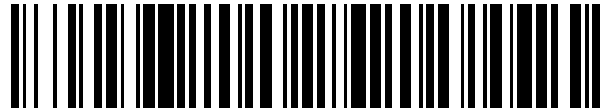


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 272**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2005** **E 10002432 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2189469**

54 Título: **Constructos de ARNsi multicistrónico para inhibir tumores**

30 Prioridad:

**18.11.2004 US 629659 P**

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

**14.01.2016**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY  
OF ILLINOIS (100.0%)  
352 HENRY ADMINISTRATION BUILDING, 506  
SOUTH WRIGHT STREET  
URBANA, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

**RAO, JASTI S.;  
GONDI, CHRISTOPHER S. y  
LAKKA, SAJANI S.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 556 272 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

Constructos de ARNsi multicistrónico para inhibir tumores

5 **Antecedentes**

La progresión tumoral implica la modulación de la adhesión de células tumorales durante la migración y la degradación celular de la matriz extracelular (ECM) durante la invasión tisular. Un balance complejo de proteasas, sus activadores y sus inhibidores, regula ambos procesos durante la invasión tumoral. Las serina proteinasas, metaloproteinasas y cisteína proteinasas son tres clases de proteinasas que degradan la ECM. El activador del plasminógeno de uroquinasa (uPA) inicia una cascada de proteasas que pueden degradar la mayoría de los componentes de la matriz y de la membrana basal e interfieren con las interacciones de célula-célula y célula-matriz. El uPA, unido a su receptor de la superficie celular, el receptor del activador de plasminógeno de uroquinasa (uPAR), es un participante de la degradación de la ECM, tal como se demuestra mediante un aumento de la activación del plasminógeno varias veces, uPA también activa varios factores de crecimiento después de la degradación de componentes de la ECM. La unión de uPA con su receptor uPAR activa moléculas de señalización corriente abajo a través de una serie de rutas, que incluyen las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y señalizan transductor y activador de rutas de transcripción (Stat).

El reciente discernimiento del ARN de interferencia (ARNi) ha abierto nuevas vías en la terapia para el cáncer. El ARNi es un mecanismo de silenciamiento genético posterior a la transcripción, específico de secuencia que se ve influido a través de moléculas de ARN bicatenario homologarse a la secuencia del gen diana.

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo de silenciamiento genético posterior a la transcripción, específico de secuencia, que se acciona con el ARN bicatenario (ARNds) y provoca la degradación del ARNm con una secuencia homóloga a la del ARNds. El ARNi depende de la formación del ARN bicatenario (ARNds) cuya hebra antisentido es complementaria con la del transcrito de un gen dirigido. La inhibición del ARNi específica de secuencia también se puede inducir en células de mamífero. En una realización de ARNi, la degradación selectiva de los ARNm diana en células de mamífero se consiguió mediante transfección con los ARN de interferencia cortos, bicatenarios (los ARNsi), que conduce a una degradación de la diana rápida y eficaz. Se mostró que estos ARNsi evitaban los efectos no específicos, bien documentados desencadenados por los ARN bicatenarios más largos en células de mamífero.

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia más común en los hombres americanos, con cálculos de 230.110 nuevos casos y aproximadamente 30.000 muertes en 2004. Como tal, el cáncer de próstata plantea un problema de salud pública principal en Estados Unidos y en todo el mundo. En la actualidad, el cáncer de próstata metastásico es incurable y por último reivindica la vida de los pacientes. Un factor en la gravedad relativa del cáncer de próstata es la capacidad de invasión de las células tumorales componentes que causan las metástasis. La naturaleza invasiva de las células tumorales es una característica de la metástasis del cáncer. La invasión de células tumorales y la metástasis son procesos complejos con tres estadios importantes: adhesión de células malignas (neoplásicas) a la matriz extracelular, digestión de la matriz para liberar células de la masa del tumor primario, y migración de las células tumorales a dianas secundarias.

El glioblastoma multiforme (GBM) es una neoplasia del sistema nervioso central primario altamente maligna, que es altamente resistente a la terapia. Una propiedad que hace que el glioblastoma sea resistente al tratamiento es la tendencia de las células tumorales a invadir el tejido de un cerebro normal. La terapia que afecta al tejido del cerebro normal, no es aceptable. Por lo tanto, se considera que la capacidad de invasión es un determinante principal del comportamiento maligno de los gliomas humanos. La invasión de una sola célula difusa, que se produce en todos los tumores de la glía independientemente del grado histológico, se define como una translocación de células neoplásicas a través de barreras celulares y ECM del hospedador. Los gliomas malignos expresan niveles más elevados de uPA, uPAR y MMP-9 en comparación con el tejido de cerebro normal.

Las MMP aumentan la invasión de células tumorales mediante la degradación de proteínas de la matriz extracelular, activando cascadas de transducción de señales que estimula la motilidad y que activan factores de crecimiento, tales como factor  $\beta$  de crecimiento transformante, que están implicados en la motilidad del GBM. La expresión de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 se correlaciona con los potenciales invasivos y metastásicos de diversos cánceres, que incluyen gliomas. Los niveles de MMP-9 se correlacionaban en gran medida con el grado histológico de la neoplasia del trastorno maligno, glioma. La MMP-9 es relevante en la morfogénesis de células endoteliales y la formación de capilares en cocultivos gliales/endoteliales *in vitro*. Las MMP también regulan la angiogénesis tumoral y podrían ser necesarias para el 'intercambio angiogénico' que se produce durante la neovascularización tumoral.

La actividad proteolítica de la cathepsina B, una cisteína proteasa, implica la degradación directa de las proteínas de la ECM, incluyendo fibronectina, colágeno de tipos I y IV y laminina. La Cathepsina B también activa indirectamente otras enzimas implicadas en la cascada proteolítica que media la degradación de ECM, incluyendo metaloproteinasas y activador de plasminógeno de uroquinasa tanto soluble como unido a receptor (uPA). Además, se ha sugerido que la cathepsina B aumenta la actividad de MMP mediante la inactivación de inhibidores tisulares de

metaloproteinasas de matriz (TIMP). Por lo tanto, la catepsina B podría ser un regulador corriente arriba importante en la activación de pro-uPA/plasminógeno y las pro-MMP. También se ha mostrado que la Catepsina B contribuye a la apoptosis causando la liberación de citocromo c y activación de caspasa 9 y 3 (sucesos fundamentales en la ruta mitocondrial de la apoptosis). El aumento de la expresión de catepsina B y las reducciones en sus niveles inhibidores se asociaron con crecimiento tumoral, vascularización, invasión y metástasis en diversos cánceres.

Se desea el desarrollo de moléculas de ARNsi que se dirigen a una pluralidad de genes implicados en tumores para desarrollar composiciones terapéuticas.

- 10 Lakka S: *et al.*, PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 44, 1 de julio de 2003 (01-07-2003), página 650, XP001525366, ISSN: 0197-016X es un resumen de la reunión con respecto a los efectos de la "degradación de ARN diana mediado por ARNsi de uPAR y MMP-9 en líneas celulares de glioma humano". LAKKA SAJANI S *ET AL.*: "Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth.", CANCER RESEARCH, vol. 63, n° 10, 15 de mayo de 2003 (15-05-2003), páginas 2454-2461, XP002608814, ISSN: 0008-5472) se refiere a la eficacia de la expresión mediada por adenovirus de uPAR y MMP-9 antisentido en la inhibición de la invasión y crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*. CHRISTOPHER S GONDI *ET AL.*: "Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth" NEURON GLIA BIOLOGY, vol. 1, n° 2, 25 de octubre del 2004 (25-10-2004), página 176, XP002543013 ISSN: 1740-925X doi: 1 0.1017/S 1740925X04000237 describe un constructo tricistrónico y describe que MMP-9, uPAR y uPA desempeñan un papel en la invasión y crecimiento tumoral de glioma.

## Sumario

25 La invención se define en las reivindicaciones.

30 La invención se refiere a un constructo de ARN de interferencia corto bicistrónico que comprende una primera secuencia autocomplementaria de receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y una segunda secuencia autocomplementaria de metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMP-9) y una secuencia de intervención entre la primera y la segunda secuencias autocomplementarias de aproximadamente 22-68 pares de bases.

35 La primera secuencia autocomplementaria incluye una secuencia de nucleótidos del receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y la segunda secuencia autocomplementaria comprende una secuencia de nucleótidos de metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMP-9). Una secuencia autocomplementaria de uPAR es CTACAGCAGTGGAGAGCGATT-lazo- AATCGCTCTCCACTGCTGTAG y una secuencia autocomplementaria de MMP-9 es CAAGTGGCACCACCACAACAA-lazo-TTGTTGTGGT-GGTGCCACTTG y el lazo incluye aproximadamente 9 nucleótidos que son deficientes en GC. Una secuencia de lazo adecuada incluye una secuencia de nucleótidos ATATATAAT. Las secuencias autocomplementarias de uPAR y MMP-9 por lo general se separan con una secuencia de intervención con una longitud de aproximadamente 22-35 pares de bases. Una secuencia de intervención es GATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT GCTGG AATT. El constructo de uPAR-MMP-9 es un ácido nucleico circular o uno lineal.

45 Una secuencia autocomplementaria de uPAR es CTACAGCAGTGGAGAGCGATT-lazo- AATCGCTCTCCACTGCTGTAG; y una secuencia autocomplementaria de MMP-9 es CAAGTGGCACCACCACAACAA-lazo-TTGTTGTGGT-GGTGCCACTTG. El lazo incluye aproximadamente 9 nucleótidos que son deficientes en GC. La secuencia de lazo incluye una secuencia de nucleótidos ATATATAAT. Las secuencias autocomplementarias de uPAR y MMP-9 por lo general se separan con una secuencia de intervención con una longitud de aproximadamente 22-68 pares de bases. Una secuencia de intervención es GATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGT-GT GCTGG AATTC TGCAGATATC CATCACACTG GCGGCCGC TCGA.

Se desvela un método para inhibir tumores, método que incluye las etapas de:

- 55 (a) administrar un constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto; y  
 (b) reducir la expresión de una pluralidad de genes expresados en tumores, inhibiendo de ese modo la formación o crecimiento de tumores, y la reversión de tumores que ya existen.

60 Se desvela un método para usar un constructo multicistrónico de formación corto o de ARN de interferencia que se dirige, por ejemplo, al receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y al activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), reduciendo de este modo la expresión de uPAR y uPA e inhibiendo tumores. El constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto incluye una secuencia de nucleótidos TGAGAGCCCTGCTGGCGGCC-lazo-GGCGCGCCAGCAGGGCTCTCA-secuencia de intervención-CTACAGCAGTGGAGAGCGATT-lazo-AATCGCTCTCCACTGCTGTAG. Otra expresión para "secuencia de intervención" es un "espaciador". Un tumor se inhibe mediante la reducción de al menos uno de proliferación de células tumorales, invasión de células tumorales, migración de células tumorales y angiogénesis. Algunos tumores

incluyen cáncer de próstata, glioma, cáncer de mama, y melanoma. El constructo se administra a través de un vector viral o se administra mediante administración directa o mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia.

- 5 Un método para usar un constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto también se puede dirigir al receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y a la metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMP-9), reduciendo de ese modo la expresión de uPAR y MMP-9 e inhibiendo tumores. El constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto incluye una secuencia de nucleótidos CTACAG-CAGTGGAGAGCGATT-lazo-AATCGCTCTCCACTGCTGTAG-spacer-CAAGTGGCACCACCACAACAA-lazo-TT-GTTGTGGTGGTGCCACTTG. El
- 10 tumor se inhibe mediante la reducción de al menos uno de proliferación de células tumorales, invasión de células tumorales, migración de células tumorales y angiogénesis. Algunos tumores incluyen cáncer de próstata, glioma, cáncer de mama, y melanoma. El constructo se administra a través de un vector viral o se administra mediante administración directa o mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia.
- 15 Se desvela un método para inhibir tumores, que incluye las etapas de:
- (a) administrar un constructo multicistrónico dirigido a al menos uno de uPA, uPAR, MMP-9 y CB; y  
(b) reducir la expresión de al menos uno de uPA, uPAR, MMP-9 y CB, inhibiendo de ese modo tumores.
- 20 Una molécula de ARN de interferencia corto incluye moléculas de ARN dirigidas a:
- (a) receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMP-9), que incluye una secuencia de ácidos nucleicos CUACAGCAGUGGAGAGCGAUU-lazo-AAUCGCUCUCCACUGCUGUAG-espaciador-CAAGUGGCACCACCACAACAA-lazo-UUGUUGUGGUGGUGCCACUUG.
- 25

En el presente documento se desvela una célula recombinante transformada con el constructo de uPAR-MMP-9 que se reivindica.

- 30 En el presente documento se desvela un virus recombinante transformado con el constructo de uPAR-MMP-9 que se reivindica.

### **Abreviaturas**

- 35 uPA se refiere a activador de plasminógeno de tipo uroquinasa; uPAR se refiere a receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa; MMP-9 se refiere a metaloproteasa de la matriz tipo 9; CB se refiere a catepsina B; CMV se refiere a citomegalovirus; SV40 se refiere a tipo 40 de virus de simio; GFP se refiere a proteína fluorescente de color verde; ECM se refiere a matriz extracelular; ARNsi se refiere a ARN de interferencia corto; ARNsh se refiere a ARN de horquilla corto; ARNi se refiere a ARN de interferencia.
- 40

### **Breve descripción de las figuras**

- La **FIG. 1** muestra que los niveles de expresión de las proteínas uPA y uPAR y la actividad de uPA se correlacionan con el potencial invasivo de las líneas celulares de cáncer de próstata humana. La expresión endógena de las proteínas uPA y uPAR se examinó con análisis de inmunotransferencia de proteína celular total aislada a partir de las siguientes líneas celulares de cáncer de próstata: LNCaP, DU145 y PC3. Cantidades iguales de proteína aislada de extractos celulares de las tres líneas celulares se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti-uPA, anti-uPAR y anti-GAPDH. El GAPDH se usó como un control de carga (A). La actividad de uPA en líneas celulares de cáncer de próstata se evaluó con zimografía de fibrina. Cantidades iguales de proteína de células cancerígenas de próstata en medios sin suero se separaron con SDS-PAGE en geles al 10 % que contenían fibrinógeno y plasminógeno en condiciones no reductoras. Después de intercambio de SDS con lavado con Triton X-100, el gel se incubó en tampón de glicina (0,1 M, pH 8,0). La actividad fibrinolítica se detectó en forma de bandas de lisis transparentes después de tinción con negro de amido y posterior eliminación de tinción con metanol-ácido acético (B).
- 45
- 50 La comparación de los potenciales invasivos *in vitro* de líneas celulares de cáncer de próstata (C). Los ensayos de invasión se realizaron en cámaras Transwell de 12 posibles que contenían filtros de policarbonato con poros de 12  $\mu$ m revestidos con Matrigel. Las células que se habían pasado a la superficie inferior de los filtros se tiñeron y se realizaron fotografías en microscopio con un aumento de 200X (C). Se hizo recuento de la invasión celular a través del Matrigel con un microscopio en tres campos aleatorios con un aumento de 200X. Cada
- 60 /representa la media  $\pm$  DT de los tres campos en los que las diferencias significativas de las células LNCaP bajas o no metastásicas, que presentaban expresión indetectable de proteínas uPA y uPAR, se representan con asteriscos \* ( $P < 0,05$ ) (D).
- La **FIG. 2** muestra que la genosupresión del ARNi de expresión de uPA y uPAR en la línea de células PC3 de cáncer de próstata. Representación esquemática del constructo del plásmido sh-uPAuPAR (A). El constructo consiste en un promotor de CMV humano y secuencias homólogas dirigidas frente a uPA y uPAR. Después de la expresión, el promotor de CMV fuerte conduce la formación de moléculas de horquilla corta específicas para uPA
- 65

y uPAR. La secuencia de poli adenilación de hormona de crecimiento bovino (BGH) sirve como una señal de determinación del promotor de CMV basada en ARN pol II. Dicer/Drosha procesa el ARNsh específico para uPA y uPAR y las moléculas de ARNsi resultantes interactúan con los genes diana de uPA y uPAR. Esta interacción da como resultado la genosupresión simultánea de la expresión genética de uPA y uPAR. Transcripción inversa semicuantitativa-PCR de ARN extraídos de células PC3 transfectadas con ARNsh (B). El ARNm de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se co amplificó como un control. Inmunotransferencia de lisados de proteínas totales extraídos de células PC3 transfectadas con ARNsh (C). Ambas bandas de uPA y uPAR están presentes en células tras décadas con simulado, EV y SV. Por consiguiente, cada calle de ARNsh específicas del gen muestra una disminución significativa de la banda apropiada. La GAPDH se incluyó como un control de carga. Los niveles de expresión de proteínas uPA y uPAR también se detectaron usando inmunofluorescencia indirecta en células PC3. Las células PC3 transfectadas con las células EV, SV y simuladas se tiñeron de forma positiva para detección de inmunofluorescencia de uPA (FITC) y uPAR (Rojo Texas) (D). Las células transfectadas con ARNsh específico de genes cambiaron básicamente los perfiles de tinción celular de uPA y uPAR en comparación con células transfectadas con EV/SV disimuladas. La contratinción nuclear se obtuvo con DAPI. (Los resultados son representativos de al menos tres experimentos separados).

La **FIG. 3** muestra que la genosupresión del ARNi de la expresión de uPA y uPAR inhibe el potencial invasivo de las células PC3. El potencial invasivo de las células simuladas y de las células transfectadas con los plásmidos de ARNsh indicados se examinaron mediante el ensayo de invasión con Matrigel (campo visual representativo de un experimento) (A). Los ensayos de invasión se realizaron como se describe en el presente documento (véase la FIG. 1C). Se hizo el recuento del número representativo de células invasivas a través del matrigel con microscopio en tres campos aleatorios a 200X (B). Cada /representa la DT media de los tres campos a los que se hizo recuento. La diferencia significativa de los controles (es decir, células simuladas o transfectadas con vector codificado) se indica con asteriscos \* ( $P < 0,05$ ).

La **FIG. 4** ilustra que la genosupresión del ARNi de la expresión de uPA y uPAR inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en células PC3. La viabilidad de las células PC3 transfectadas con cualquiera de plásmidos o controles de ARNsh específicos de genes (células simuladas o transfectadas con EV/SV) se reveló con el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (A). Cada barra representa análisis por triplicado de DT media en los que la diferencia significativa de los controles se representa con un asterisco \* ( $P < 0,05$ ). Las inmunotransferencias representativas muestran cambios en la expresión genética proapoptótica en células PC3 genosuprimidas para uPA-uPAR (B). El GAPDH se usó como un control de carga. La activación de la caspasa se detectó *in situ* con marcado con fluorescencia (panel inferior) usando FAM-VAD-FAK, un inhibidor de caspasa permeable celular que se une a caspasas activadas (C). La tinción nuclear se realizó con DAPI (panel superior). Un número significativo de células transfectadas con sh-uPAuPAR presentan fluorescencia de color verde. El diagrama de barras muestra datos cuantitativos de la proporción de células marcadas con DAPI/FMK-VAD-FAK de tres campos aleatorios con un microscopio confocal (D). La proporción de DAPI to FMK-VAD-FAK aumentó de forma significativa en células transfectadas con sh-uPAuPAR. Las diferencias significativas de las células simuladas o transfectadas con EV/SV se indican con asteriscos \* ( $P < 0,05$ ). Se observó marcado de ADN en células transfectadas con ARNsh de uPA-uPAR y células tratadas con actinomicina D (ActD, 0,2 g/ml) (E). Un gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió con luz UV. Los marcadores de ADN se sometieron a electroforesis como una referencia de pares de kilobases con patrón de bandas de 2,0, 1,5, 1,0, 0,75 y 0,5 kb (calle M).

La **FIG. 5** demuestra que la genosupresión del ARNi de la expresión de uPA y uPAR inhibe la señalización corriente abajo en células PC3. Análisis de inmunotransferencia de las formas totales y fosforiladas de quinasa regulada por señal extracelular (ERK), p38 y JNK en células simuladas y transfectadas con ARNsh (A). Las células PC3 transfectadas con simulado, EV, SV, sh-uPA, sh-uPAR y sh-uPAuPAR se lisaron 72 h después y se sometieron a SDS-PAGE seguido de una transferencia con formas totales y fosforiladas de anticuerpos ERK, p38 y JNK. Los anticuerpos de GAPDH se usaron para verificar que se cargaban cantidades similares de proteínas en cada calle. Análisis de inmunotransferencia de proteína Stat 3 en células simuladas y transfectadas con ARNsh (B). Se cargaron cantidades iguales de proteína y la inmunotransferencia se realizó usando anticuerpos de Stat 3 fosfo-específicos frente a tirosina 705 y anticuerpos frente a una forma no fosforilada de Stat 3. La GAPDH se incluyó como un control de carga. Ensayo electroforético de desplazamiento de movilidad de células simuladas y transfectadas con ARNsh (C). Los complejos de proteína-ADN se separaron en un gel de poliácridamida al 6 %, se secaron y se hicieron autorradiografías. Anteriormente se mostró la actividad de unión específica a ADN de extractos nucleares preparados a partir de las células transfectadas indicadas con ARNsh. Se muestra la posición de la sonda libre.

La **FIG. 6** muestra que la genosupresión del ARNi de la expresión de uPA-uPAR anula el crecimiento tumoral en un modelo ortotópico de tumor de próstata en ratón. Fotografías *in situ* representativas de cada grupo de tratamiento de ratones que portan tumores ortotópicos de PC3 (A). El tumor de próstata primario se marca con flechas discontinuas y las flechas sólidas indican la posición de la metástasis. Las células PC3 se trasplantaron por vía intraprostática en ratones atímicos y los tumores de próstata de PC3 establecidos se trataron con ARNsh específico para uPA, uPAR y uPAuPAR. Después de 4 semanas del tratamiento de estos constructos, los ratones se sacrificaron y se evaluaron para crecimiento del tumor de próstata primario y metástasis de forma visual. Una comparación de tumores de próstata diseccionados de cada grupo de tratamiento de ARNsh (B). Cada barra representa la DT media del peso tumoral de seis animales por grupo. Las diferencias significativas de los grupos de control (es decir, simulados o tratados con EV/SV) se representan con asteriscos \* ( $P < 0,05$ ). Las muestras de proteína extraída de tumores de próstata de PC3 de seis animales por grupos se analizaron usando

inmunotransferencia para niveles de expresión de uPA y uPAR (C). La GAPDH se incluyó como un control de carga.

La **FIG. 7** demuestra que la genosupresión del ARNi de la expresión de uPA y uPAR anula de forma simultánea el crecimiento tumoral en un modelo ortotópico de tumor de próstata de ratón. Fotografías *in situ* de cada grupo de tratamiento de ratones que portan tumores ortotópicos de PC3 (A). El tumor de próstata primario se marca con flechas discontinuas y las flechas sólidas indican la posición de la metástasis. Las células PC3 se trasplantaron por vía intraprostática en ratones atímicos y los tumores de próstata de PC3 establecidos se coinyectaron con los vectores tanto sh-upA como sh-uPAR. Después de 4 semanas del tratamiento de estos constructos, los ratones se sacrificaron y se evaluaron para crecimiento del tumor de próstata primario y metástasis de forma visual. Una comparación de tumores de próstata diseccionados de cada grupo de tratamiento de ARNsh (B). Cada barra representa la DT media del peso tumoral de seis animales por grupo. Las diferencias significativas de los grupos de control (es decir, simulados o tratados con EV/SV) se representan con asteriscos \* ( $P < 0,05$ ).

Las muestras de proteína extraída de tumores de próstata de PC3 de seis animales por grupos se analizaron usando inmunotransferencia para niveles de expresión de uPA y uPAR (C). La GAPDH se incluyó como un control de carga. Secciones representativas de hematoxilina y eosina de los tumores ortotópicos de próstata de ratón PC3 (D). Se recogieron tumores de próstata primarios de cada grupo de tratamiento al final del experimento. Los tumores se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Se prepararon secciones de tejido (5  $\mu$ m) y se tiñeron con H y E para análisis histopatológico. Tinción con ADN fragEL de secciones de parafina microdiseccionadas de tumores de próstata establecidos a partir de los grupos de tratamiento indicados (E). Se realizaron ensayos de marcado de extremo del fragmento de ADN. Los resultados se muestran con un aumento de 40X excepto para la caja, que tiene un aumento de 200X. Diagrama de barras que muestra datos cuantitativos de células marcadas con ADN fragEL de seis campos aleatorios por grupo de tratamiento (F). Las diferencias significativas de los grupos de control se indican con asteriscos \* ( $P < 0,05$ ).

La **FIG. 8** muestra una representación esquemática de la representación del ARNsi para uPAR y MUMP-9 del vector pUM. Se desarrollaron constructos del plásmido pcADN 3 con dos repeticiones invertidas complementarias dirigidas por un promotor de CMV dirigido frente a uPAR y MMPs-9. El promotor de CMV dirige la formación de una estructura de horquilla doble que, a su vez, se procesa por el ARN bicatenario que reconoce la enzima DICER para formar moléculas de ARNsi viables. La estabilidad de la molécula de horquilla doble se asegura porque la estructura secundaria de la molécula que recuerda a una molécula de ARNm que tiene una cola de poli A dirigida por una secuencia de señal poli-a de hormona de crecimiento bovina (BGH).

La **FIG. 9** ilustra si el ARN de horquilla larga (hp) se procesa a ARNsi; si se transfectan unas moléculas en células SNB19 con control/EV, SV, puPAR, pMMP-9 y pUM; si las células también se transfectaron con un constructo sin relacionar dirigido a células GFP en células distintas de GFP para determinar el procesamiento de las moléculas de ARNsi apropiadas. Se permitió que las moléculas pequeñas de ARN fraccionadas en un gel de agarosa al 2 % se hibridaran con oligo sentido marcado con DIG apropiado en presencia de 6x SSC. La solución de híbrido resultante se realizó en un gel de poliacrilamida al 15 % y se sometió a electrotransferencia en una membrana de nailon. La membrana se procesó para visualizar el híbrido de ADN:ARN de 21 pb de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las sondas usadas se representan como números (véase la Tabla 1), 1-suPAR, 2-sMMP-9 y 3-sGFP (FIG. 9A). Las células SNB19 se transfectaron con control/EV (*calle a*), SV (*calle b*), puPAR (*calle c*), pMMP-9 (*calle d*) y pUM (*calle e*) de acuerdo con protocolos convencionales conocidos por los expertos en la materia. 72 h más tarde, el ARN total se aisló y la primera hebra de ADNc se sintetizó usando un kit de síntesis de ADNc (Invitrogen) (FIG. 9B). La reacción de PCR se preparó usando la primera hebra de ADNc como el molde para uPAR y Mump-9; la PCR para GAPDH también se preparó para que sirviera como control de carga (véase la Tabla 1).

La **FIG. 10** caracteriza análisis de transferencia de Western para uPAR y zimografía de gelatina para MMP-9. Las células SNB19 se transfectaron con simulado, un vector vacío/codificado y un vector que codifica ARNsi individual o bicistrónico para uPAR y Mump-9 (puPAR, pMMP-9, pUM). (A) Análisis de transferencia de Western de expresión de proteína uPAR en lisados celulares de células SNB19 transfectadas con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM. El análisis de transferencia de Western se realizó usando un anticuerpo específico para uPAR. La GAPDH se inundó detectó de forma simultánea para verificar la carga de cantidades similares de lisados celulares. (B) Medios acondicionados que contienen cantidades iguales de proteína (20  $\mu$ g) de células transfectadas de EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM se mezclaron con tampón de muestra Laemmli y se realizaron en geles de SDS-PAGE al 10 % que contenían gelatina al 0,1 % para determinar la actividad de MMP-9 con zimografía de gelatina.

La **FIG. 11** demuestra que la regulación negativa mediada con ARNi de uPAR y MUMP-9 reduce la proliferación de células SNB19 de glioma. En resumen,  $5 \times 10^4$  células SNB19 transfectadas con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pCM se sembraron en microplacas de 96 pocillos revestidas con VN en condiciones sin suero. El número de células viables se evaluó con ensayo de MTT.

La **FIG. 12** ilustra que el ARNi disminuyan los niveles de SPAR y MMP-9 como se muestra con análisis inmunohistoquímico con y angiogénesis inducida por tumor. (A) Las células SNB19 se transfectaron con EV, SV, puPAR, pMMP-9 y pUM. También se usaron células de control o sin transfectar. 72 h después de la transfección, las células se mezclaron y se procesaron para visualizar la expresión de uPAR y MMP-9 *in vivo*. Las células se montaron usando medios de montaje con DAPI para visualizar el núcleo. (B) Las células SNB19 ( $2 \times 10^4$ ) se sembraron en portaobjetos de cámara de 8 pocillos y se transfectaron con simulado EV, puPAR, pMMP-9 y pUM. Después de 24 h de incubación, el medio se retiró y las células se cocultivaron con  $4 \times 10^4$  células del endotelio

dérmico microvascular humano. Después de 72 h, las células endoteliales se investigaron con anticuerpo para antígeno del factor VIII o se tiñeron con H y E y se examinaron con microscopio láser de barrido confocal. (C) Cuantificación de la angiogénesis en cultivos transfectados con simulado EV, puPAR, pMMP-9 y vector pUM o vector pUM. Los valores son la media  $\pm$  D.T. de tres experimentos diferentes. Inhibición de la angiogénesis tumoral en vector pUM con ensayo de ventana dorsal de ratón (D). PV, vasculatura existente previamente, TN, tumor induce vasculatura.

La **FIG. 13** demuestra que el ARNsi para uPAR y MMP-9 inhibe la invasión de células SNB 19. Se permitió que las células SNB19 ( $1 \times 10^6$ ) transfectadas con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM migraran a través de insertos de Transwell revestidos con Matrigel (poros de 8  $\mu$ m) durante 24 h. Las células que invadían a través de los insertos revestidos con Matrigel se tiñeron, se hizo recuento y se fotografiaron con microscopía de luz con un aumento de 20X. (A) El porcentaje de invasión se cuantificó. Los valores son la media  $\pm$  D.T. de cinco experimentos diferentes ( $P < 0,001$ ). Se seleccionaron esferoides de células SNB19 (fluorescencia) de 100-200  $\mu$ m de diámetro, se transfectaron con EV/SV, puPAR, puMMP-9 y pUM y se cocultivaron con agregados de cerebro de rata fetal (fluorescencia de color verde). La destrucción progresiva de agregados de cerebro de rata fetal y la invasión de células SNB19 se observó durante 72 h usando microscopía de barrido láser confocal. (C). Los volúmenes restantes de los agregados de cerebro o esferoides tumorales a las 24, 48 y 72 h se cuantificaron usando software de análisis de imágenes (D).

La **FIG. 14** analiza la regresión mediada por ARNi de agregados intracerebrales establecidos previamente en crecimiento tumoral. Las células SNB19-GFP de glioblastoma se inyectaron por vía intracerebral ( $2 \times 10^6$  células en 10  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato buffer) en ratones atímicos. Después de 10 días, se usó simulado EV, puPAR, pMMP-9 y pUM (150  $\mu$ g de cada vector se inyectaron en el cerebro usando mini bombas de Alzet a la tasa de 0,25  $\mu$ l/h (ocho ratones en cada grupo). Se examinaron secciones de tumor fotomicrografiadas para fluorescencia con GFP (A) y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (B). Semicuantificación del volumen tumoral en grupos tratados con EV simulado, puPAR, pMMP-9 y vector pUM después de 4-6 semanas después de inyección intracraneal de estas células (C). Los datos mostrados son valores de  $\pm$  D.T. de ocho animales de cada grupo. En otro conjunto de experimentos, 10 días después de inyección intracerebral de células SNB19 GFP, el vector pUM se inyectó por vía intraperitoneal dos veces en un intervalo de 3 días y los animales se sacrificaron después de 4 meses.

La **FIG. 15** muestra que la regulación negativa mediada por ARNi de uPAR y MMP-9 reduce la fosforilación de ERK, MAPK y AKT. Análisis de transferencia de Western de formas totales y fosforiladas de MAPK, ERK y AKT. Las células SNB19 se transfectaron con EV/SV, puPAR, MMP-9 y pUM en placas revestidas con VN y las células acondicionadas sin suero se lisaron 72 h después y se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia con las formas totales y fosforiladas de anticuerpos MAPK, ERK y AKT. Los anticuerpos de GADPH se usaron para verificar que se cargaban cantidades similares de proteína en cada calle.

La **FIG. 16** es una presentación esquemática de vector uPAR y MMP-9 (A) y sucesos celulares en la superficie celular (B). Después de activación de plasminógeno en plasmina, que a su vez activa las MMP, liberación de uPA de varios factores de crecimiento después de la degradación de la ECM. La presentación esquemática demostraba la implicación de las integrinas en varias moléculas de ruta de señalización.

La **FIG. 17** es una representación esquemática que muestra la formación de moléculas de ARNhp a partir de un solo constructo de repetición invertida doble dirigida de CMV para catepsina B y uPAR. El promotor viral de CMV dirige la formación de una molécula de ARN que posee repeticiones invertidas autocomplementarias para catepsina B y uPAR.

La **FIG. 18** muestra análisis de transferencia de Western para uPAR y catepsina B. Las células SNB19 se transfectaron con simulado, un vector vacío y un vector que codifica ARNsi para catepsina B y uPAR (pCU). Análisis de transferencia de Western de niveles de proteína de catepsina B (A) uPAR (C) lisados celulares de células SNB19 transfectadas con simulado, vector vacío y pCU se realizó usando un anticuerpo específico para catepsina B y uPAR. La  $\beta$ -actina se sometió a inmunoinvestigación de forma simultánea para control de carga. La cuantificación de la catepsina B (B) y proteína uPAR (D) se obtuvo mediante barrido de los autorradiogramas con densitometría.

