehículo y un agente fotosensibilizador como se describen en la presente memoria. Preferiblemente, dicho kit (o producto) es para el uso simultáneo, separado o secuencial en un tratamiento médico.

20 Descrito de forma alternativa, la presente invención proporciona el uso de una molécula de ARNip y vehículo y agente fotosensibilizador como se describen en la presente memoria, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección, alterando la expresión de uno o más genes diana en dicho paciente. Opcionalmente, dicho medicamento puede contener solo uno de dicha molécula de ARNip o vehículo, y se puede usar en métodos en los que dicha molécula de ARNip o vehículo no presentes en dicho medicamento, es para administrar a dicho paciente cuando se trata o previene la enfermedad trastorno o infección. Preferiblemente, dicho medicamento es para terapia génica, es decir, para tratar una enfermedad o trastorno que se caracteriza por la expresión de genes anómala, o que se beneficiaría de la supresión de uno o más genes. Dicha alteración incluye la regulación por disminución de dicha expresión.

25 Según las diferentes realizaciones expuestas antes, dicho agente fotosensibilizador y dicha molécula de ARNip y vehículo, se ponen en contacto con células o tejidos de un paciente de forma simultánea o secuencial y dichas células son irradiadas con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador y la irradiación se lleva a cabo antes, durante o después de la absorción celular de dicha molécula de ARNip y el vehículo en un compartimento intracelular que contiene dicho agente fotosensibilizador, preferiblemente antes de la absorción celular de dicha molécula de transferencia en cualquier compartimento intracelular.

30 También se describe un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en un paciente, que comprende introducir una molécula de ARNip y vehículo en una o más células in vitro, in vivo o ex vivo según los métodos descritos en lo que antecede y donde sea necesario (es decir, cuando la transfección se lleva a cabo in vitro o ex vivo), administrando dichas células a dicho paciente.

35 Como se define en la presente memoria "tratamiento" se refiere a reducir, aliviar o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o infección que se está tratando, con respecto a los síntomas antes de tratamiento. "Prevención" se refiere a retrasar o prevenir la aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o infección.

40 Las composiciones también pueden comprender una célula que contiene una molécula de ARNip que se ha internalizado en el citosol de dicha célula por un método de la invención. La invención se extiende además a dichas composiciones para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección alterando la expresión de uno o más genes diana en dicho paciente, en donde preferiblemente dicha enfermedad o trastorno se caracteriza por la expresión de genes anómala, o se beneficiaría de la supresión de uno o más genes, preferiblemente cáncer.

45 Se puede obtener una célula o una población de células que contiene una molécula de ARNip que se ha internalizado en el citosol de dicha célula por un método de la presente invención.

50 Un aspecto adicional más de la invención proporciona el uso de dicha célula o población de células para preparar una composición o un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección alterando la expresión de uno o más genes diana en dicho paciente, en donde preferiblemente dicha enfermedad o trastorno se caracteriza por la expresión de genes anómala, o se beneficiaría de la supresión de uno o más genes, preferiblemente cáncer.

Se describe además un método de tratamiento de un paciente que comprende administrar a dicho paciente células o composiciones de la presente invención, es decir, un método que comprende las etapas de introducir una molécula de ARNip en una célula como se describe en lo que antecede y administrar dicha célula así preparada a dicho paciente. Preferiblemente, dichos métodos se usan para tratar el cáncer o en terapia génica.

55 In vivo se puede usar cualquier modo de administración común o convencional en la técnica, p. ej., inyección,

infusión, administración tópica, tanto a superficies del cuerpo internas como externas, etc. Para uso in vivo, la invención se puede usar en relación con cualquier tejido que contenga células en las que se localicen el agente fotosensibilizador y la molécula de ARNip, incluyendo sitios en fluidos corporales, así como tejidos sólidos. Se pueden tratar todos los tejidos siempre que el fotosensibilizador sea absorbido por las células diana y la luz se pueda suministrar de forma adecuada.

Por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden formular de cualquier forma conveniente de acuerdo con técnicas y procedimientos conocidos en la técnica farmacéutica, p. ej., usando uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. "Farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria se refiere a ingredientes que son compatibles con otros ingredientes de las composiciones, así como fisiológicamente aceptables para el receptor. La naturaleza de la composición y vehículos o materiales excipientes, dosificaciones etc. se puede seleccionar de forma rutinaria según la vía de administración elegida y deseada, el propósito del tratamiento etc. Igualmente, las dosificaciones se pueden determinar de forma rutinaria y pueden depender de la naturaleza de la molécula, el propósito del tratamiento, edad del paciente, modo de administración etc. En relación con el agente fotosensibilizador, también debe tenerse en cuenta la potencia/capacidad para alterar las membranas por irradiación.

Los métodos descritos antes se pueden usar alternativamente para generar una herramienta de cribado para los métodos de cribado de alta capacidad, en particular para analizar los efectos del silenciamiento de un gen particular. El ARNip dirigido a uno o más genes específicos se puede generar y usar en el método de la invención como se ha descrito antes. Por lo tanto, el ARNip se puede usar para reducir la expresión de un gen en una población de células. La población de células resultantes después se puede usar como una herramienta de cribado para identificar efectos secuencia abajo del silenciamiento de genes, con técnicas convencionales.

Los intentos previos de reducir la expresión de genes con oligonucleótidos no codificantes normales y químicamente modificados han sido limitados por problemas con la degradación por nucleasas de los oligonucleótidos no codificantes, la aparición de efectos no específicos y/o la insuficiente afinidad por la diana. Usando el método de la invención para administrar el ARNip, se pueden superar estos problemas.

Un método de modificación del patrón de expresión génica de una célula (p. ej. una población de células) para preparar una célula (o población de células) para usar como una herramienta de cribado (p. ej., para el cribado de alta capacidad) puede comprender poner en contacto una molécula de ARNip capaz de inhibir o reducir la expresión de un gen, un vehículo y un agente fotosensibilizador con una célula (p. ej. una población de células) e irradiar la célula (p. ej. una población de células) con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador. Las propiedades específicas de dichas células, p. ej., los niveles de expresión del ARNm de dichas células se puede examinar, p. ej., en micromatrices. Por "patrón de expresión génica modificado" se entiende que como consecuencia de la presencia de dicha molécula de ARNip en el núcleo celular, se afecta a la transcripción o traducción de los genes a los que se dirige.

Como consecuencia de este cambio en la expresión del gen, puede haber influencia en la expresión de otros genes. Por lo tanto, afectando a la expresión normal del gen que se está estudiando, se pueden determinar los cambios en el patrón de expresión de otros genes. La identificación de estos genes y de la influencia que esta expresión del gen que se está estudiando tiene en ellos, permite al investigador extraer conclusiones sobre las funciones de los genes, p. ej., sus funciones secuencia abajo. Los genes que son afectados por el cambio en la expresión normal del gen que se está estudiando se pueden regular por aumento o por disminución, pero el cambio total en el patrón de expresión da una indicación de la función del gen en el funcionamiento celular normal y de las consecuencias de su mala regulación.

Usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia, se puede estudiar el efecto de la regulación por disminución o la eliminación de la expresión del gen en cuestión. Esto puede hacerse, por ejemplo, mirando los cambios funcionales en las células (o población de células), tales como cambios en la adhesión celular, secreción de proteínas o cambios morfológicos. Alternativamente, el perfil de expresión de genes se puede estudiar directamente analizando los patrones de ARNm y/o expresión de proteínas, de nuevo usando técnicas convencionales que se conocen bien en la técnica.

Por inhibición o reducción de la expresión de un gen, debe entenderse que se reduce la expresión del gen en cuestión, cuando se compara con una célula que no se ha sometido al método, es decir, una célula natural o normal. El cambio en el nivel de expresión del gen se puede determinar por técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Puede hacer una inhibición completa de la expresión, de modo que no haya expresión detectable del gen, es decir no hay ARNm o proteína detectable, o puede haber una inhibición parcial de la expresión, es decir, una reducción, por la cual la cantidad de expresión del gen es menor que en la célula natural o normal. Esto se puede evaluar y controlar comparando el efecto de un ARNip con una secuencia específica con el efecto de un ARNip con una secuencia desordenada, es decir, la misma composición de nucleótidos, pero con un orden diferente en la secuencia. Preferiblemente, para que esta técnica sea útil, la reducción en la expresión es hasta menos de o a 80% de los niveles de control, p. ej., <50%, preferiblemente <20, 10 o 5% de los niveles de control. La o las células

usadas preferiblemente serán una población celular, cuyas células individuales son genéticamente idénticas. Las células pueden ser cualquier célula, como se ha discutido antes.

La célula o población de células generada según los métodos de la invención, se puede usar para hacer una biblioteca.

- 5 La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes, con referencia a los siguientes dibujos en los que:

La figura 1 muestra los resultados de un experimento de silenciamiento génico usando la línea celular OHS con diferentes reactivos de transfección, con (barras negras) y sin (barras blancas) tratamiento de PCI usando siRNA9. La gráfica presenta los niveles de proteína S100A4, de izquierda a derecha: 1) lípido siPORT, 2) FuGene 6, 3) Lipofectamine 2000, 4) Lipofectin, 5) jetSI y 6) jetSI-ENDO. Los resultados se representan como porcentaje de las células de control no tratadas. Las barras son la media de tres experimentos individuales. Las barras de error muestran el error típico de la media (SEM).

La figura 2 muestra los resultados de un experimento de silenciamiento génico donde células de diferentes tipos son transfectadas con ARNip usando jetSI-ENDO, con y sin tratamiento de PCI. El resultado en (A) presenta los niveles de proteína S100A4 en cuatro líneas celulares cuando son tratadas con el ARNip. Las barras grises muestran el ARNip desordenado de control con PCI, las barras negras presentan el ARNip efector sin PCI y las barras blancas presentan el ARNip efector con PCI. Líneas celulares de izquierda a derecha: HCT-116, SW620, OHS y RMS. Las barras son la media de tres experimentos individuales. Las barras de error muestran el error típico de la media (SEM). Los resultados en (B) muestran una transferencia Western que muestra diferentes líneas celulares, desde la parte superior a la inferior, HCT-116, SW620, OHS y RMS. El panel superior presenta el control de carga de  $\alpha$ -tubulina y el panel inferior los niveles de S100A4. En cada uno de los paneles inferiores, las bandas 1-3 muestran los niveles de proteína sin tratamiento de PCI: control no tratado (C), control desordenado (siRNA11), y efector (siRNA9). Las bandas 4-6, muestran los niveles de proteína con tratamiento de PCI: control no tratado (C), control desordenado (siRNA11), y efector (siRNA9).

La figura 3 muestra los resultados de un experimento de silenciamiento génico en células OHS, a) silenciamiento dependiente de dosis (ARNip 1-5 nM) 96 h después de irradiación, b) silenciamiento dependiente del tiempo (24, 48 y 96 h) con siRNA9. Los resultados se representan como porcentaje de células de control no tratadas. Las barras son la media de tres experimentos individuales. Las barras de error muestran el error típico de la media (SEM).

La figura 4 muestra los resultados del silenciamiento génico con ARNip transfectado con jetSI, con y sin tratamiento de PCI 96 h después de irradiación. Los resultados muestran el nivel de proteína S100A4 (A) y niveles de ARN (B) después de tratamiento de la línea celular OHS con ARNip 100 nM como se indica más adelante. Las barras negras representan las muestras sin PCI y las barras blancas representan muestras sometidas a PCI. El control no tratado sin tratamiento de PCI se usó como control para todas las muestras (no se muestra). Muestras: 1 y 4) control desordenado (siRNA11), 2 y 5) efector (siRNA9), 3) control no tratado. Las barras representan la media de tres experimentos individuales. Las barras de error muestran el error típico de la media (SEM).