La **FIG. 19** muestra que el ARNi inhibe la formación de redes capilares inducidas por células tumorales. Las células SNB19 se transfectaron con simulado, vector vacío, pC, pU y pCU durante 24 horas. A continuación, las células cocultivaron con células endoteliales de dermis humana durante 48 h. Después de incubación, las células se fijaron y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2 % durante 1 h y las células endoteliales se investigaron con anticuerpo para antígeno del factor VIII. (Anticuerpo del Factor VIII, DAKO Corporation, Carpintería, California) o tinción con H y E y se examinaron con microscopio confocal de barrido láser (A). Cuantificación de la angiogénesis en cocultivos infectados con simulado, vector vacío o vector pCU (B). Inhibición de la angiogénesis tumoral en células SNB19 infectadas con vector pCU con ensayo de ventana dorsal de ratón (C). PV, vasculatura existente previamente, TN, vasculatura inducida por tumor.

La **FIG. 20** demuestra que el ARNi inhibe la migración y la invasión de células de glioma. Los esferoides de SNB19 GFP se infectaron con simulado, vector vacío, pC, pU y pCU. Después de 72 h, esferoides de un solo glioma se colocaron en el centro de un pocillo revestido con vitronectina de una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 48 h. Al final del ensayo de migración, los esferoides se fijaron y se fotografiaron (A). La migración de las células de los esferoides se midió usando un microscopio calibrado con una plataforma y un micrómetro ocular (B). Los datos mostrados son el valor medio  $\pm$  D.T. de los resultados de cuatro experimentos independientes de cada grupo. Las células SNB19 se tripsinaron 72 h después de la transfección con simulado, vector vacío, pC, pU y pCU, se lavaron con PBS y se volvieron a suspender en medio sin suero. Los ensayos de

invasión se realizaron en una unidad Transwell de 12 pocillos (Costar, Cambridge, Massachusetts) en filtros de policarbonato con poros de 8  $\mu\text{m}$  revestidos con Matrigel. Después de un periodo de incubación de 24 h, las células que habían pasado a través del filtro en los pasillos inferiores se tiñeron, se hizo frecuente se fotografiaron con microscopio de luz (C). El porcentaje de invasión se cuantificó (D). Los valores son la media  $\pm$  D.T. de 5 experimentos diferentes ( $P < 0,001$ ). Los esferoides de las células SNB19 se transfectaron con simulado, vector vacío, pC, pU y pCU y se tiñeron con Dil y se cocultivaron agregados de cerebro de rata fetal teñidos con DiO. Se observó la destrucción progresiva de los agregados de cerebro fetal con esferoides tumorales (E). Cuantificación de los agregados de cerebro fetal restantes con esferoides de SNB19 infectados con vector vacío, pC, pU o vector pCU (F).

La **FIG. 21** muestra que la regulación negativa mediada por el ARNi de uPAR y Catepsina B reduce la proliferación de células SNB 19 de glioma. Ensayo de proliferación. En resumen, se sembraron  $5 \times 10^4$  células SNB19 transfectadas con PBS, EV, SV, pU, pC y pCU en microplacas de 96 pocillos revestidas con VN en condiciones sin suero. El número de células viables se evaluó con el ensayo de MTT. Se muestran los valores medios ( $\pm$  D.T.) de tres experimentos por separado.

La **FIG. 22** ilustra que la regulación negativa mediada por el ARNi de uPAR y Catepsina B reduce la fosforilación de ERK y FAK. Análisis de transferencia de Western de proteínas ERK, FAK, totales y fosforiladas usando sus anticuerpos específicos después de la transfección de células SNB19 con constructos de simulado, EV, SV, pU, pC y pCU. Los niveles de  $\beta$ -actina sirvieron como control de carga.

La **FIG. 23** muestra la regresión mediada por ARNi del crecimiento tumoral establecido previamente. Las células tumorales SNB19 GFP se inyectaron por vía intracerebral con la ayuda de un marco estereotáctico en ratones atímicos. Después de 1 semana, cualquiera de un vector vacío o un vector que expresa ARNsi para catepsina B y uPAR (pCU) o por separado con pC o pU se inyectó en el cerebro usando una bomba mini osmótica de Alzet. Las secciones de tumor fotomicroografiadas se observaron para fluorescencia de GFP (A) y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (B). Semicuantificación del volumen tumoral en grupos tratados con vector simulado/vacío, pU, pC y vector pCU después de 5 semanas. Los datos mostrados son los valores de  $\pm$  D.T. de 6 animales de cada grupo ( $*P < 0,001$ ) (C).

La **FIG. 24** es una representación esquemática de la formación de moléculas de ARNhp de un solo constructor de repetición tri-invertida, dirigida por CMV para uPAR, uPA y MMP-9. El promotor viral de CMV potente dirige la formación de una molécula de ARNcr posee repeticiones invertidas autocomplementarias para uPA, uPAR y MMP-9.

La **FIG. 25** es un análisis de transferencia de Western, zimografía de fibrina/gelatina e inmunohistoquímico de uPA y MMP-9. Las células SNB19 se transfectaron con simulado o se transfectaron con un vector vacío/vector codificado (EV/SV) y vectores que codifican ARNsi uPAR (puPAR), uPA (puPA), MMP-9 (pMMP-9) y una combinación de los tres puntos (pU<sub>2</sub>M). Después de un periodo de incubación de 3 días, los lisados celulares totales se prepararon en tampón de extracción y 50  $\mu\text{g}$  de proteína de estas muestras se separaron con SDS-PAGE no reductor al 12 % y se inmunotransfirieron con anticuerpo anti-uPAR (A). La GAPDH se sometió a inmunoinvestigación de forma simultánea con un control de carga. El medio acondicionado se recogió de estas muestras (20  $\mu\text{g}$ ) y se realizó zimografía de de gelatina y de fibrina para detectar la actividad de MMP-9 (B) y uPA (C). (D) Las células SNB19 ( $1 \times 10^4$ ) se sembraron en portaobjetos de cámara Lab-Tek II y se transfectaron con simulado o se transfectaron con EV/SV y vectores que codifican ARNsi puPA, puPAR y pMMP-9 ya sea de forma individual o en conjunto (pU<sub>2</sub>M). Después de 72 horas, las células se fijaron, se lavaron durante 1 hora con tampón de bloqueo y se tiñeron para expresión de uPAR, uPA y MMP-9 usando anticuerpos específicos para uPA, uPAR y MMP-9.

La **FIG. 26** ilustra la inhibición de la angiogénesis de glioma y la invasión con constructos de ARNsi. Las células SNB19 ( $2 \times 10^4$ ) se sembraron en portaobjetos de cámara de 8 pocillos y se transfectaron con EV/SV directores que codifican ARNsi uPAR (puPAR), uPA (puPA), MMPs-9 (pMMP-9) y una combinación de los tres puntos (pU<sub>2</sub>ND). Después de un periodo de incubación de 24 horas, en medio se retiró, las células se cocultivaron con cualquiera de  $4 \times 10^4$  células endoteliales humanas o  $4 \times 10^4$  células endoteliales solas y se cultivaron en presencia de medios acondicionados. Después de 72 horas las células endoteliales se tiñeron para antígeno del factor VIII en los cocultivos (fluorescencia de color verde). Las células cultivadas en los medios acondicionados conservados se tiñeron con H y E y se examinaron con cualquiera de un microscopio fluorescente o un microscopio de campo brillante (A). (B) Cuantificación del angiogénesis en cocultivos infectados con vectores EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M. Los valores son la media  $\pm$  D.T. de cuatro experimentos. Las células SNB19 se tripsinaron 72 horas después de transfección con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M, se lavaron con PBS y se volvieron a suspender el medio sin suero. (C) se realizaron ensayos de invasión en una unidad Transwell de 12 pocillos en filtros de policarbonato con poros de 8  $\mu\text{m}$  revestidos con matrigel ( $0,7 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Después de un periodo de incubación de 24 horas, las células que habían pasado a través del filtro en los pocillos inferiores se tiñeron, se hizo recuento se fotografiaron el microscopio de campo brillante. (D) el porcentaje de invasión se cuantificó.

La **FIG. 27** muestra la inhibición y la regresión de la capacidad de invasión y crecimiento tumoral con ARNsi con ensayos de esferoides e intracraneales. (A) La capacidad de invasión de esferoides de glioma se mediante cocultivo de esferoides de glioma con agregados del cerebro de rata fetal. Los esferoides de células SNB19 se transfectaron con EV/SV, puPA, puPAR, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M y se tiñeron con Dil y se cocultivaron con agregados de cerebro de rata fetales teñidos con DiO. Las secciones de 1  $\mu\text{m}$  de espesor en serie se obtuvieron desde la superficie a través del centro de los cocultivos con un microscopio de barrido láser confocal en los puntos temporales indicados. (B) Se midió el volumen restante del agregado de cerebro de rata transfectado con EV/SV,



puPA, puPAR, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M. Los valores son la media  $\pm$  DT de tres experimentos. (C, D) Regresión mediada por ARN de crecimiento de tumor establecido previamente. Las células SNB19 GFP en suspensión ( $2 \times 10^6$  en 10  $\mu$ l de medio sin suero) se inyectaron por vía intracraneal. Una semana más tarde, los ratones se inyectaron con cualquiera de los vectores de expresión de EV/SV o ARNsi (puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M) usando una bomba mini osmótica de Alzet (constructos diluidos a  $1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  en PBS e inyectados a  $0,25 \mu\text{g hora}^{-1}$ , con seis ratones en cada grupo). Después de un periodo de seguimiento de 5 semanas, los ratones sacrificaron, sus cerebros se extrajeron, se embebieron en parafina y se seccionaron. Las secciones se observaron con microscopía de fluorescencia para células que expresaban GFP. (D) La semicuantificación del volumen tumoral en grupos tratados con control, EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M se evaluó después de 5 semanas. Los datos se muestran como media  $\pm$  DT de seis animales de cada grupo.

La **FIG. 28** demuestra que la regulación negativa mediada con el ARNi de uPAR, uPA y MMP-9 reduce la fosforilación de ERK. Análisis de transferencia de Western de proteína ERK (pERK) total y fosforilada después de transfección de células de glioblastoma con constructos de EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M. Los niveles de GAPDH sirvieron como control de carga.

La **FIG. 29** es una representación esquemática de la expresión del ARNsi para catepsina B y MMP-9 de constructos de vector pCM: plásmido pCADN 3 desarrollados con dos repeticiones invertidas complementarias dirigidas por un promotor de CMV dirigido frente a catepsina B y MMP-9. El promotor de CMV dirige la formación de una estructura de horquilla doble que, a su vez, se procesó con el ARN bicatenario que reconoce la enzima DICER para formar moléculas de ARNsi viables. La estabilidad de la molécula de horquilla doble se aseguró debido a la estructura secundaria de la molécula que recuerda a una molécula de ARNm que tiene una cola de poli A dirigida por una secuencia señal de poli-a de hormona de crecimiento bovina (BGH).

La **FIG. 30** confirma que el ARN de interferencia disminuía los niveles de catepsina B y MMP-9 en células SNB19 cells. Los lisados de células totales y el medio sin suero se recogieron de células SNB19 transfectadas con simulado, vector vacío o un vector que codifica ARNsi para MMP-9 (pM) y catepsina B (pC) y en conjunto (pCM). Posteriormente, se separaron 30  $\mu$ g de proteína de estas muestras en condiciones no reductoras en SDS-PAGE de un 8 % a un 12 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se investigaron con anticuerpos para Catepsina B (A) y MMP-9 (C) y con anticuerpo secundario apropiado (conjugado de peroxidasa de rábano picante) y se desarrollaron de acuerdo con el protocolo del fabricante (Amersham, Arlington Heights, Illinois). La  $\beta$ -actina se inmunodetectó de forma simultánea para verificar la carga de cantidades similares de lisados celulares. La actividad de MMP-9 de las células SNB19 infectadas con vector vacío, pC, pM o vector pCM durante 3 días en medio sin suero y se determinó con zimografía de gelatina (B).

La **FIG. 31** muestra que el ARNi inhibe la formación de redes capilares inducidas por células tumorales tumor. Las células SNB19 se transfectaron con simulado, vector vacío, pM, pC y pCM durante 24 h. A continuación, las células se cocultivaron con células endoteliales de dermis humana durante 48 h. Después de incubación, las células se fijaron y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2 % durante 1 h y las células endoteliales se investigaron con anticuerpo para antígeno de factor VIII. (Anticuerpo de Factor VIII, DAKO Corporation, Carpintería, California) y se examinaron con microscopía de fluorescencia después de investigar con un anticuerpo secundario conjugado con FITC apropiado. Las células endoteliales crecieron en presencia de medios acondicionados con SNB19 (control, vector vacío, PM, pC, o pCM transfectados) que se tiñeron con H y E y se fotografiaron (A). Cuantificación de la angiogénesis en cocultivos infectados con simulado, vector vacío o vector pCM (B). Inhibición de la angiogénesis tumoral en células SNB19 infectadas con vector pCM mediante ensayos de pliegue cutáneo dorsal de ratón (C). Vasculatura preexistente a PV, vasculatura inducida por tumor TN. Se tomaron fotografías os han microscopía de luz (panel superior) y para fluorescencia con FITC (panel inferior) para determinar la presencia de vasculatura recién desarrollada.

La **FIG. 32** demuestra que el ARNi inhibe la migración y la invasión de células de glioma. Los esferoides de SNB19 GFP se infectaron con simulado, vector vacío y un vector que codifica ARNsi para catepsina B y MMP-9 (pCM). Después de 3 días, esferoides de un solo glioma se colocaron en el centro de una placa de 96 pocillos revestida con los pocillos revestidos con vitronectina y se cultivaron durante 48 h. Al final del ensayo de migración, los esferoides se fijaron y se fotografiaron (A). Las células SNB19 se tripsinaron 3 días después de la transfección con simulado, vector vacío y un vector que codifica ARNsi para catepsina B y MMP-9 (pCM), se lavó con PBS y se volvió a suspender en medio sin suero. Los ensayos de invasión se realizaron en una unidad Transwell de 12 pocillos (Costar, Cambridge, Massachusetts) en filtros de policarbonato con poros de 8  $\mu$ m revestidos con Matrigel. Después de un periodo de incubación de 24 h, las células que habían pasado a través del filtro en los pocillos inferiores se tiñeron, se hizo recuento y se fotografiaron con microscopio de luz (B). Los esferoides de células SNB 19 se transfectaron con simulado, vector vacío y un vector que codifica ARNsi para catepsina B y MMP-9 (pCM) y se tiñeron con Dil y se cocultivaron con agregados de cerebro de rata fetal teñidos con DiO. Se observó destrucción progresiva de agregados de cerebro fetal con esferoides tumorales (C).

La **FIG. 33** muestra la regresión mediada con ARNi del crecimiento tumoral establecido previamente. Las células tumorales SNB19 GFP se inyectaron por vía intracerebral con la ayuda de un marco estereotáctico en ratones atímicos. Después de 1 semana, cualquiera de un vector vacío o un vector que expresa ARNsi para catepsina B y MMP-9 (pCM), catepsina B (pC) o MMP-9 (pM) se inyectó en el cerebro usando una bomba mini osmótica de Alzet. Las fotografías de secciones de tumor se observaron con fluorescencia de GFP (A) y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (B). Se realizó semicuantificación del volumen tumoral en grupos tratados con vector simulado/vacío, vector pM, pC y pCM después de 5 semanas. Los datos mostrados son los valores de  $\pm$  D.T. de 6 animales de cada grupo (\*P < 0,001) (C). En otro experimento, 10 días después de inyección intracerebral, el vector pCM se inyectó por vía intraperitoneal dos veces y los animales se sacrificaron después

de 4 meses (D).

La **FIG. 34** es una representación esquemática de promotor de ARN pol II (CMV) para la inducción de ARNi.

La **FIG. 35** es una representación esquemática de promotor basado en ARN pol III (U6) para la inducción de ARNi.

5 La **FIG. 36** es una representación esquemática de producción de adeno virus recombinante.

La **FIG. 37** indica células SNB19 GFP transfectadas con ARNi para expresión de GRP o GRP que muestra simulado.

10 La **FIG. 38** muestra la expresión de OAS en células SNB 19 transfectadas con vectores de ARNi dirigidos por ARN pol II (CMV) o ARN pol III (U6) que se determinó con RT-PCR. La RT-PCRT para GAPDH sirvió como control.

15 La **FIG. 39** demuestra la regulación negativa de uPAR y uPA como se determina mediante análisis de transferencia de Western y zimografía de fibrina de lisados de células SNB 19 de células afectadas con cualquiera de promotores dirigidos por U6 o CMV. Plásmidos de ARNi para vector codificado (SV), plásmido que expresa ARNi para uPAR (puPAR), uPA (puPA) y constructo bicistrónico de uPAR-uPA (pU2). La GAPDH se investigó para control de carga.

La **FIG. 40** es una representación esquemática de constructos de expresión de ARNsi usados para determinar la inducción de respuesta inmune celular.

20 La **FIG. 41** muestra la determinación de la expresión de la 2'5'-oligoadenilato sintetasa (OAS1) en células SNB19 transfectadas con casete de expresión circular (C), lineal (L) o poli A con señal suprimida ( $\Delta$ ) para vector vacío (EV), vector codificado (SV), constructos de expresión de ARNsi para uPAR (puPAR), uPA (puPA) y constructo bicistrónico para uPAR y uPA (pU2) con RT-PCR. La RT-PCR se normalizó con GAPDH. La expresión de OAS1 se cuantificó tal como se muestra.

25 La **FIG. 42** es una representación esquemática de la estructura secundaria predicha de transcritos de EV y SV que no muestran estructura de tipo inductor de ARNi viable RNA y transcrito predicho de puPAR, puPA y pU2 con poli A y sin poli A pU2 $\Delta$ ).

La **FIG. 43** es una representación esquemática de la estructura secundaria parcial de transcrito de pU2 que muestra estructura secundaria en el espacio. La estructura secundaria en el espacio no se parece con la del ARNm.

30 La **FIG. 44** muestra RT-PCR en un ARN total aislado a partir de control (C), uPAR antisentido (como uPAR), uPA antisentido (como uPA) y constructos de ARNi para uPAR (puPAR), uPA (puPA), uPAR-uPA (pU2), GFP (pGFP), vector vacío (pEV), y vector codificado (pSV) para niveles de ARN en uPA, uPAR y OAS. La GAPDH sirvió como control.

35 La **FIG. 45** muestra la hibridación *in situ* del promotor de CMV en ratones inyectados IP. Se usó sonda en secciones de cráneo de ratones infectados por vía intraperitoneal con solución salina (Simulado), vector vacío (EV), vector codificado (SV), vectores de expresión de ARNi para uPAR (puPAR), uPA (puPA), y constructo bicistrónico de uPAR-uPA (pU2), para la presencia de promotor de CMV que contenía ADN mediante marcado con sonda de ADN con fosfatasa alcalina (AP). La actividad de AP se detectó con sustrato Western Blue para AP (Promega, Madison, WI).

#### 40 Descripción detallada

Los ARN de horquilla pequeña (ARNsh), también denominados ARN interferencia pequeños (ARNsi), genes humanos diana tales como uPA y uPAR para inhibir el crecimiento tumoral, invasión tumoral, y proliferación tumoral. Los constructos de ARNsi inhibían de forma significativa la expresión de uPA y uPAR a los niveles tanto del ARNm  
45 como de proteínas en una línea de células PC3 de cáncer de próstata altamente metastásico. La genosupresión de uPA-uPAR en células PC3 dio como resultado una reducción significativa de la invasión de células tumorales como se indica, por ejemplo, con un ensayo de invasión en Matrigel. El silenciamiento simultáneo de los genes para uPA y uPAR usando un solo constructor de plásmido que expresa los ARNsh tanto para uPA como para uPAR redujo de forma significativa la viabilidad celular y también dio como resultado la inducción de la muerte celular apoptótica. El  
50 ARNi para uPA y uPAR también anuló la señalización de uPA-uPAR a moléculas diana corriente abajo tales como quinasas 1/2 (ERK1/2) reguladas por señal extracelular y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Stat 3). La inyección intratumoral con un constructo de plásmido que expresa los ARNsh para uPA y uPAR inhibió de forma significativa el crecimiento tumoral establecido y la supervivencia en un modelo ortotópico de cáncer de próstata de ratón. La evidencia de una red de señalización que funciona corriente abajo de uPA-uPAR que avanzar  
55 de forma activa la invasión de células tumorales, proliferación y supervivencia de células de cáncer de próstata está sin cubrir. El direccionamiento de uPA y uPAR dirigido por ARNi y los correspondientes ARNsi son nuevos agentes terapéuticos para terapia para el cáncer, que incluye cánceres de próstata.

60 La degradación del ARN diana de uPAR y MMPs-9 mediada por ARNsi en líneas de células de glioma humano dio como resultado la inhibición tumoral. El ARNi dirigido hacia uPAR y MMP-9 consiguió una inhibición específica de uPAR y de MMPs-9. Un constructo bicistrónico (pUM) inhibió la formación de estructuras de tipo capilar en modelos de angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. El bloqueo de la expresión de uPAR y MMP-9 dio como resultado la inhibición significativa de la invasión de tumor de glioma en modelos de ensayo de invasión en Matrigel y esferoides. El ARNi para uPAR y MMP-9 inhibió la proliferación celular y redujo los niveles de las formas fosforiladas de  
65 moléculas de la ruta de señalización de MAPK, ERK y AKT cuando se comparan con células SNB19 precursoras y transfectadas con vector vacío/vector codificado (EV/SV). Además, el uso de ARNi para dirigir de forma simultánea

dos moléculas de proteasa e inyectar estos constructos por vía intracerebral *in vivo* usando mini bombas de Alzet o inyecciones intraperitoneales dio como resultado la regresión significativa del crecimiento tumoral intracerebral establecido previamente. El uso de vectores de expresión de ARNsi de horquilla para uPAR y MMP-9 proporciona una herramienta terapéutica eficaz para terapia para el cáncer, incluyendo glioblastoma.

5 En otra realización, el enfoque de ARNi silenció la expresión de uPAR y de catepsina B. El ARNi se para inhibir la expresión de proteasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular, un elemento característico de la progresión del tumor. El ARNi de uPAR y catepsina B redujo la invasión de células de glioma y la angiogénesis en modelos *in vitro* e *in vivo*. Las inyecciones intratumorales de vectores de plásmido que expresan ARNhp (ARNsi) para uPAR y catepsina B dieron como resultado la regresión de tumores intracraneales establecidos previamente. El ARNi para uPAR y catepsina B inhibió la proliferación celular y redujo los niveles de pERK y pFAK en comparación con los controles. El ARNi funciona en células de glioma humano y proporciona una base para terapia genética para el cáncer, que incluye glioblastoma.

15 El enfoque de ARNi silencio la expresión de uPA, uPAR y MMP-9 en células tumorales. Un molde de ADN dirigido por el promotor de citomegalovirus (CMV) en un solo constructo tricistrónico indujo al ARNi desencadenado por ARN de horquilla (ARNhp) a que inhibiera la expresión genética de uPA, uPAR y MMP-9 con un solo constructo. Se encontró que los niveles de proteína uPAR y la actividad enzimática de uPA y MMP-9 disminuían de forma significativa en células transfectadas con un plásmido que expresa ARNsi de horquilla para uPAR, uPA y MMP-9. Las células SNB19 transfectadas con pU2M disminuían de forma significativa la expresión de uPA, uPAR y MMP-9 en comparación con células con simulado y transfectadas con EV/SV, determinada con análisis inmunohistoquímico. Los constructos individuales para estas moléculas dieron como resultado una inhibición específica de sus respectivos niveles de proteína, como se demuestra con análisis inmunohistoquímico. Después de transfección con un vector de plásmido que expresa ARNds para uPA, uPAR y MMP-9, la invasión de células de glioma se retraso en comparación con grupos simulados y tratados con EV/SV, demostrado con un ensayo de invasión en Matrigel y ensayo de invasión de esferoides. La regulación negativa de uPA, uPAR y MMP-9 usando ARNi inhibió la angiogénesis en un modelo *in vitro* (cocultivo). Las inyecciones intratumorales directas de ADN de plásmido que expresa ARNhp para uPA, uPAR y MMP-9 también revertieron de forma significativa los tumores intracraneales establecidos previamente en ratones atímicos. Las células tratadas con ARNi para uPAR, uPA y MMP-9 mostraron niveles ácidos de pERK en comparación con las células SNB 19 precursoras y tratadas con EV/SV. La represión simultánea de uPAR, uPA y MMP-9 es una herramienta terapéutica para tratar cánceres.

Un ARN de horquilla de ADN dirigido por promotor de citomegalovirus (CMV) (ARNhp, ARNsi) de un solo constructor, bloqueó la expresión genética de MMP-9 y catepsina B. La transfección de un vector de plásmido que expresa ARNds para MMP-9 y catepsina B inhibió de forma significativa la expresión de MMP-9 y catepsina B y redujo el comportamiento invasivo de la línea celular de glioblastoma, SNB 19, en modelos de invasión en Matrigel y esferoides. La regulación negativa de MMP-9 y catepsina B usando ARNi en células SNB 19 también redujo la interacción de célula-célula de células de endotelio microvascular humano, dando como resultado la alteración de la formación de red de capilares en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Las inyecciones intratumorales directas de ADN de plásmido que expresa ARNhp para MMP-9 y catepsina B inhibió de zona significativa el crecimiento del tumor de glioma establecido en la invasión en tumores intracraneales *in vivo*. Las inyecciones intraperitoneales (ip) de ADN de plásmido que expresa ARNhp para MMP-9 y catepsina B revertieron de forma completa los tumores establecidos previamente durante un periodo de tiempo significativo. La dirección simultánea mediada por ARNi de MMP-9 y catepsina B es una metodología de tratamiento adecuada para gliomas humanos.

45 El ARNhp dirigido por promotor de CMV, basado en plásmido que se dirige a uPAR, uPA y MMP-9, ya sea de forma individual o simultánea, induce ARNi en la línea de células de glioma humano, SNB 19. La regulación negativa mediada por ARNi, simultánea de uPAR, uPA y MMP-9 en células de glioma humano, SNB 19, provocó:

- 50 (1) Inhibición de invasión y angiogénesis *in vitro*.  
 (2) Regresión de tumores intracraneales establecidos previamente en ratones atímicos *in vivo*.  
 55 (3) Reducción de la fosforilación de moléculas de señalización de ERK 1 y 2.

Los ARNsi o ARNsh o ARNhp dirigidos desde un plásmido circular (por ejemplo, uPA, uPAR, MMP-9, y catepsina B o cualquier combinación de los mismos) son adecuados para inducir ARN de interferencia *in vitro*. Los ARNsi de plásmidos circulares son estables y no inducen respuesta inmune indeseable, tal como se demuestra mediante inducción con OAS1. Algunos constructos lineales de uPA, uPAR, MMPs-9, y catepsina B o cualquier combinación de los mismos también son adecuados para la inducción de ARNi.

Los ARNsi o ARNsh o ARNhp que se desvelan en el presente documento incluye nacidos nucleicos que consisten básicamente en secuencias autocomplementarias de uPA, uPAR, MMP-9, catepsina B o una combinación de las mismas. La región de lazo y el espaciador (presiones de intervención) pueden variar tanto en la longitud como en la secuencia dependiendo de la secuencia diana, el constructo, y el uso terapéutico. Las moléculas de ácido nucleico que se esperan en el presente documento se pueden modificar de forma apropiada con análogos de ácido nucleico,

derivados, o cualquier modificación adecuada para aumentar la estabilidad o eficacia de la inducción del ARNi. Las moléculas de ácido nucleico que se desvelan en el presente documento también se pueden administrar en combinación con otros agentes de activación inmune específicos de tumor, agentes de dirección de tumor, y cualquier vehículo o al silbante farmacéuticamente aceptable adecuado. Las moléculas de ácido nucleico que se desvelan en el presente documento también se pueden administrar en conjunto con otras terapias para el cáncer tales como terapia de radiación o quimioterapia.

### Ejemplos

Los ejemplos que no están cubiertos con las reivindicaciones son solamente para fines ilustrativos.

#### **Ejemplo 1. La expresión de proteína uPA y uPAR endógena está asociada con la capacidad de invasión *in vitro* de células de cáncer de próstata humano.**

Las células PC3 son altamente metastásica, mientras que las células DU145 y LNCaP son moderadamente y escasamente metastásicas, respectivamente. uPA y su receptor uPAR están implicadas en invasión y metástasis tumoral. Se compararon los niveles de estas proteínas en las tres líneas celulares de cáncer de próstata humano con diferentes potenciales metastásicos. Como se muestra en la FIG. 1A, los niveles de proteínas uPA y uPAR eran significativamente más elevados en células PC3 y DU145 en comparación con las células LNCaP escasamente metastásicas, que expresaba niveles indetectables de estas proteínas. Una tendencia similar se observó en la actividad de uPA tal como se evalúa mediante zimografía de fibrina (FIG. 1B). Por lo tanto, los niveles de proteínas uPA uPAR así como la actividad de uPA se correlacionaban de forma positiva con sus potenciales metastásicos conocidos. La capacidad de las células de cáncer de próstata para invadir Matrigel, una capa de gel formada por una base de proteínas de membrana, se examinó. Este ensayo es un modelo *in vitro* bien establecido para evaluar la capacidad de invasión tumoral. La línea de células PC3 de cáncer de próstata altamente metastásica mostró los niveles más elevados de capacidad de invasión seguido de las líneas de células DU145 y LNCaP un orden coherente con sus potenciales metastásicos conocidos (FIG. 1C y 1D). Las células PC3 eran 14 veces más invasivas y las DU145 eran 9 veces más y masivas que las células LNCaP. Se demostró una fuerte correlación entre los niveles de proteínas uPA y uPAR y la capacidad invasiva de las células de cáncer de próstata humano con diferentes potenciales metastásicos. Las líneas de células PC3 y DU145 eran más y masivas que las células LNCaP, coherente con sus potenciales metastásicos conocidos. Existe una fuerte correlación entre los patrones de expresión de uPA y uPAR y el potencial invasivo de las líneas celulares de cáncer de próstata usadas (FIG. 1). El aumento de la expresión de uPA y uPAR en líneas celulares de cáncer de próstata está asociado con el aumento de la capacidad de invasión y potencial metastásico.

#### **Ejemplo 2. Genosupresión eficaz de la expresión genética de uPA y uPAR en células PC3 de cáncer de próstata humano usando ARNi.**

El papel biológico de uPA y uPAR en la evolución del tumor de próstata se investigó usando ARNi de horquilla pequeño para genosuprimir la expresión genética de uPA y uPAR endógenas en la línea de células PC3 de cáncer de próstata humano, que expresa uPA y uPAR así como un potencial metastásico elevado. Se desarrollaron vectores de pcADN3-CMV que contenían constructos de horquilla pequeña capaces de generar oligonucleótidos de ARNi dúplex de 19 o 21 nt que corresponden a cualquiera de uPA o uPAR. Además, se construyó un solo constructo bicistrónico dirigido por promotor de citomegalovirus (CMV) para administrar horquillas pequeñas dobles dirigidas frente a uPA así como a uPAR para someter a ensayo la y calcio de la expresión de inhibición de forma simultánea de dos genes endógenos (FIG. 2A). Los vectores que expresan los ARNsh para uPA, uPAR y la combinación uPA-uPAR se transfectaron en células PC3.

Como se muestra en la FIG. 2B, el análisis de las células transfectadas con ARNsh para la expresión de uPA y uPAR mediante PCR de transcripción inversa semicuantitativa demostró una reducción específica en los niveles de ARNm para cada gen con respecto a las células transfectadas con EV/SV o células simuladas. Sin embargo, el efecto del ARNi fue mayor con el vector de ARNsh que se dirige de forma simultánea a uPA y uPAR (FIG. 2B). El análisis de ninguna transferencia de extractos celulares se realizó para determinar si la disminución de la expresión del ARNm, tal como se observa, se correlacionaba con la disminución de la traducción del producto genético. Una tendencia similar también se observó con el ensayo digno transferencia (FIG. 2C). No se observaron efectos del ARNi en la expresión de GAPDH, que se usó como un control interno para especificidad y carga al nivel del ARNm así como a nivel proteico. Además, las células transfectadas con EV/SV también mostraban que la genosupresión de uPA y uPAR dirigida por el ARNi es específica (FIG. 2B y 2C).

Además, los efectos de los ARNsh específicos de gen en la expresión de las proteínas uPA y uPAR se detectaron en células PC3 usando inmunotinción doble con anticuerpos anti-uPA y anti-uPAR. Como se muestra en la FIG. 2D, la tinción de uPA y uPAR se redujo radicalmente con los ARNsh específicos de gen en comparación con células transfectadas con EV/SV. La inmunotinción doble de uPA y uPAR disminuyó totalmente en células transfectadas con sh-uPAuPAR (FIG. 2D). Por el contrario, las células PC3 transfectadas con EV y SV presentaban una intensidad de tinción y patrones similares al de las células simuladas. Estos estudios de inmunofluorescencia se confirmaron con los análisis de RT-PCR y de inmunotransferencia.

La inhibición simultánea de dos genes usando un sistema de ARNi basado en plásmido es una herramienta útil. El ARNi regula de forma negativa eficazmente el ARNm de uPA y uPAR así como la expresión de proteínas en la línea de células PC3 de cáncer de próstata (FIG. 2B y 2C). Estos plásmidos de ARNi específicos de gen redujeron la extensión de uPA y uPAR sustancialmente en comparación con las células simuladas o transfectadas con EV/SV. Los datos de tinción inmunohistoquímica mostraban que las células simuladas o transfectadas con EV/SV rebelaban tinción positiva para uPA y uPAR, mientras que las células transfectadas con sh-uPAuPAR apenas estaban teñidas, con la excepción de la tinción nuclear con DAPI, lo que sugiere la genosupresión de la expresión de las proteínas uPA y uPAR (FIG. 2D). De forma análoga, la intensidad de la inmunotinción para uPA y uPAR se redujo con el ARNi específico de gen.

### **Ejemplo 3. La genosupresión de uPA y uPAR con ARNi inhibió la invasión en Matrigel de células PC3.**

Una de las funciones de uPA y uPAR es la promoción de la invasión, un proceso necesario para la metástasis tumoral. El impacto de la genosupresión de uPA y uPAR en la invasión de células PC3 se evaluó con un ensayo de invasión en Matrigel usando las células transfectadas con ARNsh. Cuando se comparan con células simuladas o células transfectadas con EV/SV, las células transfectadas con sh-uPAuPAR presentaban una reducción sustancial de la capacidad de invasión (FIG. 3A). La invasión de las células PC3 se redujo a un 75 % de la de los controles (es decir, células simuladas o transfectadas con EV/SV) con sh-uPA y a un 90 % con sh-uPAuPAR (FIG. 3B). Aunque la genosupresión de uPAR solo no presentaba una inhibición significativa de la invasión, la genosupresión de uPA así como de uPAR presentaba un efecto significativo (FIG. 3A y 3B), lo que sugiere que la invasión de células PC3 en Matrigel está regulada básicamente por la función coordinada de uPA y uPAR. Estos resultados muestran que la expresión de uPA y uPAR es necesaria para la invasión de cáncer de próstata así como de metástasis. El efecto de sh-uPAuPAR era tan significativo que las células apenas podían invadir a través de la membrana de Matrigel, lo que sugiere que el ARNi había indefinido en forma significativa con el sistema uPA-uPAR mediando la actividad proteolítica y la viabilidad celular.

### **Ejemplo 4. La genosupresión de uPA y uPAR con el ARNi inhibe la proliferación celular e induce apoptosis.**

Los efectos del silenciamiento de uPA y uPAR mediado por ARNi en la proliferación y la supervivencia celular se examinaron con análisis de MTT 72 h después de la transfección con ARNsh específico para uPA y uPAR (FIG. 4A). La dirección del ARNi frente a uPA no tenía efecto en la capacidad proliferativa de las células PC3, mientras que el ARNi específico para uPAR presentaba un efecto inhibitorio bajo. Por el contrario, se observó una reducción drástica en la proliferación de las células PC3 con el ARNi de forma simultánea a la dirección de uPA y uPAR (FIG. 4A). Los porcentajes de células viables se redujeron en presencia del ARNi de uPAR y uPA-uPAR en aproximadamente un 30 % y un 60 % como promedio, respectivamente, en comparación con las células de control. Estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de uPA y/o uPAR en células tumorales podrían otorgar a las células un aumento de la capacidad de crecimiento y supervivencia. Como tal, la reducción de los niveles de uPA y uPAR puede inducir apoptosis en células cancerígenas.

Para examinar esta posibilidad, las células PC3 se transformaron con plásmido se expresan sh-uPA, sh-uPAR o sh-uPAuPAR. El análisis molecular de extractos de proteína de células PC3 reveló la transfección de sh-uPAuPAR inducida con genes proapoptóticos, incluyendo Bax, caspasa 9 de Bcl-X<sub>S/L</sub> (FIG. 4B). Además, la tinción con colorante fluorescente de células PC3 transfectadas con sh-uPAuPAR con FAM-VAD-FMK reveló un aumento de la actividad de caspasa que no se detectaba en cualquiera de las células simuladas o las células transfectadas con EV/SV (FIG. 4C y 4D). El análisis de fragmentación de ADN proporcionó una evidencia adicional de inducción apoptótica. Tal como indica la FIG. 4E, las células PC3 transfectadas con sh-uPAuPAR presentaban marcado de ADN, una evidencia habitual de apoptosis, en electroforesis en gel de agarosa que no se detectaba en cualquiera de células simuladas o transfectadas con EV/SV. Este marcado de ADN era similar al de la apoptosis inducida por tratamiento con actinomicina D (FIG. 4E), confirmando de este modo que la muerte celular observada era un resultado de la apoptosis. Además, el marcado de ADN no se observaba en células transfectadas con cualquiera de sh-uPA o sh-uPAR. Estos resultados tan están de acuerdo con la inducción de caspasa 9 y aumento de la actividad de caspasa en general como se determina con FAM-VAD-FMK.

### **Ejemplo 5. La genosupresión de uPA y uPAR con ARNi inhibe su señalización corriente abajo y la tumorigénesis en ratones atómicos.**

Las consecuencias biológicas debidas al silenciamiento de uPA y uPAR pueden ser un resultado de cambios en la señalización mediada por uPA-uPAR y posteriores funciones corriente abajo. Dado que el aumento de la expresión de uPA y uPAR activa la señalización de ERK1/2, se examinó el estado de las proteínas quinasas activadas con mitógeno en las células de genosupresión de uPA-uPAR. El análisis de inmunotransferencia muestra que la fosforilación de ERK 1/2 se eliminó completamente en las células transfectadas con sh-uPAuPAR, pero no en las células de control (FIG. 5A). La fosforilación de ERK no cambió en las células transfectadas con cualquiera de sh-uPA o sh-uPAR. La actividad total, incluyendo fosforilación, de Stat 3 se suprimió básicamente en células transfectadas con sh-uPAuPAR cuando se comparaba con células de control (FIG. 5B). Además, el ensayo electroforético de desplazamiento de movilidad (EMSA) con extractos nucleares de células transfectadas con sh-uPAuPAR demostraba que la genosupresión de la expresión de uPA y uPAR inhibía la unión de los extractos a los

sitios de unión de Stat 3 marcados (FIG. 5C). Dado que la activación de Stat 3 contribuye a la estimulación de la ruta antiapoptótica, el nivel reducido de fosfo-Stat 3 así como la actividad de unión a ADN puede explicar el aumento de susceptibilidad de células PC3 transfectadas con sh-uPAuPAR a la muerte celular apoptótica. Como alternativa, la activación constitutiva de ERK puede contribuir a la supervivencia celular.

5 Se investigó si el ARNi de uPA-uPAR también suprimía la tumorigenicidad de los tumores ortotópicos de PC3 establecidos previamente en ratones atímicos. Las células PC3 se inocularon por vía intraprostática en el lóbulo lateral de la próstata. Los días 7 y 14 después de la implantación, los tumores se inyectaron con constructos de plásmido que expresaban sh-uPA, sh-uPAR o sh-uPAuPAR. A continuación, los ratones se sacrificaron 14-15 días después de la segunda dosis de tratamiento con ARNi, tal como se necesitaba con la morbilidad resultante de los tumores que se habían formado en los grupos de control. Se examinó la morfología total de los tumores primarios y sitios de metástasis (FIG. 6A). No se reservaron tumores secundarios visualmente en ratones tratados con los plásmidos sh-uPA, sh-uPAR y sh-uPAuPAR, mientras que los ratones tratados con EV, SV y simulado presentaban tumores secundarios además del tumor primario dentro de la glándula prostática (FIG. 6A). Los tumores se diseccionaron y se pesaron (FIG. 6B). Se observó una incidencia de un 90-100 % de tumores primarios así como secundarios en grupos tratados con simulado, EV y SV. Aunque los tratamientos con sh-uPA y sh-uPAR no inhibían el crecimiento del tumor completamente, los pesos de las masas tumorales formadas a partir de estos grupos de tratamiento eran menores que los tumores de los grupos de tratamiento de control (FIG. 6B). Una reducción significativa del peso tumoral se observan ratones tratados con sh-uPAuPAR. El análisis de inmunotransferencia para niveles de proteína en muestras de tumor confirmaban que los tumores tratados con sh-uPAuPAR presentaban niveles significativamente reducidos de uPA y uPAR (FIG. 6C). 150 µg adicionales de sh-uPAuPAR revertieron completamente el cáncer de próstata establecido previamente.

El análisis inmunohistoquímico se realizó en los tejidos tumorales cosechados embebidos en parafina para evaluar los efectos de sh-uPAuPAR en el comportamiento de células PC3 *in vivo*. La expresión del ARNi dirigido por sh-uPAuPAR no cambiaba la arquitectura general de la glándula prostática y la tinción con H y E mostraba una histología muy normal, mientras que la tinción revelaba células tanto tumorales como hospedadora se los grupos de control. El ARNi dirigido frente a cualquiera de uPA o uPAR sólo reducía ligeramente las células tumorales con respecto a los grupos de control. Supuestamente, no había rescate *in vivo* de la apoptosis inducida por el ARNi de uPA-uPAR. Para someter al ensayo esto, las secciones de tumor embebidas en parafina de todos los grupos de tratamiento se tiñeron para marcadores apoptóticos usando el análisis de fragmentación de ADN Klenow-FragEL DNA. Este marcado terminal de células apoptóticas demuestra diferencias significativas entre grupos de tratamiento. Los tumores de los grupos tratados con simulado, EV y SV mostraban tinción de bajo nivel, generalizada para FragEL, por lo tanto esto indica que las células tumorales estaban sanas. Por el contrario, la mayoría de las zonas de los tumores de próstata PC3 tratados con sh-uPAuPAR eran positivas para tinción con Klenow.

La coinyección intratumoral de sh-uPA y sh-uPAR también dio como resultado una regresión casi completa del crecimiento del tumor de próstata establecido previamente, mientras que los grupos de control de simulado, EV y SV mostraban tumores irreproducibles y significativos (FIG. 7A y 7B). El análisis de inmunotransferencia demostraba la genosupresión selectiva de los niveles de proteínas uPA y uPAR en tumores cotratados con constructos de sh-uPA y sh-uPAR (FIG. 7C). Este cotratamiento presentaba una histología muy normal mediante tinción con H y E mientras que los tumores de los grupos tratados con simulado, EV y SV presentaban cambio observable en la arquitectura general de la glándula prostática y la tinción con H y E mostraba células tanto tumorales como hospedadoras (FIG. 7D). La genosupresión de uPA y uPAR mediante cotratamiento también dio como resultado una inducción significativa de la muerte de células apoptóticas, tal como se revela mediante tinción de Klenow positiva (FIG. 7E y 7F). Cuando se combinan con los datos presentados en las FIGS 6A-C y 7A-F, estos resultados muestran que el tratamiento con sh-uPAuPAR, sin embargo, tiene un efecto de ARNi potente cuando se compara con el cotratamiento con sh-uPA y sh-uPAR, que provoca una reducción significativa del tamaño del tumor establecido.

Los resultados del análisis de marcado de ADN *in vitro* y un ensayo de marcado de extremo de fragmento de ADN *in vivo* muestran que la genosupresión simultánea de uPA y uPAR con ARNi basado en ARNsh induce apoptosis. La señalización corriente abajo mediada por uPA-uPAR una diana excelente para el tratamiento de cáncer de próstata independiente de hormonas. La señalización corriente abajo mediada por uPA-uPAR se requiere probablemente para invasión, supervivencia y proliferación celular en la línea de células PC3 de cáncer de próstata.

### Ejemplo 6. Señalización funcional de uPA y uPAR y su papel en la tumorigénesis

Se encontró que la expresión anómala de uPA y uPAR era una de las alteraciones más frecuentes en el cáncer de próstata en estadio avanzado. El hecho de que uPA y uPAR se sobreexpresan solamente en el estadio avanzado del cáncer de próstata sugiere que uPA y uPAR influyen en las rutas funcionales que son relevantes para determinar los fenotipos de cánceres en estadio avanzado, tales como aumento de proliferación e invasión. La invasión a través de la matriz extracelular es una etapa característica de la metástasis tumoral. La anulación de la expresión de cualquiera de uPA o uPAR para suprimir la tumorigénesis se ha conseguido usando varios enfoques diferentes. El acoplamiento de uPA con uPAR dirige varias moléculas de señalización diferentes que forman una red única de varios tipos diferentes de respuestas biológicas, tales como proliferación, migración, invasión, angiogénesis y metástasis. Estas respuestas biológicas para la unión a uPA-uPAR parece que son altamente específicas para el

tipo celular, la naturaleza de la molécula de señalización corriente abajo y el nivel de su expresión. La unión de uPA con uPAR activa ERK 1 y 2 y es esta actividad de ERK inducida la que es necesaria para la migración de células de cáncer de mama MCF-7 inducida por uPA. Una cascada de señalización que incluye FAK, Src y She es responsable de la activación y la migración celular de ERK inducidas por uPA. Por el contrario, la migración y proliferación de células de músculo liso vascular (VSMC) inducidas por uPA necesitaban activación de la ruta de Stat. En células de cáncer de mama, la actividad mitogénica inducida por uPA requiere activación de las rutas tanto de Stat como de ERK. La uPA antisentido inhibía la señalización de PI3K/Akt y sensibilizar a las células para apoptosis con estaurosporina en la línea de células SNB 19 de glioblastoma. La unión de uPA con uPAR probablemente activa las cascadas de señalización para regular la migración, invasión, proliferación y supervivencia celular.

El ARNi para uPA-uPAR en células PC3 mostraba una supresión notable de la invasión y la proliferación así como inducción de apoptosis (FIGS. 3-4). La supresión del sistema uPA-uPAR y las moléculas de señalización corriente abajo (ERK y Stat 3) se observó en células transfectadas con sh-uPAuPAR PC3 pero no en células simuladas o transfectadas con EV/SV (FIG.5). Esto sugiere que todos los cambios fenotípicos observados en estas células están mediados por la supresión de la interacción de uPA-uPAR y el estado de fosforilación de sus moléculas corriente abajo. La señalización de uPA-uPAR estimula las rutas tanto de Stat como de ERK y protege a las células cancerígenas de la muerte. Varias líneas de evidencia mostraron que las rutas tanto de ERK como de Stat 3 son capaces de proteger las células de la muerte celular apoptótica. La transfección con cualquiera de sh-uPA o sh-uPAR no desencadena la apoptosis en células PC3 (FIG. 4) y esto se puede deber a que el bloqueo de cualquiera de uPA o uPAR solo puede no influir suficientemente en las moléculas ERK y Stat 3 de señalización corriente abajo.

Dado que la señalización de uPA-uPAR modula la expresión de ERK y Stat 3, la inhibición simultánea de uPA y uPAR puede alterar estas rutas, lo que conduce a la inhibición del crecimiento y a inducción de la apoptosis. El sistema uPA-uPAR funciona probablemente como un regulador positivo de la supervivencia celular facilitando proliferación y supervivencia celular, las dos evidencias del cáncer. Por lo tanto, cuando se sobreexpresan en cánceres, uPA y uPAR proporcionan una célula cancerígena con aumento de proliferación y/o aumento de resistencia a la apoptosis. Por el contrario, la genosupresión de la expresión o función de uPA-uPAR debería inhibir el crecimiento de células cancerígenas e inducir apoptosis. La detención de la señalización mediada por uPA-uPAR mediante genosupresión de uPA y uPAR inhibía de forma simultánea el crecimiento de células cancerígenas e inducía la apoptosis. Se debe observar, que el ARNi de uPA-uPAR trabajaba en la línea de células PC3 de cáncer de próstata resistente a hormonas. Esto sugiere que la genosupresión de la expresión de uPA-uPAR con ARNi es una estrategia para inhibir el crecimiento y la supervivencia del tumor de próstata resistente a hormonas.

La implantación ortotópica de células cancerígenas humanas en ratones atímicos se parece en mayor medida a los comportamientos biológicos de estas células en seres humanos, en particular con respecto al desarrollo de metástasis. Se ha demostrado que esto es cierto en particular para células de cáncer de próstata humano, que forman tumores primarios y metástasis con una eficacia mucho menor cuando se implantan por vía ectópica en ratones atímicos. Un sistema de plásmido de ARNi basado en ARNsh representa una estrategia que puede suprimir de forma eficaz la expresión de uPA-uPAR en tumores de próstata ortotópicos como se determina mediante análisis de inmunotransferencia (FIG. 6C). Además, el tratamiento *in vivo* de tumores ortotópicos establecidos previamente con ARNi dirigido por sh-uPAuPAR demostraban una inhibición casi total del crecimiento tumoral, mientras que se observaba una reducción solamente parcial con ARNi de cualquiera de sh-uPA o sh-uPAR (FIG. 6B). Además, el cotratamiento de tumores ortotópicos establecidos previamente con sh-uPA y sh-uPAR también inhibía casi completamente el crecimiento tumoral (FIG. 7). No se observaron efectos perjudiciales en los grupos de animales tratados con ARNi en comparación con grupos tratados con simulado o con EV/SV. Además, este enfoque se puede dirigir a la una gran diversidad de tipos de tumores e inhibir fenotipos malignos dependientes de uPA-uPAR *in vitro* así como *in vivo*. Por lo tanto, este sistema de ARNi proporciona una nueva herramienta terapéutica potente y también sirve para analizar las frutas de señalización corriente abajo de uPA-uPAR así como para ofrecer opciones de tratamiento para intervención en cáncer con relevancia clínica. Además, el ARNi proporciona un modo conveniente y selectivo, nuevo para interferir con la expresión de uPA-uPAR y para estudiar la significancia biológica de su señalización en la biología del cáncer.

A pesar de los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares del cáncer humano, el desarrollo de enfoques terapéuticos para el tratamiento clínico de neoplasias humanas sigue siendo un desafío principal. La genosupresión de la expresión de uPA-uPAR inhibía de forma significativa el crecimiento de células PC3 *in vitro* así como *in vivo* y por último daba como resultado muerte celular apoptótica. Distintos genes diana (ERK y Stat 3) se regulaban corriente debajo de la señal de uPA-uPAR. Las células PC3 presentaban una baja fosforilación de Stat 3 y la fosforilación de ERK estaba totalmente anulada cuando se transfectaban con sh-uPAuPAR. El ARNi inducía la muerte celular de uPA-uPAR en células PC3 *in vitro* así como *in vivo*.

**Ejemplo 7. Las repeticiones invertidas de 21 pb conducidas por promotor de CMV basado en plásmido dirigidas a uPAR y MMP-9 se procesan a ARNsi.**

Para determinar si el transcrito conducido por el promotor de CMV (dirigidos por uPAR y MMP-9) se procesa correctamente a ARNsi, las células SNB 19 se transfectar un con control/EV, SV, puPAR, pMMP-9 y pUM. La FIG. 8 ilustra una representación esquemática del constructo. Las células también se transfectaron con un constructo no

relacionado dirigido a GFP en células distintas de GFP para determinar el procesamiento del transcrito de ARN a ARNsi, y confirmar el hecho de que los resultados obtenidos no son simplemente productos de degradación del gen diana. Las células SNB 19 transfectadas distintas de GFP con pGFP dieron como resultado el procesamiento del transcrito de ARN a ARNsi (FIG. 9A). De forma análoga, las células transfectadas con puPAR, pMMP-9 y pUM dieron como resultado el procesamiento del transcrito de ARN al ARNsi apropiado. Las células transfectadas con EV no producirán ningún fragmento similar al ARNsi de dirección a uPAR o MMPs-9 lo que indica que el fragmento de ARNsi observado se procesa a partir de los lazos de repetición invertida incorporados en el constructo. Las células transfectadas con SV tampoco produjeron ningún fragmento similar al ARNsi de dirección a uPAR o MMP-9; SV consistía en una secuencia de repetición invertida imperfecta sin homología con ningún gen conocido. Cuando se investigaban con un oligo sentido de 21 pb para SV, no se observaba ningún híbrido de ADN:ARN de 21 pb lo que indica que este constructor no se profesaba a fragmentos similares al ARNsi.

Las células SNB 19 transfectadas con pUM provocaban la regulación negativa del ARNm tanto de uPAR como de MMPs-9. Para determinar si el constructo de plásmido que contenía secuencias de 21 pares de bases invertidas homologadas a uPAR y MMP-9 induciría ARNi, las células SNB19 se transfectaron con control/EV, SV, puPAR, pump-9 y pUM. El ARN total se aisló de las células transfectadas y la primera hebra del ADNc se sintetizó usando un kit de síntesis de ADNc (Invitrogen). A continuación, el ADNc se sometió a PCR de acuerdo con protocolos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Usando cebadores específicos para uPAR, MMP-9, y GAPDH (véase la Tabla 1) en células transfectadas con control/EV y SV, no se produjo reducción en los niveles de uPAR o MMPs-9; mientras que en células transfectadas con puPAR y niveles de uPAR, el ARNm se reducía de forma significativa, y los niveles de ARNm de MMP-9 no cambiaban. En células transfectadas con pMMP-9, los niveles de ARNm de MMP-9 se redujeron, mientras que los niveles de ARNm de uPAR no cambiaron lo que indica la especificidad de los vectores para moléculas diana. Las células transfectadas con pUM presentaban una disminución en los niveles de ARNm tanto de uPAR como de MMP-9. Los niveles de GAPDH no cambiaron (FIG. 9B).

#### **Ejemplo 8. Inhibición de la actividad de MMP y niveles de proteína uPAR con ARN de interferencia**

Las células SNB19 se transfectaron con EV/SV, puPAR, MMP-9 y pUM y a continuación se determinaron los niveles de uPAR y MMP-9 en lisados celulares mediante transferencia de Western y medios acondicionados con zimografía de gelatina respectivamente. Las células SNB19 transfectadas con el vector pUM expresaban disminución de las cantidades de proteína uPAR cuando se comparaban con las células precursoras y tratadas con EV/SV mediante transferencia de Western (FIG. 10A). Para determinar si este efecto inhibitorio era específico para uPAR, se evaluaron los niveles de  $\beta$ -actina en la misma transferencia. Los niveles de  $\beta$ -actina eran similares en todas las calles lo que confirma una carga igual en todas las calles. Los medios acondicionados a partir de células SNB19 infectadas con pUM expresaban de forma significativa bajos niveles de actividad de MMP-9 en comparación con células transfectadas con simulado y con vector vacío/codificado (FIG. 10B). Los niveles de MMP-2 no cambiaron, lo que indica inhibición específica de la proteína diana. El análisis cuantitativo de las bandas de uPAR y MMP-9 mediante densitometría revelaron una disminución significativa de la proteína uPAR (de 12 a 14 veces) y la actividad enzimática de MMPs-9 (de 8 a 10 veces) en células transfectadas con pUM en comparación con las células precursoras y transfectadas con EV/SV. Las células transfectadas con vectores puPAR y pMMP-9 inhibían los niveles de uPAR y MMP-9 (FIG. 10A y 9B) casi de la misma manera a la del constructo bicistrónico, pero la regulación negativa de las moléculas diana era más pronunciada con el constructo bicistrónico en comparación con los constructos individuales.

La expresión mediada por vector del ARN de horquilla corta (ARNsh) para uPAR y MUMP-9 puede conseguir un silenciamiento genético eficaz y estable en una línea de células de glioma *in vitro* e *in vivo*. El silenciamiento genético basado en ARNi se puede adaptar para dirigir proteínas sobreexpresadas en gliomas con potencial terapéutico significativo. Las moléculas de ARNsi sintéticas también tienen el mismo efecto de supresión de los niveles de MMP-9 uPAR endógenos.

#### **Ejemplo 9. Inhibición de la proliferación celular con ARNsi para uPAR y MMP-9.**

El ensayo de MTT se usó para evaluar el efecto de los vectores de ARNsi (EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM) en la proliferación de células cultivadas en microplacas revestidas con vitronectina. Después de 3 días de infección, las células SNB19 infectadas con puPAR, el puPAR, pMMP-9 y vector pUM presentaban una disminución de la proliferación con respecto a la de las células SNB19 precursoras y transfectadas con EV/SV (FIG. 11). El efecto del vector pUM era mucho más elevado en la proliferación de SNB19 en comparación con los constructos de ARNsi individuales (puPAR y pMMP-9). No había diferencia en la proliferación entre células SNB19 precursoras y transfectadas con EV/SV.

#### **Ejemplo 10. El ARN de interferencia inhibía la inmunofluorescencia de uPAR y MMP-9 y la angiogénesis inducida por tumor.**

Las células SNB 19 transfectadas con puPAR y pMMP-9 provocaron la regulación negativa de los niveles de proteínas uPAR y MMP-9 tal como se determina con inmunocitoquímica. Las células transfectadas con pUM



provocaron la regulación negativa de los niveles de proteína tanto uPAR como MMP-9 tal como se determina con inmunocitoquímica (FIG. 12A). Para determinar el efecto del constructo combinado que expresa ARNsi tanto para uPAR como para MMP-9, las células SNB19 se transfectaron con puPAR, pMMP-9 y pUM; las células también se transfectaron con EV y SV, que sirvieron como controles. A partir de los resultados, es evidente que las células transfectadas con puPAR solo presentaban una regulación negativa de los niveles de proteína uPAR. Las células transfectadas con pMMP-9 presentarían una regulación negativa de MMP-9 solo, mientras que células transfectadas con pUM provocaban una regulación negativa de los niveles de proteínas uPAR y MMP-9, lo que indica que el constructo doble era eficaz, si no más, para regular de forma negativa los niveles de proteína diana. Para someter a ensayos y el ARNsi para uPAR y MMP-9 también podía inhibir la formación de capilares inducida por tumor, se células SNB19 de glioma transfectadas y sin transfectar con células endoteliales humanas. El análisis inmunohistoquímico se realizó usando antígeno del factor VIII para evaluar la formación de vasos inducida por tumor en sistema de cocultivo *in vitro* y tinción con H y E de estos cocultivos después de transfección con EV/SV, puPAR o pMMP-9 y pUM. La FIG. 12B muestra que las células endoteliales cultivadas con células SNB19 formaban redes similares a capilares distintas en cultivos transfectados con simulado y con vector vacío en 24-48 h. Por el contrario, las células SNB19 transfectadas con pUM no inducían la formación de redes similares a capilares en células endoteliales. La cuantificación de los puntos de ramificación y el número de ramificaciones estaba reducido de forma significativa en cocultivos transfectados con pUM en comparación el cocultivo transfectado con precursor y vector vacío/codificado (FIG. 12C). Además, el efecto era inferior a un 50 % en vector puPAR y pMMP-9 y era inferior a un 50 % en cocultivo transfectado con vector puPA y pMMP, cuando se comparaba con el grupo tratado con EV/SV precursor en relación con la formación de estructura similar a capilares. La implantación de una cámara que contenía células SNB 19 transfectadas con EV precursor dio como resultado desarrollo de microvasos con estructuras finas, curvadas y muchos puntos diminutos de sangrado. por el contrario, la implantación de células SNB 19 transfectadas con el vector pUM no daba como resultado el desarrollo de ningún microvaso adicional (FIG. 12D).

#### 25 **Ejemplo 11. El ARNsi para uPAR y MMP-9 inhibe la invasión de células SNB19.**

Dado que la expresión del ARNsi inhibía uPAR y MMPs-9, se evaluó su capacidad para inhibir la invasión celular. Se permitió que las células SNB19 transfectadas con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y el vector PUM invadieran a través de filtros revestidos con Matrigel. La FIG. 13A ilustra que la tinción de células SNB 19 transfectadas con pUM era significativamente menor que la de las células sólo así transfectadas con EV/SV. El análisis cuantitativo de las células mostraba que solamente un 8 % de las células transfectadas con pUM invadían en comparación con las células precursoras y transfectadas con EV/SV (FIG. 13B). Además, el análisis cuantitativo de la invasión de células SNB19 transfectadas con vector puPAR y pMMP-9 invadían un 25 % y un 50 % en comparación con las células SNB19 precursoras y transfectadas con EV/SV (FIG. 13A y 13B). El ARNi también inhibía la invasión de células SNB19 en un modelo de invasión esferoide tridimensional. La FIG. 13C demuestra que los esferoides de glioma transfectados con simulado y vector vacío/codificado se unían ha agregados de cerebro de rata e invadían los agregados de forma progresiva. Sin embargo, los cocultivos con esferoides de glioma transfectados con pUM fallaban en la unión a agregados de cerebro de rata y no invadían. El análisis cuantitativo indicaba que solamente un 2-4 % de los agregados de cerebro de rata fetal permanecían en los esferoides precursores y transfectados con EV/SV, mientras que un 90-95 % de los agregados de cerebro de rata fetal permanecían en los esferoides transfectados con pUM (FIG. 13D). A las 72 h, los agregados de cerebro de rata revelaban aproximadamente un 25 % y un 45 % de invasión en los cocultivos transfectados con puPAR y pMMP-9. tomados en conjunto, estos hallazgos proporcionan una fuerte evidencia de que el silenciamiento de uPAR y MMP-9 mediado con ARNi inhibe en gran medida la invasión de células de glioma en ambos modelos *in vitro* en comparación con los constructos de ARNsi individuales para uPAR y MMP-9. Estos resultados mostraban que los constructos de ARNsi individuales para uPAR eran más eficaces que el constructo de ARNsi individual para MMP-9.

#### 50 **Ejemplo 12. Efecto terapéutico del ARNsi para uPAR y MMPs-9.**

Para evaluar la eficacia de la interferencia de la expresión genética de uPAR y MMP-9 mediada con el ARNi en la evolución del tumor, el vector pUM se inyectó en ratones portadores de tumores usando una bomba estereotáctica. Para facilitar la detección de células tumorales y masivas, se evaluaron células de glioblastoma humano (SNB19) con el ADNc para proteína fluorescente de color verde (SNB19-GFP). El examen microscópico de las secciones de cerebro revelaron que los animales de control que recibían PBS o vector vacío (EV) solo desarrollaban crecimiento del tumor significativo después de un periodo de seguimiento de 5 semanas tal como se visualiza mediante fluorescencia con GFP y tinción con H y E de secciones similares. Por el contrario, el crecimiento del tumor o la fluorescencia con GFP o la tinción con H y E no se detectaba en animales que recibían el vector pUM en las mismas condiciones (FIG. 14A y 14B). La cuantificación de las secciones de cerebro teñidas con hematoxilina y eosina o secciones de GFP con un neuropatólogo al que se le había ocultado el tratamiento no revelaron diferencias en el tamaño del tumor entre los grupos de control y tratados con vector vacío; sin embargo, la regresión total de los tumores se reveló en el grupo tratado con vector pUM (FIG. 14C). En el caso de un constructos individuales tratados con ARNsi para uPAR y MMP-9, el crecimiento del tumor intracraneal establecido previamente se inhibía en un 70 % y en un 40 %, respectivamente. Las inyecciones intraperitoneales del vector pUM dieron como resultado una regresión completa del crecimiento del tumor intracraneal establecido previamente durante un período de tiempo más largo de 6 meses. Estos resultados demostraban que la supresión de uPAR y MMPs-9 mediada con el ARNi inhibía de forma drástica el crecimiento del tumor intracraneal establecido previamente.

La inhibición de uPAR y MMP-9 mediada con ARNi puede inhibir el crecimiento tumoral de varias formas independientes. La apoptosis medida con fragmentación de ADN era más elevada en los cerebros de animales inyectados con los clones estables de uPAR antisentido en comparación con la línea celular precursora. Los efectos antitumorales observados en el modelo de tumor intracraneal se podían deber a la inducción de muerte de células tumorales.

Las células tumorales dependen de la angiogénesis para sobrevivir y proliferar. La inhibición de uPAR y MMP-9 mediada con ARNi inhibía de forma significativa la inducción del tumor en un sistema de cocultivo *in vitro*. Los efectos antiangiogénicos del vector pUM suprimían la capacidad de las células tumorales para reclutar vasos sanguíneos necesarios para supervivencia y dirigían los efectos antiinvasivos en las células tumorales por sí mismas. La capacidad del ARNi de uPAR para bloquear la evolución del tumor también podría incluir el bloqueo de los efectos antiapoptótico y angiogénicos de uPA. En general ningún agente antiangiogénico individual (incluyendo angiostatina y endostatina) usado como monoterapia en modelos preclínicos es capaz de reducir la carga tumoral después de que los tumores hayan alcanzado 100 mm. Se informó que la ausencia de Plg, uPA, o tPA disminuía de forma significativa el desarrollo de neovascularización coróidea experimental en comparación con ratones de tipo silvestre o deficientes en uPAR. Se sugería que este efecto se debía parcialmente a una modulación de la actividad de la metaloproteinasas de la matriz. Aunque algunos estudios han demostrado el efecto antiangiogénico de los inhibidores de MMP sintéticos, prácticamente todos estos inhibidores carecen de especificidad para un MMP individual. Por ejemplo, se observó disminución de la densidad de vasos y aumento de la apoptosis de células tumorales en tumores primarios y metástasis en ratones tratados con KB-R7785, que inhibe MMP-1, -3 y -9. Las MMPi han mostrado poco beneficio clínico cuando se usan como monoterapia en pacientes con enfermedades avanzadas. Por lo tanto, el uso combinado de inhibición de MMP con otras modalidades también es una estrategia para el tratamiento del cáncer.

#### 25 **Ejemplo 13. ARNi frente a uPAR y MMP-9 inhibe el nivel de ERK, MAPK y AKT fosforilados.**

Las rutas de ERK, MAPK y AKT desempeñan un papel principal en la proliferación y supervivencia celular. La transferencia de Western se usó para comparar los niveles de las formas totales y fosforiladas de ERK, MAPK y AKT usando anticuerpos específicos, específicos para estas moléculas después de transfección de células SNB19 con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM. No se produjo diferencias significativas en las cantidades de MAPK, ERK y AKT totales con constructos de EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM (FIG. 15). Sin embargo, los niveles de las formas fosforiladas de MAPK, ERK y AKT disminuía de forma significativa con pUM en comparación con las células SNB19 transfectadas con EV/SV, puPAR y puPA (FIG. 15).

La unión de uPA a uPAR en células MCF-7 activa ERK1 y ERK2, que son necesarias en la motilidad celular. En la línea de células de cáncer de próstata (PC<sub>3</sub>MLN<sub>4</sub>), la hipoxia aumentaba la invasión de células tumorales mediante la regulación positiva de la expresión de uPAR, que se podría mediar a través de la ruta de señalización de MAPK, ERK y p38 quinasa. Además, la regulación positiva de la expresión de uPAR con Bcl2 en hipoxia se mediaba con la actividad de unión de SP1 ADN a través de la ruta de señalización de ERK. En ausencia de EGFR, una ruta alternativa une uPAR a ERK. Sin embargo, esta ruta se silencia con la expresión de EGFR, lo que indica por lo tanto la implicación de uPAR en la motilidad celular. La transfección estable de PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina) redujo la secreción de MMP-9 causada por la fosforilación de la quinasa de adhesión focal y la señalización de ERK1/ERK2 inducidas por ácido hialurónico. Los glioblastomas con amplificación de EGFR VIII demostraban los niveles más elevados de MMP-9. La transfección transitoria de células SNB 19 con mt ERK o mt JNK reprimían al promotor MMPs-9 lo que sugiere que la interferencia con cualquier ruta podría dar como resultado la inhibición de la expresión MMP-9. La regulación de la activación de MMP-9 con diversos estímulos o en diferentes escenarios celulares puede implicar diferentes rutas de transducción de señales. La inhibición de ERK con inhibidores específicos de MEK bloqueaba la expresión de MMP-9 en células de cáncer de mama y disminuía la producción de MMP-9 y atenuaba la capacidad invasión *in vivo* en células de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Las células transfectadas estables, mt-ERK, eran menos invasivas y reducción de forma significativa los niveles de MMP-9. Se ha informado que estas dos rutas de señalización (MAPK y ERK1/2) se activan cuando uPA se une a uPAR. El constructo de pUM inhibe las formas fosforiladas de estas moléculas de la ruta de señalización (FIGS. 15-16).