La figura 5 muestra la distribución del ARNip marcado con fluorescencia en OHS después de transfección (200 nM) con jetSI-ENDO, con y sin tratamiento de PCI, a) Suministro de ARNip sin tratamiento de PCI, de izquierda a derecha: contraste de fase, fluorescencia y la correspondiente fusión. b) Suministro de ARNip con tratamiento de PCI, de izquierda a derecha: contraste de fase, fluorescencia y la correspondiente fusión. c) Imágenes de fluorescencia sin tratamiento de PCI que presentan de izquierda a derecha: fluorescencia atrapada en endosomas (cuadro de la izquierda) y pérdida de fluorescencia de los endosomas (cuadro de la derecha), aumento de la imagen dentro del cuadro de la izquierda, y aumento de la imagen dentro del cuadro de la derecha.

La figura 6 muestra los resultados del silenciamiento génico usando jetSI después de tratar OHS con ARNip 100 nM y jetSI al 50% del nivel recomendado comparado con el protocolo convencional. Las barras representan: 1) ARNip desordenado de control sin PCI, 2) ARNip efector sin PCI, 3) control no tratado, con PCI, 4) ARNip desordenado de control con PCI, 5) ARNip efector de control con PCI. Las barras representan la media de tres experimentos individuales.

La figura 7 muestra la estructura de lipopoliaminas preferidas (véase también Ahmed et al, véase antes, y Behr et al (1989) *PNAS*, 86, 6982-6).

La figura 8 muestra los resultados del silenciamiento génico usando PEI como vehículo. La transferencia Western presenta un control de carga (alfa-tubulina) en el panel superior y los niveles de proteína S100A4 en el panel inferior. Banda 1 = control no tratado (sin PEI), 2 = 1  $\mu$ l de PEI + ARNip efector, 3 = 10  $\mu$ l de PEI + ARNip efector, 4 = control no tratado (sin PEI), 5 = 1  $\mu$ l de PEI + ARNip efector, 6 = 10  $\mu$ l de PEI + ARNip efector. Las bandas 1-3 son sin PCI, y las bandas 4-6 son con PCI.

La figura 9 muestra los resultados del silenciamiento génico usando PEI de 25 kDa como vehículo. Las muestras usadas se indican en la figura. A. nivel de proteína S100A4 cuantificado por barrido de transferencias Western (usando ARNip de S100A4 con o sin PCI, media de 3 experimentos individuales, donde las barras de error

representan la SEM). B. Un ejemplo de una transferencia Western.

La figura 10 muestra el efecto de la PCI en la actividad del ARNip con diferentes vehículos PEI usados en diferentes concentraciones. Los niveles de proteína S100A4 se cuantificaron por barrido de transferencias Western. Las barras negras representan transfecciones sin PCI, mientras que las barras blancas representan transfección con PCI. Los resultados son la media de 3 experimentos individuales.

La figura 11 muestra los resultados de experimentos para determinar la toxicidad de la PEI sola y en combinación con PCI y ARNip. Se indican las cantidades de PEI y las dosis de luz usadas en los experimentos de PCI. A. Toxicidad de la PEI sin PCI. Se indica el MW de diferentes vehículos PEI (ramificada) ensayados (media de 5 experimentos individuales). B. Toxicidad de la combinación de PCI, PEI (1 µg) y ARNip con diferentes dosis de luz. Se muestran las muestras ensayadas y las dosis de luz usadas. Control - = control no tratado (con PEI pero sin PCI), desordenado - = ARNip desordenado de control (con PEI pero sin PCI), ARNip - = ARNip de S100A4 (con PEI pero sin PCI). Control +, desordenado + y ARNip +, son los mismos que control-, desordenado - y ARNip -, pero con PCI (media de 5 experimentos individuales).

La figura 12 muestra el suministro inducido por PCI de moléculas de ARNip usando beta-ciclodextrina-amina como un vehículo. Bandas 1 y 4 = control sin ARNip, bandas 2 y 5 = ARNip desordenado de control, bandas 3 y 6 = ARNip de S100A4. Se muestran la banda de control de la tubulina y la banda de S100A4.

La figura 13 muestra el suministro inducido por PCI de moléculas de ARNip usando dendrímeros de poliamidoamida (PAMAM) (G2-7) con núcleo de etilendiamina. (A) Transferencia Western en la que las bandas superiores representan el control de carga (alfa-tubulina), las bandas inferiores representan los niveles de S100A4. Las muestras en las diferentes bandas son: 1. PAMAM G6 con PCI. 2. PAMAM G7 con PCI. 3. Control con PCI. 4. PAMAM G6 sin PCI. 5. PAMAM G7 sin PCI. 6. Control sin PCI. (B). Nivel de proteína S100A4 cuantificada por barrido de transferencias Western. Las barras negras representan transfecciones sin PCI, mientras que las barras blancas representan transfección con PCI. Los resultados son la media de 3 experimentos individuales. Las diferentes formas de PAMAM usadas se indican en la figura.

La figura 14 muestra la fórmula estructural de los dendrímeros PAMAM G0, G1 y G2.

La figura 15 muestra el efecto de la PCI en el suministro de ARNip mediado por poliarginina. El nivel de proteína S100A4 se analizó por transferencia Western. La banda superior representa un control de carga (alfa-tubulina), la banda inferior representa los niveles de S100A4. Las muestras en el gel eran las siguientes: C+ = control con PCI, S+ = RNAip desordenado de control con PCI, R+ = RNAip de S100A4 con PCI, C = control sin PCI, S = RNAip desordenado de control sin PCI, R = RNAip de S100A4 sin PCI. 1 = poliarginina MW 15.000-70.000 con 0,35 µg, 2 = poliarginina MW 15.000-70.000 con 0,7 µg, 3 = poliarginina MW > 70.000 con 0,35 µg, 4 = poliarginina MW > 70.000 con 0,7 µg.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### Líneas celulares y condiciones de cultivo

HCT-116 (adenocarcinoma colorrectal) y SW620 (adenocarcinoma colorrectal) se obtuvieron de The American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE.UU.). La línea celular OHS (osteosarcoma) y RMS se establecieron en el Radium Hospital de Noruega. Todas las líneas celulares se cultivaron usando medio RPMI-1640 (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica o GibcoBRL, Paisley, Reino Unido), sin antibióticos, pero complementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS; PAA Laboratories, Linz, Austria) y L-glutamina 2 mM (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica). Las células se desarrollaron y se incubaron a 37°C en una atmosfera humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5%. Se ensayaron todas las líneas celulares y se encontraron negativas para infección por *Mycoplasma* antes de los experimentos.

#### Fuente de luz y fotosensibilizador

Se usó un Lumisource® (PCI Biotech AS, Oslo, Noruega) como fuente de luz. El Lumisource® es un banco de cuatro tubos fluorescentes diseñado para proporcionar iluminación homogénea de la zona de tratamiento, emitiendo principalmente luz azul con un máximo a 420 nm. El fotosensibilizador tetrafenilporfina disulfonada (TPPS<sub>2a</sub>) se adquirió en Porphyrin Products (Logan, UT, EE.UU.). El TPPS<sub>2a</sub> se disolvió primero en NaOH 0,1 M, y después se diluyó en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,5, hasta una concentración de 5 mg/ml y una concentración final de NaOH 0,002 M. El fotosensibilizador se protegió de la luz y se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### Transfección de ARNip sin PCI

Se evaluaron diferentes reactivos de transfección para el suministro de ARNip, usando: el reactivo Lipofectin™ de Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, EE.UU.), Lipofectamine™ 2000 de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.), FuGene 6 de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), agente de transfección lipídico siPORT™ de Ambion

(Austin, TX, EE.UU.), jetSI™ y jetSI™-ENDO de Polyplus transfection (Illkirch, Francia). Todos los reactivos de transfección se manipularon de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Todas las líneas celulares se cultivaron como se describe en “Líneas celulares y condiciones de cultivo”, y se cultivaron durante 24 h en placas de 6 pocillos hasta 50-70% de confluencia antes de transfección durante 24, 48 o 96 h. Se aplicó el reactivo de transfección solo a las células como un control no tratado, además de ARNip desordenado con reactivos de transfección.

El protocolo usado para jetSI/jetSI-ENDO era el siguiente para una placa de 6 pocillos convencional:

- Etapa 1: Para cada pocillo, diluir 4,2(8,4) µl de disolución de jetSI/jetSI-ENDO en 100 µl de medio. Mezclar con mezclamiento vorticial enérgicamente (importante: no pipetear para mezclar) y esperar durante 10 min (importante: no superar 30 min).
- Etapa 2: Para cada pocillo, diluir 1,4 µg (100 nM) de ARNip dúplex y en 100 µl de medio. Mezclar con mezclamiento vorticial suavemente.
- Añadir 100 µl de disolución de medio de jetSI a la disolución de 100 µl de ARNip y mezcla la disolución de una vez (importante: no mezclar las disoluciones en el orden inverso)
- Inmediatamente mezclar con mezclamiento vorticial la disolución durante 10 segundos.
- Incubar durante 30 min a temperatura ambiente y dejar que se formen los complejos (importante: no superar 1 hora).
- Durante la formación del complejo, separar el medio de crecimiento de las placas y añadir 0,8 ml de medio que contiene suero reciente (y fotosensibilizador, si se usa), precalentar a 37°C.
- Añadir los 200 µl de disolución de jetSI/ARNip a cada pocillo y homogeneizar la mezcla mediante agitación con movimiento circular de la placa suavemente.
- Incubar la placa en las condiciones de cultivo celular requeridas durante 18 h, después lavar la placa 3 veces con medio reciente y volver a incubar con 2-4 ml de medio.

#### Transfección de ARNip sin PCI

Las células se cultivaron y se transfectaron como en “Transfección de ARNip sin PCI”, excepto por algunas modificaciones. Se añadió el fotosensibilizador TPPS<sub>2a</sub> (0,5 µg/ml) al medio tras la transfección. Después de 18 h de incubación, las células se lavaron 3 veces con medio reciente, y se incubaron durante 4 h antes de tratamiento con luz. Después de 4 h, las células se expusieron a luz azul (7 mW/cm<sup>2</sup>) durante diferentes duraciones (60-90 s) dependiendo de la línea celular, y se volvieron a incubar durante 24, 48 y 96 h antes de recogerlas. Para medir el efecto de la PCI, se aplicaron solos el ARNip efector, ARNip desordenado y reactivo de transfección en los diferentes pocillos de la misma placa, con o sin fotosensibilizador, y se les dio el mismo tratamiento. Las células se protegieron de la luz con papel de aluminio durante estos experimentos.

#### PCR con transcriptasa inversa en tiempo real de S100A4

Se aisló el ARN celular total con el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, GER) y se usó el kit iScript cDNA synthesis kit (BioRad, Hercules, CA) para la transcripción inversa. Ambos kits se usaron de acuerdo con los manuales de los fabricantes. Todas las PCR se llevaron a cabo en paralelo, la detección en tiempo real se obtuvo usando SYBR Green I. Para cada PCR se añadieron 10 µl de ADNc, 30 µl de iQ SYBRGreen Supermix (BioRad), 300 nM de cada cebador y agua exenta de nucleasa, hasta un volumen final de 60 µl. Las muestras de 25 µl cada una, después se aplicaron a la placa de PCR. Este método asegura que los experimentos en paralelo son realmente en paralelo, y que hay suficiente mezcla de PCR para todas las repeticiones. El diseño del cebador se llevó a cabo usando el software Primer Express de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). El conjunto de cebadores usados (cebador directo 5'-AAGTTCAAGCTCAACAA GTCAGAAC-3' y cebador inverso 5'-CATCTGTCTTTTCCCAAGA-3') amplifica un segmento de 79-pb en el exón 2 y 3 de la secuencia de S100A4.