#### 55 **Ejemplo 14. Terapias para el cáncer medianas con ARNi y administración de los ARNi**

La inhibición del ARNi de genes tal como, por ejemplo, sobreexpresión de uPAR y MMP-9 extiende la lista de modalidades terapéuticas disponibles para el tratamiento de cáncer humano. Aunque están disponibles algunos enfoques antisentido, incluyendo tecnologías de oligonucleótido y ribosima antisentido, su eficacia no es satisfactoria. La inhibición de uPAR y MMP-9 mediada por ARNi suprimía completamente el crecimiento tumoral de glioma establecido previamente en ratones atímicos. Por lo tanto, el ARNi es una alternativa más poderosa con respecto a otras herramientas genéticas tales como tecnologías de oligonucleótido y ribosima antisentido en la reducción de la expresión de genes diana. Los efectos del ARNi o similares a los del ARNi eran más potentes que los efectos antisentido en la reducción de la expresión de genes diana, que también sugieren la capacidad de aplicación potencial del ARNi. Se usó un vector peptídico que incluía motivo de arginina-glicina-ácido aspártico buscador de tumor en una conformación cíclica, una oligo lisina de unión ADN y restos de histidilo para facilitar la

administración en el citosol. El vector peptídico puede funcionar como un vehículo de ARNsi. La terapia genética basada en ARNi es un nuevo enfoque para el tratamiento de gliomas y otros tumores metastásicos, que incluyen cáncer de próstata, cáncer de mama, y melanoma.

5 **Ejemplo 15. Efecto del vector pCU en los niveles de proteína de catepsina B y uPAR en extractos celulares totales.**

10 El ARNi dirigidos frente a la degradación proteolítica es una intervención para prevenir la invasión de células cancerígenas (FIG. 17). Se ha mostrado que catepsina B y uPAR desempeñan papeles significativos en la degradación ECM. La transfección de células SNB19 con el vector que expresa ARNsi para catepsina B y uPAR (pCU) inhibía en gran medida la expresión de ambas proteínas en comparación con controles simulados y de vector vacío (EV) (FIG. 18 A y C). Los niveles de  $\beta$ -actina determinaban que se cargaban cantidades iguales de proteína en el gel (FIG. 18). El análisis cuantitativo de las bandas de catepsina B y uPAR mediante densitometría revelaba una disminución significativa ( $P < 0,001$ ) de proteína catepsina B (14 a 16 veces) y uPAR (10 a 12 veces) y en células transfectadas con pCU en comparación con células transfectadas con simulado y vector vacío (FIG. 18B y D). Las células transfectados con vectores pU y pC inhibían los niveles de uPAR y catepsina B, respectivamente (FIG. 18 A y C).

20 **Ejemplo 16. Inhibición de la formación de redes capilares inducida por células tumorales con vector pCU.**

Los tumores emergentes dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos que proporcionan combustible al crecimiento tumoral. Dado que se ha informado que catepsina B y uPAR regulan la angiogénesis, se evaluó el efecto de pCU en la angiogénesis inducida por tumor. El análisis inmunohistoquímico se realizó usando antígeno del factor VIII para evaluar la formación de vasos inducida por tumor en un sistema de cocultivo *in vitro* y tinción con H y E para células endoteliales cultivadas en presencia de medios acondicionados de células SNB 19 después de transfección con simulado, vector vacío, pC, pU o pCU. Los resultados demuestran que las células endoteliales forman estructuras similares a capilares en presencia de células transfectadas con simulado y vector vacío en 48 h; mientras que el vector pCU inhibía de forma significativa la formación de redes similares a capilares inducida por células tumorales (FIG. 19A). La cuantificación de los puntos de ramificación y el número de ramificaciones era indetectable en cocultivos transfectados con pCU en comparación con simulador y vector vacío (FIG. 19B). Además, el efecto era inferior a un 50 % en cocultivos tratados con pC o pU cuando se comparaba con vector pCU en relación a las estructuras similares a capilares. Para confirmar los experimentos de cocultivo *in vitro*, se examinó si el vector pCU puede inhibir la angiogénesis tumoral *in vivo* tal como se evalúa con el modelo de cámara dorsal. Las cámaras implantadas que contenían células SNB19 transfectadas con simulado y vector vacío (EV dieron como resultado el desarrollo de microvasos (tal como se indica con flechas) con estructuras finas curvadas y muchos puntos de sangrado y minutos. Por el contrario, las cámaras implantadas de células SNB19 transfectadas con el vector pCU no daban como resultado el desarrollo de microvasos adicionales (FIG. 19C).

40 **Ejemplo 17. Inhibición de la migración de esferoides de SNB19 con ARNsi.**

Para determinar si la expresión del ARNsi de catepsina B y uPAR es capaz de influir en la migración y proliferación de células tumorales, los esferoides de SNB 19 se transfectaron con el vector pCU. Tal como se muestra en la FIG. 20A, se producía una migración celular mucho más elevada desde los esferoides transfectados con simulado y vector vacío (EV) y se observaba hasta un 50 % de inhibición de la migración con esferoides transfectados con constructo individual. Sin embargo, la migración celular de los esferoides de tumor se inhibía completamente en esferoides transfectados con el vector pCU. La migración de los esferoides transfectados con simulado y vector vacío era significativamente más elevada ( $P < 0,001$ ) en comparación con los esferoides transfectados con pC, pU y pCU tal como se cuantifica con el número de células que emigran fuera de los esferoides (FIG. 20B). La migración de las células desde los esferoides se inhibía con constructo bicistrónico en comparación con constructos de ARNi individuales para estas moléculas. Unas pocas células migraron de los esferoides de SNB19 transfectados con pCU en comparación con las de los controles simulado y con vector vacío, lo que indica por lo tanto el papel de catepsina B y uPAR en la migración celular.

55 **Ejemplo 18. El ARNsi frente a catepsina B y uPAR inhibe la invasión de células tumorales.**

Para evaluar el impacto de la inhibición de catepsina B y uPAR mediada con el ARNsi en la capacidad de invasión de glioma, se usó un sistema de los modelos. Las células SNB19 transfectadas con simulado y vector vacío invadían de forma extensa los insertos de Transwell revestidos con Matrigel tal como se observa con la tinción intensa de las células. Por el contrario, los cultivos transfectados con pC, pU y pCU tenían menos capacidad invasión a través de la membrana basal reconstituida, en comparación con las células transfectadas con simulado y vector vacío (FIG. 20C). La determinación cuantitativa de la invasión confirmaba que las células SNB19 transfectadas con el vector pC, pU y pCU invadían solamente un 55 %, 40 % y un 6 % respectivamente en comparación con los controles transfectados con simulado y vector vacío (FIG. 20D). La inhibición del comportamiento invasivo de estas células tal como se determina con el ensayo de invasión de Matrigel era mucho más elevada en las en the células transfectadas con constructo bicistrónico cuándo se comparaba con el constructo individual.

Se sometió a ensayo el alcance del efecto de pCU en ensayo de invasión de esferoides. En el ensayo de cocultivo de esferoides, los esferoides de glioma de control y los esferoides transfectados con el vector vacío invadían de forma progresiva los agregados de cerebro de ratas fetales y daban como resultado una inhibición parcial a casi completa de la invasión de esferoides transfectados con pCU (FIG. 20E). La cuantificación de los agregados de cerebro de rata fetal reveló que los esferoides de glioma invadían los agregados de cerebro de rata fetal en un 25 % en 24 h, > 70 % en 48 h y > 90 % a las 72 h. Por el contrario, los esferoides de tumor transfectados con el vector pCU no invadían los agregados de cerebro de rata fetal. A las 72 h, los agregados de cerebro de rata revelaban una invasión de aproximadamente un 90 %, 85 %, 55 % y un 35 % en los cocultivos transfectados con simulado, vector vacío, pC, y pU, pero solamente una invasión de un 2 % a un 3 % en los cocultivos transfectados con pCU (FIG. 20F). Tomados en conjunto, estos hallazgos proporcionan una gran evidencia de que el silenciamiento de catepsina B y uPAR mediado con ARNi inhibe en gran medida la invasión de células de glioma en ambos modelos *in vitro*, y que el efecto era mucho mayor con constructo bicistrónico en comparación con constructos individuales.

La adquisición de la capacidad de invasión de células tumorales es uno de los aspectos de la evolución del tumor. Existen varios informes que indican que la expresión de catepsina B y uPAR son componentes esenciales del proceso de invasión. La transfección con el vector pCU inhibía la capacidad de invasión de las células SNB 19 y esteroides en los ensayos de cocultivo de invasión en Matrigel y esferoides. El requisito para la invasión de catepsina B hacia Matrigel se podría deber a su interacción con una red de proteasas. Se mostró que la catepsina B activaba los precursores de serina proteinasas a sus formas activas, tales como pro-uPA y metaloproteinasa, tal como prostromelisin. La capacidad de invasión a través de Matrigel de líneas de células epiteliales de mama humana transformadas estaba relacionada con la expresión de la catepsina B y se inhibía con inhibidores de cisteína proteinasa. En células de cáncer de ovario, la inhibición de la catepsina B de superficie celular previene la activación de pro-uPA, y posteriormente, la invasión de las células de carcinoma a través de Matrigel. La actividad de la catepsina B en cáncer de colon humano está asociada con la capacidad invasión de células cancerígenas, células endoteliales y células inflamatorias así como muerte celular apoptótica y necrótica. Se sabe que uPA y uPAR se sobreexpresan en diversas neoplasias que incluyen cánceres de mama, ovario y gástrico, y se ha demostrado que son esenciales en el mantenimiento del fenotipo invasivo y metastásico.

**Ejemplo 19. La regulación negativa mediada con ARNsi de Catepsina B y uPAR reduce la proliferación de células SNB 19.**

Se usó un ensayo de MTT convencional para evaluar el efecto de los vectores de ARNsi (Control, EV, SV, pC, pU y pCU) en la proliferación de células cultivadas en microplacas revestidas con vitronectina (FIG. 21). 72 h después de la infección, las células SNB 19 infectadas con vector pC, pU y pCU presentaban una disminución de la proliferación con respecto a la de los controles de SNB19 y de vector. Las células transfectadas con PCU no presentaban ningún crecimiento apreciable incluso después de 7 días del transfección. No se observaban células flotantes ni residuos celulares en ninguna de las células transfectadas incluso después de 7 días de ensayo lo que indica la ausencia de apoptosis.

**Ejemplo 20. La regulación negativa mediada con ARNsi de uPAR y catepsina B inhibe la fosforilación de ERK1/2 y FAK.**

Para determinar el efecto de la regulación negativa de uPAR y catepsina B en moléculas de la ruta de señalización, la fosforilación de ERK y FAK se sometió a ensayo con transferencia de Western ambas de las cuales están directamente implicadas en la supervivencia, migración y proliferación de células tumorales. La FIG. 22 muestran que la regulación negativa simultánea de uPAR y catepsina B mediada por ARNi retrasa la fosforilación de ERK1/2 y FAK y el efecto era mucho menor con constructos individuales.

Los resultados demuestran que la regulación negativa de uPAR y catepsina B induce la regulación negativa de la fosforilación de ERK1/2 y FAK que son directamente responsables de la supervivencia y proliferación celular. La implicación de uPAR en la cascada de ERK-FAK se ha informado anteriormente en células HEp3 de carcinoma humano, el papel de la catepsina B aún no está claro. Una regulación negativa de combinación de uPAR y catepsina B es más eficaz en la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y FAK.

**Ejemplo 21. El ARNsi de catepsina B y uPAR suprime el crecimiento del tumor intracraneal.**

Un modelo de tumor intracraneal se usó para evaluar los efectos potenciales de la inhibición mediada con ARNi en el crecimiento de tumor establecido previamente *in vivo*. Las secciones de cerebro de los grupos de control sin tratar (simulado) y tratados con EV se caracterizaban por una gran dispersión del crecimiento tumoral mediante tinción con H y E y elevada fluorescencia con GFP después de un periodo de seguimiento de 5 semanas (FIG. 23A y B). Sin embargo, la fluorescencia con GFP no se detectaba en las secciones de cerebro de ratones tratados con el vector pCU (FIG. 23A y B). La cuantificación adicional de las secciones de cerebro teñidas con H y E puntuada por un neuropatólogo al que se le ocultó el tratamiento, no revelaba diferencia en el tamaño del tumor entre los grupos de tratamiento con simulado y con vector vacío y una regresión significativa del crecimiento del tumor en un 55 % y en un 65 % en los grupos tratados con pC y pU en comparación con los controles. Sin embargo, la regresión total de los tumores establecidos previamente se reveló en el grupo tratado con pCU (FIG. 23). Estos resultados demuestran

que la supresión de catepsina B y uPAR mediada con ARNi inhibía de forma significativa el crecimiento del tumor intracraneal.

5 La administración intracraneal local de pCU usando bombas mini osmóticas inhibía de forma eficaz el crecimiento del glioma maligno humano. Las bombas mini osmóticas mantienen un patrón de exposición al fármaco bien definido y coherente durante un período de tiempo significativo y se pueden usar de forma satisfactoria para administrar agentes al cerebro. La regulación negativa de catepsina B y uPAR da como resultado la inhibición de la angiogénesis inducida por tumor. Se usó un ensayo de cocultivo *in vitro* para someter a ensayo el efecto de pCU en la angiogénesis. Los resultados demuestran que la catepsina B y uPAR desempeñan papeles relevantes en la estimulación de la angiogénesis, lo que sugiere un posible mecanismo de acción para la actividad antitumoral de pCU *in vivo* en el modelo del tumor intracraneal. Una tinción intensa para la catepsina B está presente en las células endoteliales de los neo-vasos pero no en la microvasculatura existente previamente en la próstata. De forma análoga, se observaba una inmunotinción fuerte de la catepsina B en las células endoteliales microvasculares de cerebro de rata a medida que se formaban tubos capilares *in vitro*. Dado que se muestra que la catepsina B es un inhibidor de los TIMP y los TIMP son inhibidores de la angiogénesis, la catepsina B también podría estimular la angiogénesis, que tiene un papel relevante en la propagación del tumor. La dirección de catepsina B y uPAR mediada por el ARNi suprimía el crecimiento del tumor intracraneal establecido previamente, posiblemente mediante la inhibición de la angiogénesis y la capacidad de invasión. Estos resultados también apoyan que la regulación negativa de la expresión de genes diana mediada por el ARNs es lo suficientemente estable dentro del microentorno cerebral.

**Ejemplo 22. Efecto de constructos de ARNs en proteína uPAR, y actividad enzimática de uPA y MMP-9 en células SNB19 de glioblastoma.**

25 Para inhibir de forma simultánea tres genes endógenos con ARNs de horquilla, se construyó un vector (pU<sub>2</sub>M) que expresaba ARNs para uPAR (77-98 bases de uPAR humano en ARN), uPA (346-367 bases de uPA humano en ARN) y MMP-9 (360-381 bases de MMP-9 humano en ARN) bajo el control del promotor de CMV (FIG. 24). Las bases indican las posiciones en una secuencia de codificación de longitud completa. El análisis de transferencia de Western se realizó para examinar el efecto de la transfección de vector vacío/vector codificado (EV/SV), puPAR, puPA, MMP-9 y pU<sub>2</sub>M en concentraciones de proteína uPAR en células SNB 19. La banda de la proteína uPAR estaba presente en células SNB19 transfectadas con EV/SV, puPA y pMMP-9, mientras que se reducía de forma significativa en células tratadas con puPAR y pU<sub>2</sub>M (FIG. 25A). El efecto del constructo tricistrónico (pU<sub>2</sub>M) era mayor que el de puPAR (FIG. 25A). Los niveles de GAPDH determinaban que se cargaban cantidades iguales de proteína en el gel (FIG. 25A). Se realizó zimografía de fibrina para examinar el efecto de células SNB 19 tratadas con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M en la actividad enzimática de uPA. Se realizó zimografía de gelatina se realizó para determinar el efecto de estos constructos en los niveles de MMP-9 en células SNB19. Los niveles de MMP-9 estaban de significativamente reducidos en células SNB19 tratadas con puPAR, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M en comparación con las células precursoras, tratadas con EV/SV y puPA (FIG. 25B). De forma interesante, los niveles de MMP-2 también estaban regulados de forma negativa en las células tratadas con pU<sub>2</sub>M. Se tuvo cuidado para cargar cantidades iguales de proteínas. (FIG. 25B). La actividad enzimática de uPA (MR 55 000) se redujo de forma significativa en las células tratadas con puPA y pU<sub>2</sub>M en comparación con los grupos precursores, tratados con EV/SV, puPAR y pMMP-9 (FIG. 25C).

45 El efecto del constructo tricistrónico era más pronunciado que los constructos de ARNs individuales para estas moléculas. Determinada con análisis inmunohistoquímico, la transfección de puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M disminuía las concentraciones de uPAR, uPA y MMP-9 en células SNB 19. La FIG. 25D muestra los niveles de proteína de uPAR, uPA y MMP-9 en células precursoras, células transfectadas con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9- y pU<sub>2</sub>M usando anticuerpos específicos para uPAR, uPA y MMP-9. Las respectivas intensidades de uPAR, uPA y MMP-9 eran elevadas en las células precursoras y en las células transfectadas con EV/SV. Por el contrario, la intensidad de uPAR disminuía en células SNB19 transfectadas con puPAR y pU<sub>2</sub>M. La transfección de puPA y pU<sub>2</sub>M disminuía de forma significativa la intensidad de la proteína uPA en comparación con células precursoras, células transfectadas con EV/SV, puPAR y pMMP-9. Además, la concentración de proteína MMPs-9 disminuía de forma significativa en células transfectadas con pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M en comparación con células precursoras, células transfectadas con EV/SV, puPA y puPAR. Estos resultados demuestran que el efecto de los constructos individuales es específico de molécula y que el efecto del constructo tricistrónico es mucho más pronunciado que el de los constructos individuales solos.

**Ejemplo 23. puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M inhiben la formación de redes capilares inducida por tumor.**

60 El crecimiento de un tumor glial depende de la inducción de nuevos vasos sanguíneos capilares que son necesarios para apoyar el desarrollo de la masa tumoral. Se usó un sistema de cocultivo en el que las células endoteliales microvasculares se indujeron con medios acondicionados a partir de células gliales para formar estructuras similares a capilares para examinar el efecto de la supresión de uPAR, uPA y MMP-9 mediada por el ARNi. El análisis inmunohistoquímico usando el antígeno del factor VIII para evaluar la formación de vasos inducida por tumor sistema de cocultivo *in vitro* y se realizó tinción con H y E. Las células endoteliales forman estructuras similares a capilares en presencia de medios acondicionados de células SNB19 precursoras y transfectadas con EV/SV (FIG.

26A). Por el contrario, la transfección de células SNB 19 con vectores que expresan ARNs para uPA, uPAR y MMP-9 ya sea de forma individual o en combinación inhibían parcial o totalmente la formación de microvasos inducida por tumor (FIG. 26A). No se detectaban nuevos puntos de ramificación ni/o un aumento del número de ramificaciones en células transfectadas con pU<sub>2</sub>M en comparación con células tratadas con EV/SV (FIG. 26A). Además, comparada con células tratadas con EV/SV, la formación de estructuras similares a capilares se inhibía en ~5 % en cultivos tratados con puPAR, ~36 % en cultivos tratados con puPA y ~60 % en cultivos tratados con pMMP-9 (FIG. 26B).

El medio acondicionado a partir de una línea de células de glioblastoma transfectadas con pU<sub>2</sub>M inhibía las estructuras el simulado o vector vacío (FIG. 26A-B). Esto indica que la señal angiogénica necesaria para la inducción de angiogénesis no estaba presente en las células transfectadas con pU<sub>2</sub>M. Tal como se muestra con la ausencia de inducción angiogénica en células SNB19 de glioma transfectadas con pU<sub>2</sub>M, la regulación negativa de uPA, uPAR y MMP-9 por el ARNhp provocó la regulación negativa de factores angiogénicos. La ausencia de uPA o activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA) disminuía de forma significativa el desarrollo de experimental neovascularización coroida en comparación con ratones de tipo silvestre (WT) o deficientes en uPAR (uPA<sup>-/-</sup>). Se ha informado que se producía una disminución de forma significativa del crecimiento del tumor primario en uPA<sup>-/-</sup> y en ratones deficientes en el inhibidor 1 activador de plasminógeno (PAI-1<sup>-/-</sup>), con respecto a los ratones WT y los tumores en ratones uPA<sup>-/-</sup> y PAI<sup>-/-</sup> presentaban índices de proliferación más bajos y apoptóticos más elevados y también presentaban una morfología neovascular diferente, en comparación con los ratones WT. Varios péptidos que se ha mostrado que inhiben la unión a uPA con presentación de bacteriófagos inhiben la angiogénesis y el crecimiento del tumor primario en ratones singénicos.

#### **Ejemplo 24. puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M inhiben la invasión en células SNB19.**

La degradación proteolítica de los componentes de ECM es relevante para la invasión de células tumorales. Para evaluar el impacto de la inhibición de uPAR, uPA y MMP-9 mediada por ARNs en la capacidad de invasión de glioma, se usaron dos modelos. En el primer modelo, la capacidad de invasión de las células SNB19 transfectadas con puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M se comparó con la de las infectadas con el vector EV/SV. Las células SNB19 transfectadas con EV/SV y las células precursoras demostraban una extensa invasión a través de insertos de Transwell revestidos con Matrigel, como se indica con la intensa tinción de células. Por el contrario, los cultivos transfectados con puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M eran menos invasivos a través de la membrana basal reconstituida, como se indica mediante la intensidad de la tinción en comparación con los controles (FIG. 26C). La cuantificación confirmaba que la transfección con vectores puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M reducía la invasión con células SNB 19 en un 9 %, 40 %, 15 % y un 2 %, respectivamente, en comparación con controles precursores y transfectados con EV/SV (FIG. 26D). La inhibición de la invasión era más elevada en células transfectadas con el constructor tricistrónico cuando se comparaba con constructos individuales solos.

El efecto de los vectores puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M se examinó usando un ensayo de invasión de esferoides. Una ventaja potencial, significativa del uso de esferoides de glioma es que las células tumorales que crecen en cultivos tridimensionales presentan propiedades que se parecen en mayor medida a las de los tumores *in vivo*. En el sistema de cocultivo de esferoides, los esferoides de control y los esferoides transfectados con el vector EV/SV invadían de forma progresiva los agregados de cerebro de rata fetales mientras que los esferoides transfectados con puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M demostraban una inhibición de la invasión de parcial a casi completa (FIG. 27A). La cuantificación revelaba que los esferoides de glioma invadían los agregados de cerebro de rata fetal en un 30 % en 1 día, un 55 % en 2 días y un 95 % en 3 días, momento en el que el esferoide tumoral y los agregados de rata se habían combinado en una sola entidad (FIG. 27B). Una tendencia similar se observó con esferoides de glioma transfectados con el vector EV/SV. Por el contrario, los esferoides tumorales transfectados con el vector pU<sub>2</sub>M no invadían los agregados de cerebro de rata fetal. A los 3 días, los agregados de cerebro de ratas estaban invadidos en aproximadamente un 96 %, 95 %, 45 %, 25 % y un 15 % en los cocultivos precursor, transfectados con EV/SV, puPA, pMMP-9 y puPAR, y en un 1% en los cocultivos transfectados con pU<sub>2</sub>M (FIG. 27B). Estos resultados proporcionan una fuerte evidencia de que el pU<sub>2</sub>M inhibe la invasión de glioma en ambos modelos *in vitro*.

#### **Ejemplo 25. El pU<sub>2</sub>M revierte completamente el crecimiento del tumor intracraneal.**

La regulación negativa de los niveles de uPAR, uPA y MMP-9 se examinó usando cualquiera de constructos individuales o tricistrónicos que causa la regresión de crecimiento del tumor intracraneal establecido previamente en ratones atímicos. Todos los animales en los grupos de control y tratados con EV/SV tenían tumores cerebrales intactos que se caracterizaron por una fuerte fluorescencia con GFP (FIG. 27C) mientras que las secciones de cerebro de los ratones tratados con puPAR, puPA y pMMP-9 tenían tumores pequeños, ilustrados con una fluorescencia con GFP mínima. En particular, la fluorescencia con GFP no se detectaba en secciones de cerebro de ratones tratados con pU<sub>2</sub>M (FIG. 27C). La cuantificación adicional de estas secciones (puntuada por un neuropatólogo al que se le ocultan las condiciones de tratamiento) no revelaba diferencia en el tamaño del tumor entre los grupos tratados con precursor y con EV/SV y una regresión significativa del crecimiento del tumor intracraneal establecido previamente en dos grupos tratados con puPAR, puPA y pMMP-9 (un 80 %, un 55 %, y un 68 % respectivamente) en comparación con los grupos de control (FIG. 27D). Sin embargo, la regresión completa del crecimiento del tumor intracraneal establecido previamente se reveló en el grupo tratado con pU<sub>2</sub>M. Estos resultados demuestran que la supresión de uPAR, uPA y MMP-9 mediada con el ARNi usando un constructo

triccistronico erradicarla completamente el crecimiento de glioma maligno en ratones atimicos.

**Ejemplo 26. Inhibición de la fosforilación de ERK1/2.**

5 Para entender mejor el efecto de la regulación negativa de uPAR, uPA y MMP-9 mediada con el ARNsi en las rutas de señalización, se sometieron a ensayo los niveles totales y fosforilado de ERK1/2, que están implicados directamente en la supervivencia, migración y proliferación de las células tumorales. Las transferencias de Western mostraban que no había una diferencia significativa en las concentraciones totales de ERK1/2 en células de control y transfectadas con EV/SV en comparación con células transfectadas con puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M (FIG. 28).  
 10 Sin embargo, la concentración de fosfo-ERK1/2 se redujo de forma significativa en células SNB19 transfectadas con el vector pU<sub>2</sub>M en comparación con las células SNB19 de control, transfectadas con EV/SV, puPAR, puPA y pMMP-9. En particular, no había efecto en los niveles de fosfo-ERK en células SNB19 transfectadas con cualquiera de los constructos individuales. Los niveles de GAPDH indicaban que se cargaban cantidades iguales de proteína en el gel (FIG. 28).

**Ejemplo 27. Expresión de proteína MMP-9 y catepsina B menor de los ARNsi específicos de gen en una línea de células de glioma.**

20 Para someter a ensayo la eficacia de la inhibición de forma simultánea de dos genes endógenos con un vector de expresión de ARNsi de horquilla, se construyó un vector que expresa ARNsi para catepsina B (732 a 753 bases de ARNm de catepsina B humana) y MMP-9 (360 a 381 bases de ARNm de MMP-9 humano) bajo el control del promotor (pCM) del citomegalovirus (CMV) humano (FIG. 29). Las bases indican las posiciones en una secuencia de codificación de longitud completa. La FIG. 30A demuestra que la transfección con vector pC y pCM inhibía de forma específica los niveles de catepsina B en comparación con los controles simulado, vacío, y vector pM. Los niveles de β-actina evaluados en la misma transferencia indicaban que la inhibición de la catepsina B era específica y confirmaban la misma carga de muestra. Los niveles de MMP-2 y MMP-9 se determinaron en el medio acondicionado en las células transfectadas. La cantidad de MMP-9 liberado de las células transfectadas con simulado y vector vacío (EV) eran las mismas. Las células transfectadas con vector pM y pCM expresaban niveles bajos de MMP-9 en comparación con los controles simulado, EV, y pC. No se producía cambio en la expresión de MMP-2 lo que demuestra la inhibición específica de la secuencia del vector pM y pCM (FIG. 30B). Para confirmar que la disminución de la actividad de MMP-9 se debía a una disminución de la expresión de proteína, el medio condicionado se analizó usando en inmunotransferencia con un anticuerpo específico para MMP-9. La banda de la proteína MMP-9 disminuyó radicalmente con inmunotransferencia del medio acondicionado de las células transfectadas con vector pM y pCM, pero las bandas eran significativamente mucho más elevadas en el medio acondicionado de las células infectadas con el vector vacío o con el vector pC (FIG. 30C).

**Ejemplo 28. Inhibición de la formación de redes capilares inducida por células tumorales con vector PCM.**

40 El crecimiento de un tumor glial depende de la inducción de nuevos vasos sanguíneos capilares ya que son necesarios para apoyar el desarrollo de la masa tumoral. Se usó un sistema de cocultivo en el que se indujeron células endoteliales microvasculares con células gliales para formar estructuras similares a capilares para examinar la supresión de catepsina B y MMP-9 mediada por el ARNi. Las SNB19 inducían células endoteliales para su diferenciación en estructuras similares a capilares en 72 h. Por el contrario, la transfección de células SNB 19 con el vector que expresa ARNsi para catepsina B y MMP-9 inhibía completamente la morfogénesis de microvasos inducida por células tumorales (FIG. 31A). La cuantificación adicional de los puntos de ramificación y el número de ramificaciones era indetectable en cocultivos transfectados con pCM en comparación con simulador y vector vacío (FIG. 31B). Además, el efecto era solamente de un 50 % en cocultivos tratados con pC o pM cuando se compara con vector pCM en relación estructuras similares a capilares. Para confirmar los experimentos de co cultivo *in vitro*, se examinó si el vector pCM podía inducir la angiogénesis tumoral *in vivo* tal como se evalúa con el modelo de ventana dorsal. La implantación de la cámara que contenía células SNB19 transfectadas con simulado y vector vacío (EV) dio como resultado el desarrollo de microvasos (tal como se indica con flechas) con estructuras finas curvadas y muchos puntos desangrado diminutos. Por el contrario, la implantación de células SNB 19 transfectadas con el vector pCM no daba como resultado el desarrollo de microvasos adicionales (FIG.31C).

55 El mantenimiento del crecimiento de tumores malignos está muy relacionado con el desarrollo de la red vascular que proporciona nutrientes al tumor. No se observó la formación de la una red vascular caracterizada por polígonos cerrados y estructuras similares a mallas complejas en células tratadas con el vector pCM. Por lo general, esta red se observa cuando las células de glioma se cocultivan con células endoteliales. La proteólisis de componentes de la matriz extracelular permite que las células endoteliales migren y libera moléculas de señalización angiogénica almacenadas desde la matriz extracelular. El análisis inmunohistoquímico demostró que la catepsina B estaba muy expresada en astrocitomas y glioblastomas anaplásicos malignos en comparación con tejido cerebral normal.

65 Estos resultados muestran que las MMP pueden estimular la angiogénesis y la falta absoluta de actividad de MMP puede prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos. La regresión del tumor conseguida con el tratamiento combinado en la presente divulgación se debe a las acciones complementarias de catepsina B y MMP-9. La dirección de la expresión de catepsina B y MMP-9 en células tumorales es un enfoque eficaz para controlar la

angiogénesis y el crecimiento tumoral.

#### **Ejemplo 29. Efectos de supresión del vector pCM en migración e invasión de glioma**

5 La migración celular requiere la regulación coordinada de las uniones celulares-célula, unión de celular-matriz y remodelación de la matriz. Se estudió la influencia de la supresión de catepsina B y MMP-9 en la capacidad de las células para migrar en vitronectina en un ensayo de migración de esferoides. Se cultivaron esferoides de glioma multicelulares a partir de células SNB19-GFP en placas de 6 pocillos revestidas con agarosa. Después de comprobar la viabilidad usando morfología y exclusión con azul de tripano, los esferoides de diámetro similar (100-  
10 200  $\mu\text{m}$ ) se transfectaron con simulado, vector vacío (EV) o el vector pCM que expresa ARNsi para catepsina B y MMP-9. Tres días después, los esferoides individuales se colocaron en placas revestidas con vitronectina y se permitió que migraran. La FIG. 32A indica que las células de los esferoides de control y de los esferoides infectados con el vector vacío mostraban una capacidad de las células significativamente más elevada para migrar en comparación con las células infectadas con el vector pCM. La degradación proteolítica de los componentes de la matriz extracelular es relevante para la invasión de células tumorales. Para investigar si la expresión del ARNsi para catepsina B y MMP-9 desempeña un papel en la capacidad de invasión de glioma, se comparó la capacidad de invasión de las células SNB19 transfectadas con el vector pCM con respecto a las células infectadas con simulado y vector vacío. Las células SNB19 transfectadas con simulado y vector vacío (EV) invadían a través de Matrigel de forma más extensa en comparación con células transfectadas con el vector pCM vector que penetraban a través de  
20 the matrigel (FIG. 32B).

Se examinó el alcance de los efectos supresores del ARNsi en un modelo de invasión de esferoides. País feliz en una ventaja potencial del uso de esferoides de glioma es que se ha mostrado que las células tumorales que crecen en cultivos tridimensionales inhiben propiedades que se parecen en gran medida a las de los tumores *in vivo*. Los esferoides transfectados con simulado y con vector vacío invadían un 25 % de los agregados de cerebro normales en un día, un 50 % en todos días y en tres días, un 95 % de esferoide de tumor y agregado de cerebro se habían combinado en una sola entidad (FIG. 32C). Por el contrario, los esferoides de glioma transfectados con el vector pCM que expresa ARNsi para catepsina B y MMP-9 permanecían separados de los agregados de cerebro normal.

30 La presente divulgación muestra que la expresión del ARNsi dirigida por el promotor de CMV frente a catepsina B y MMP-9 (pCM) puede silenciar de forma satisfactoria la expresión de catepsina B y MMP-9 en la línea de células SNB19 de glioblastoma, tal como se analiza mediante transferencia de Western y zimografía de gelatina. Los resultados también demuestran que el potencial invasivo de las células de glioma tratadas con el vector pCM se inhibía de forma significativa. Las células cancerígenas se deben separar de las células vecinas y de los componentes de la matriz extracelular para migrar e invadir. La proteólisis puede modular directamente la adhesión a la matriz celular ya sea mediante retirada de los sitios de adhesión o mediante exposición de un sitio de unión, que a su vez puede influir en la migración celular. La inhibición de catepsina B y MMP-9 mediada con ARNi bloqueaba de forma significativa la migración de las células SNB19 de glioma tal como se muestra en un ensayo de migración de esferoides.