Las reacciones en tiempo real se llevaron a cabo en un iCycler (Bio-Rad) con el siguiente protocolo de amplificación: 3 min de desnaturalización inicial a 95°C, 50 ciclos de 10 s de desnaturalización a 95°C y 35 s de reasociación/extensión a 60°C, un mantenimiento a 95°C durante 20 s seguido de un mantenimiento durante 1 min a 55°C, y finalmente un análisis de la curva de fusión de 80 etapas cada uno durante 10 s, con aumentos de 0,5°C hasta una temperatura final de 95°C. La calidad de las muestras de ARN se verificó por amplificación de dos genes de mantenimiento, TBP (cebador directo 5'-GCCCGAAACGCCGAATAT-3' y cebador inverso 5'-CGTG GCTCTTTATCCTCATGA-3') y RPLPO (cebador directo 5'-CGCTGCTGAA CATGCTCAAC-3' y cebador inverso 5'-TCGAACACCTGCTGGATGAC-3'). Se usó el programa The Gene Expression Macro, versión 1.1 (Biorad), para los cálculos cuantitativos. El programa lleva a cabo cálculos basados en el método de  $\Delta\Delta$  CT, que permite la comparación de los valores del ciclo umbral obtenidos usando diferentes conjuntos de cebadores en el mismo

conjunto de muestras.

Estudios de microscopía

5 Las células se incubaron con complejos de ARNip/jetSI-ENDO como se ha descrito (transfección de ARNip con y sin PCI) y se analizaron con y sin tratamiento de PCI después de 48 h con un microscopio invertido Zeiss, Axiovert 200 equipado con filtros para FITC (filtro de excitación BP 450-490 nm, un divisor de haz FT 510 nm, y un filtro de emisión LP 515-565 nm), y rodamina (filtro de excitación BP 546/12 nm, un divisor de haz FT 580 nm, y un filtro de emisión LP 590 nm). Las imágenes se compusieron mediante el software de Carl Zeiss AxioCam HR, Versión 5.05.10 y AxioVision 3.1.2.1. Las imágenes se prepararon con Adobe Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA) y Zeiss LSM Image Browser (Versión 3).

10 Inmunotransferencia Western

15 Los lisados de proteínas se prepararon en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 150 mM y NP-40 al 0,1% con pepstatina 2 g/ml, aprotinina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) y leupeptina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El lisado de proteínas totales (30 µg) de cada muestra se separó por electroforesis en gel de acrilamida-SDS al 12%, y se transfirió a membranas Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) de acuerdo con el manual del fabricante. Como control de carga y de transferencia, las membranas se tiñeron con Amidoblack al 0,1%. Posteriormente las membranas se incubaron con Tris-HCl (pH 7,5) 20 mM, que contenía NaCl 0,5 M y Tween 20 (TBST) al 0,25% con leche en polvo al 10% (disolución de bloqueo) antes de incubación con anticuerpo policlonal de conejo anti-S100A4 (diluido 1:300, DAKO, Glostrup, Dinamarca) y anticuerpo monoclonal de ratón anti  $\alpha$ -tubulina (diluido 1:250, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra) en TBST que contenía leche en polvo al 5%.  
20 Después de lavado, las proteínas inmunorreactivas se visualizaron usando peroxidasa de rábano picante conjugada con anticuerpos secundarios (diluido 1:5000 DAKO, Glostrup, Dinamarca), y el sistema de quimioluminiscencia potenciado (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra). Los niveles de proteína S100A4 se dieron como porcentajes de la muestra de control y se usó  $\alpha$ -tubulina como un control de carga.

Ejemplo 1. Silenciamiento génico en la línea celular OHS

25 Se transfectaron células OHS con ARNip diseñado para dirigirse a la expresión de la proteína S100A4 usando diferentes sistemas de transfección. Se usó el protocolo de transfección convencional en cada caso, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando se usó fotosensibilizador, era TPPS<sub>2a</sub> (0,5 µg en un volumen de transfección de 1 ml, aparte de jetSI donde se usó un volumen de transfección de 2 ml). El tiempo de irradiación en cada caso era 60 segundos.

30 Se mezcló disolución madre de ARNip 20 µM con cada uno de los diferentes reactivos de transfección, y se transfectaron en placas de 6 pocillos hasta un volumen final de 1 ml (excepto para jetSI y jetSI-ENDO, donde el volumen final era 2 ml).

Lípido siPORT = se ensayaron 2 y 4 µl, combinado con 1,4 µg de ARNip en 1000 µl

FuGene 6 = se ensayaron 4,2 µl y 8,4 µl, combinado con 1,4 µg de ARNip en 1000 µl

35 Lipofectamine 2000 = se ensayaron 4,2 y 7 µl, combinado con 1,4 µg de ARNip en 1000 µl

Lipofectin = se ensayaron 4,2 y 7 µl, combinado con 1,4 µg de ARNip en 1000 µl

jetSI = 8,4 µl, combinado con 2,8 µg de ARNip en 2000 µl

jetSI-ENDO = 4,2 µl, combinado con 1,4 µg de ARNip en 2000 µl.

40 La molécula de ARNip usada era contra la secuencia de ARNm de S100A4 (número de acceso en GenBank NM\_002961). Se diseñó un ARNip específico que tenía la secuencia

5'-UGAGCAAGUUCAAUAAAGA-3'

3'-ACUCGUUCAAGUUUUUCU-5'

45 según Elbashir et al., ((2001), *Genes Dev.* 15, 188-200). Además del ARNip diseñado contra el gen diana seleccionado, se diseñó ARNip de control haciendo un ARNip desordenado (5'-CGCAUAAGUGAAAUAGAAU-3', 3'-GCGUAUUCACUUUAUCUUA-5') y se realizó una búsqueda con BLAST para eliminar la hibridación falsa. El contenido de GC en los dúplex se mantuvo en el intervalo de 30-70%, y todas las moléculas de ARNip se sintetizaron con extremos salientes de dTdT en sus extremos 3' para la estabilidad óptima de los dúplex de ARNip. Las moléculas de ARNip se encargaron en Eurogentec (Seraing, Bélgica).

50 Los oligonucleótidos de ARNip secos se volvieron a suspender hasta 100 µM en agua tratada con DEPC y se almacenaron a -20°C. La reasociación se llevó a cabo mediante partes alícuotas separadas y diluyendo cada oligonucleótido de ARN hasta una concentración de 50 µM. Después, se combinaron 30 µl de cada disolución de

oligonucleótido de ARN y 15 µl de 5X tampón de reasociación, hasta una concentración final de Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM en agua tratada con DEPC. Después la disolución se incubó durante 3 min en un baño de agua a 95°C, seguido de enfriamiento gradual durante 45 min en la mesa de trabajo. La reasociación satisfactoria se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa NuSieve al 4% (no se muestran los datos).

- 5 Se puede ver a partir de la figura 1, que el silenciamiento génico dependiente de PCI se puede lograr usando los agentes de transfección jetSI y jetSI-ENDO. Cuando estos dos agentes de transfección se usan en ausencia de PCI (es decir, irradiación, pero en ausencia de fotosensibilizador), la expresión génica es aproximadamente 75% del control basándose en la medición de los niveles de proteína usando transferencia Western, sin embargo, cuando se usa además la PCI, la expresión génica se reduce a aproximadamente 15% del control.
- 10 En cambio, el uso del lípido SIPOINT o Fugene 6 como agentes de transfección, no logró ninguna reducción significativa en la expresión génica, y el uso de Lipofectamine 2000 y Lipofectin lograron la inhibición de la expresión génica independientemente de si se usaba también la PCI.

#### Ejemplo 2. Silenciamiento génico en líneas celulares diferentes

- 15 Se transfectaron cuatro líneas celulares diferentes HCT 116, SW620, OHS y RMS con ARNip 50 nM (jetSI-ENDO = 4,2 µl, combinado con 1,4 µg de ARNip) diseñado para silenciar la expresión de S100A4 (véase el ejemplo 1) usando el protocolo de jetSI-ENDO convencional, en presencia y ausencia del fotosensibilizador (TPPS<sub>2a</sub> 0,5 µg/ml). Las células se sometieron a irradiación, y los niveles de proteína S100A4 se determinaron llevando a cabo transferencias Western 96 h después de irradiación (las condiciones de irradiación eran las siguiente OHS = 60 s, SW620 = 80 s, HCT116 =90 s, RMS = 70 s).
- 20 Los ejemplos de los resultados se muestran en la figura 2B, y los resultados se representan gráficamente en la figura 2A. En cada tipo de célula, la exposición de las células transfectadas al tratamiento de PCI produjo niveles altos de silenciamiento génico, mientras que aquellas células que fueron transfectadas con ARNip de S100A4, pero no se sometieron a tratamiento de PCI mostraron significativamente menos silenciamiento génico. Se mostró que el efecto era específico puesto que el ARNip desordenado no tenía efecto en la expresión génica, ni en presencia ni en ausencia de PCI. No había una diferencia significativa en el efecto de silenciamiento génico entre las diferentes líneas celulares que se ensayaron.
- 25

#### Ejemplo 3. Efecto de la concentración de ARNip y el tiempo

- 30 La molécula de ARNip diseñada para silenciar la expresión de la proteína S100A4 se transfectó en células OHS en concentraciones de 1 a 5 nM, usando 4,2 µl de jetSI-ENDO, y se sometieron a tratamiento de PCI como se ha descrito antes.
- Los niveles de proteínas en los lisados celulares se midieron usando transferencia Western y se muestran como un porcentaje de niveles de proteína en las células de control no tratadas en la figura 3A.
- El efecto del silenciamiento génico aumentó con la concentración de ARNip a la que se exponían las células, aunque hay poca diferencia entre los efectos de silenciamiento génico que se observan con ARNip 4 nM y 5 nM.
- 35 La molécula de ARNip desordenado también se usó en todos los experimentos, y se mostró que no afectaba a la expresión génica. Como tal, el efecto de inhibición génico es específico.

La figura 2B muestra el efecto del tiempo en el silenciamiento génico alterando el periodo de tiempo entre la irradiación de las células y la recogida del lisado celular para el análisis. Se puede ver que cuanto más tiempo se dejan las células después de la irradiación y antes de recogerlas, se observa más inhibición de la expresión génica.

#### 40 Ejemplo 4. Silenciamiento génico en células OHS después de tratamiento con ARNip y PCI

- Las células OHS se transfectaron con ARNip 100 nM o ARNip desordenado como se ha descrito antes y el efecto del tratamiento de PCI en los niveles de proteína y ARNm se determinó 96 h después de irradiación por transferencia Western y RT-PCR y se comparó con los niveles de proteína y ARNm en controles no tratados.
- 45 Los resultados mostrados en la figura 4 indican que, con respecto tanto a los niveles de proteína como de ARNm, se observa mayor cantidad de silenciamiento génico del gen de S100A4 cuando el ARNip específico para este gen se transfecta con jetSI-ENDO y las células se someten a tratamiento de PCI (banda 5 de las figuras 3A y B). Se observa una pequeña cantidad de reducción en niveles de proteína y ARNm sin tratamiento de PCI (banda 2 de las figuras 3A y B), pero está notablemente potenciada por el tratamiento de PCI.

#### Ejemplo 5. Suministro citosólico de ARNip marcado

- 50 Se transfectaron células OHS con ARNip marcado con FITC 200 nM usando jetSI-ENDO (jetSI-ENDO = 8,4 µl, combinado con 2,8 µg de ARNip en un volumen de transfección de 1000 µl = disolución de ARNip 200 nM), con y sin fotosensibilizador. Después, las células transfectadas se sometieron a irradiación.

- Las células se inspeccionaron usando microscopía de contraste de fase y microscopía de fluorescencia. Comparando las imágenes, se observó que en ausencia de tratamiento de PCI, el ARNip permanece en una distribución puntiforme, lo cual es representativo de una distribución en vesículas endocíticas (figura 5a y c). También se observa algo de pérdida (recuadro de la derecha en la figura 5c). En cambio, después de tratamiento de PCI, el ARNip marcado se observa que está distribuido por todo el citoplasma y en los núcleos (véase la figura 5b).
- Esto demuestra que el tratamiento de PCI es necesario para que el ARNip sea suministrado en el compartimento de la célula requerido, y que el suministro depende del tratamiento de PCI.
- Ejemplo 6. El silenciamiento génico usando ARNip-PCI requiere el uso de menos vehículo que la transfección convencional
- Se transfectaron células OHS con ARNip 100 nM usando jetSI. A diferencia de los experimentos descritos antes, jetSI se usó con una concentración menor, es decir al 50% de la recomendada en el protocolo convencional. El protocolo convencional para una placa de 6 pocillos es: 2,8 µg de ARNip + 8,4 µl de jetSI en 2000 µl de medio, resultando ARNip 100 nM en cada pocillo.
- En cambio, para una placa de 6 pocillos, se mezclaron 1,4 µg de ARNip con 4,2 µl de jetSI en 1000 µl de medio, resultado ARNip 100 nM en cada pocillo. La cantidad total de los complejos se redujo así en 50%.
- Después de la transfección, las células se sometieron a tratamiento de PCI (la dosis de luz para este experimento era 30 s con TPPS<sub>2a</sub> 0,5 µg/ml) o se dejaron sin tratar, y se midió el silenciamiento génico usando RT-PCR. El ARNip efector era capaz de reducir la expresión del gen de S100A4 a menos de 20% del control no tratado, mientras que se observó poca reducción sin PCI, y con el uso de ARNip desordenado (con o sin tratamiento de PCI).
- Esto demuestra que no solo el uso combinado de vehículos con PCI ofrece la ventaja de la liberación selectiva de la molécula de ARNip, sino que se pueden lograr niveles altos de silenciamiento génico usando concentraciones menores de los agentes de transfección, cuando se combina con PCI. Por comparación de la banda 5 de la figura 6 y la banda 5 de la figura 1, se puede observar que incluso usando solo 50% del agente de transfección que se usa en el ejemplo 1, cuando se usa también la PCI, el grado de inhibición génica es mucho mayor.
- Ejemplo 7. Transfección usando PEI como vehículo
- La diana del ARNip se seleccionó contra la secuencia de ARNm de S100A4 (número de acceso en Gene Bank NM\_002961). Se usó ARNip 481-499 como efector (para la secuencia véase el ejemplo 1).
- Se evaluó la polietilenimina (PEI) para el suministro inducido por PCI. Se cultivaron líneas celulares (RPMI-1640 complementado con FBS al 10%, 10 ml de L-glutamato, 10 ml de Hepes) en placas de 6 pocillos hasta 50-80% de confluencia antes de transfección. Se usó ARNip 100 nM como la concentración de referencia.
- La PEI usada era de Sigma y se diluyó en agua estéril y se hizo una disolución madre que contenía 1000 µl de PEI y 9000 µl de agua estéril. A partir de la disolución madre, se usaron 1 y 10 µl para transfectar células con 1,4 µg de ARNip (100 nM en cada pocillo).
- Se usó PEI de Sigma (Polietilenimina 408719 (Mw medio ~800 por LS, Mn medio ~600 por GPC, ramificada, bajo peso molecular, exenta de agua)).
- Para la transfección se prepararon dos disoluciones, disolución A: se diluyó ARNip en 100 µl de medio (OPTI-MEM I) exento de suero. Disolución B: Se diluyó PEI en 100 µl de medio exento de suero. Las disoluciones A y B se mezclaron mediante mezclamiento suave y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La disolución mezclada después se añadió a las células (1 ml de ARNip 100 nM).
- El tratamiento de PCI se llevó a cabo como se ha descrito antes para jetSI. La dosis de luz para el experimento con PEI era 40 segundos. Los niveles de proteína se midieron por transferencia Western 96 h después de irradiación.
- A partir de la figura 8 se puede ver que la expresión de la proteína S100A4 se reduce en las muestras mostradas en las bandas 5 y 6, es decir, las muestras que se habían sometido a transfección con PEI, y tratamiento de PCI.
- Ejemplo 8. Efecto de la PCI en la actividad del ARNip usando un vehículo de PEI de 25 kDa
- Transfección de ARNip. Todas las líneas celulares se cultivaron como se describe en "Líneas celulares y condiciones de cultivo", y se pusieron en placas de 6 pocillos al 25-50% de confluencia antes de transfección. El ARNip y el vehículo formaron complejo mediante mezclamiento suave y se incubaron durante 30 min antes de añadir a las células. Las células se transfectaron con el ARNip, vehículo y o bien con o bien sin el fotosensibilizador (TPPS<sub>2a</sub> = 0,5 µg/ml) y se incubaron durante 18 h, después se lavaron 3 veces con medio reciente y se volvieron a incubar durante 4 h antes del tratamiento con luz. Después de 4 h, las células se expusieron a luz azul (7 mW/cm<sup>2</sup>) durante diferentes duraciones (0-60 s), dependiendo del experimento, y se volvieron a incubar durante 96 h antes de recogerlas. Para medir el efecto de la PCI sobre el silenciamiento génico, se aplicaron ARNip específico, ARNip desordenado, y reactivo de transfección solo en los diferentes pocillos de la misma placa, con o sin

fotosensibilizador, y se les dio el mismo tratamiento exacto. Las células se protegieron de la luz mediante papel de aluminio durante los experimentos.

5 El silenciamiento génico de S100A4 mediado por ARNip se midió en el nivel de proteína con y sin tratamiento de PCI usando polietilenimina (PEI) de 25 kDa ramificada (1 µg/ml) y un ARNip que se dirigía al gen de S100A4 en una  
 10 concentración 100 nM. Se siguió el protocolo descrito antes, usando una dosis de luz de 30 s, tanto con la complejación como con la transfección en medio que contenía suero. La figura 9A muestra que con el uso de ARNip para S100A4 con PCI típicamente se reducía el nivel de S100A4 a 5-15% del nivel en controles no tratados (tratados con PEI pero sin ARNip). En cambio, el ARNip para S100A4 sin PCI solo era capaz de reducir el nivel de S100A4 a 100-80% del control. Los niveles del control no tratado eran comparables a los controles donde se usó un ARNip  
 15 desordenado en lugar del ARNip específico para S100A4 (no se muestran los datos). En la figura 9B, el experimento se representa por transferencias Western. Las bandas superiores representan un control de carga (alfa-tubulina) y la banda inferior representa los niveles de S100A4, como se indica en la figura. Como puede verse a partir de las transferencias, S100A4 es silenciada significativamente con el ARNip cuando se usa PCI, comparado con la situación para células que reciben ARNip para S100A4 que no se trataron con PCI, donde no se pudo detectar un silenciamiento génico significativo.

Ejemplo 9. Efecto de la PCI en la actividad del ARNip con diferentes vehículos de PEI usados en diferentes concentraciones

20 Se investigaron los efectos de la PCI en la actividad del ARNip para S100A4, para el uso de diferentes formulaciones de PEI ramificada en diferentes concentraciones (0,1 µg/ml, 1µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml, se usó 1 ml de medio por pocillo). Las especies de PEI (todas ramificadas) ensayadas eran las siguientes:

PEI	MW (Da)
1	800
2	1200
3	1300
4	1800
5	2000
6	25000

25 Se siguió el protocolo descrito en Materiales y métodos, usando una dosis de luz de 30 s, tanto con la complejación como con la transfección en medio que contiene suero. El ARNip se usó en una concentración 100 nM. Como puede verse a partir de la figura 10, el uso de PCI puede potenciar significativamente el efecto de silenciamiento génico del ARNip para S100A4 con diferentes vehículos de PEI. Este efecto es especialmente destacado con cantidades menores de PEI (1 y 10 µg/ml) donde el efecto sin PCI era muy modesto, excepto para PEI 4 (MW 1800) 10 µg/ml. Con estas dos concentraciones de PEI, la PCI potenciaba significativamente el efecto del silenciamiento génico de todas las muestras de PEI ensayadas, excepto para la PEI 1 (MW 800).

30 Sin PCI el grado de silenciamiento génico aumenta con el aumento de concentración de PEI, con PCI este efecto no es tan pronunciado, excepto que se puede observar que no hay silenciamiento génico (ni con ni sin PCI) con PEI 0,1 µg/ml. Una posible explicación para esto es que esta cantidad de PEI no es suficientemente alta para formar complejo con todos los ARNip, conduciendo a complejos con carga negativa que no son absorbidos por las células. Parece que sin PCI hay una tendencia hacia el mayor silenciamiento génico con el peso molecular creciente del vehículo de PEI; con la PCI este efecto no es conspicuo, de nuevo con la excepción del PEI 1 (MW 800). El efecto  
 35 de la PEI sin PCI a mayores MW y mayores cantidades, probablemente se debe a las propiedades endosomolíticas descritas de la PEI que funcionan solo en concentraciones altas de PEI.

Esto muestra que la PCI puede sustituir este efecto, permitiendo usar cantidades bajas y MW bajos de polietilenimina, una propiedad que es muy ventajosa para evitar la toxicidad y otros problemas con los vehículos de PEI.

Ejemplo 10. Estudios de toxicidad

40 Se evaluó primero la toxicidad de diferentes formulaciones de PEI (MW 800-25.000) sola (sin tratamiento de PCI). En este ensayo, se cultivaron en placa células OHS en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche en medio que contenía suero. Después, el medio se descartó y las células se incubaron con medio y diferentes formulaciones de PEI en diferentes concentraciones durante 20 h. El medio que contenía PEI después se descartó, y se añadió disolución de MTS (de Promega, Madison, WI, EE.UU.) a cada pocillo (dilución 1:6, 100 µl/pocillo) y las  
 45 placas se volvieron a incubar durante otras 4 h. Se midió la absorbancia a 490 nm.

Como puede observarse a partir de la figura 11A, la toxicidad aumentaba con el aumento del peso molecular de la formulación de PEI (p. ej., PEI 25000 frente a PEI 800) y con cantidades crecientes de PEI. Es importante que las formulaciones de PEI de 1 µg/ml (no se muestran) y de 10 µg/ml no mostraron una toxicidad significativa. Para estas muestras, se podía lograr un efecto biológico significativo del ARNip con PCI, mientras que el efecto sin la PCI era muy modesto (véase el ejemplo 9).

También se evaluó la toxicidad de la PEI con tratamiento de ARNip/PCI. Se cultivaron en placa células OHS en placas de 6 pocillos y se dejó que se adhirieran durante la noche en medio que contenía suero. Después, el medio se descartó y las células en placas de 6 pocillos se transfectaron con PEI solo, ARNip desordenado y ARNip específico, con o sin fotosensibilizador. Después, las células se incubaron durante la noche y posteriormente se lavaron y se trataron con luz azul (PCI) como se describe en "Transfección de ARNip". Después de incubar de nuevo durante 44 h, se añadieron 166,6 µl de disolución de MTS a cada pocillo y las placas se volvieron a incubar durante otras 4 h. Se midió la absorbancia a 490 nm. La figura 11B muestra la toxicidad del tratamiento combinado con PEI (MW 25000) 1 µg/ml, ARNip 100 nM y PCI, con diferentes dosis de luz. Como puede verse a partir de esta gráfica, el tratamiento de PCI no inducía toxicidad significativa con la dosis de luz usada (30 s) en todos los experimentos de silenciamiento génico con PEI, que es una dosis de luz a la cual la PCI inducía un efecto de silenciamiento génico fuerte (véase la figura 10). Incluso con la dosis de luz más alta de 40 s, no se podía observar citotoxicidad del tratamiento de PCI, mostrando que la PCI puede inducir el suministro de ARNip totalmente potenciado, sin producir efectos citotóxicos.