40

#### **Ejemplo 30. El ARNi induce la regresión completa de tumores de glioblastoma en ratones atómicos.**

La capacidad del ARNsi para MMP-9 y catepsina B para inhibir la regresión de tumores SNB19 intracraneales se sometió a ensayo en ratones atómicos. Los ratones con crecimiento de glioma establecido previamente se inyectaron por vía estereotáctica con PBS (simulado), vector vacío (EV), pC, pM y vector pCM. Las secciones de cerebro de ratones tratados con simulado y EV presentaban un crecimiento tumoral rápido mientras que los ratones inyectados con el vector pCM usando bombas mini osmóticas en un tumor establecido previamente, daban como resultado una inhibición completa del crecimiento tumoral durante un periodo de tiempo de 5 semanas (FIGS. 32A y 32B). La cuantificación del tamaño tumoral mostraba una reversión total del tumor en el grupo tratado con vector pCM en comparación con el vector simulado o vacío (FIG. 33C). Las secciones de cerebro de ratones tratados con el grupo tratado con vector pC o pM, daban como resultado una regresión del tumor de aproximadamente un 50 % en comparación con los grupos de control. Las inyecciones intraperitoneales del vector también daban como resultado una regresión completa del crecimiento del tumor intracraneal establecido previamente sin indicación de células tumorales durante un periodo de tiempo largo de varios meses (FIG. 33D). Por lo tanto, el ARNi era capaz de erradicar completamente el crecimiento del tumor de glioma maligno en este modelo de ratón atómico. La supresión sostenida del crecimiento del glioma se podría deber a la amplificación del ARNsi. El ARNsi frente a catepsina B y MMP-9 elimina el crecimiento del glioma de forma más eficaz que el oligodesoxinucleótido antisentido para MMP-9 y catepsina B. Por lo tanto, el control de la expresión tanto de catepsina B como de MMP-9 tiene una significancia considerable para la regulación de la progresión del tumor.

60

Se demostró la eficacia anticáncer de la inhibición mediada por el ARNi de catepsina B y MMP-9. La comparación de los efectos supresores de oligonucleótido antisentido y los ARNsi dirigidos frente a las mismas dianas en células de mamífero reveló que el valor de la  $CI_{50}$  para el ARNsi era aproximadamente 100 veces menor que el de los oligonucleótidos antisentido. La capacidad del ARNsi para silenciar genes diana específicos de secuencia y las concentraciones menores necesarias para inhibir la expresión genética hacen del ARNi una herramienta potente para terapia genética.

65



**Ejemplo 31. Respuesta inmunogénica reducida para los ARNsi de plásmidos circulares**

Para desarrollar un vector capaz de producir moléculas de ARNsi de horquilla para uPA y uPAR, se usó el vector pCADN 3 plásmido de expresión en mamíferos. Las FIGS. 34-35 ilustran representaciones esquemáticas de las diversas formas de constructos de ARNi dirigidos por U6 y CMV. Se sintetizaron secuencias de repetición invertida autocomplementarias espaciadas con una región deficiente en G y C de 9 bases dirigida a uPA (346 a 367) y uPAR (77 a 89). Los oligos para uPA se terminaron con sitios *HindIII* y los oligos para uPAR se terminaron con *BamHI* y se auto hibridaron mediante calentamiento a 100 °C durante 5 min y se enfriaron a temperatura ambiente en 6x SSC que dio como resultado la formación de moléculas de ADN bicatenario con los respectivos extremos de sitios de restricción adhesivos. Estas moléculas de ADNds se ligaron a los sitios *BamHI* y *HindIII* del vector de plásmido pCADN3, dando como resultado la formación de un plásmido que contenía repeticiones invertidas para uPA y uPAR corriente abajo del promotor de CMV y se terminaban con un terminador de BGH. El plásmido resultante, denominado pU2, cuando se transfecta en las células de mamífero daba como resultado la producción de una molécula de ARNsi de horquilla doble que se dirigía tanto a uPA como a uPAR que adicionalmente se procesaban con un ARNds que reconocía enzimas (DICER) para producir moléculas de ARNsi individuales para inducir el ARNi. Se usó una secuencia homóloga a GFP en la construcción de un vector codificado. Se usaron secuencias imperfectas, que no forman una estructura de horquilla perfecta para desarrollar el vector codificado. Dos oligos autocomplementarios se sintetizaron y se hibridaron para generar una molécula de ADNds con sitios *HindIII*. Esta molécula de ADNds se ligaba en el sitio *HindIII* del plásmido de pCADN3. El plásmido resultante se denominaba pSV. El transcrito dirigido por CMV resultante no tenía estructura de tipo horquilla y no era homólogo con ningún gen nativo.

Un casete de expresión que expresa ARNsi para uPA y uPAR se subclonó en el vector lanzadera Ad5 en la región  $\Delta E1$  dirigida con cualquiera de un promotor de ARN pol II o de ARN pol III. El plásmido resultantes se cotransfectó con plásmido genómico Ad 5 (tal como PJM17) en 293 células permisivas de replicación para generar partículas de virus Ad 5 con déficit de replicación recombinante que contenían casete de expresión de ARNsi para uPA y uPAR (FIG. 36). Se construyó un vector de ARNi de GFP para determinar la especificidad de la dirección usando ARNi. Se usaron células SNB19 estables que expresaban GFP como controles y se transfectaron con ARNi dirigido frente a GFP. Las células transfectadas con ARNi de GFP perdieron la expresión de GFP (FIG. 37) mientras que no se observó cambio en la expresión del ARNm de GAPDH en la reacción de RT-PCR (FIG. 44).

Para determinar si los plásmidos circulares con cualquiera de los promotores U6 (ARN pol III) o CMV (ARN pol II) inducen respuesta inmune al nivel celular, se usaron 5 constructos con cualquiera de los promotores U6 o CMV. Las células SNB19 de glioma humano se transfectaron con plásmidos circulares que contenían cualquiera de los promotores U6 o CMV para dirigir lo siguiente: ningún inserto denominado vector vacío (EV), inserto de ARNi de GFP que no formara estructura de horquilla perfecta denominado vector codificado (SV), elemento de expresión de horquilla de ARNi para uPAR (puPAR), elemento de expresión de horquilla de ARNi para uPA (puPA), una expresión de horquilla de ARNi doble tanto para uPAR como para uPA (pU2). La RT-PCR se realizó para determinar los niveles de expresión de OAS1. El ARN total se aisló de cada una de las células transfectadas después de 48 h de transfección y la RT-PCR se realizó para determinar el nivel de expresión de OAS1 por 50 ng de ARN total. (La RT-PCR se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen)). No se produjo cambio en los niveles de ARNm de OAS1 ni en los niveles de ARNm de GAPDH en células SNB19 transfectadas con plásmidos circulares que contenían cualquiera de los promotores U6 o CMV (FIG. 38).

**Ejemplo 32. Comparación de ARN pol II (CMV) y ARN pol III (U6) como promotores para el inicio del ARNi.**

Para determinar la actividad y la eficacia de ARN pol II y de ARN pol III, se construyeron vectores de ARNi en plásmido pSilenciador (Ambion, Austin TX) para vector codificado, uPAR, uPA y combinación de uPAR-uPA al igual que en pCADN3. Los constructos de pSilenciador se terminaron con tetra Ts de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células SNB19 se transfectaron en dos conjuntos, un conjunto contenía promotor de CMV de ARN pol II y el segundo conjunto contenía promotor de U6 de ARN pol III (C, SV, puPAR, puPA y pU2). 48 h después de la transfección, las proteínas se extrajeron de las células de acuerdo con protocolos convencionales y se cargaron en un gel de poli(acrilamida) SDS al 12 % (10  $\mu$ g/calle). Se realizó transferencia de Western y zimografía de fibrina se realizó de acuerdo con protocolos convencionales y se investigó para uPAR y uPA y el control de carga se determinó mediante investigación para la GAPDH. A partir de la FIG. 39, era evidente que los constructos de promotor de ARN pol II eran más eficaces en la regulación negativa de las moléculas diana cuando se comparaba con los constructos de promotor de ARN pol III.

**Ejemplo 33. Determinación del gen OAS1 de respuesta a interferón.**

Se usaron constructos de plásmido para vector vacío (EV), vector codificado (SV), uPAR (puPAR), uPA (puPA), y el constructo bicistrónico para uPAR y uPA (pU2) para determinar el nivel de inducción de interferón en la línea de células SNB19 de glioma humano. La expresión del gen OAS1 se usó como un indicador para inducción de interferón. Se usaron plásmidos circulares (C), casete de expresión lineal (L), y casete de expresión lineal consecuencia señal de poli A de BGH suprimida ( $\Delta A$ ). Las células SNB 19 se transfectar un con cantidades equivalentes del plásmido o los casetes de expresión mencionados anteriormente (representación esquemática de

C, L, ΔA) y el ARN total se aisló después de 48 h de transfección usando protocolos convencionales. La RT-PCR se realizó en las muestras mencionadas anteriormente y los niveles de amplicón de OAS1 se determinaron en gel de agarosa. Los cebadores usados para amplificación de OAS1 fueron 5'-aggttgtaaagggtggctcc-3' y 5'-acaaccaggtcagcgtcagat-3'. Los cebadores usados para amplificar el casete de expresión de los plásmidos mencionados anteriormente (EV, SV, puPAR, puPA y pU2) fueron: cebador directo 5'ctggtgtcgacctgctccgcgatgtacgggc3' y cebador inverso 5'ctggtgtcgacatccccagcatgctgctat3' (FIG. 40).

La RT-PCR para inducción de ARNm de OAS1 (2'5'-oligoadenilato sintetasa) se realizó para determinar la importancia de una secuencia señal de poli A. Se usaron casetes circulares, lineales (solamente casete de expresión) y de expresión con secuencia señal de poli A suprimida (C, L, y -A respectivamente). En el caso de EV, no se esperaba que la longitud global del transcrito fuera superior a 1 kb y la estructura predicha del transcrito no tenía una estructura de ARNds significativa para inducir una respuesta inmune con o sin una cola de poli A como se observa en la figura (también en SV) (FIG. 44). Por el contrario, con puPAR, puPA y pU2, la estructura secundaria predicha poseía estructuras de ARNds pero con la presencia de una cola de poli A, aunque no se detectaba la inducción de respuesta inmune (expresión de OAS1). En el caso de casete de expresión solo, cuando estaba presente una secuencia señal de poli A pero el constructo transfectado era lineal, este inducía una respuesta inmune. Esto indicaba que la presencia de una molécula circular producía una cola de poli A viable; y dado que el constructo lineal se terminaba justo antes de la secuencia señal de poli A, el inicio de una cola de poli A viable no se iniciaba o era incompleto. En el caso de constructos lineales con una secuencia señal de poli A suprimida, la respuesta inmune se iniciaba, lo que indicaba que la presencia de una cola de poli A puede ser importante en la prevención de una respuesta inmune y en la estabilidad de la molécula de ARN transcrito (FIGS. 41-42).

El ARNm predicho del constructo bicistrónico no se parecía al del ARNm i y tenía una estructura perfecta de lazo y horquilla para secuencias tanto de uPAR como de uPA. Se introdujo una secuencia de 48 bases formando un ARNds parcial de 24 bases entre las secuencias de uPAR y uPA para permitir la transcripción eficaz de ambas moléculas de ARNs. La secuencia bicistrónica se terminaba con una secuencia de poli A codificada con una secuencia señal de BGH poli-ΔA (FIG. 43).

La RT-PCR para el gen OAS1, un gen de respuesta antiviral clásico, indicaba que no había respuesta inmune al igual que las células de control transfectadas y EV/SV. La RT-PCR también se realizó para transcritos del uPA y uPAR en células antisentido y transfectadas con ARNi. Tal como se determina con la RT-PCR, no se observó cambio en los transcritos de ARNm de uPAR o uPA en las células transfectadas antisentido, mientras que los niveles de ARNm de uPAR o uPA en las células transfectadas con ARNi se redujeron, lo que indica una destrucción del respectivo ARNm (24 h). El mecanismo del ARNi implica la destrucción de las moléculas de ARNm diana. La expresión de OAS1 era similar a la de los grupos de control (pGFP, pEV y pSV) lo que indica la ausencia de respuesta inmune a nivel celular (FIG. 44).

#### **Ejemplo 34. Localización *in situ* de vectores de expresión de ARNi.**

Las secciones embebidas en parafina se desparafinaron y se volvieron a hidratar de acuerdo con protocolos convencionales en condiciones sin nucleasa. Estas secciones se trataron con proteinasa K para revelar cualquier ADN unido a proteínas. El ADN se desnaturalizó de acuerdo con protocolos convencionales. Se tomó el plásmido de pcADN 3 y el casete de expresión que contenía el promotor del CMV (digerido con Nru I Hind III) se marcó con fosfatasa alcalina termoestable (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se hibridó con las secciones tratadas. La hibridación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ratones inyectados con simulado no presentaban actividad alguna de fosfatasa alcalina, mientras que los ratones tratados con inyecciones IP de EV, SV, puPAR, puPA o pU2 presentaban actividad de fosfatasa alcalina, lo que indica la presencia del promotor de CMV. La actividad de la fosfatasa alcalina se localizaban la mayoría de los casos alrededor de los vasos sanguíneos y mostraba patrones radiantes alrededor de la vasculatura, lo que indica al cruce de los vectores de plásmido que portan CMV a través de la barrera hematoencefálica (FIG. 45).

#### **Ejemplo 35. Determinación del gen OAS1 de respuesta a interferón para plásmidos circulares de uPAR-Catepsina B.**

Se usaron constructos de plásmido para vector vacío (EV), vector codificado (SV), uPAR (pU), catepsina B (pC), y el constructo bicistrónico para uPAR y catepsina B (pCU) para determinar el nivel de inducción de interferón en la línea de células SNB19 de glioma humano. La expresión genética de OAS1 se usó como un indicador de la inducción de interferón. Se usaron plásmidos circulares (C), casete de expresión lineal (L), y casete de expresión lineal con secuencia señal de poli A de BGH suprimida (-A). Las células SNB19 se transfectaron con cantidades equivalentes del plásmido o casetes de expresión mencionados anteriormente y el ARN total se aisló después de 48 h de transfección usando protocolos convencionales. La RT PCR se realizó en las muestras mencionadas anteriormente y los niveles de amplicón de OAS1 se determinaron en un gel de agarosa. Los cebadores usados para la amplificación de OAS1 fueron 5'-aggttgtaaagggtggctcc-3' y 5'-acaaccaggtcagcgtcagat-3'. Los cebadores usados para amplificar el casete de expresión de los plásmidos mencionados anteriormente (EV, SV, pU, pC y pCU) fueron: cebador directo 5'ctggtgtcgacctgctccgcgatgtacgggc3' y cebador inverso 5'ctggtgtcgacatccccagcatgctgctat3'.

La RT-PCR para inducción de ARNm de OAS1 (2',5'-oligoadenilato sintetasa) se realizó para determinar la importancia de una secuencia señal de poli A. Se usaron casetes circulares, lineales (solamente casete de expresión) y de expresión con secuencia señal de poli A suprimida (C, L, y -A respectivamente). En el caso de EV y SV, no se detectó sobre inducción de ARNm de OAS1. En el caso de EV, no se esperaba que la longitud global del transcrito fuera superior a 1 kb y la estructura predicha del transcrito no tenía una estructura de ARNs significativa para inducir una respuesta inmune con o sin una cola de poli A como se observa en la figura (también en SV). Por el contrario, con pU, pC y pCU, la estructura secundaria predicha poseía estructuras de ARNs pero con la presencia de una cola de poli A, aunque no se detectaba la inducción de respuesta inmune (expresión de OAS1). En el caso de casete de expresión solo, cuando estaba presente una secuencia señal de poli A pero el constructo transfectado era lineal, este inducía una respuesta inmune. Esto indicaba que la presencia de una molécula circular producía una cola de poli A viable; y dado que el constructo lineal se terminaba justo antes de la secuencia señal de poli A, el inicio de una cola de poli A viable no se iniciaba o era incompleto. En el caso de constructos lineales con una secuencia señal de poli A suprimida, la respuesta inmune se iniciaba, lo que indicaba que la presencia de una cola de poli A puede ser importante en la prevención de una respuesta inmune y en la estabilidad de la molécula de ARN transcrito.

La inducción de OAS1 se examinó en tumores de xenoinjerto intracraneal tratados con EV, SV, pU, pC y pCU. Se incluyeron los ratones normales que se trataron con interferón  $\alpha$  (3  $\mu$ g/ratón) por vía intracraneal y se sacrificaron 5 horas más tarde. El bazo y el hígado se usaron como tejidos de control normal para corroborar la especificidad del anticuerpo en el que la presencia de expresión de OAS1 estará presente en condiciones normales. Además, de la inmunohistoquímica, se realizó hibridación *in situ* en estos tejidos usando oligos sentido (acaaccaggctcagcgtcat) para determinar los niveles de ARN en OAS1. Solamente había una expresión muy mínima de ARNm de OAS1 y proteína en los cerebros de ratón con tumores intracraneales con intracraneal o en los cerebros de los ratones tratados con pU, pC y pCU. En particular, no se producía inducción de OAS1 en el grupo tratado con pCU.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcción de plásmido se expresan ARN de horquilla pequeña:

**uPA-uPAR:** Se sintetizaron y se hibridar un oligonucleótidos de interferencia pequeños específicos para uPA de 346 a 367 bases (agcttGagagccctgctggcgcgccatataatggcgcgccagcagggctctca) y para uPAR de 77 a 98 bases (gatccTacagcagtgagagcggattatataataatcgctctccactgctgtag). Se construyó un vector de plásmido de ARNi uPA-uPAR que expresan los ARNsh tanto para uPA como para uPAR bajo el control de un promotor de CMV humano mediante la inserción de pares de oligonucleótidos de ADN hibridados específicos para uPA en el sitio *Hind III* y uPAR en el sitio *BamHI* secuencialmente en el vector pcADN3 (sh-uPAuPAR). También se construyeron vectores de expresión de ARNsh para uPA (sh-uPA) y uPAR (sh-uPAR) de forma individual. Un vector codificado con pcADN3 con una secuencia imperfecta, que no forma parte de la estructura de horquilla perfecta, se usó para desarrollar el vector codificado para uso como un control. Los controles de vector vacío (EV) y de vector codificado (SV) se han sometido al ensayo en múltiples líneas celulares y no demuestran ninguna toxicidad con respecto a células tal como se demuestra con el ensayo de MTT después de transfección así como que no tienen efecto en la expresión de genes constitutivos, GAPDH y  $\gamma$ -actina.

**uPAR y MMP-9.** Se usó pcADN 3 para la construcción de un vector que expresa ARNsi tanto para uPAR como para MMPs-9 corriente abajo del promotor de citomegalovirus (CMV) (Esquema 1). La secuencia de uPAR de +77 a +98 se usó como la secuencia diana y por conveniencia se usó un oligo de autocomplementariedad. La secuencia de uPAR de 21 bases de longitud con una región lazo de 9 bases y sitios de *BamHI* se incorporaron en los extremos (gatctacagcagtgagagcggattatataataatcgctctccactgctgtag). El oligo se autohibridó en 6x SSC usando protocolos convencionales y se ligó en el sitio *BamHI* de un plásmido vector de pcADN-3. De forma análoga, una secuencia complementaria de MMP-9 de +360 a +381 (aattcaagtggcaccaccacaacaatatataattgtgtggtggtgcccattg) con sitios *EcoRI* incorporados en los extremos se ligó en el sitio *EcoRI* del vector que contenían la secuencia de ARNsi para uPAR. Por último, esto dio como resultado un plásmido de expresión de ARNsi para uPAR y MMP-9 con una separación de 35 pb. La orientación de cualquier inserto no importaba dado que los oligos son autocomplementarios y tienen una simetría bilateral. El terminador SV40 sirvió como una señal de parada para la síntesis de ARN.

**Catepsina B y uPA:** Se usó pcADN 3 para la construcción de un vector que expresa ARNsi tanto para catepsina B como para uPAR corriente abajo del promotor de citomegalovirus (CMV) (FIG. 17). La secuencia de uPAR de +77 a +98 se usó como la secuencia diana y por conveniencia se usó un oligo autocomplementario. Se usó la secuencia de uPAR de 21 bases de longitud con una región lazo de 9 bases con sitios *BamHI* incorporados en los extremos (gatctacagcagtgagagcggattatataataatcgctctccactgctgtag). El oligo se autohibridó en 6x SSC usando protocolos convencionales y se ligó en el sitio *BamHI* de un plásmido vector de pcADN-3. De forma análoga, una secuencia complementaria de catepsina B de +732 a +753 (tcgaggtggcctctatgaatccaatatataattgggattcatagagccacc) con sitios *XhoI* incorporados en los extremos se ligó en el sitio *XhoI* del vector que contenían la secuencia de ARNsi para uPAR. Por último, esto dio como resultado un plásmido de expresión de ARNsi para catepsina B y uPAR denominado pCU. También se construyeron vectores de expresión de ARNsi individuales para uPAR (pU) y catepsina B (pC). La orientación de cualquier inserto en el individual o bicistrónico no importaba dado que los oligos eran autocomplementarios y presentaban simetría bilateral. Un terminador de BGH poli A sirvió como una señal de

parada para la síntesis de ARN de los tres constructos.

**uPAR, uPA y MMP-9:** Se usó pcADN3 para la construcción de un vector que expresa ARNsi para uPAR, uPA y MMP-9 corriente abajo del promotor de citomegalovirus (CMV). La secuencia de uPAR de +77 a +98 se usó como la secuencia diana y por conveniencia se usó un oligo autocomplementario. Se usó la secuencia de uPAR de 21 bases de longitud con una región lazo de 9 bases con sitios BamHI incorporados en los extremos (gatcctacagcagtgagagcgattatataataatcgctctccactgctgtag). El oligo se autohibridó en 6x SSC usando protocolos convencionales y se ligó en el sitio BamHI de un plásmido vector de pADN3. De forma análoga, la secuencia complementaria de uPA de +346 a +367 (agcttgagagccctgctggcgcgcatatataatggcgcgccagcagggtctca) con sitios HindIII incorporados en los extremos se ligó en el sitio HindIII y MMP-9 de +360 a +381 (aattcaagtgccaccaccacaacaatataatgtgtgtgtgtgccacttg) se ligó en el sitio EcoRI del vector que contenía la secuencia de ARNsi para uPAR y uPA. Por último, esto dio como resultado un plásmido de expresión de ARNsi para uPAR, uPA y MMP-9 denominado pU<sub>2</sub>M. También se construyeron vectores de expresión de ARNsi individuales para uPAR (puPAR), uPA (puPA) y MMP-9 (pMMP-9). La orientación del inserto en cualquiera del constructo individual o tricistónico no era un factor porque los oligos eran autocomplementarios y presentaban simetría bilateral. El terminador de BGH poli A sirvió como una señal de parada para síntesis de ARN para los cuatro constructos.

**Catepsina B y MMP-9:** Se sintetizaron secuencias de repetición invertida autocomplementarias espaciadas con una región deficiente en G y C de 9 bases dirigida a catepsina B (732 a 753) y MMP-9 (360 a 381). Los oligos para catepsina B se terminaron con sitios *XhoI* y los oligos para MMP-9 se terminaron con *EcoRI* y se auto hibridaron mediante calentamiento a 100 °C durante 5 min y se enfriaron a temperatura ambiente en 6x SSC que daría como resultado la formación de moléculas de ADN bicatenario con los respectivos extremos de sitios de detención adhesivos. Estas moléculas de ADNds se ligaban a los sitios *XhoI* y *EcoRI* del vector plásmido de pCADN, dando como resultado la formación de un plásmido que contenía repeticiones invertidas para catepsina B y MMP-9 corriente abajo del promotor del CMV y terminadas con un terminador de SV40. El plásmido resultante denominado pCM transfectado a células de mamífero daría como resultado la producción de una molécula de ARNsi de horquilla doble dirigida tanto a Catepsina B como a MMP-9 que se procesaría adicionalmente mediante un ARNds de reconocimiento enzimático (DICER) para producir moléculas de ARNsi individuales para inducir ARNi (Esquema 1).

#### **Condiciones de cultivo y transfección celular:**

**Células de cáncer de próstata:** Se obtuvieron líneas de células de cáncer de próstata humana, LNCaP, DU145 y PC3, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Las células LNCaP se cultivaron en medio RPMI complementado con L-glutamina 2 mM, 1,5 g/l de bicarbonato sódico, 4,5 g/l de glucosa, HEPES 10 mM, y piruvato sódico 1,0 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células PC3 y DU145 se cultivaron en medio esencial mínimo. Ambos medios contenían suero bovino fetal al 10 % (GIBCO BRL, Lewisville, TX) y penicilina al 5 %/estreptomina y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se realizaron transfecciones usando el reactivo Lipofectamine™ 2000 (Life technologies, Rockville, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 72 h de transfección, las células usaron para ensayos de proliferación celular, análisis de inmunotransferencia, análisis de RT-PCR, ensayo de invasión con Matrigel, ensayo de fragmentación de ADN, ensayo de EMSA y ensayo de actividad de caspasa. Para inmunotinción con DAPI y doble, se realizaron transfecciones en portaobjetos de cámara Lab-Tek II (Nalge Nunc International, Naperville, IL).

**Células de glioblastoma:** La línea de células SNB19 de glioblastoma humano mantuvo en DMEM F-12 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) complementado con FCS al 10 %, 100 pg/ml de estreptomina y 100 unidades/ml de penicilina (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % humidificada. Las células se transflectaron con pC pU o plásmido de pCU que expresa ARNsi usando el reactivo Lipofectamine (Invitrogen Grand Island, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de transfección, las células se incubaron en medio que contenía suero durante 48 h.

**Zimografía de fibrina:** La actividad enzimática y el peso molecular de formas de uPA separadas electroforéticamente se determinaron en medio acondicionado de líneas de células de cáncer de próstata, LNCaP, DU145 y PC3, con SDS-PAGE. En resumen, el gel de SDS-PAGE contiene acrilamida a la que se añadieron estratos purificados de plasminógeno y fibrinógeno antes de la polimerización. Después de la polimerización, cantidades iguales de proteínas en las muestras se sometieron a electroforesis en el gel que se lavó y se tiñó. Las células SNB 19 transflectadas con EV/SV puPAR, puPA, pMMP-9 y que pU<sub>2</sub>M también se prepararon como se describe en el presente documento.

**Zimografía de gelatina.** Se recogieron medios acondicionados a partir de transflectadas con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM y se centrifugaron para retirar residuos celulares. Se sometieron a ensayo veinte microgramos de las muestras resultantes para actividad de gelatinasa usando dodecil sulfato sódico al 10 %-geles de poli(acrilamida) que contenían gelatina (0,5 mg/ml). Los geles se tiñeron con negro de Amido (Sigma Aldrich ST LOUIS MO) y la actividad de gelatinasa se visualizó en forma de áreas con bandas transparentes en los geles. Las células SNB 19 transflectadas con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M también se prepararon como se describe en el presente documento.

**Análisis de transcripción inversa-PCR:**

**uPA-uPAR:** Se aisló ARN celular usando el kit RNeasy de Qiagen y 1 g de ARN se trató con DNasa (10 unidades/g de ARN, 1 h) y se usó como un molde para la reacción de transcripción inversa (RT, 20 1). La mezcla de reacción de RT (Invitrogen) contenía 11 (10 pm) de cebadores. El ADNc resultante se usó a continuación en reacciones de PCR y se analizó mediante electroforesis en gel. Se usaron los siguientes cebadores:

uPA-sentido: 5'TGCGTCCTGGTCGTGAGCGA 3';  
 uPA-antisentido: 5'CTACAGCGCTGACACGCTTG 3';  
 uPAR-sentido: 5'CATGCAGTGTAAGACCCAACGGGGA 3';  
 uPAR-antisentido: 5'AATAGGTGACAGCCCGGCCAGAGT 3';  
 GAPDH-sentido: 5'CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT 3'; y  
 GAPDH-antisentido: 5'AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC3'.

Tabla: 1

<b>Cebadores de RT-PCR (MMP-9, UPAR)</b>	<b>uPAR</b>	CATGCAGTGTAAGACCCAACGGGGA
		AATAGGTGACAGCCCGGCCAGAGT
	<b>MMP-9</b>	GTTGCGAAATTAGTTTGGTTAAC
		CCGAATAACTAATATTATAAACG
	<b>GAPDH</b>	<b>CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT</b>
		<b>AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC</b>
<b>Sondas usadas</b>	<b>sGFP (3)</b>	GAGCTGTTCCACGGGGTGGTG
	<b>suPAR (1)</b>	CTACAGCAGTGGAGAGCGATT
	<b>sMMP-9 (2)</b>	CAAGTGGCACCACCACAACAA

El análisis de RT-PCR para células SNB19 transfectadas con control/EV, SV, puPAR, pMMP-9 y pUM se realizó como se describe en el presente documento.

Las condiciones de PCR fueron las que siguen a continuación: 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 títulos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 1 minuto. La extensión final se produjo a 72 °C durante 5 min. La temperatura de hibridación varía dependiendo de la secuencia de los diversos constructos y se realizó siguiendo procedimientos convencionales.

**Detección de Inmunofluorescencia de PC3:** Se fijaron células PC3 transfectadas con diversos plásmidos de ARNsh con paraformaldehído al 4 % y se incubaron con anti-uPA (1: 500; Biomedica, Foster City, CA) y/o anti-uPAR (1: 500; American Diagnostics Inc., Greenwich, CT). Después de lavado, se añadieron anticuerpos secundarios fluorescentes (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) con una dilución a 1:500. Las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS, se contratiñeron con DAPI. Se tomaron imágenes de fluorescencia usando una Cámara RT Slider Spot con dispositivo de carga acoplado (Diagnostic Instruments Inc, Burroughs Sterling Heights, MI) conectada a un microscopio (Olympus, Melville, NY) y dirigida con un ordenador equipado con el software v3.5 RT de aplicación puntual (Diagnostic instruments, Burroughs Sterling Heights, MI).

**Ensayo de invasión en de Células PC3:** Después de transfección, las células se separaron y se lavaron dos veces en PBS. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células en la cámara superior de un inserto Transwell (poros 12  $\mu$ M) revestido con Matrigel (0,7 mg/ml) (Collaborative Research Inc., Boston, MA). La cámara inferior se rellenó con 4001 de medio RPMI. Después de un periodo de incubación de 24 h, las células no migradas en la Cámara superior se retiraron raspando cuidadosamente y las células adherentes presentes en la superficie inferior del inserto se tiñeron con Hema-3 y se fotografiaron.

**Ensayo de actividad de caspasa *in situ*:** La activación de la caspasa se detectó usando el kit de detección de policaspasa (Immunochemistry Technologies, Bloomington, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este ensayo, los inhibidores de Caspasas de Fluorocromo no citotóxicos, permeables a las células (FLICA) se unen de forma covalente a un resto de cisteína reactivo en la subunidad grande del heterodímero de caspasa activo, inhibiendo adicionalmente de este modo la actividad enzimática. Este kit usa un inhibidor peptídico de muchas caspasas de fluorometil cetona marcado con carboxifluoresceína (caspasa 1, -3, -4, -5, -6, -7, -8 y -9; FAM-VAD-FMK), que es una sonda genérica para la detección de la mayoría de las caspasas y emite fluorescencia de color verde. La señal fluorescente de color verde es una medida directa de la cantidad de caspasa activa en la célula en el momento en el que se añade el reactivo. Después de 72 h de transfección, la activación de la caspasa se detectó mediante tinción de las células con el colorante FAM-VAD-FMK (marcador *in situ*). El marcador unido se localizó mediante detección de fluorescencia tal como se observó con un microscopio confocal. Para tinción nuclear se usó

DAPI.

**Ensayo marcador de ADN:** Después de transfección, las células se cosecharon y se lavaron dos veces en PBS. Los sedimentos celulares se volvieron a suspender en tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM y Triton X-100 al 1 %) que contenía 0,1 mg/ml de Proteinasa K (Invitrogen) y a continuación se incubó a 37 °C durante 2 h. El ADN se eliminó de los lisados mediante centrifugación y a continuación se extrajo usando un volumen igual de fenol/cloroformo y se precipitó mediante la adición de etanol absoluto y acetato sódico 0,3 M (pH 5,2) a -80 °C durante 2 h. El ADN se volvió a suspender en tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM; pH 7,5, EDTA 1 mM), se trató con RNasa A a 37 °C durante 1 h, y a continuación se resolvió en un gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml).

**Ensayo electroforético de desplazamiento de movilidad (EMSA):** Después de transfección, se extrajeron proteínas nucleares usando un kit de extracción de proteína (Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de las proteínas nucleares se determinaron en nuestras diluidas usando un procedimiento con ácido bicíncónico (Pierce Biochemical Company, Rockford, IL). La interacción entre Stat 3 en el estrato de proteína y la sonda de ADN se investigó usando un kit de ensayo electroforético de desplazamiento de movilidad (EMSA) de Panomics (Redwood City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Ensayo de marcado del extremo del fragmento de ADN:** secciones de tejido de tumor de próstata tratadas con ARNsh o control (5 M de espesor) se desparafinizaron y se volvieron a hidratar. A continuación, las secciones de tejido se permeabilizaron y cubriendo la muestra de ensayo completa con solución de Proteinasa K (20 g/ml de Proteinasa K en Tris 10 mM, pH 8) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con Tris (1x de TBS, Tris 20 mM a pH 7,6, NaCl 140 mM). La inactivación de las peroxidasas endógenas se consiguió sumergiendo las secciones de tejido en peróxido de hidrógeno al 3 % diluido en metanol durante 5 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos de vidrio se colocaron a continuación en tampón de equilibrio Klenow (Tris 50 mM a pH 8, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) durante 30 min. A continuación, las secciones de tejido se incubaron con 60 l de una solución que contenía una mezcla de desoxinucleótidos marcados y sin marcar a una proporción óptima de marcado del extremo del fragmento de ADN con Klenow, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de detección de fragmentación de ADN Klenow-FragEL, Oncogene Research Products, Cambridge, MA) a 37 °C durante 90 min en una cámara humidificada. La reacción enzimática se detuvo mediante incubación con EDTA (0,5 M, pH 8) durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación los portaobjetos se lavaron con TBS y se sumergieron en tampón de bloqueo durante 10 min (BSA al 4 % en PBS) seguido de incubación con 100 l de una solución que contenía peroxidasa estreptavidina durante 30 min en una cámara humidificada a temperatura ambiente. A continuación, las secciones de tejido se lavaron en TBS y se cubrieron con una solución que contenía 3, 3' diaminobencidina (DAB, 0,7 mg/ml), peróxido de hidrógeno y urea (0,6 mg/ml). A continuación, los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se contratiñeron con verde de metilo (0,3 %) durante 30 segundos y se examinaron en un microscopio de fluorescencia de Olympus. La tinción positiva marcada del extremo del fragmento de ADN se puntuó a partir de seis imágenes/muestras capturadas de forma aleatoria usando el software v3.5 de RT de aplicación puntual (Diagnostic instruments, MI).