Ejemplo 11. Suministro de moléculas de ARNip inducido por PCI usando β-ciclodextrina-amina como un vehículo.

Se investigó el efecto de la PCI en el suministro de ARNip mediado por beta-ciclodextrina-amina. Se usó una dosis de luz de 60 s en estos experimentos y se siguió el protocolo descrito en Materiales y métodos. La beta-ciclodextrina-amina como se ha descrito antes con  $n = 6$  y  $X = 4$  se diluyó en agua estéril y la complejación y transfecciones se llevaron a cabo en medio exento de suero. Como puede verse a partir de la transferencia Western (figura 12), la beta-ciclodextrina-amina con 100 µg/ml (se usó 1 ml por pocillo) formando complejo con el ARNip 50 nM (0,7 µg) era eficaz para el suministro de ARNip inducido por PCI (banda 3), mientras que en estas condiciones, el suministro sin PCI no era eficaz (banda 6). La beta-ciclodextrina-amina usada en este estudio consiste en moléculas de beta-ciclodextrina conjugadas por un puente de amina responsable de la unión al ARNip, y se describe en Hwang S.J. et al. (2001, *Bioconjugate Chem.* 12, 280-290).

Ejemplo 12. Suministro de moléculas de ARNip inducido por PCI usando dendrímeros de poliamidoamida (PAMAM) (G2-7) con núcleo de etilendiamina

Se evaluaron los dendrímeros de poliamidoamida (PAMAM) para el suministro de ARNip inducido por PCI. La PAMAM se diluyó en agua estéril y las transfecciones se llevaron a cabo en medio que contenía suero. Se formaron complejos de diferentes tipos de dendrímeros de PAMAM (G2-7) 100 µg/ml (se usó 1 ml por pocillo) con ARNip 100 nM (1,4 µg) y se llevó a cabo la transfección según los procedimientos descritos antes. Se usó una dosis de luz de 30 s en estos experimentos. Como puede verse a partir de la transferencia Western (figura 13A) la PCI podría potenciar mucho la actividad del ARNip (bandas 1 y 2) en condiciones donde el ARNip/PAMAM solo no era eficaz en el silenciamiento génico (bandas 4 y 5). Como puede verse en la figura 13B, este efecto era apreciable también para varios otros tipos de dendrímeros de PAMAM, indicando que la PCI puede potenciar en general el suministro de ARNip por dendrímeros basados en poliamina.

Los diferentes tipos de PAMAM usados en el estudio que contienen diferentes cantidades de grupos amina superficiales son como sigue:

G2 = Fórmula molecular:  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_n$  (G=2); dendri PAMAM(NH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>

G3 = Fórmula molecular:  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_n$  (G=3); dendri PAMAM(NH<sub>2</sub>)<sub>32</sub>

G4 = Fórmula molecular:  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_n$  (G=4); dendri PAMAM(NH<sub>2</sub>)<sub>64</sub>

G5 = Fórmula molecular:  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_n$  (G=5); dendri PAMAM(NH<sub>2</sub>)<sub>128</sub>

G6 = Fórmula molecular:  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_n$  (G=6); dendri PAMAM(NH<sub>2</sub>)<sub>256</sub>

G7 = Fórmula molecular:  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_n$  (G=7); dendri PAMAM(NH<sub>2</sub>)<sub>512</sub>

Generación (G)	MW	Diámetro medido (nm)	Grupos amina superficiales
2	3.256	29	16
3	6.909	36	32
4	14.215	45	64

Generación (G)	MW	Diámetro medido (nm)	Grupos amina superficiales
5	28.826	54	128
6	58.048	67	256
7	116.493	81	512

Ejemplo 13. Suministro de moléculas de ARNip inducido por PCI usando hidrocloreuro de poli-L-arginina como el vehículo

5 La poliarginina se diluyó en agua estéril y las transfecciones se llevaron a cabo en medio exento de suero. Se ensayaron dos tipos de vehículos de poliarginina (peso molecular de 15000-70000 y >70000). Se formaron complejos de la poliarginina con 0,35 o 0,7 µg/ml (se usó 1 ml por pocillo) con ARNip 100 nM (1,4 µg), y se siguió el protocolo descrito antes, evaluando la expresión de S100A4 por transferencia Western después de dar una dosis de luz de 30 s. Como puede verse a partir de la figura 15, hay una diferencia significativa en la eficacia del silenciamiento génico entre las muestras tratadas con PCI y las no tratadas. Por lo tanto, mientras que todas las

10 muestras tratadas con PCI (muestras R+ en la figura 15) muestran silenciamiento génico significativo, no se puede observar efecto de silenciamiento en las muestras correspondientes no tratadas por PCI (muestras R- en la figura 15). Por lo tanto, la PCI es eficaz para inducir el silenciamiento génico con ambos vehículos de poliarginina diferentes ensayados y en ambas concentraciones usadas, mostrando que la PCI puede potenciar significativamente el suministro de ARNip mediante un vehículo basado en péptido catiónico.

15

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método in vitro o ex vivo para introducir una molécula de ARNip en el citosol de una célula, comprendiendo dicho método

i) poner en contacto dicha célula con una molécula de ARNip, un vehículo y un agente fotosensibilizador, y

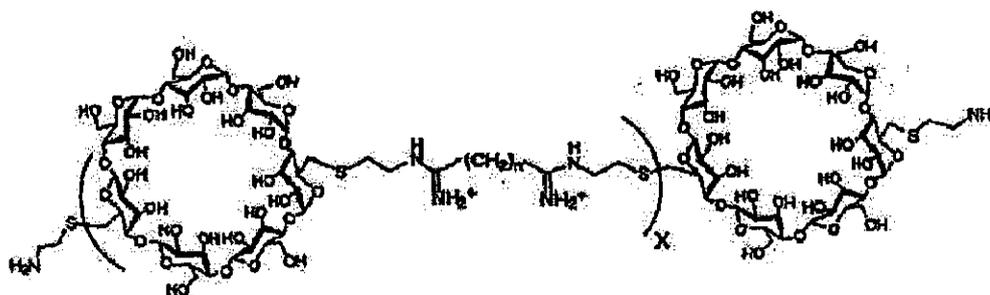
5 ii) irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador,

en donde dicho vehículo comprende una poliamina catiónica seleccionada de

(a) una lipopoliamina en una formulación no liposomal, en donde preferiblemente la lipopoliamina contiene grupos amina primaria y secundaria, o una mezcla de los mismos y/o en donde preferiblemente la región de poliamina de la lipopoliamina tiene al menos 2 átomos de nitrógeno y una carga de al menos +1 a pH fisiológico,

10 (b) una polietilenimina (PEI),

(c) un polímero de betaciclodextrina-amina de fórmula



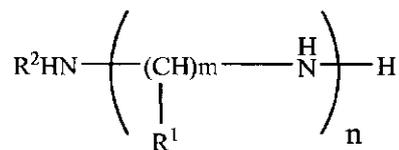
en donde X es un número entero de 1 a 100 inclusive, y n es un número entero de 4 a 10 inclusive,

15 (d) un dendrímero que contiene un grupo amina, y

(e) un péptido catiónico,

en donde dicha célula preferiblemente es de mamífero y/o dicha molécula de ARNip preferiblemente es de 12-28 nucleótidos de longitud y/o preferiblemente se usa ARNip 10 nM - 200 nM para la transfección.

20 2.- El método de la reivindicación 1, en donde la región de poliamina de la lipopoliamina preferiblemente tiene la fórmula (I)



en la que

25 m es un número entero mayor o igual que 2 y n es un número entero mayor o igual que 1, en donde m puede ser el mismo o diferente cuando aparece en dicha fórmula, en cada posición R<sup>1</sup> es hidrógeno o un grupo de conexión con la parte lipo de la lipopoliamina, o la propia parte lipo, y pueden ser iguales o diferentes en cada átomo de carbono,

R<sup>2</sup> es un hidrógeno o un grupo de conexión con la parte lipo de la lipopoliamina o la propia parte lipo,

30 en donde solo uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es un grupo de conexión con la parte lipo de la lipopoliamina, o la propia parte lipo, y en donde cuando R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> es el grupo de conexión unido a dicha parte lipo o la propia parte lipo, la fórmula (I) es dicha lipopoliamina, en donde preferiblemente m es entre 2 y 6 inclusive y n es entre 1 y 5, en especial preferiblemente n es 3, y/o preferiblemente R<sup>2</sup> es H.

3.- El método de la reivindicación 2, en donde la región de poliamina está representada por la siguiente fórmula



- (ii) un radical de fórmula general (III) en la que  $R^6-X$ - y  $R^7-X$ - representa cada uno un radical alcanilo que contiene de 12 a 22 átomos de carbono.
- 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la región lipófila de dicha lipopoliamina es cualquier cadena hidrocarbonada saturada o insaturada, colesterol u otro esteroide, un lípido natural o un lípido sintético capaz de formar fases laminares o hexagonales, en donde preferiblemente la longitud de la cadena hidrocarbonada es de 10 a 30 carbonos de longitud.
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la lipopoliamina se selecciona de 5-carboxiespermilglicinadioctadecilamida (DOGS), 5-carboxiespermilamida de la dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPEs), trifluoracetato de 2,3-dioleil-oxi-N-[2-esperminacarboxil-amido]etil-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxiespermina)propilamida (DOSPER) y RPR-120535.
- 8.- El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el vehículo es JetSI™, JetSI-ENDO™ o Transfectam®.
- 9.- El método de la reivindicación 1, en donde el vehículo es una molécula de dendrímero de PAMAM.
- 10.- El método de la reivindicación 9, en donde la molécula de dendrímero de PAMAM es una molécula de dendrímero de PAMAM de generación 2-6.
- 11.- El método de la reivindicación 1, en donde el vehículo es una molécula de PEI ramificada, en donde preferiblemente el peso molecular de la PEI es menor que 50 kDa.
- 12.- El método de la reivindicación 1, en donde el vehículo es una molécula de PEI con un peso molecular menor que 30 kDa.
- 13.- El método de la reivindicación 11 o 12, en donde el peso molecular de la PEI es menor o igual a 25 kDa.
- 14.- El método de la reivindicación 1, en donde el vehículo es polihistidina, poliarginina, polilisina histidilada y poliornitina, o un copolímero de restos de L o D lisina, L o D arginina, L o D histidina y/u ornitina con uno o más de otros aminoácidos.
- 15.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el agente fotosensibilizador se selecciona de una porfirina, ftalocianina, purpurina, clorina, benzoporfirina, base débil lisosomotrópica, naftalocianina, colorante catiónico, tetraciclina, ácido 5-aminolevulínico y/o ésteres de los mismos, o un derivado de cualquiera de dichos agentes, o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 16.- El método de la reivindicación 15, en donde el agente fotosensibilizador se selecciona de TPPS<sub>4</sub>, TPPS<sub>2a</sub>, AIPcS<sub>2a</sub>, TPCS<sub>2a</sub>, ácido 5-aminolevulínico y/o ésteres de ácidos 5-aminolevulínico, o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 17.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que además comprende la etapa adicional de poner en contacto dicho ARNip con dicho vehículo, en donde preferiblemente el ARNip se mezcla con el vehículo de modo que se forme un complejo, el cual después se administra a la célula simultánea o secuencialmente con el agente fotosensibilizador, en donde en especial preferiblemente la molécula de ARNip y la molécula vehículo se ponen en contacto entre sí durante 20-40 min antes de ponerlos en contacto con la célula.
- 18.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde está adicionalmente presente un vehículo fotosensibilizador seleccionado de un policatión, polietilenimina, un dendrímero, un lípido catiónico y un péptido.
- 19.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde dicho método se lleva a cabo poniendo en contacto dicha célula con un agente fotosensibilizador, poniendo en contacto dicha célula con el vehículo y la molécula de ARNip que se va a introducir e irradiando dicha célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, en donde dicha irradiación se lleva a cabo antes de la absorción celular de dicha molécula de ARNip y dicho vehículo en un compartimento intracelular que contiene dicho agente fotosensibilizador, preferiblemente antes de la absorción celular de dicha molécula y dicho vehículo en cualquier compartimento intracelular.
- 20.- Un método in vitro o ex vivo de inhibición de la expresión de un gen diana mediante la introducción de una molécula de ARNip en una célula que contiene dicho gen diana, por un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde dicha molécula de ARNIP inhibe específicamente la expresión de dicho gen diana.
- 21.- Una composición o kit que contiene una molécula de ARNip y una molécula vehículo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y un agente fotosensibilizador como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 22.- La composición de la reivindicación 21, para usar en terapia.

- 23.- Un producto que contiene una molécula de ARNip y una molécula vehículo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y un agente fotosensibilizador como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para el uso simultáneo, separado o secuencial en terapia.
- 5 24.- Una composición o producto como se define en la reivindicación 22 o 23, o una célula o una población de células, que contiene una molécula de ARNip que se ha internalizado en el citosol de dicha célula, cuya célula se puede obtener por un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección, alterando la expresión de uno o más genes diana en dicho paciente, en donde preferiblemente dicha enfermedad o trastorno se caracteriza por la expresión génica anormal o se beneficiaría de la supresión de uno o más genes.
- 10 25.- La composición o producto o célula o población de células, que contiene una molécula de ARNip que se ha internalizado en el citosol de dicha célula, para usar según la reivindicación 24, en donde dicha enfermedad o trastorno es cáncer.
- 15 26.- El uso de una composición o producto como se define en la reivindicación 22 o 23, o una célula, o una población de células, que contiene una molécula de ARNip que se ha internalizado en el citosol de dicha célula, cuya célula se puede obtener por un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección, alterando la expresión de uno o más genes diana en dicho paciente, en donde preferiblemente dicha enfermedad o trastorno se caracteriza por la expresión génica anormal o se beneficiaría de la supresión de uno o más genes, preferiblemente cáncer.