**Modelo ortotópico de tratamiento de próstata de ratón:** Los ratones desnudos macho atímicos (*nu/nu*; 6-8 semanas de edad) se obtuvieron en Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). La manipulación de los animales y los procedimientos experimentales son aprobados por el comité de experimentos animales de la University of Illinois College of Medicine. La implantación ortotópica se realizó como se ha descrito anteriormente. En resumen, después de la anestesia total del cuerpo con quetamina (50 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg), se realizó una incisión en la línea media baja en el abdomen inferior. Se inyectó una suspensión de células PC3 cells (1 x 10<sup>6</sup>) en 30 µl de PBS en un lóbulo lateral de la próstata y la herida se cerró con grapas metálicas quirúrgicas. Esta concentración celular era necesaria para conseguir un crecimiento del tumor local coherente a los 7 días de la implantación. Los ratones se dividieron en cinco grupos de tratamiento con seis ratones por grupo de tratamiento. Los días 7 y 14 después de la implantación, se realizó una incisión de la línea media baja y los tumores se inyectaron con constructos de plásmido que expresaban controles de sh-uPA, sh-uPAR, sh-uPA-uPAR o EV/SV (75 µg/150 µg cada una). En otro conjunto de experimentos, los ratones implantados por vía ortotópica se coinyectaron por vía intratumoral con plásmidos de sh-uPA y sh-uPAR (150 µg cada uno) los días 7 y 14. Los ratones se sacrificaron 14-15 días después de la inyección final de plásmido de ARNsh y el crecimiento del tumor primario y los sitios de metástasis se determinaron mediante inspección visual y se fotografiaron. A continuación, los tumores primarios se escindieron, se midieron y se pesaron. Las muestras de ensayo se fijaron en formalina y se embebieron en parafina para tinción con H y E. Además, una parte del tejido se congeló de forma instantánea inmediatamente para inmunotransferencia.

**Transferencia de Western.** Las células SNB19 se transfectaron con simulado, vector vacío, pC, pU o pCU y se cultivaron 48 h. Al final de la incubación, las células se cosecharon, se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron en tampón (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 1 %, pH 7,4), que contenían inhibidores de proteasa. Cantidades iguales de proteína (30 µg/calle) a partir de sobrenadantes o células se sometieron a electroforesis en condiciones no reductoras en geles de acrilamida al 10 %. Después de SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Bio-Rad). Para bloquear la unión no específica, la membrana se incubó durante 2 h en PBS con Tween-20 [T-PBS] al 0,1 % que contenía leche desnatada sin grasa al

5 % durante 2 h. Posteriormente, la membrana se incubó durante 2 h con anticuerpo frente a cathepsina B, uPAR, ERK, pERK, FAK o pFAK respectivamente en T-PBS + leche sin grasa al 5 %. Después de lavar en T-PBS, la proteína en la membrana se visualizó en usando el kit de detección ECL™ con un anticuerpo anticonejo marcado con peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el control de carga, las membranas se separaron y se investigaron con anticuerpos monoclonales para β-actina, de acuerdo con protocolos convencionales. El análisis de inmunotinción para células SNB19 que se transfectaron con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU2M también se realizó como se describe en el presente documento. Los siguientes anticuerpos se usaron para el análisis de inmunotransferencia de uPA-uPAR: anti-uPA (Biomedica, Foster City, CA), anti-uPAR (American Diagnostics Inc., Greenwich, CT), anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Bcl-X<sub>SL</sub>, (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-caspasa 9 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA), y anti-GAPDH (Abcam, Cambridge, MA). Los anticuerpos frente a las formas total y fosfo de ERK, JNK, p38 y Stat 3 se obtuvieron en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). La transferencia de Western para células SNB19 que se transfectaron con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU2M también se realizó como se describe en el presente documento.

**Análisis inmunohistoquímico.** Las células SNB19 ( $1 \times 10^4$ ) se sembraron en portaobjetos de cámara de 8 pocillos revestidos con vitronectina, se incubaron durante 24 h y se transfectaron con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM. Después de otras 72 h, las células se fijaron con formaldehído al 3,7 % y se incubaron con albúmina en suero bovino al 1 % en PBS a temperatura ambiente durante 1 h para bloqueo. A continuación, los portaobjetos se lavaron con PBS, se añadió cualquiera de anti-uPAR de IgG (conejo) o anti-MMP-9 de IgG (ratón) a una concentración de 1:200. Los portaobjetos se incubaron a 4 °C durante una noche y se lavaron tres veces con PBS para retirar el exceso de anticuerpo primario. Las células se incubaron a continuación con IgG de conjugado de FITC anti-ratón o conjugados de anti-FITC (dilución a 1:500) durante 1 h a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron a continuación tres veces, se cubrieron con cubreobjetos de vidrio y se obtuvieron fotomicrografías fluorescentes. Se obtuvieron imágenes mezcladas compuestas para visualizar la expresión de uPAR y MMP-9 en células transfectadas con control/EV, SV, puPAR, pMMP-9 y pUM.

**Ensayo de proliferación de Células SNB19.** El crecimiento celular se evaluó mediante ensayo de MTS. Para detectar el efecto de estos constructos en el crecimiento de las células SNB19 *in vitro*, se midió la masa de células viables usando el ensayo de colorimetría Cell Titer 96™. Se sembraron  $5 \times 10^3$  células de glioblastoma por triplicado en placas de 96 o 24 pocillos y se permitió que crecieran durante 24 h antes de la transfección con vectores de medio de cultivo solo (simulado), EV, SV, pC, pU y pCU durante 48 h. A continuación, estas células se cambiaron a medio que contenía suero y se permitieron diferentes intervalos de tiempo. Antes de cada punto temporal, se añadió el reactivo de MTS y continuó la incubación durante un periodo adicional de 2 h para permitir el desarrollo de color. Se midió A490 en cada pocillo usando un lector de placas de ELISA. Las lecturas de absorbancia para cultivos celulares a corto plazo con respecto a largo plazo se compararon, y los efectos de estos constructos se interpretaron con respecto al crecimiento de los grupos sin tratar/control correspondientes. El porcentaje de inhibición del crecimiento debido a los constructos de ARNs se calculó con respecto a la tasa de crecimiento de las mismas células en el mismo medio menos estos constructos.

**Ensayos de proliferación de células PC3:** La viabilidad de células 72 h después de la transfección se evaluó usando un ensayo de MTT. Se añadió MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (Sigma) al medio de cultivo en cada pocillo a una concentración de 500 g/ml, y las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C. Se añadió inmediatamente ácido-isopropanol (HCl 0,04 N/isopropanol) a los pocillos y se mezcló vigorosamente de modo que los cristales de color azul oscuro se disolvieron de forma eficaz. La absorbancia se midió 570 nm (Benchmark, BIORAD, Hercules, CA).

**Ensayo angiogénico *in vitro* de SNB19.** Se sembraron células SNB19 cells ( $2 \times 10^4$ ) en portaobjetos de cámara de 8 pocillos y se transfectaron con simulado, EV, pU, pC y pCU de acuerdo con protocolos convencionales. Después de un periodo de incubación de 24 h, el medio se retiró y se sembraron  $4 \times 10^4$  células endoteliales de dermis humana y se permitió el cocultivo durante 72 h. Después de fijación en formaldehído al 3,7 %, las células endoteliales se investigaron de forma inmunológica para factor VIII antigénicos. El anticuerpo del factor VIII se adquirió en DAKO Corporation (Carpintería, CA). Las células se lavaron con PBS y se incubaron con FITC conjugado con anticuerpo secundario durante 1 h. y a continuación se lavaron y se examinaron con un microscopio de fluorescencia. Los portaobjetos similares de células endoteliales cultivadas en presencia de medios acondicionados a partir de las células SNB 19 transfectadas con el simulado, EV, pU, pC o pCU se tiñeron con H y E topara visualizar la formación de redes. Para la cuantificación de la angiogénesis usó el software Image Pro soft, el grado de angiogénesis se midió con el siguiente método: se hizo el recuento del número de puntos de ramificaciones y el número total de ramificaciones por punto de forma aleatoria (por 10 campos), con el producto indicando el grado de angiogénesis en comparación con los controles. Los ensayos angiogénicos *in vitro* para células SNB19 ( $2 \times 10^4$ ) sembradas en portaobjetos de cámara de 8 pocillos y transfectados con simulado/EV, puPAR, pMMP-9 y pUM se realizaron como se describe en el presente documento. Los ensayos angiogénicos para células SNB19 ( $1 \times 10^4$  pocillo<sup>-1</sup>) sembradas en portaobjetos de cámara de 8 pocillos, incubadas durante 24 horas y transfectadas con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y que pU2M se realizaron como se describe en el presente documento.

**Modelo de cámara de pliegue cutáneo dorsal:** Se alimentaron ratones desnudos alquímicos (nu/nu; 18 macho/hembra, 28-32 g) y se mantuvieron dentro de un entorno sin gérmenes con patógenos específicos con la técnica de implantación del modelo de cámara de pliegue cutáneo dorsal. Se siguieron técnicas quirúrgicas estériles para animales pequeños. Los ratones anestesiaron mediante inyección ip con quetamina (50 mg/kg) y zilazina (10 mg/kg). Una vez que el animal se anestesió completamente, se realizó un saco de aire dorsal en el ratón mediante inyección de 10 ml de aire. Se prepararon cámaras de difusión (Fisher) mediante alineamiento de membranas de 0,45 micrómetros de Millipore (Fisher) en ambos lados del borde del anillo en "O" (Fisher) con sellado. Una vez que las cámaras estaban secas (2-3 min), se esterilizaron con variación UV durante 20 min. Se usaron 20 µl de PBS para humedecer las membranas. Se inyectaron 2 x 10<sup>6</sup> células SNB 19 (simulado, vector vacío o pCU transfectado), suspendidas en 100-150 µl de PBS estéril, en la cámara a través de abertura del anillo en "O". La abertura se cerró herméticamente con una pequeña cantidad de cera ósea. Se realizó una incisión superficial de ½ a 2 cm de forma horizontal a lo largo del borde del saco de aire dorsal y el saco de aire que se abrió. Con la ayuda de fórceps, las cámaras se colocaron por debajo de la piel y se suturaron con cuidado. Después de 10 días, los animales se anestesiaron con quetamina/xilazina y se sacrificaron mediante perfusión intracardiaca con solución salina (10 ml) seguido de una solución de 10 ml de formalina al 10 %/fosfato 0,1 M y seguido de solución de FITC al 0,001 % en PBS. Los animales se sensibilizaron con cuidado alrededor de las cámaras implantadas y las cámaras implantadas se retiraron desde la fascia aérea s.c. El pliegue cutáneo que cubría las cámaras se fotografió con luz visible y para fluorescencia de FITC. Se hizo recuento de los números de vasos sanguíneos dentro de la cámara en la zona de la fascia del saco de aire y sus longitudes se midieron. También se usaron células SNB 19 transfectadas con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM para modelo de cámara de pliegue cutáneo dorsal como se describe en el presente documento.

**Ensayo de Migración de Células SNB19:** Una suspensión de 2 x 10<sup>6</sup> en medio de Eagle modificado con Dulbecco de una variante de expresión de GFP de células SNB19 se pipeteó en placas de cultivo de tejido de 100 mm de unión ultra baja y se cultivaron hasta que se formaron agregados esferoides. Se seleccionaron esferoides que median ~150 µm de diámetro (aproximadamente 4 x 10<sup>4</sup> células/esferoide), se transfectaron con simulado, vector vacío, pC, pU y pCU y se cultivaron durante 48 h. 72 h después de la transfección, un esferoide de un solo glioma se puso en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos revestida con vitronectina (50 µg/ml) y se cultivó con 200 µl de medio libre sin suero. Los esferoides se incubaron a 37 °C durante 24 h, tras lo cual los esferoides se fijaron y se tiñeron con Hema-3 y se fotografiaron. La migración de las células desde los esferoides a las monocapas se midió usando un microscopio calibrado con una plataforma y micrómetro ocular y se usó como un índice de migración celular. Las células de glioblastoma se sembraron por triplicado en placas de 96 o 24 pocillos y se permitió que crecieran durante 24 h antes de la transfección con medio de cultivo solo (simulado), EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM como se describe en el presente documento. Se realizaron ensayos de migración celular para células SNB19 transfectadas con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM como se describe en el presente documento. Los ensayos para células SNB19 (1 x 10<sup>4</sup> pocillo<sup>-1</sup>) sembradas en portaobjetos de cámara de 8 pocillos, incubadas durante 24 horas y transfectadas con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M se realizaron como se describe en el presente documento.

**Ensayo de invasión en cámara de Boyden de células SNB19:** La capacidad de invasión *in vitro* de células SNB19 cells en presencia del vector que expresa ARNsi para cathepsina B y uPAR se evaluó usando un ensayo modificado en cámara de Boyden. Las células SNB19 se transfectaron con simulado, EV, pU, pC o vector pCU que expresa ARNsi para cathepsina B y uPAR individual o en conjunto durante 48 h. Se suspendieron 1 x 10<sup>6</sup> células en 600 µl de medios y suero complementado con BSA al 0,2 % y se colocaron en el compartimento superior de las cámaras Transwell (Nº de Cat 07-200-158 de Corning Costar Fischer Scientific, Pittsburg, PA) revestidas con Matrigel (0,7 mg/ml). El compartimento inferior de la cámara se llenó con 200 µl de medio sin suero y se permitió que las células migraran durante 24 h. Después de incubación, las células se fijaron y se tiñeron con Hema-3 y se fotografiaron. Se realizó cuantificación del ensayo de invasión. Los ensayos para células SNB19 (1 x 10<sup>4</sup> pocillo<sup>-1</sup>) sembradas en portaobjetos de cámara de 8 pocillos, incubadas durante 24 horas y transfectadas con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M se realizaron como se describe en el presente documento.

**Ensayo de SNB19 Esferoide:** Se sembraron células de glioblastoma SNB19 (3 x 10<sup>6</sup>) en placas de cultivo de tejidos de 100 mm (Corning, Corning, NY) revestidas previamente con agar al 0,75 % preparadas en DMEM y se cultivaron hasta que se formaron agregados esferoides. Se seleccionaron esferoides de 100-200 µm de diámetro y se transfectaron con simulado, vector vacío, pC, pU y pCU durante 48 h. Tres días después de la infección, se tiñeron esferoides de SNB19 con el colorante fluorescente Dil y se colocaron en contacto con agregados de cerebro de rata fetal teñidos con DiO. La destrucción progresiva de los agregados de cerebro de rata fetal y la invasión de células SNB 19 se observaron con microscopía de barrido láser confocal y se fotografiaron como se ha descrito anteriormente. El volumen restante de agregados de cerebro o esferoides tumorales durante los cocultivos se determinó como se ha descrito anteriormente. Los ensayos de esferoides para células SNB19 transfectadas con EV/SV, puPAR, pMMP-9 y pUM se realizaron como se describe en el presente documento. Los ensayos para células SNB19 (1 x 10<sup>4</sup> pocillo<sup>-1</sup>) sembradas en portaobjetos de cámara 8 pocillos, incubadas durante 24 horas y transfectadas con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M se realizaron como se describe en el presente documento.

**Experimentos con ratones para análisis de glioma.** Se inyectaron células SNB19 GFP (2 x 10<sup>6</sup>) en los cerebros de ratones atímicos usando un marco estereotáctico. Después de 8-10 días, los ratones se trataron con simulado, vector vacío de EV/SV, pC, pU y pCU. La administración intracraneal *in vivo* de vectores se realizó usando bombas



mini-osmóticas de Alzet (Direct Corp. Cupertino, CA) a la tasa de 0,25  $\mu\text{l/hr}$ , simulado (PBS) de 150  $\mu\text{g}$  de ADN vector, 150  $\mu\text{g}$  de pC, 150  $\mu\text{g}$  de pU, 150  $\mu\text{g}$  de pCU o vector de puPAR (150  $\mu\text{g}$ ), vector de pMMP-9 (150  $\mu\text{g}$ ) y vector de pUM (150  $\mu\text{g}$ ) se inyectaron en el cerebro (100  $\mu\text{l}$  por ratón). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales establecidas por el Institutional Animal Control Users Committee que aprueba los experimentos en la University of Illinois College of Medicine en Peoria. Después de 5 semanas, o cuando los ratones de control comenzaron a mostrar síntomas, los ratones se sacrificaron mediante perfusión cardiaca con formaldehído. Los cerebros se retiraron a continuación y se embebieron en parafina de acuerdo con protocolos convencionales. Las secciones se prepararon y se observaron para expresión de GFP o se tiñeron con H y E. Las secciones se revisaron de forma oculta y se actuaron de forma semicuantitativa para tamaño del tumor en cada caso. El área media de tumor por sección se usó para calcular el volumen tumoral y se comparó entre grupos de control y tratados. Se realizaron experimentos para células SNB19 ( $1 \times 10^4$  pocillo<sup>-1</sup>) que se sembraron en portaobjetos de cámara de 8 pocillos, se incubaron durante 24 horas y se transfectaron con EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M como se describe en el presente documento.

**15 Análisis Estadístico:** Se realizaron comparaciones estadísticas usando ANOVA para análisis de significancia entre diferentes valores usando el software GraphPad Prism (San Diego, CA). Los valores se expresan como DT media a partir de al menos tres experimentos separado y las diferencias se consideraron significativas a un valor de *P* inferior a 0,05.

**20 Inhibición del crecimiento tumoral intracraneal.** Para el modelo de tumor intracerebral, se inyectaron  $2 \times 10^6$  células SNB19 GFP por vía intracerebral en ratones desnudos. Se permitió que los tumores crecieran durante 10 días. En este momento, los animales se clasificaron al azar en siete grupos y se inyectaron 150  $\mu\text{g}$  de cada constructo de EV/SV, puPAR, puPA, pMMP-9 y pU<sub>2</sub>M en el cerebro usando mini bombas Alzet a la tasa de 0,25  $\mu\text{l h}^{-1}$  (seis ratones en cada grupo). Cinco semanas después de la inoculación del tumor, se sacrificaron seis ratones de cada grupo mediante perfusión cardiaca con formaldehído al 3,5 % en PBS. Sus cerebros se retiraron y se colocaron en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas, se embebieron en parafina y se seccionaron. Las secciones se identificaron sistemáticamente para fluorescencia con GFP para examinar el crecimiento del tumor en un microscopio de fluorescencia. Las secciones se revisaron con ocultación y se puntuaron de forma semicuantitativa para el tamaño del tumor. El área media del tumor en cada sección se usó para calcular el volumen tumoral y para comparación entre grupos de control y tratados.

**Ensayo de invasión con Matrigel.** La capacidad de invasión de las células SNB 19 transfectadas se sometió a ensayos *in vitro* con el ensayo de invasión en cámara de Boyden después de transfección con cualquiera del vector vacío (EV) o el vector que expresa ARNsi para cathepsina B y MMP-9 (pCM). En resumen, se revistieron insertos Transwell con poros de 8  $\mu\text{m}$  con Matrigel (0,7 mg/ml) (Collaborative Research, Inc., Boston, MA). Las células SNB19 se tripsinaron y se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular ( $1 \times 10^6$  células/ml) a los pocillos por triplicado. Después de incubación durante 24 h a 37 °C, las células que pasaban a través de los filtros en los pocillos inferiores se cuantificaron y se expresaron como un porcentaje de la suma de las células en los pocillos superiores e inferiores. Las células en el lado inferior de la membrana se fijaron, se tiñeron con Hema-3 y se fotografiaron. Los ensayos para otros constructos descritos también se realizaron siguiendo los procedimientos que se describen en el presente documento.

**Administración de ácidos nucleicos:** La administración de los ácidos nucleicos se consigue usando cualquier tipo de método tal como por ejemplo agente lipófilo, virus que incluyen adeno, adeno asociados o lenti o con virus modificados. También se usan constructos de plásmido desnudo que son circulares o lineales con extremos romos o adhesivos, tales como ARN bicatenario, ARN monocatenario, o híbridos de ADN-ARN en los que una de las hebras es ADN y la otra es ARN, o que tienen cadena principal de ribosa o de desoxirribosa en la misma hebra. ADN, ARN o híbridos de ADN-ARN revestidos con proteínas o carbohidratos o combinaciones de los mismos, o usados en conjunto con hormonas o derivados de hormonas. Como moléculas terapéuticas también se puede usar ADN o ARN químicamente modificados o híbridos de ADN-ARN para inducir la dirección al ARNi de uPAR, uPA, MMP-9 y Cathepsina B en cualquier combinación. El uso pretendido se realizaría en organismos o líneas celulares eucariotas, preferentemente en ser humano y líneas celulares humanas.

Algunos métodos y composiciones terapéuticas conocidos por los expertos en la materia para administrar los ARNsi o los ARNsh están dentro del alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, los ARNsi, los ARNsh y otros ácidos nucleicos que se desvelan en el presente documento se pueden administrar en células de mamífero a través de técnicas tales como administración de vector viral, métodos de lipofección, electroquímicos y bioquímicos. La administración basada en virus incluye la generación de vectores recombinantes adenovirales, lentivirales, retrovirales o cualquier vector adecuado que albergue un ácido nucleico de interés y la administración de los vectores virales usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Algunos sistemas de administración basados en liposomas incluyen lipofección y composiciones basadas en cardiolipina. La administración directa de ácidos nucleicos desnudos en combinación con adyuvantes químicos o bioquímicos está dentro del alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, algunos plásmidos circulares que albergan los ARNsi frente a una secuencia diana tal como, por ejemplo, uPA, uPAR, MMP-9, y cathepsina B se pueden inyectar directamente guapa ministra por vía intratumoral o se pueden inyectar por vía intraperitoneal. De forma análoga, algunos ácidos nucleicos sintéticos o preparados de forma química también se pueden administrar por vía intratumoral o por vía intraperitoneal. Además,

la administración selectiva o específica de los ARNs i o ácidos nucleicos que expresan los ARNs i también se puede conseguir a través de acoplamiento apropiado con otro agente tal como un ácido nucleico peptídico (PNA) o un anticuerpo o cualquier agente de dirección adecuado. Las técnicas y métodos que se ha mencionado anteriormente son adecuados y se pueden adaptar para administrar secuencias de ácidos nucleicos por vía intercelular, por vía intracelular, cultivos celulares *in vitro*, *in vivo*, dentro de un órgano, a través de la barrera hematoencefálica, a cánceres de próstata, gliomas, cánceres de mama y cánceres de colon.

Secuencias: En el presente documento se desvelan algunas para diversos constructos de ARNs i (secuencia parcial). La parte subrayada indica las repeticiones invertidas autocomplementarias. La letra inédita indica la secuencia de lazo de intervención.

UPAR-uPA

GCTAACTAGA GAACCCACTG CTTACTGGCT TATCGAAATT AATACGACTC  
 ACTATAGGGA GACCCA agctGagagccctgctggcgccatataataatggcgccagcagggctctca AGCT  
 TGGTACCGAG CTCG gatccTacagcagtgagagcgattatataataatcgctctccactgctgtag GATCCA  
 CTAGTAACGG CCGCCAGTGT GCTGGAATTC TGCAGATATC CATCACACTG  
 GCGGCCGCTC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC CTATTCTATA GTGTCACCTA  
 AATGCTAGAG CTCGCTGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC  
 ATCTGTTGTT TGCCCTCCC CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA  
 CTCCCCTGT CCTTTCCTAA TAAAAaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Espacio entre lazos de horquilla de 22 bases

UPAR-MMP-9

GCTAACTAGA GAACCCACTG CTTACTGGCT TATCGAAATT AATACGACTC  
 ACTATAGGGA GACCCA AGCT TGGTACCGAG CTCG  
gatccTacagcagtgagagcgattatataataatcgctctccactgctgtag GATCCA CTAGTAACGG  
 CCGCCAGTGT GCTGG aattCaagtggcaccaccacaacaataataatggtgtggtggcacttg AATTC  
 TGCAGATATC CATCACACTG GCGGCCGCTC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC  
 CTATTCTATA GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC AGCCTCGACT  
 GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCTCCC CCGTGCCTTC  
 CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CCTTTCCTAA  
 TAAAAaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Espacio entre lazos de horquilla de 35 bases

UPAR CB

GCTAACTAGA GAACCCACTG CTTACTGGCT TATCGAAATT AATACGACTC  
 ACTATAGGGA GACCCA AGCT TGGTACCGAG CTCG  
gatccTacagcagtgagagcgattatataataatcgctctccactgctgtag GATCCA CTAGTAACGG  
 CCGCCAGTGT GCTGG AATTC TGCAGATATC CATCACACTG GCGGCCG  
tcgaGgtggcctctatgaatcccaataataatgggattcatagaggccacc TC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC  
 CTATTCTATA GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC AGCCTCGACT  
 GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCTCCC CCGTGCCTTC  
 CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CCTTTCCTAA  
 TAAAAaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Espacio entre lazos de horquilla de 68 bases

**MMP9-CB**

GCTAACTAGA GAACCCACTG CTTACTGGCT TATCGAAATT AATACGACTC  
 ACTATAGGGA GACCCA AGCT TGGTACCGAG CTCG GATCCA CTAGTAACGG  
 CCGCCAGTGT GCTGG aattCaagtggcaccaccacaacaatatafaattgttptgtgtgcccacttg AATTC

TGCAGATATC CATCACACTG GCGGCCGC  
tcgaGgtggcctctatgaatcccaatataaattgggattcatagaggccacc TC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC  
 CTATTCTATA GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC AGCCTCGACT  
 GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCCTCCC CCGTGCCTTC  
 CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTTCCTAA  
 TAAAAaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa  
 Espacio entre lazos de horquilla de 37 bases

5 **UPAR, uPA y Cat B**

GCTAACTAGA GAACCCACTG CTTACTGGCT TATCGAAATT AATACGACTC  
 ACTATAGGGA GACCCA AGCT TGGTACCGAG CTCG  
gatccTacagcagtggagagcgattatataataatcgcctcaccactgctgtag GATCCA CTAGTAACGG  
 CCGCCAcTacagcagtggagagcgattatataataatcgcctcaccactgctgtagGTGT GCTGG AATTC  
 TGCAGATATC CATCACACTG GCGGCCGC  
tcgaGgtggcctctatgaatcccaatataaattgggattcatagaggccacc TC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC  
 CTATTCTATA GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC AGCCTCGACT  
 GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCCTCCC CCGTGCCTTC  
 CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTTCCTAA  
 TAAAAaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

**DOCUMENTOS MENCIONADOS**

10 Estos documentos se enumeran solamente en la medida en que se relacionan con materiales y métodos en la presente divulgación.

15 Adachi, Y. *et al.*, (2001) J Biol Chem 276, 47171-47177  
 Aguirre-Ghiso, J. A., *et al.*, (2003) Cancer Res. (2003) 63, 1684-1695  
 Aguirre Ghiso, *et al.*, (1999) J. Cell Biol. 147, 89-104  
 Ahmed, N., *et al.*, (2003) Br. J. Cancer 89, 374-384  
 Aoki, I., *et al.*, (2003) J Steroid Biochem Mol Biol 84, 217-222  
 20 Bergers, G., *et al.*, (1999) Science 284, 808-812  
 Blasi, F., Carmeliet, P. (2002) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 932-943  
 Boyd, D. D., *et al.*, (2003) Am. J. Pathol. 162, 619-626  
 Brown, P. D., *et al.*, (1993) J Natl Cancer Inst 85, 574-578  
 Caplen, N. J., *et al.*, (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 9742-9747  
 Chandrasekar, N., *et al.*, (2003) Oncogene 22, 392-400  
 25 Choe, G., *et al.*, (2002) Clin Cancer Res 8, 2894-2901  
 D'Alessio, S., *et al.*, (2004) Int. J. Cancer 110, 125-133  
 Dahiya, R., *et al.*, (1994) Int. J. Cancer 59, 126-132  
 Degryse, B., *et al.*, (2001) J Cell Biol 152, 1197-1206  
 Drummond, A. H., *et al.*, (1999) Ann N Y Acad Sci 878, 228-235  
 30 Dumler, I., *et al.*, (1998) J. Biol. Chem. 273: 315-321  
 Elbashir, S. M., *et al.*, (2002) Methods 26, 199-213  
 Ellis, V. y Dano, K. (1993) J Biol Chem 268, 4806-4813  
 Fabbrini, M. S., *et al.*, (1997) FASEB J. 11, 1169-1176  
 Forsyth, P. A., *et al.*, (1999) Br J Cancer 79, 1828-1835  
 35 Giannelli, V., Fontana, *et al.*, (1997) Infect Immun 65, 331-334  
 Giese, A. y Westphal, M. (1996) Neurosurgery 39, 235-250  
 Go, Y., *et al.*, (1997) Clin Exp Metastasis 15, 440-446  
 Guo, Y., *et al.*, (2000) FASEB J 14, 1400-1410

- Hidalgo, M., *et al.*, (2002) *Nature* 418, 244-251  
Hood, J. D., *et al.*, (2002) *Science* 296, 2404-2407  
Hoosein, N. M., *et al.*, (1991) *Cancer Commun.* 3, 255-264  
5 Jemal, A., *et al.*, (2003) *CA Cancer J. Clin.* 53, 5-26  
Jiang, M., *et al.*, (2004) *Oligonucleotides* 14, 239-248  
Jo, M., *et al.*, (2003) *J Biol Chem* 278, 1642-1646  
Joossens, J., *et al.*, (2004) *J. Med. Chem.* 47, 2411-2413  
Kajita, M., *et al.*, (2001) *J Cell Biol* 153, 893-904  
10 Keer, H. N., *et al.*, (1991) *Prostate* 18, 201-14  
Kim, S. J., *et al.*, (2003) *Clin Cancer Res.* 9, 5161-5170  
Kim, S. J., *et al.*, (2004) *Cancer Res.* 64, 4201-4208  
Kin, Y., *et al.*, (2000) *Int J Oncol* 17, 61-65  
Kondraganti, S., *et al.*, (2000) *Cancer Res* 60, 6851-6855  
Konakova, M., *et al.*, (1998) *Eur J Biochem* 253, 421-429  
15 Laiho, M. y Keski-Oja, J. (1989) *Cancer Res* 49, 2533-2553  
Lakka, S. S., *et al.*, (2000) *Clin Exp Metastasis* 18, 245-252  
Lakka, S. S., *et al.*, (2002) *Oncogene* 21, 5601-5608  
Lakka, S. S., *et al.*, (2002) *Oncogene* 21, 8011-8019  
Laniado, M. E., *et al.*, (1997) *Am. J. Pathol.* 150, 1213-1221  
20 Lee, K. H., *et al.*, (1992) *Cancer Res* 52, 6553-6560  
Lozonschi, L., *et al.*, (2001) *Exp. Cell. Res.* 264, 326-336  
Ma, Z., *et al.*, (2001) *J. Cell Sci.* 114, 3387-3396  
Mamoune, A., *et al.*, (2004) *Exp. Cell Res.* 299, 91-100  
Margheri, F. *et al.*, (2005) *Gene Ther.* 12, 702-714  
25 Mazzieri, R., *et al.*, (1997) *EMBO J* 16, 2319-2332  
Ossowski, L., Russo-Payne, H., y Wilson, E. L. (1991) *Cancer Res* 51, 274-281  
McManus, M. T. y Sharp, P. A. (2002) *Nat Rev Genet* 3, 737-747  
Miyagishi, M., Hayashi, M., Taira, K. (2003) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13, 1-7  
Miyagishi, M. y Taira, K. (2002) *Nat Biotechnol* 20, 497-500  
30 Mohan, R. R. *et al.*, (2000) *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 41, 1327-1336  
Mohanam, S., *et al.*, (1997) *Oncogene* 14, 1351-1359  
Mora, L. B., *et al.*, (2002) *Cancer Res.* 62, 6659-6666  
Mori, T., Abe, T., Wakabayashi, Y., Hikawa, T., Matsuo, K., Yamada, Y., Kuwano, M., y Hori, S. (2000) *J Neurooncol* 46, 115-123  
35 Moses, M. A. (1997) *Stem Cells* 15, 180-189  
Mohan, P. M., Chintala, S. K., Mohanam, S., Gladson, C. L. *et al.*, (1999) *Cancer Res* 59, 3369-3373  
Naldini, L. *et al.*, (1992) *Eur. Mol. Biol. Org.* 11, 4825-4833  
Nishimura, K., Matsumiya, K., Miura, H., Tsujimura, A., Nonomura, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Okuyama, A. (2003) *Int. J. Androl.* 26, 175-179  
40 Nguyen, D. H. D., Hussaini, I. M., y Gonias, S. L. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 8502-8507  
Nguyen, D. H. D., Webb, D. J., Catling, A.D., Song, Q., Dhakephalkar, A., Weber, M. J., Ravichandran, K. S., y Gonias, S. L. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 19382-19388  
Nguyen, D. H., Hussaini, I. M., y Gonias, S. L. (1998) *J Biol Chem* 273, 8502-8507  
Paddison, P. J. y Hannon, G. J. (2002) *Cancer Cell* 2, 17-23  
45 Pakneshan, *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279,31735-31744.  
Pakneshan, P., Xing, R. H., Rabbani, S. A. (2003) *FASEB J.* 17, 1081-1088  
Park, M. J. *et al.*, (2002) *Cancer Res* 62, 6318-6322  
Patel, P., Ashdown, D., James, N. (2004) *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7, S14-S19  
Pinthus, J. H. *et al.*, (2004) *J. Clin. Invest.* 114, 1774-1781  
50 Rabbani, S. A., Gladu, J. (2002) *Cancer Res.* 62, 2390-2397  
Rakic, J. M., *et al.*, (2003) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 3186-3193  
Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D. L., y Quigley, J. P. (1999) *J Biol Chem* 274, 13066-13076  
Rao, J. S. (2003) *Nat. Rev. Cancer.* 3, 489-501  
55 Rao, J. S., *et al.*, (1993) *Cancer Res* 53, 2208-2211  
Resnati, M., *et al.*, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 1359-1364  
Rye, P. D., Stigbrand, T. (2004) *Tumour Biol.* 25: 329-336  
Salvi, A., Arici, B., De Petro, G., Barlati, S. (2004) *Mol. Cancer Ther.* 3, 671-678  
Sawaya, R., *et al.*, (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 251, 632-636  
60 Sato, S., Kopitz, C., Schmalix, W. A., Muehlenweg, B., Kessler, H., Schmitt, M., Kruger, A., Magdolen, V. (2002) *FEBS Lett.* 528, 212-216  
Schuh, T., *et al.*, (2003) *Biol. Chem.* 384, 311-315  
Schweinitz, A. *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 33613-33622  
Shah, R.B. *et al.*, (2004) *Cancer Res.* 64, 9209-9216  
65 Sharp, P. A. (2001) *Genes Dev* 15, 485-490  
Simon, C., Goepfert, H., y Boyd, D. (1998) *Cancer Res* 58, 1135-1139

- Singh, S. *et al.*, (2004) Clin Cancer Res. 10, 8743-8750  
 Sontheimer, E. J. (2005) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 127-138  
 Stewart, D. A., Cooper, C. R., Sikes, R. A. (2004) Reprod. Biol. Endocrinol. 2 2  
 5 Tang, H., *et al.*, (1998) J Biol Chem 273, 18268-18272  
 Tarui, T., *et al.*, (2003) J. Biol Chem. 278, 29863-29872  
 Trisciuglio, *et al.*, (2004) J Biol Chem 279, 6737-6745  
 Usher, P. A., Thomsen, O. F., Iversen, P., Johnsen, M., Brunner, N., Hoyer-Hansen, G., Andreasen, P., Dano, K.,  
 Nielsen, B. S. (2005) Int. J. Cancer 113, 870-880  
 10 Woessmann, W., *et al.*, (2003) Rev. Clin. Exp. Hematol. 7, 270-291  
 Yamamoto, M., *et al.*, (1994) Cancer Res 54, 5016-5020  
 Yao, J., *et al.*, (2001) Oncogene 20, 8066-8074  
 Yu, Q., Grammatikakis, N., y Toole, B. P. (1996) Dev Dyn 207, 204-214  
 Yu, Q. y Stamenkovic, I. (2000) Genes Dev 14, 163-176  
 15 Zhang, X., *et al.*, (2004) Cancer Res. 64, 7086-7091  
 Zhang, Y., *et al.*, (2004) Clin. Cancer Res. 10, 3667-3677  
 Zhang, Z., *et al.*, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100, 11636-11641

Se desvela un constructo de ARN de interferencia corto multicistrónico que comprende al menos una primera y una  
 20 segunda secuencias autocomplementarias, en el que el constructo se usa para inhibir la formación de tumores y  
 para revertir tumores formados previamente.

También se desvela el constructo multicistrónico mencionado anteriormente, en el que la primera secuencia  
 25 autocomplementaria comprende una secuencia de nucleótidos del receptor del activador de plasminógeno de tipo  
 uroquinasa humano (uPAR) y su complemento, y la segunda secuencia autocomplementaria comprende una  
 secuencia de nucleótidos de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa humano (uPA) y su complemento.

Además se desvela el constructo multicistrónico mencionado anteriormente, en el que la secuencia  
 30 autocomplementaria de uPA es TGAGAGCCCTGCTGGCGCGCC-lazo-GGCGCGCCAGCAGGGCTCTCA y la  
 secuencia autocomplementaria de uPAR es CTACAGCAGTGGAGAGCGATT-lazo-AATCGCTCTCCACTGCTGTAG.

También se desvela el constructo multicistrónico mencionado anteriormente, en el que las secuencias  
 autocomplementarias de uPAR y uPA se separan mediante una secuencia de intervención con una longitud de  
 aproximadamente 22-35 pares de bases.

Además se desvela el constructo multicistrónico mencionado anteriormente, en el que la secuencia de intervención  
 35 es AGCTTGGTACCGAG CTCG GATC.

También se desvela el constructo de ARN de interferencia corto multicistrónico mencionado anteriormente que  
 40 comprende al menos una primera y una segunda secuencias autocomplementarias, en el que el constructo se usa  
 para inhibir la formación de tumores y para revertir tumores formados previamente, y en el que la primera secuencia  
 autocomplementaria comprende una secuencia de nucleótidos de receptor del activador de plasminógeno de tipo  
 uroquinasa (uPAR) y su complemento y la segunda secuencia autocomplementaria comprende una secuencia de  
 nucleótidos de metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMP-9) y su complemento.

También se desvela el constructo multicistrónico mencionado anteriormente, en el que la secuencia  
 45 autocomplementaria de uPAR es CTACAGCAGTGGAGAGCGATT-lazo-AATCGCTCTCCACTGCTGTAG y la  
 secuencia autocomplementaria de MMP-9 es CAAGTGGCACCACCACAACAA-lazo-  
 TTGTTGTGGTGGTGCCACTTG.

También se desvela el constructo multicistrónico mencionado anteriormente, en el que cada lazo comprende 9  
 50 nucleótidos.

Además se desvela el constructo multicistrónico desvelado anteriormente, en el que cada lazo comprende 9  
 55 nucleótidos, y en el que cada lazo es ATATATAAT.

También se desvela el constructo multicistrónico mencionado anteriormente que comprende al menos una primera y  
 una segunda secuencias autocomplementarias, en el que el constructo se usa para inhibir la formación de tumores y  
 para revertir tumores formados previamente desvelados anteriormente, y en el que las secuencias  
 60 autocomplementarias se separan mediante una secuencia de intervención con una longitud de de aproximadamente  
 22-35 pares de bases.

Además se desvela el constructo multicistrónico desvelado anteriormente, en el que la secuencia de intervención es  
 GATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT GCTGG AATT.

También se desvela el constructo multicistrónico mencionado anteriormente que comprende al menos una primera y  
 una segunda secuencias autocomplementarias, en el que el constructo se usa para inhibir la formación de tumores y

para revertir tumores formados previamente desvelados anteriormente, en el que el constructo es un ácido nucleico circular.

5 Se desvela un método para inhibir la formación de tumores o para revertir tumores formados previamente, método que comprende:

- (a) administrar el constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto desvelado anteriormente al tumor; y
- (b) reducir la expresión de una pluralidad de genes expresados en el tumor y dirigidos por el constructo de ARN de interferencia corto, inhibiendo de este modo el tumor.

10 También se desvela el método mencionado anteriormente, en el que el constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto se dirige al receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA).

15 Además se desvela el método mencionado anteriormente, en el que el constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto comprende TGAGAGCCCTGCTGGCGCGCC-lazo-GGCGCGCCAGCAGGGCTCTCA- secuencia de intervención-CTACAGCAGT-GGAGAGCGATT-lazo- AATCGCTCTCCACTGCTGTAG.

20 Además se desvela el constructo de ARN de interferencia corto multicistrónico mencionado anteriormente que comprende al menos una primera y una segunda secuencias autocomplementarias, en el que el constructo se usa para inhibir la formación de tumores y para revertir tumores formados previamente, y en el que los tumores se inhiben mediante la reducción de al menos uno de proliferación de células tumorales, invasión de células tumorales, migración de células tumorales y angiogénesis.

25 Además se desvela el constructo de ARN de interferencia corto multicistrónico mencionado anteriormente que comprende al menos una primera y una segunda secuencias autocomplementarias, en el que el constructo se usa para inhibir la formación de tumores y para revertir tumores formados previamente, y en el que los tumores se seleccionan entre el grupo que consiste en cáncer de próstata, glioma, cáncer de mama, y melanoma.

30 También se desvela el constructo de ARN de interferencia corto multicistrónico mencionado anteriormente, en el que el constructo se administra a través de administración directa.

También se desvela el método mencionado anteriormente, en el que el constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto se dirige al receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) a la metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMP-9).

35 También se desvela el método mencionado anteriormente, en el que el constructo multicistrónico de ARN de interferencia corto comprende CTACAGCAGTGGAGAGCGATT-lazo-AATCGCTCTCCACTGCTGTAG- secuencia de intervención-CAAGTGGCACCAC-CACAACAA-lazo- TTGTTGTGGTGGTGCCACTTG.

40 Se desvela una molécula de ARN de interferencia corto seleccionada entre el grupo que consiste en moléculas de ARN dirigidas a:

- (a) receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMPs-9) comprendiendo la molécula de ARN de interferencia corto, la secuencia de ácidos nucleicos CUACAGCAGUGGAGAGCGAUU-lazo-AAUCGCU-CUCCACUGCUGUAG-espaciador-CAAGUGGCACCACCACAACAA-lazo- UUGUUGUGGUGGCCACUUG; y
- (b) receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), comprendiendo la molécula de ARN de interferencia corto la secuencia de ácidos nucleicos UGAGAGCCCUGCUGGCGCGCC-lazo-GGCGCGCCAGCAGGGCUCUCA-CUACAGCAGUGGAGAGCGAUU-lazo-AAUCGCUCUCCACUGCUGUAG.

45 También se desvela una célula recombinante transformada con el constructo multicistrónico mencionado anteriormente.

50 También se desvela un virus recombinante transformado con el constructo multicistrónico mencionado anteriormente.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS

<120> CONSTRUCTOS MULTICISTRÓNICOS DE ARNSI PARA INHIBIR TUMORES

65

<130> 100-030T1  
 <150> EP 05 826 614.9 (PCTUS2005/041709)  
 <151> 17-11-2005  
 5  
 <150> 60/629.659  
 <151> 18-11-2004  
 <160> 38  
 10  
 <170> PatentIn Ver. 3.3  
 <210> 1  
 <211> 51  
 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 20  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (22)..(30)  
 <223> lazo nucleotídico de variable 9  
 25  
 <220>  
 <223> véase memoria descriptiva como se presenta en la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas  
 30  
 <400> 1  
 tgagagccct gctggcgcgc cnnnnnnnnn ggcgcgccag cagggtctc a 51  
 <210> 2  
 <211> 51  
 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 40  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (22)..(30)  
 <223> lazo nucleotídico de variable 9  
 45  
 <220>  
 <223> véase memoria descriptiva como se presenta en la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas  
 50  
 <400> 2  
 ctacagcagt ggagagcgat tnnnnnnnnn aatcgctctc cactgctga g 51  
 <210> 3  
 <211> 22  
 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 3  
 agcttggtac cgagctcgga tc 22

5 <210> 4  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (22)..(30)  
 <223> lazo nucleotídico de variable 9

20 <220>  
 <223> véase memoria descriptiva como se presenta en la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 4  
 caagtggcac caccacaaca annnnnnnnn ttgtgtggt ggtgccactt g 51

25 <210> 5  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 5  
 gatccactag taacggccgc cagtgtgctg gaatt 35

35 <210> 6  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

45 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (21) .. (29)  
 <223> lazo nucleotídico de variable 9

50 <220>  
 <223> véase memoria descriptiva como se presenta en la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 6  
 caagtggcac caccacaaca nnnnnnnnnt gttgtggtgg tgccacttg 49

55 <210> 7  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial



ES 2 556 272 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 7

5 gatccactag taacggccgc cagtgtgctg gaattctgca gatatccatc acactggcgg 60  
ccgctcga 68

<210> 8  
<211> 37  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 8  
aattctgcag atatcatca cactggcggc cgctcga 37

<210> 9  
20 <211> 51  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>  
<221> base modificada  
<222> (22)..(30)  
30 <223> lazo nucleotídico de variable 9

<220>  
<223> véase memoria descriptiva como se presenta en la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas

35 <400> 9  
cuacagcagu ggagagcgau unnnnnnnn aaucgcucuc cacugcugua g 51

<210> 10  
40 <211> 51  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>  
<221> base modificada  
<222> (22)..(30)  
50 <223> lazo nucleotídico de variable 9

<220>  
<223> véase memoria descriptiva como se presenta en la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas

55 <400> 10  
caaguggcac caccacaaca annnnnnnn uuguuguggu ggugccacuu g 51

ES 2 556 272 T3

<210> 11  
<211> 51  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
  
<220>  
10 <221> base modificada  
<222> (22)..(30)  
<223> lazo nucleotídico de variable 9  
  
<220>  
15 <223> véase memoria descriptiva como se presenta en la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas  
  
<400> 11  
20 ugagagcccu gcuggcgcgc cnnnnnnnnn ggcgcgccag cagggcucuc a 51  
  
<210> 12  
<211> 49  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
25  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
  
<220>  
30 <221> base modificada  
<222> (21) .. (29)  
<223> lazo nucleotídico de variable 9  
  
<220>  
35 <223> véase memoria descriptiva como se presenta en la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas  
  
<400> 12  
40 caaguggcac caccacaaca nnnnnnnnnu guuguggugg ugccacuug 49  
  
<210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
45  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
  
<400> 13  
50 aggtgtaaa ggggtgctcc 20  
  
<210> 14  
<211> 21  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

ES 2 556 272 T3

<400> 14  
 acaaccaggt cagcgtcaga t 21

5 <210> 15  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 15  
 ctgggtgoga cctgctccg cgatgtacgg gc 32

15 <210> 16  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25 <400> 16  
 ctgggtgoga catccccagc atgcctgcta t 31

30 <210> 17  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 17  
 agcttgagag ccctgctggc gcgccatata taatggcgcg ccagcagggc tctca 55

40 <210> 18  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 18  
 gatcctacag cagtgagag cgattatata taataatcgc tctccactgc tgtag 55

50 <210> 19  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 19  
 aatcaagtg gcaccaccac aacaatatat aattgtgtg gtgggtccac ttg 53

<210> 20

ES 2 556 272 T3

<211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 20  
 tcgaggtggc ctctatgaat cccaatatat aattgggatt catagaggcc acc 53

10 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 21  
 tgcgtcctgg tcgtgagcga 20

<210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

30 <400> 22  
 ctacagcgct gacacgcttg 20

<210> 23  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

40 <400> 23  
 catgcagtgt aagaccaac gggga 25

<210> 24  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

50 <400> 24  
 aatagtgac agcccggcca gagt 24

55 <210> 25  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

## ES 2 556 272 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

5 <400> 25  
cggagtcaac ggattggtc gtat 24

<210> 26  
<211> 24  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

15 <400> 26  
agccttctcc atggtggtga agac 24

<210> 27  
<211> 22  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25 <400> 27  
gttcgaaatt agtttggtta ac 22

<210> 28  
30 <211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

35 <400> 28  
ccgaataact aatattataa acg 23

40 <210> 29  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética

50 <400> 29  
gagctgttca ccggggtggt g 21

<210> 30  
<211> 21  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética

<400> 30

ES 2 556 272 T3

ctacagcagt ggagagc gat t 21

<210> 31  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética

<400> 31  
 caagtggcac caccacaaca a 21

<210> 32  
 <211> 444  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética de ARNsi

<400> 32

```

gctaactaga gaaccactg cttactggct tatecgaatt aatagactc actatagga 60
gacccaagct tgagagccct gctggegcgc catatataat ggcgccag cagggtctc 120
aagcttggtta cggagctcgg atcctacagc agtggagagc gattatata aataatcgt 180
ctccactgct gtaggatcca ctagtaacgg cgcagctgt gctggaattc tgcagatata 240
catcacactg ggcggccgctc gagcatgcat ctagagggcc ctattctata gtgtcaccta 300
aatgctagag ctcgctgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt 360
tgccctccc ccgctccttc cttgaccctg gaaggtgccca ctcccactgt ccttctctaa 420
taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 444
  
```

<210> 33  
 <211> 442  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética de ARNsi

<400> 33

```

gctaactaga gaaccactg cttactggct tatecgaatt aatagactc actatagga 60
gacccaagct tggtagcagc ctccgatcct acagcagctg agagcgatta tatataataa 120
tcgctctcca ctgctgtagg atccactagt aacggcgcgc agtgtgctgg aattcaagt 180
gcaccaccac aacaatata aattgttgtg gtggtgccac ttgaattctg cagatatcca 240
tcacactggc ggccgctcga gcatgcatc agagggccct attctatagt gtcacctaaa 300
tgctagagct cgtgatcag cctcgactgt gccttctagt tgcagccat ctgttgtttg 360
ccctccccc gtgccttctc tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata 420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 442
  
```

<210> 34  
 <211> 442  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética de ARNsi

<400> 34

```

gctaactaga gaaccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actatagggga 60
gacccaagct tggtagcgag ctcgatcct acagcagtgg agagcgatta tatataataa 120
tcgctctcca ctgctgtagg atccactagt aacggccgcc agtgtgctgg aattctgcag 180
atatccatca cactggcggc cgctcgaggt ggctctatg aatccaata tataattggg 240
attcatagag gccacctcga gcatgcatct agagggccct attctatagt gtcacctaaa 300
tgctagagct cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tggcagccat ctgttgtttg 360
cccccccc gtgccttctt tgacctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata 420
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 442
    
```

5 <210> 35  
 <211> 440  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética de ARNsi

<400> 35

```

gctaactaga gaaccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actatagggga 60
gacccaagct tggtagcgag ctcgatcca ctagtaacgg ccgccagtgt gctggaattc 120

aagtggcacc accacaacaa tatataattg ttgtgggtgg gccacttgaa ttctgcagat 180
atccatcaca ctggcggccg ctcgaggtgg cctctatgaa tccaatata taattgggat 240
tcatagaggg cacctcgagc atgcatctag agggccctat tctatagtgt cacctaaatg 300
ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagtgg ccagccatct gttgtttgcc 360
cccccctcgt gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa 420
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 440
    
```

15 <210> 36  
 <211> 493  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética de ARNsi

25 <400> 36

```

gctaactaga gaaccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actatagggga 60
gacccaagct tggtagcgag ctcgatcct acagcagtgg agagcgatta tatataataa 120
tcgctctcca ctgctgtagg atccactagt aacggccgcc actacagcag tggagagcga 180
ttatatataa taatcgctct ccactgctgt aggtgtgctg gaattctgca gatatccatc 240
acactggcgg ccgctcgagg tggcctctat gaatcccaat atataattgg gattcataga 300
ggccacctcg agcatgcatc tagagggccc tattctatag tgtcacctaa atgctagagc 360
tcgctgatca gcctcgactg tgcttctagt ttgcccagcca tctgttgttt gcccccccc 420
cgtgccttcc ttgacctgga aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaata aaaaaaaaaa 480
aaaaaaaaaa aaa 493
    
```

30 <210> 37  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 556 272 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 37

aaaaaaaaaa 10

5

<210> 38

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 38

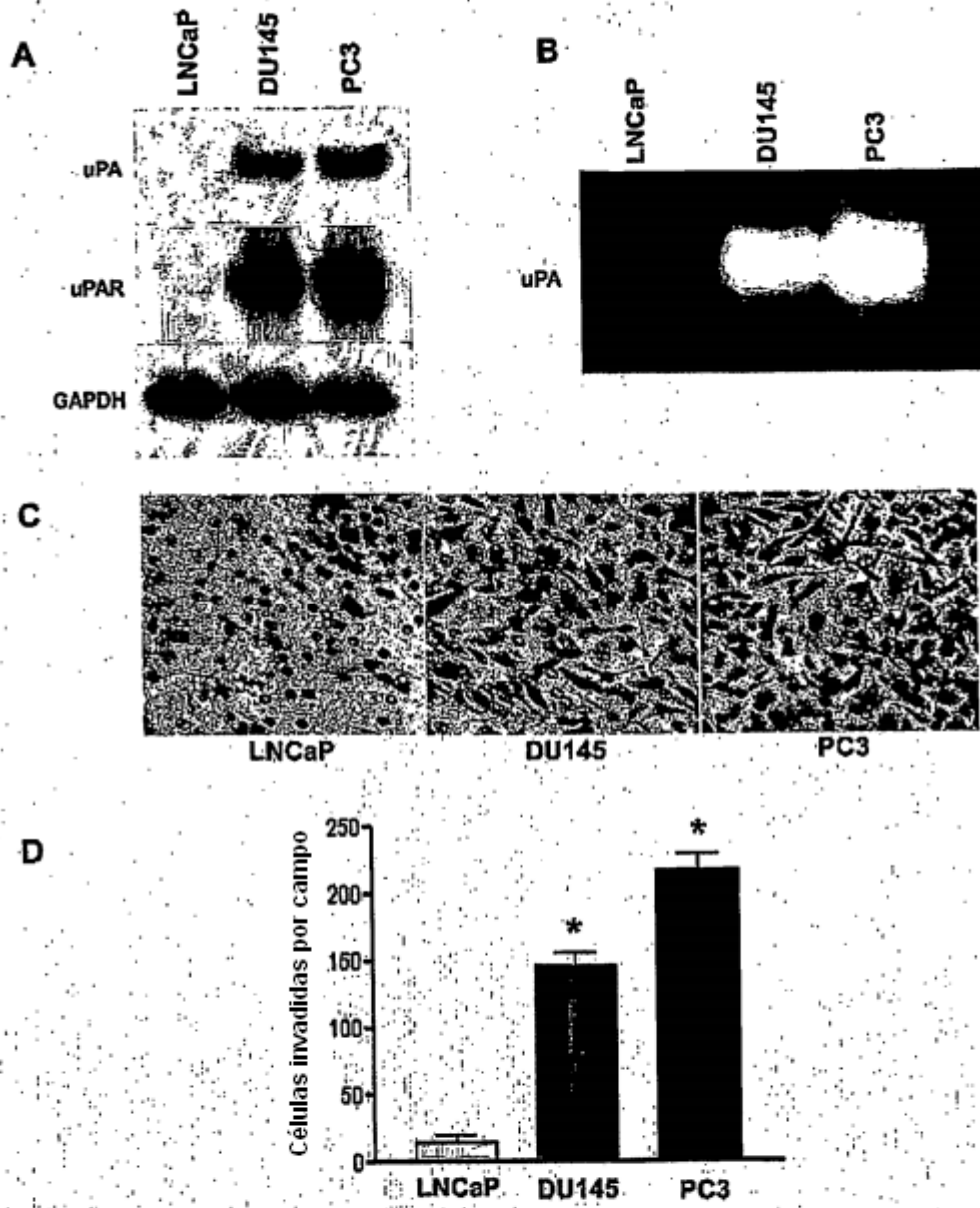
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 39

15

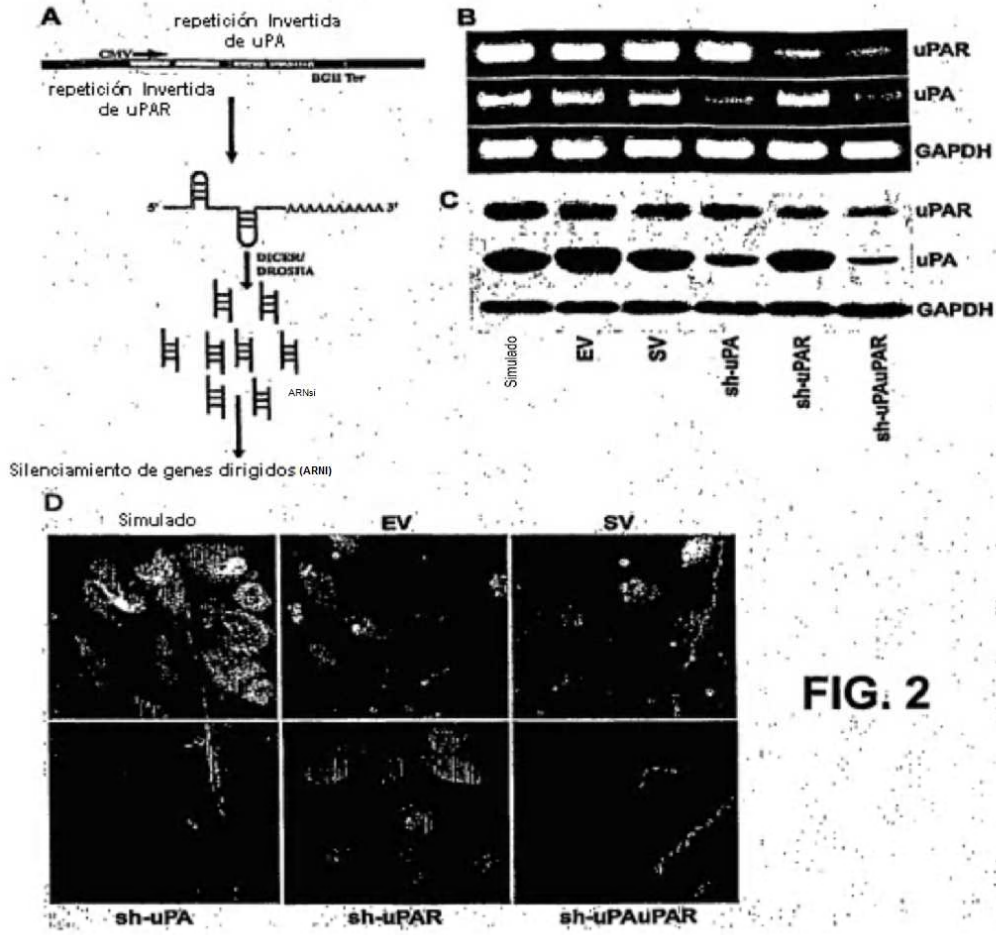


**REIVINDICACIONES**

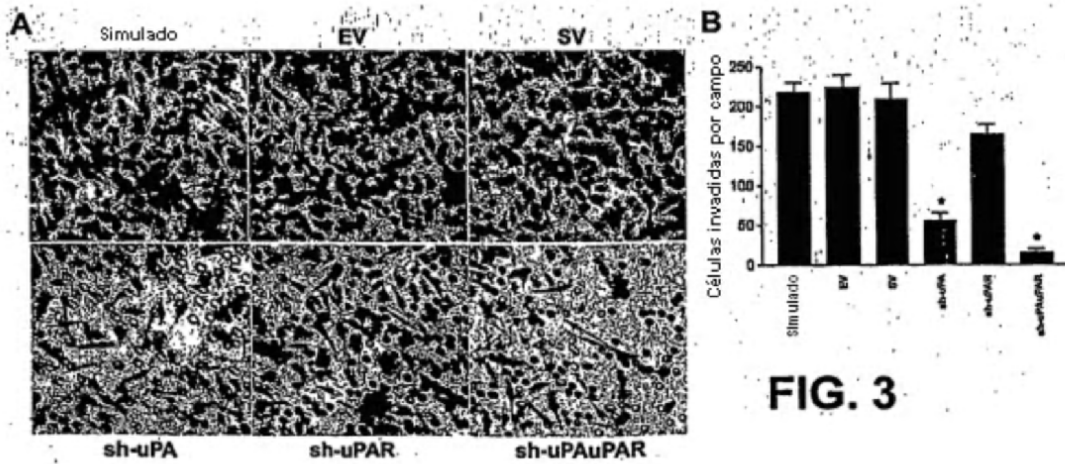
- 5 1. Un constructo de ARN de interferencia corto bicistrónico que comprende una primera secuencia autocomplementaria de receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y una segunda secuencia autocomplementaria de metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMP-9) y una secuencia de intervención entre la primera y la segunda secuencias autocomplementarias de aproximadamente 22-68 pares de bases.
- 10 2. El constructo bicistrónico de la reivindicación 1, en el que la secuencia autocomplementaria de uPAR es CTACAGCAGTGGAGAGCGATT-lazo-AATCGCTCTCCACTGCTGTAG (SEC ID N°: 2) y la secuencia autocomplementaria de MMP-9 es CAAGTGGCACCACCACAACAA-lazo-TTGTTGTGGTGGTGCCACTTG (SEC ID N°: 4).
- 15 3. El constructo bicistrónico de la reivindicación 2, en el que cada lazo comprende 9 nucleótidos.
4. El constructo bicistrónico de la reivindicación 3, en el que cada lazo es ATATATAAT.
5. El constructo bicistrónico de la reivindicación 1, en el que la secuencia de intervención es GATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT GCTGG AATT (SEC ID N°: 5).
- 20 6. El constructo bicistrónico de la reivindicación 1, en donde el constructo es un ácido nucleico circular.
7. Composición farmacéutica que comprende el constructo bicistrónico de ARN de interferencia corto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el constructo de ARN de interferencia corto bicistrónico se dirige al receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) y a la metaloproteasa de la matriz tipo 9 (MMP-9).
- 30 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el constructo bicistrónico de ARN de interferencia corto comprende CTACAGCAGTGGAGAGCGATT-lazo-AATCGCTCTCCACTGCTGTAG-secuencia de intervención-CAAGTGGCACCAC-CACAACAA-lazo-TTGTTGTGGTGGTGCCACTTG (SEC ID N°s: 2 y 4 respectivamente en orden de aparición).
- 35 10. El constructo bicistrónico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para inhibir la formación de tumores y revertir tumores formados previamente.
- 40 11. El constructo bicistrónico para el uso de la reivindicación 10, en la que los tumores se inhiben mediante la reducción de al menos uno de proliferación de células tumorales, invasión de células tumorales, migración de células tumorales y angiogénesis.
- 45 12. El constructo bicistrónico para el uso de la reivindicación 10, en donde los tumores se seleccionan entre el grupo que consiste en cáncer de próstata, glioma, cáncer de mama y melanoma.
13. El constructo bicistrónico para el uso de la reivindicación 12, en donde el constructo se debe administrar por vía sistémica.
14. El constructo bicistrónico para el uso de la reivindicación 12, en donde el constructo se debe administrar a través de administración directa.
- 50 15. Una célula recombinante transformada con el constructo bicistrónico de la reivindicación 1.
16. Un virus recombinante transformado con el constructo bicistrónico de la reivindicación 1.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