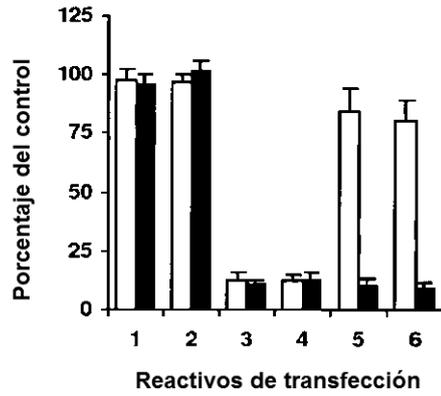


Figura 1

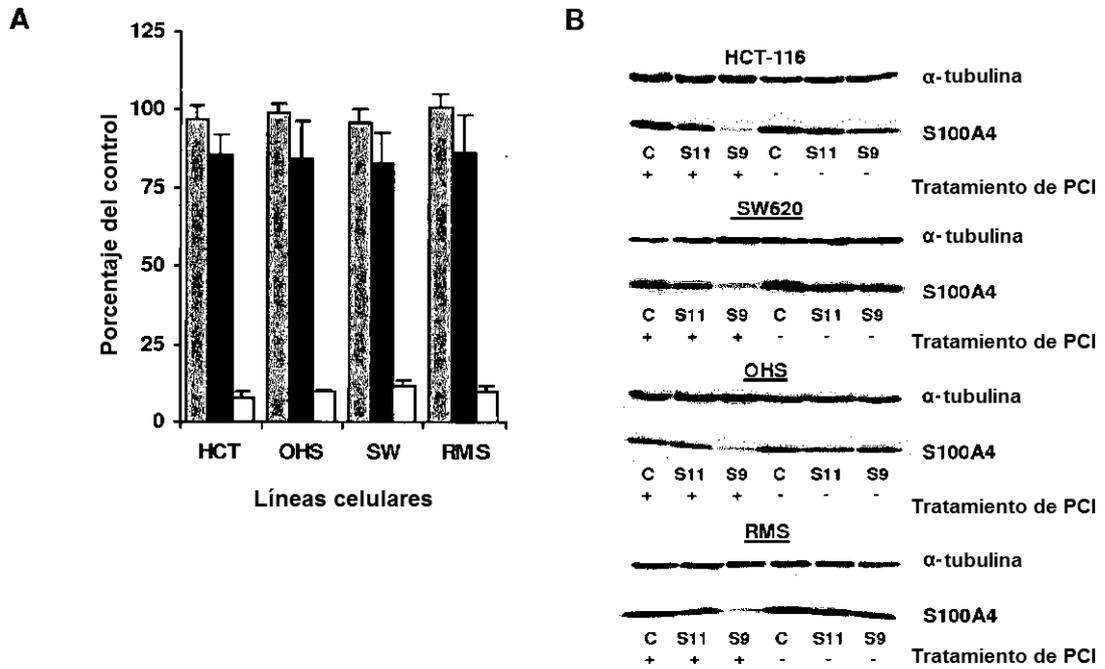


Figura 2

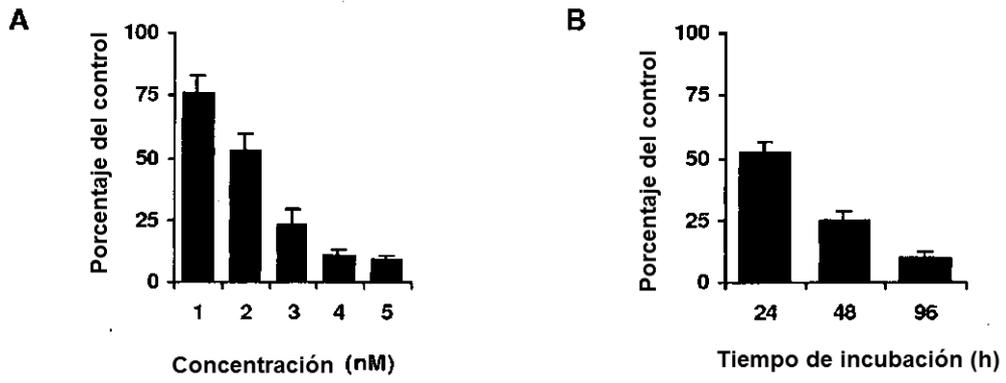


Figura 3

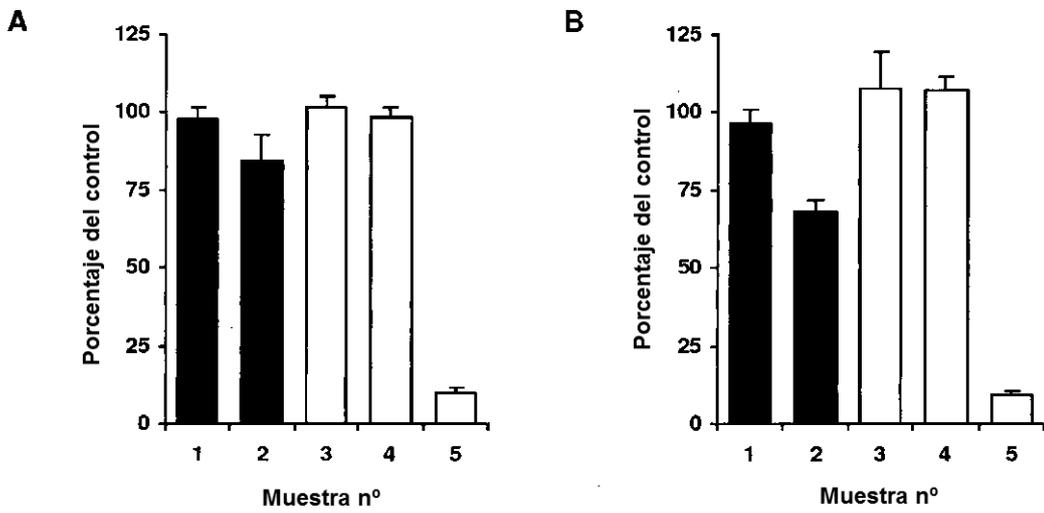


Figura 4

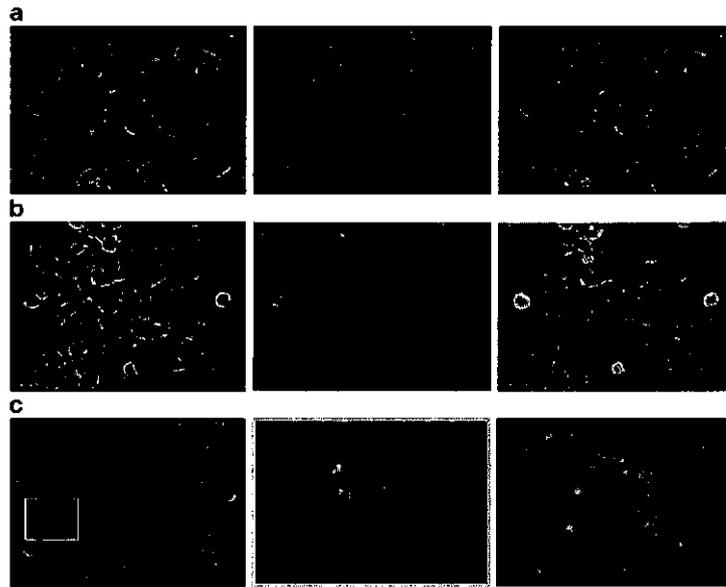


Figura 5

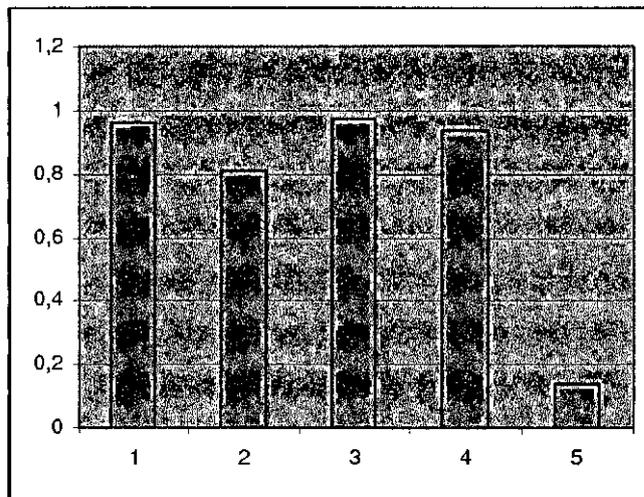
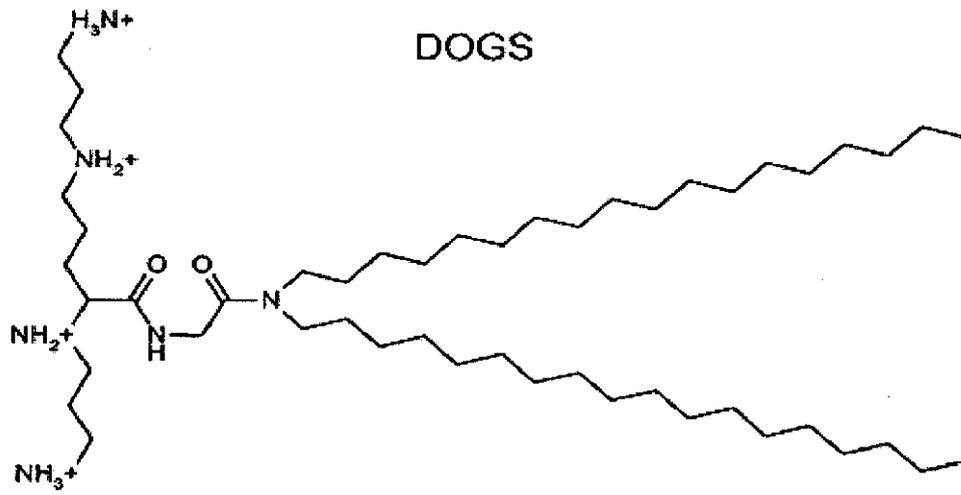
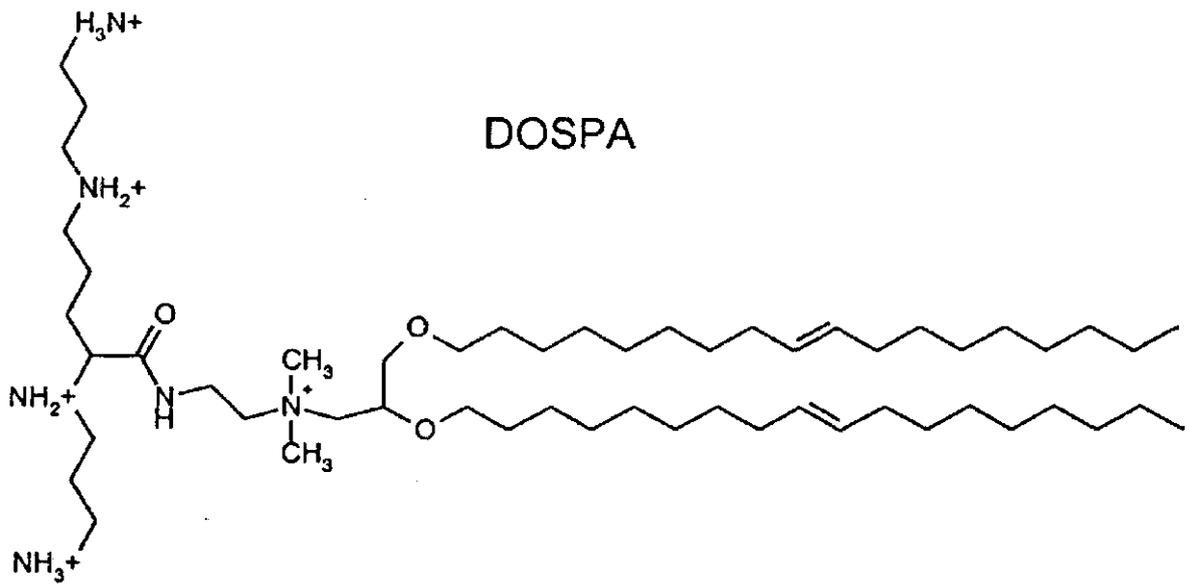
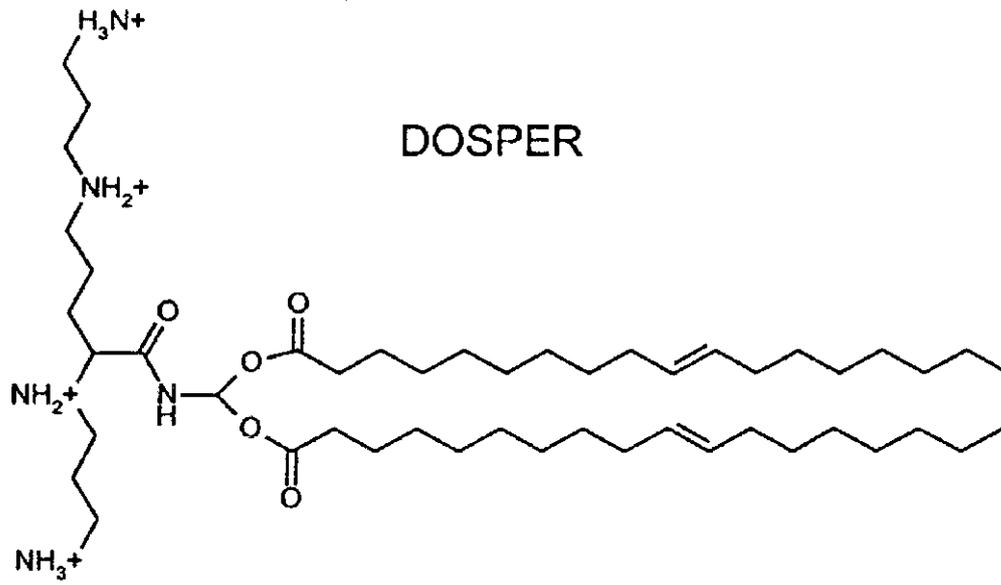
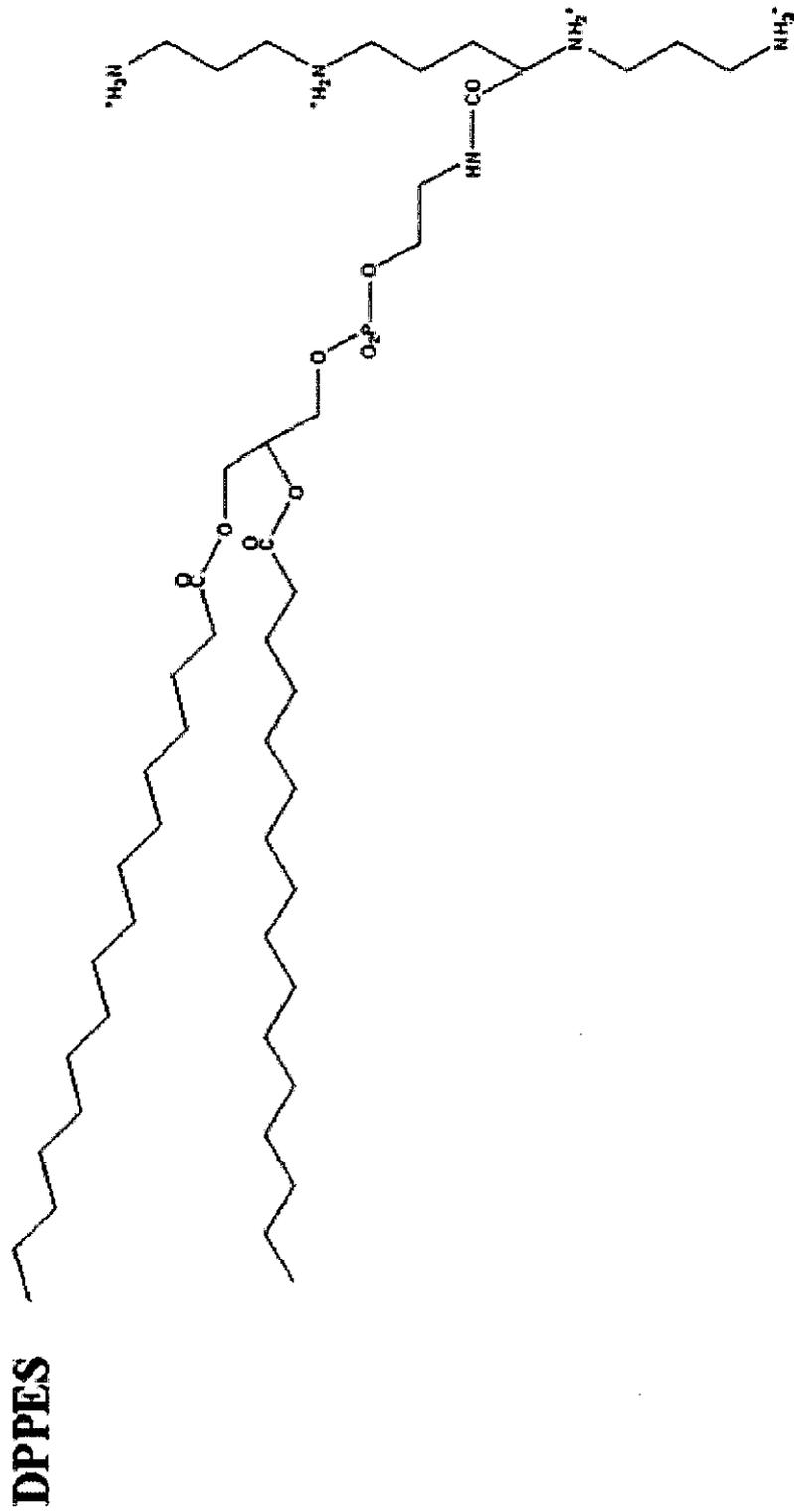


Figura 6

Figura 7









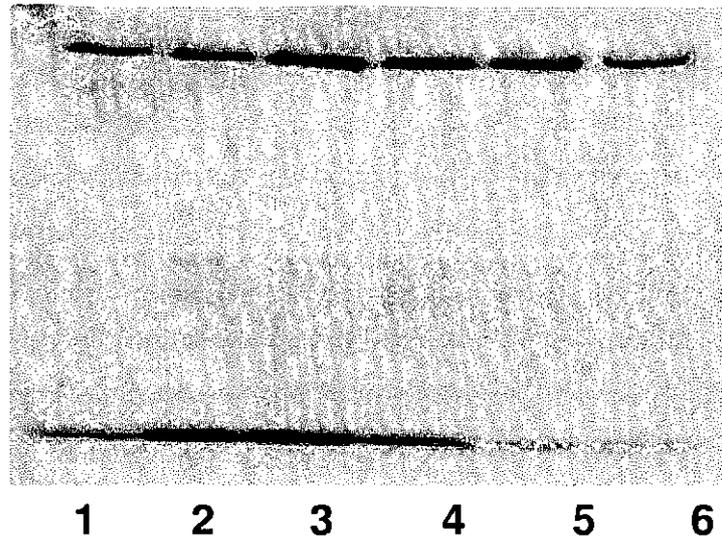


Figura 8

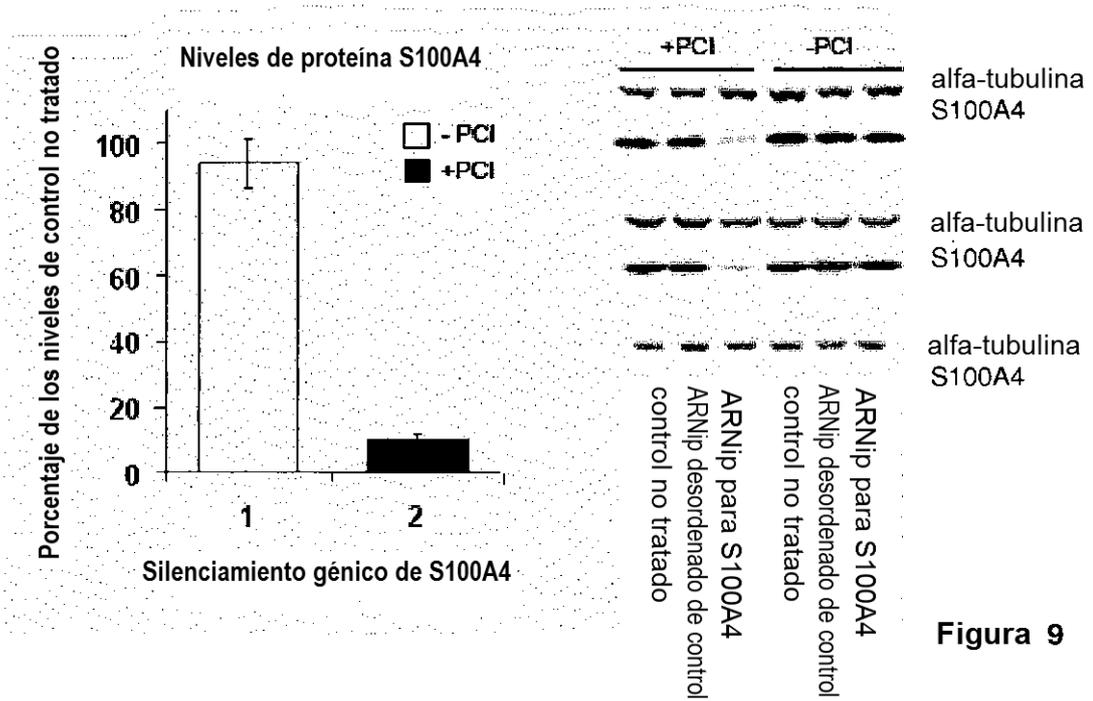


Figura 9

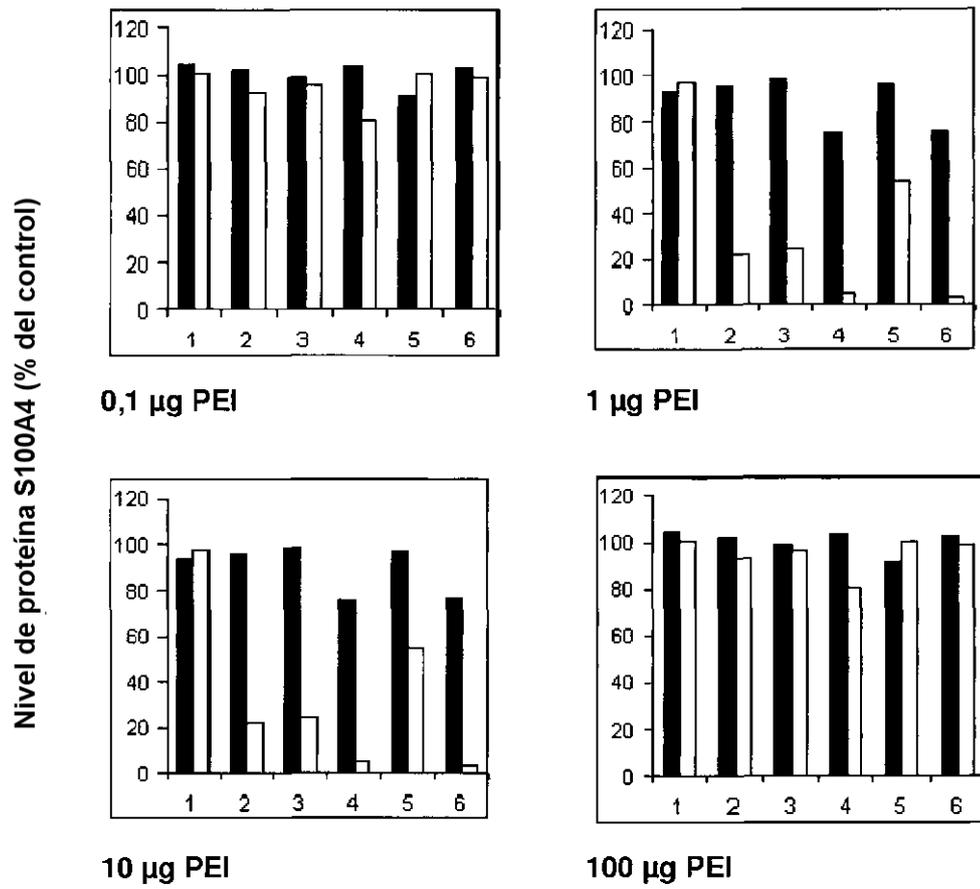
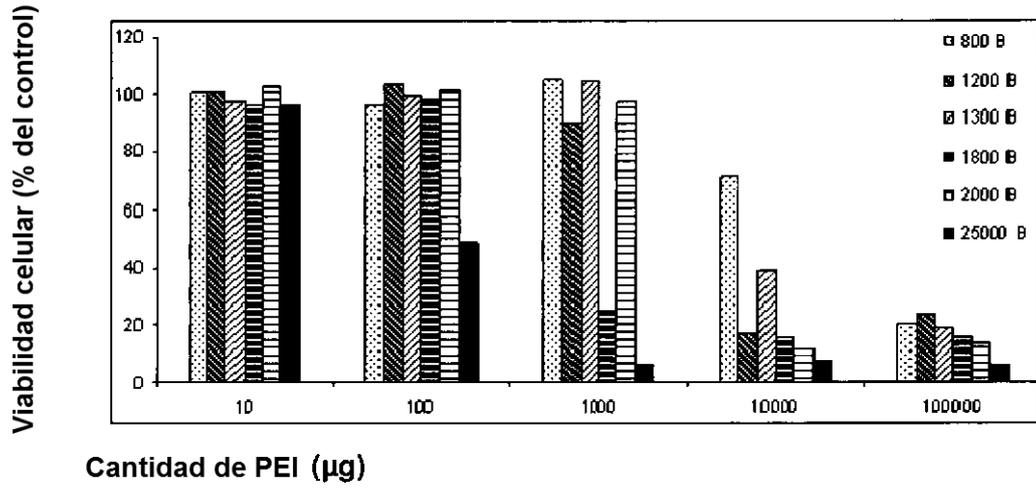
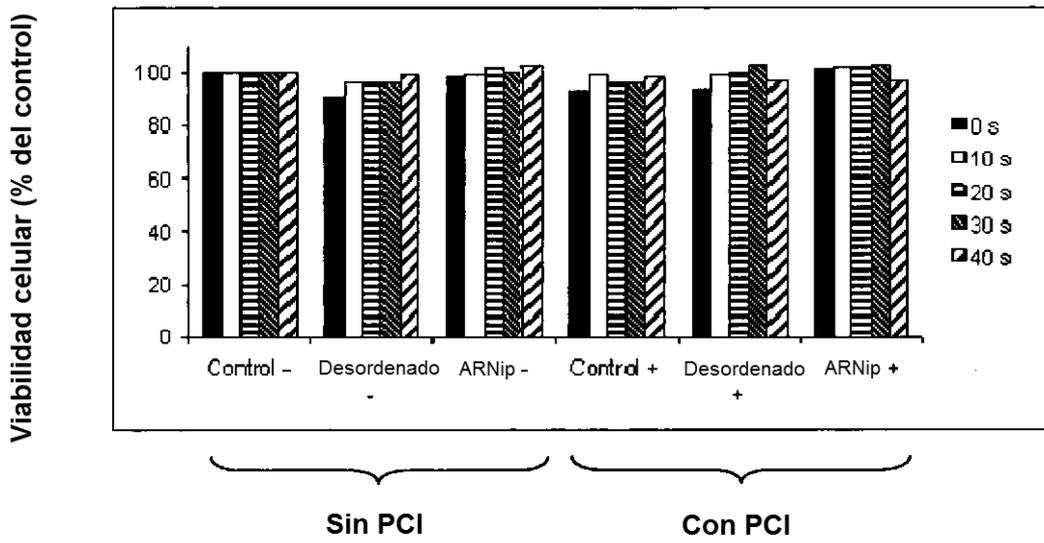


Figura 10

**A. PEI sin PCI**



**B. Combinación de PCI, ARNip y PEI (MW 25.000)**



**Figura 11**

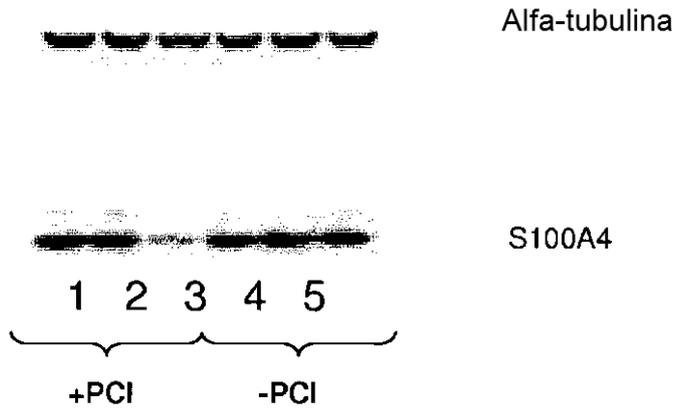
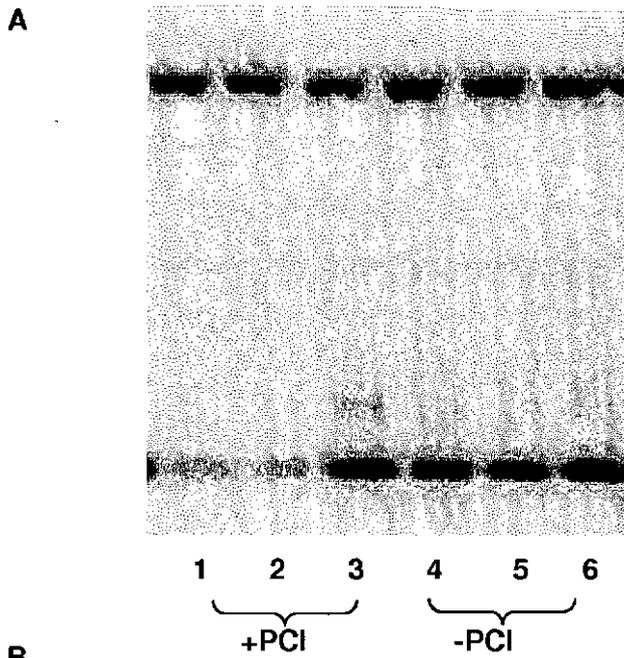


Figura 12



**B**

Nivel de proteína S100A4  
(% del control no tratado)

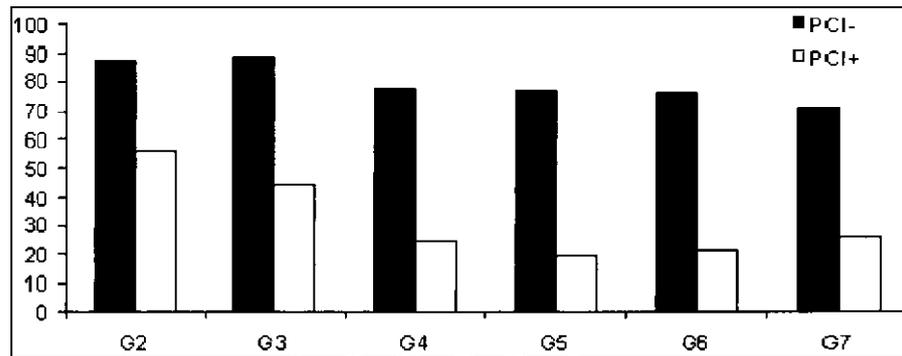


Figura 13



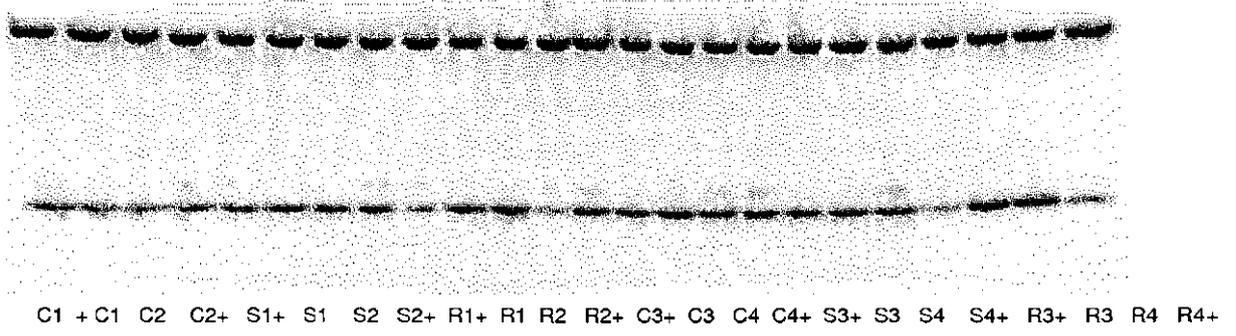


Figura 15