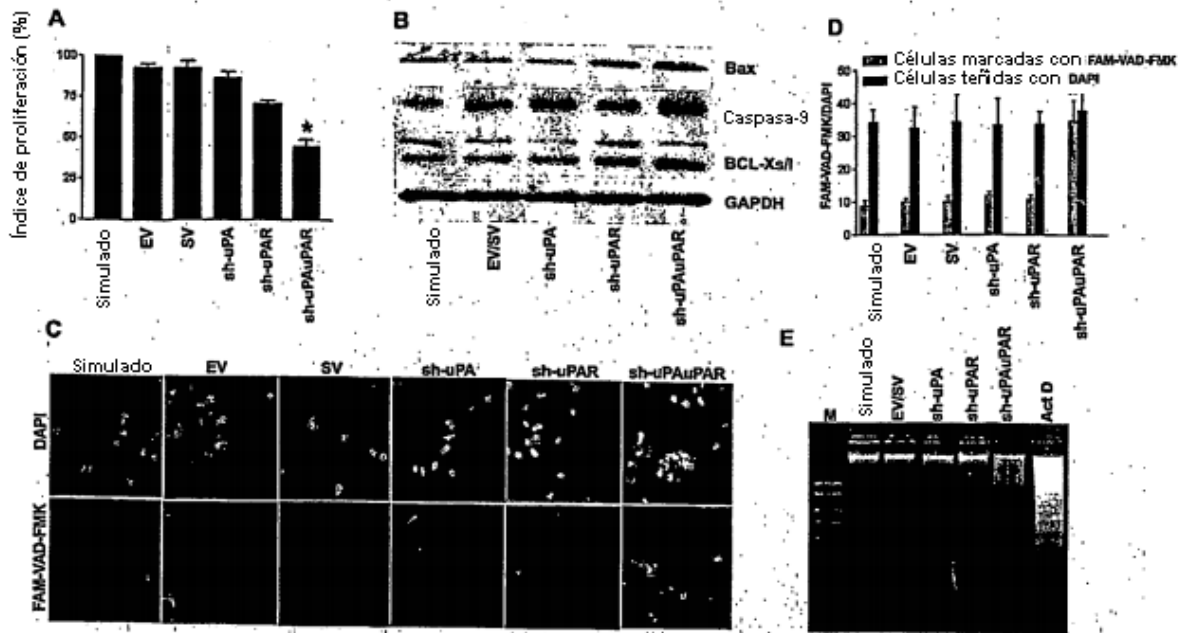


FIG. 4

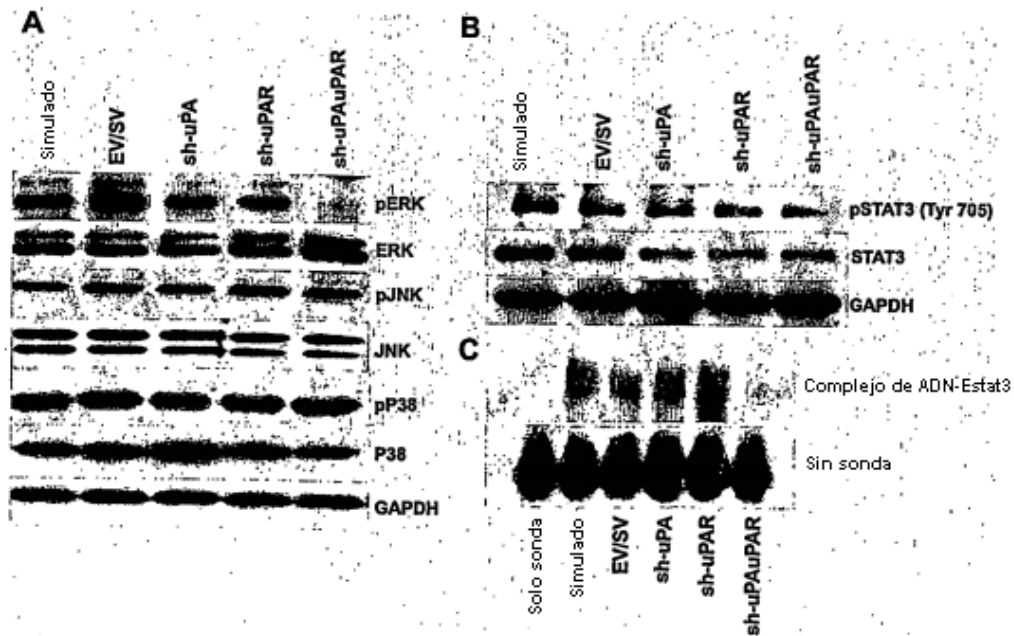
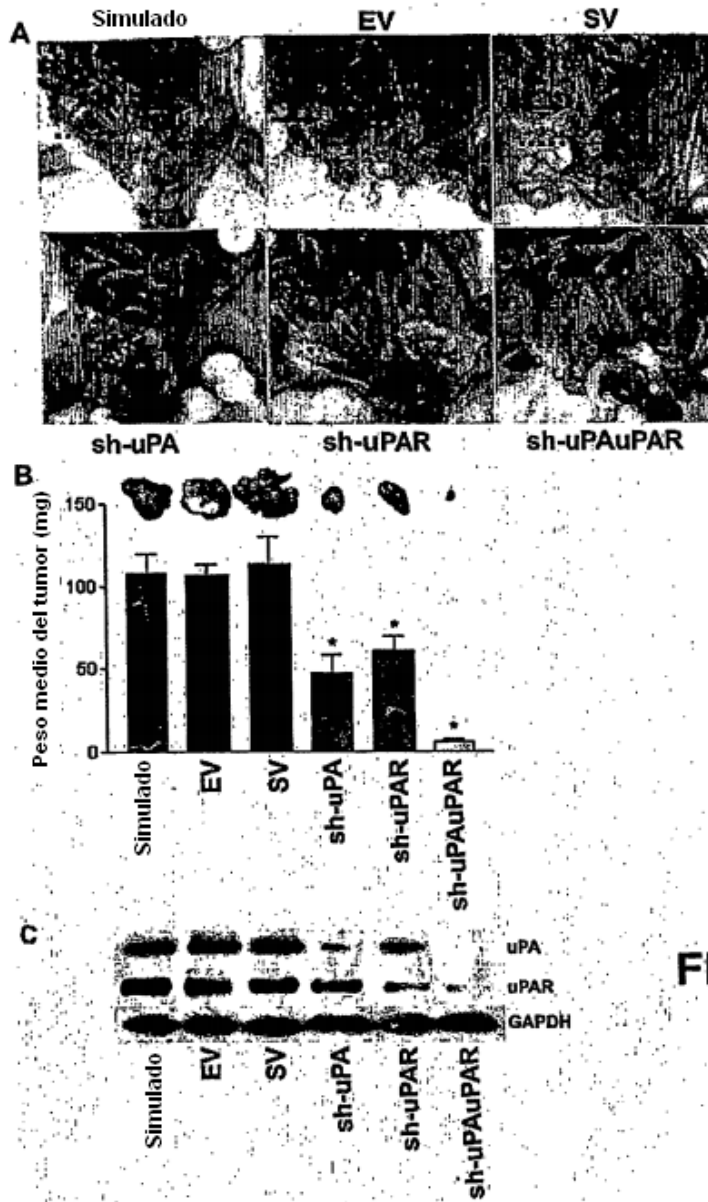
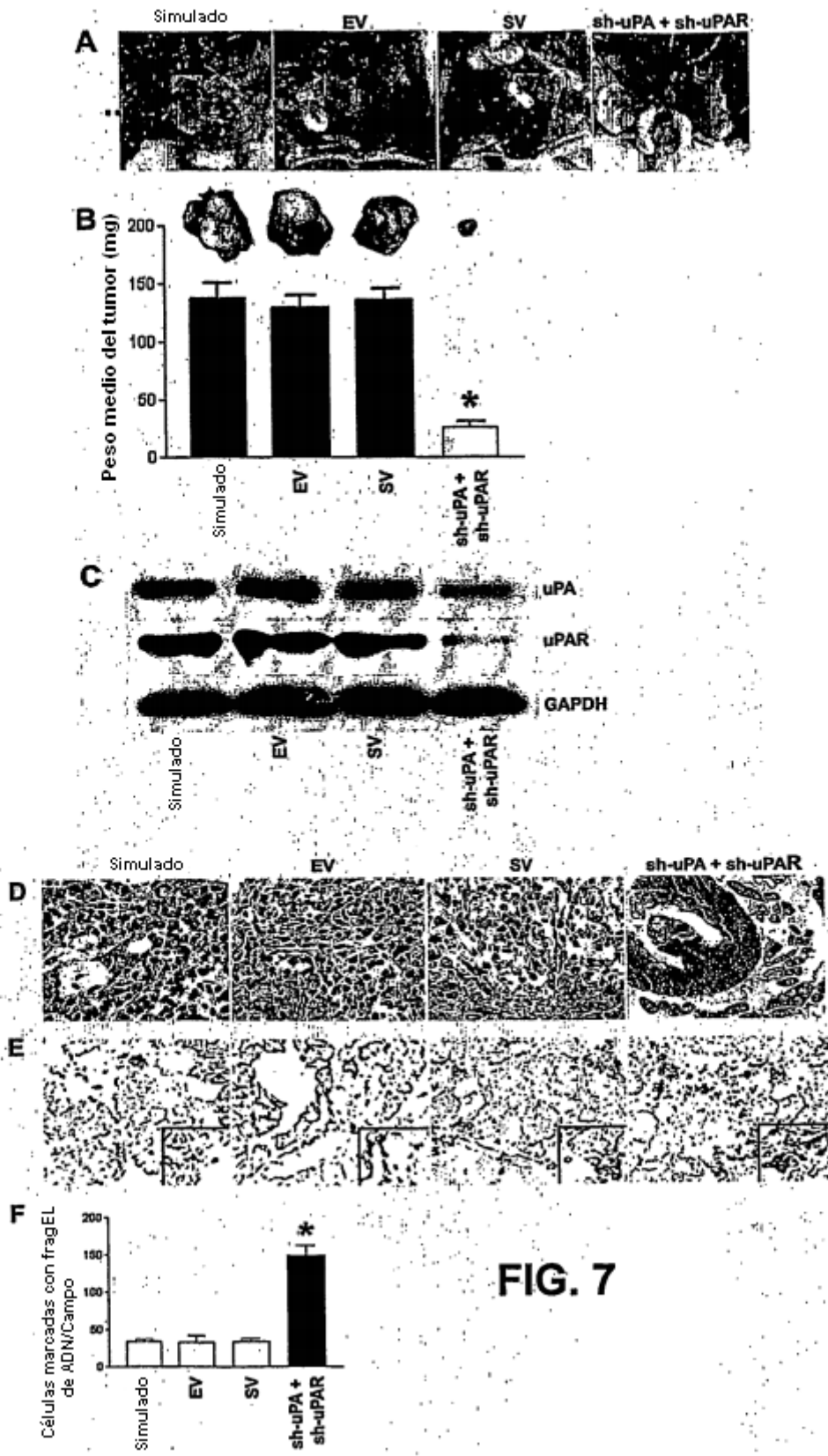
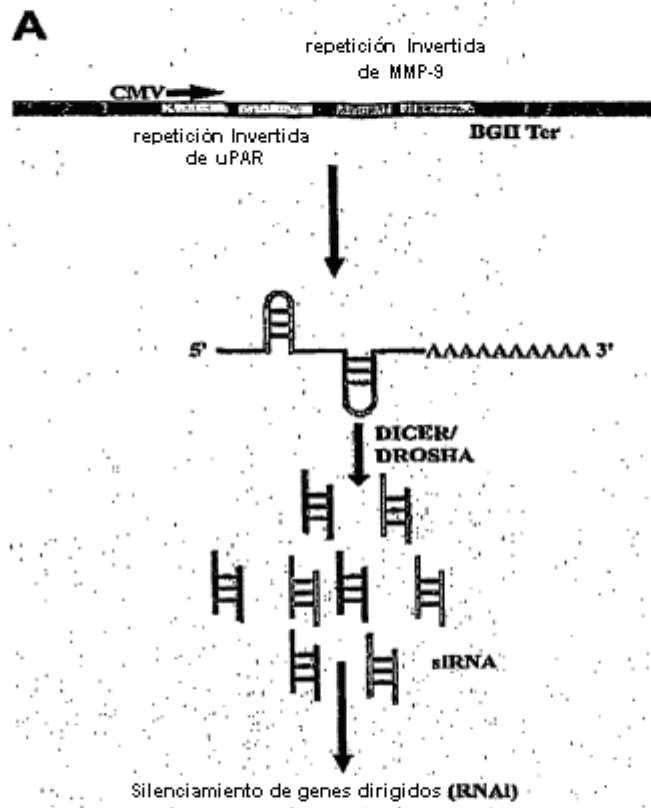


FIG. 5





**FIG. 7**



**FIG. 8**

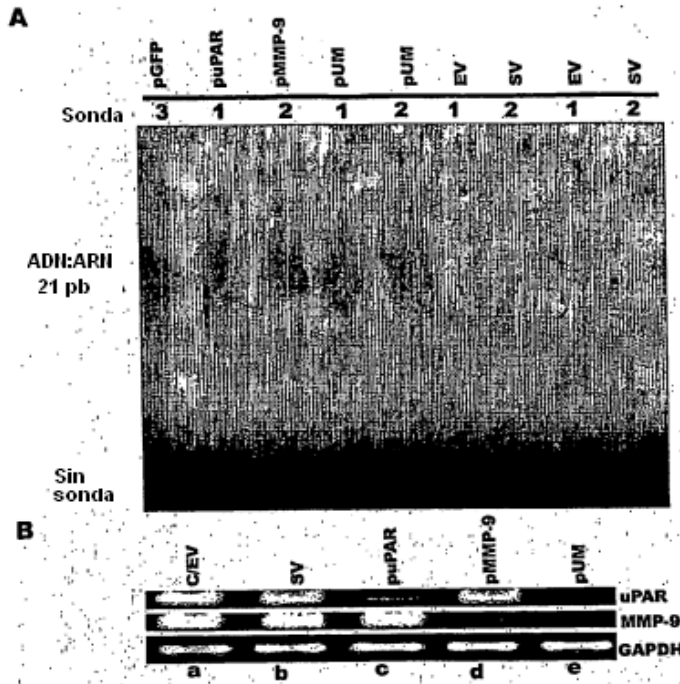


FIG. 9

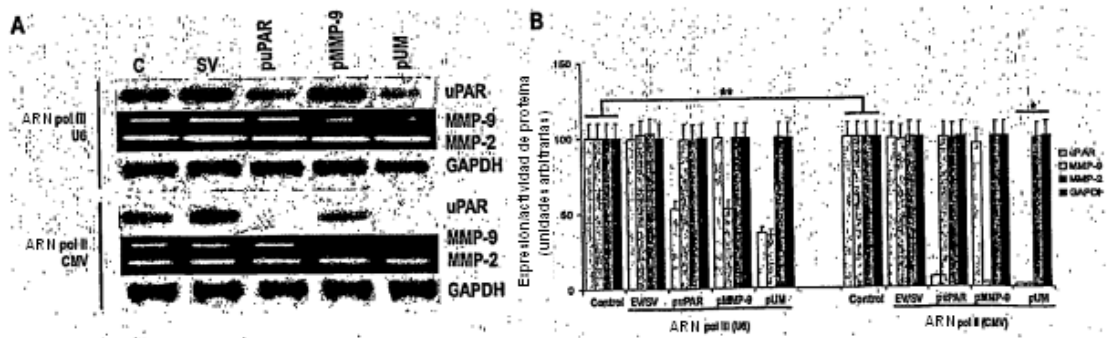


FIG. 10



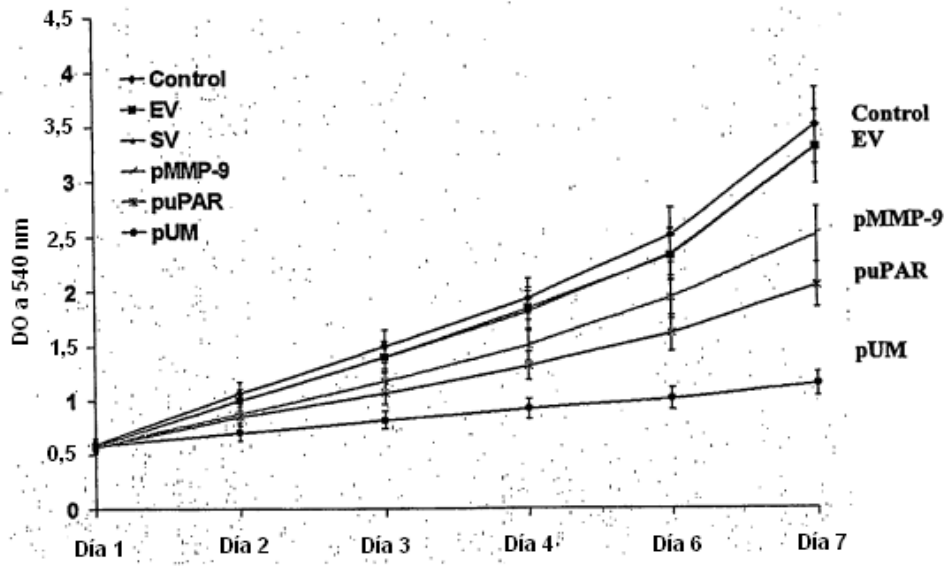


FIG. 11

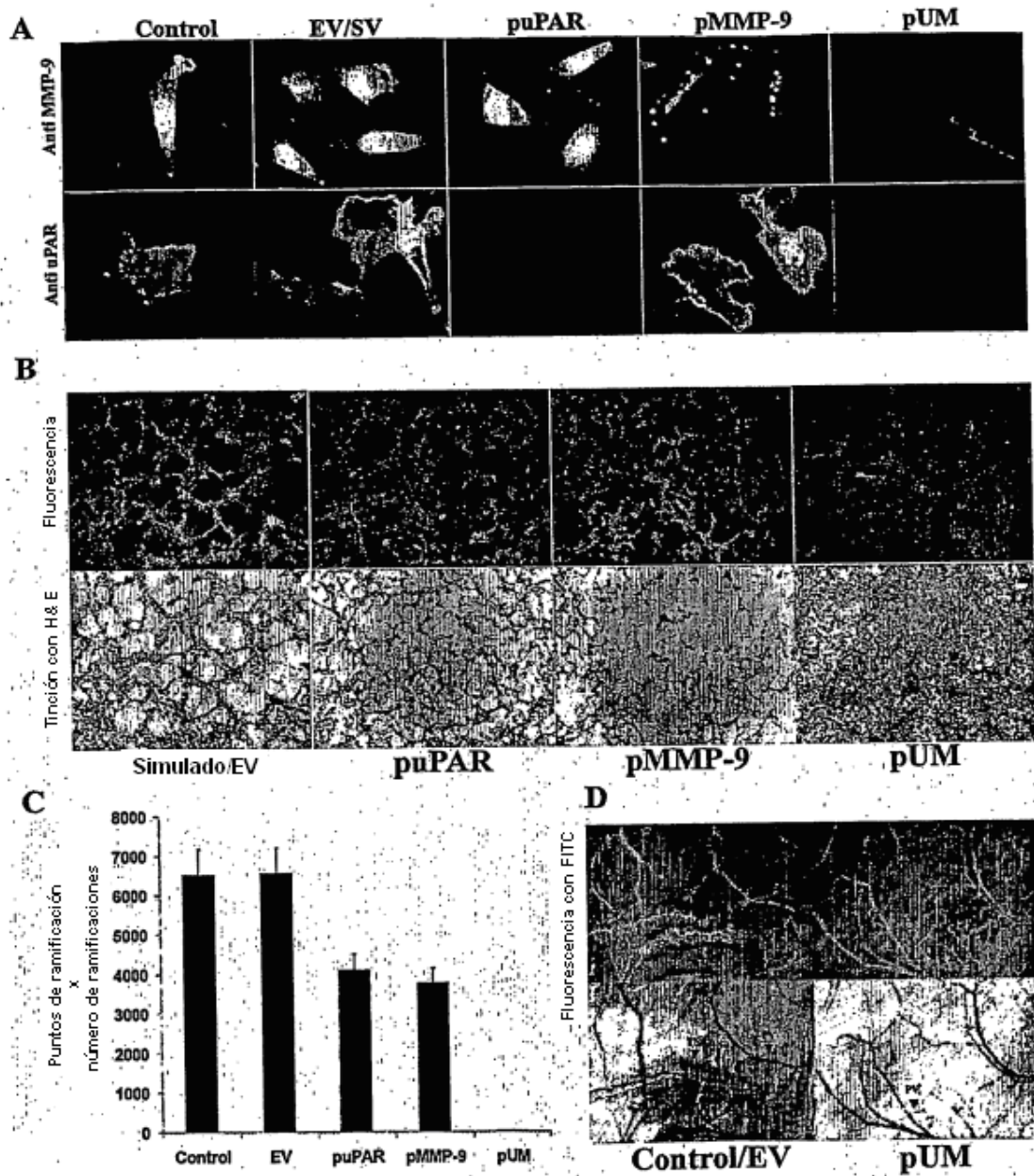


FIG. 12

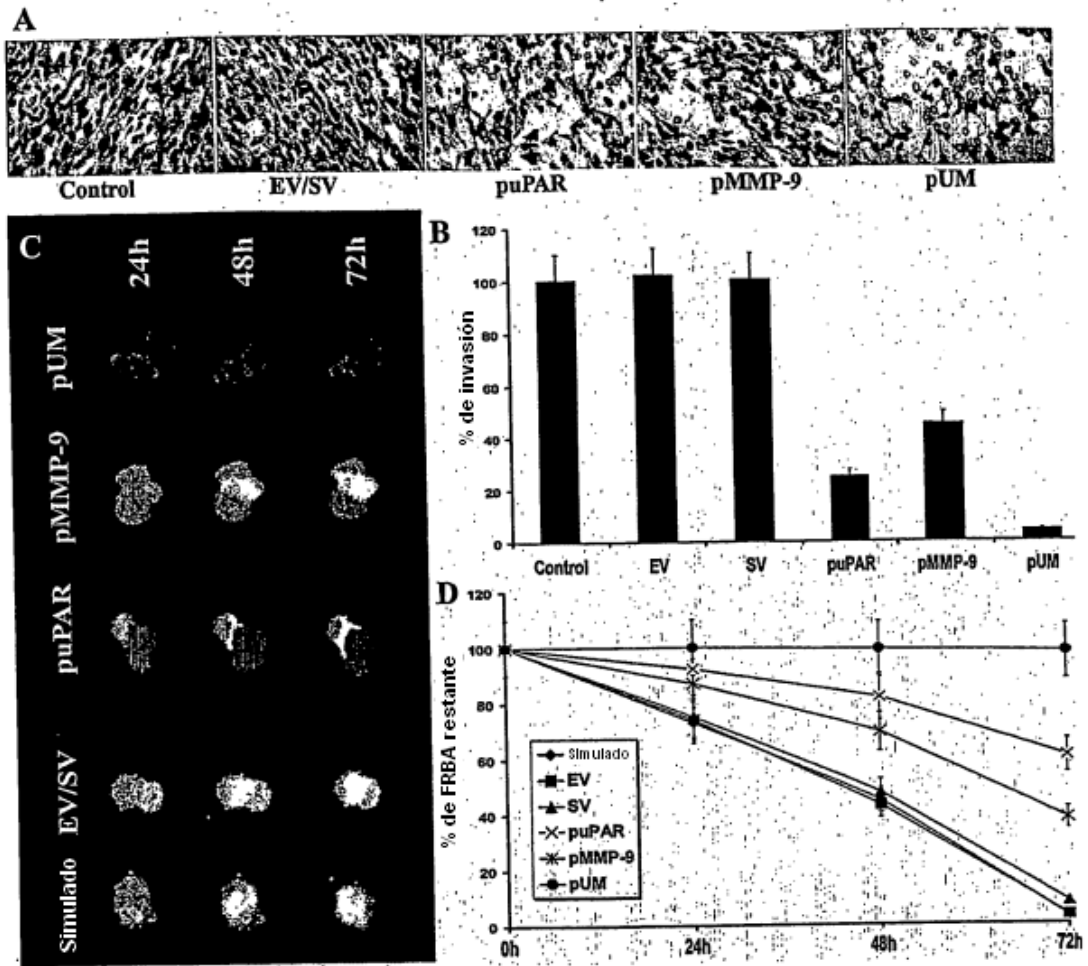


FIG. 13

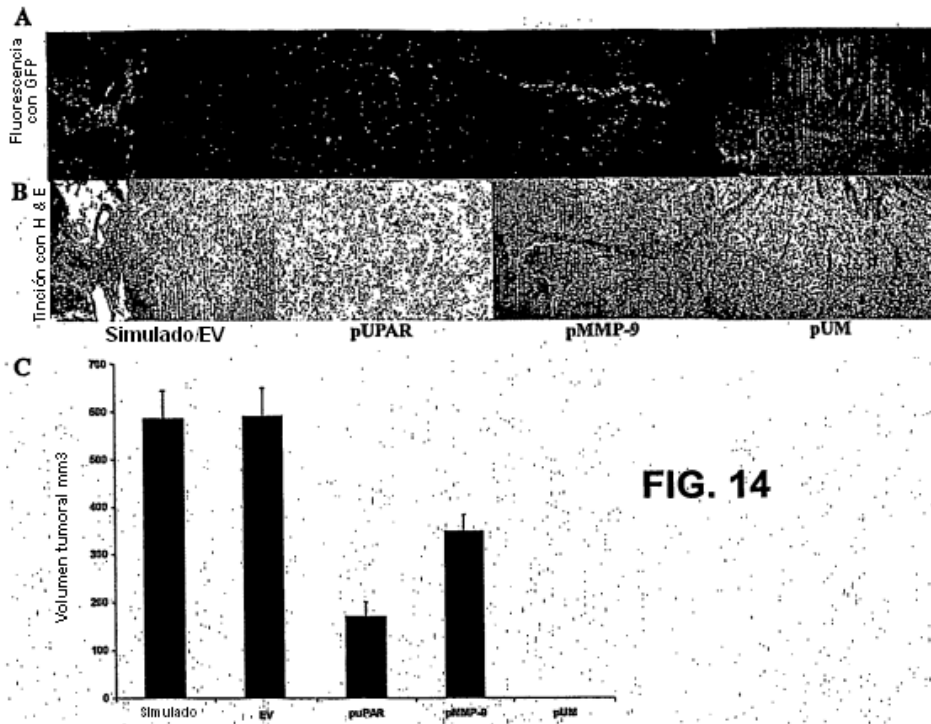


FIG. 14

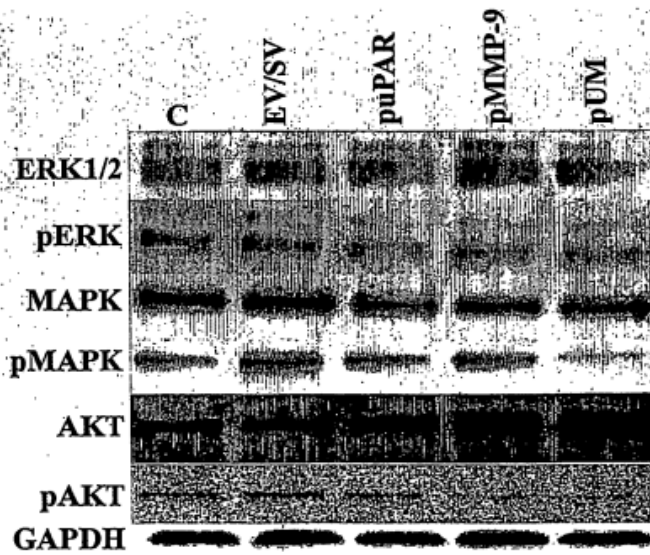


FIG. 15

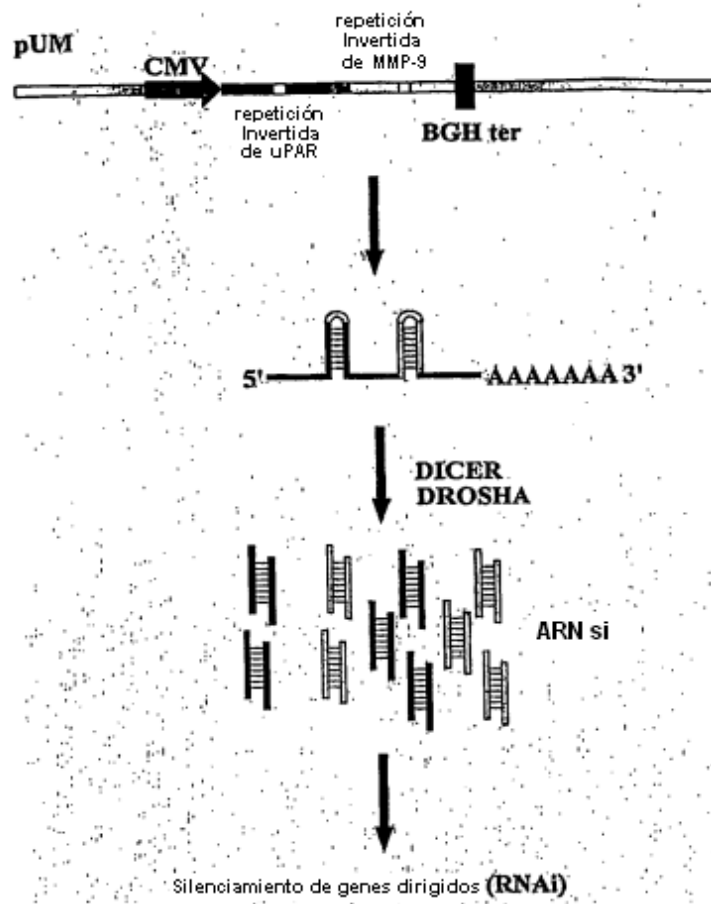


FIG. 16A

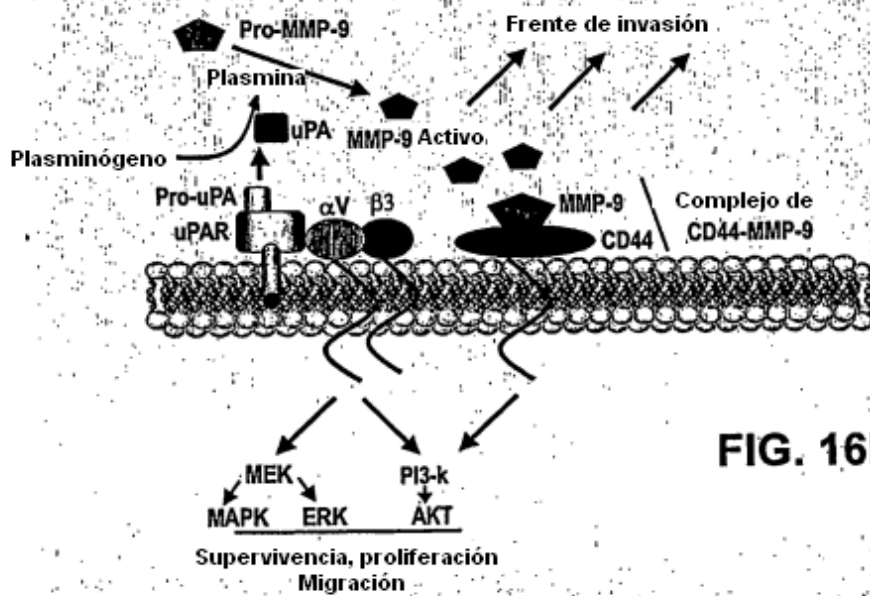


FIG. 16B

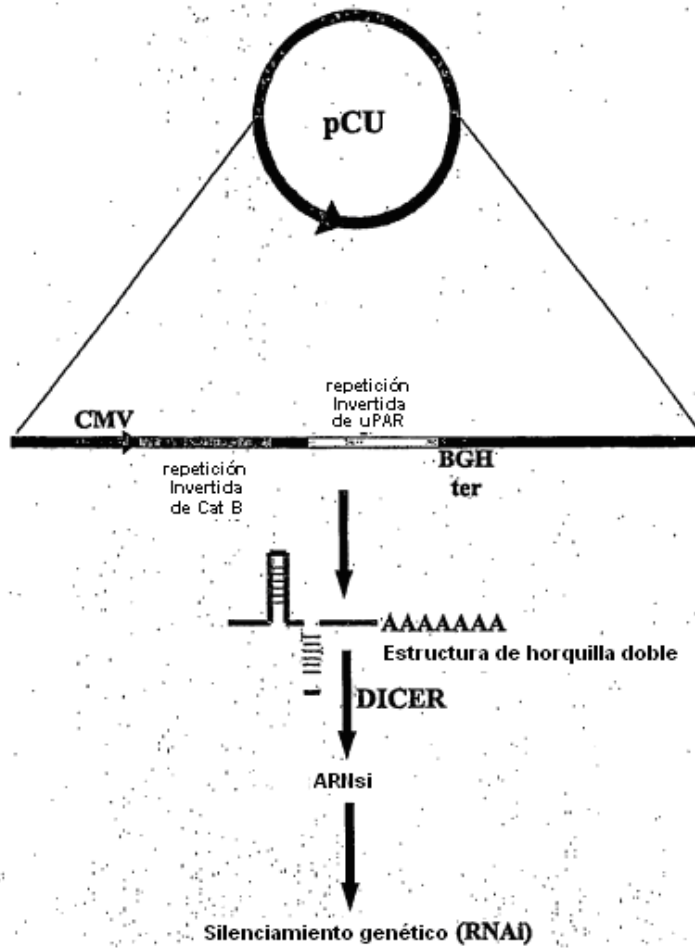


FIG. 17

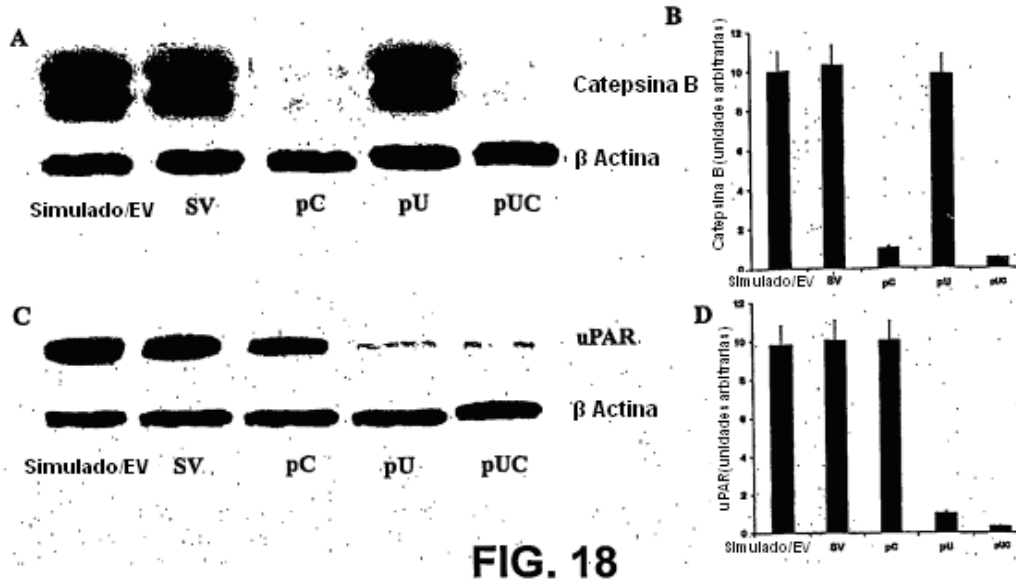


FIG. 18

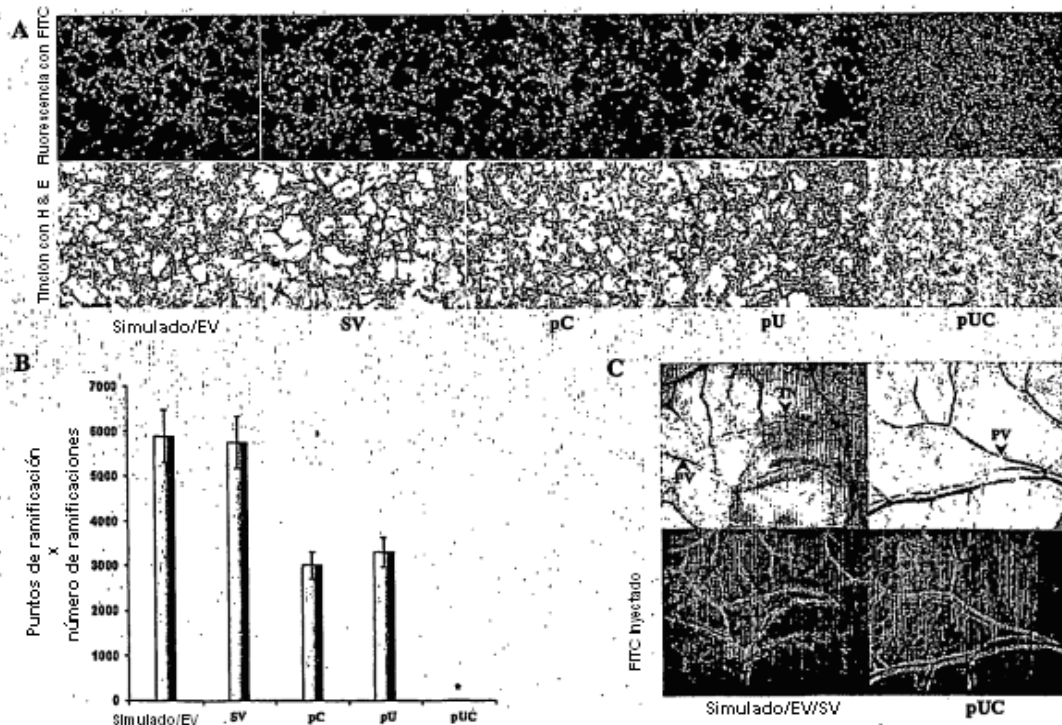


FIG. 19

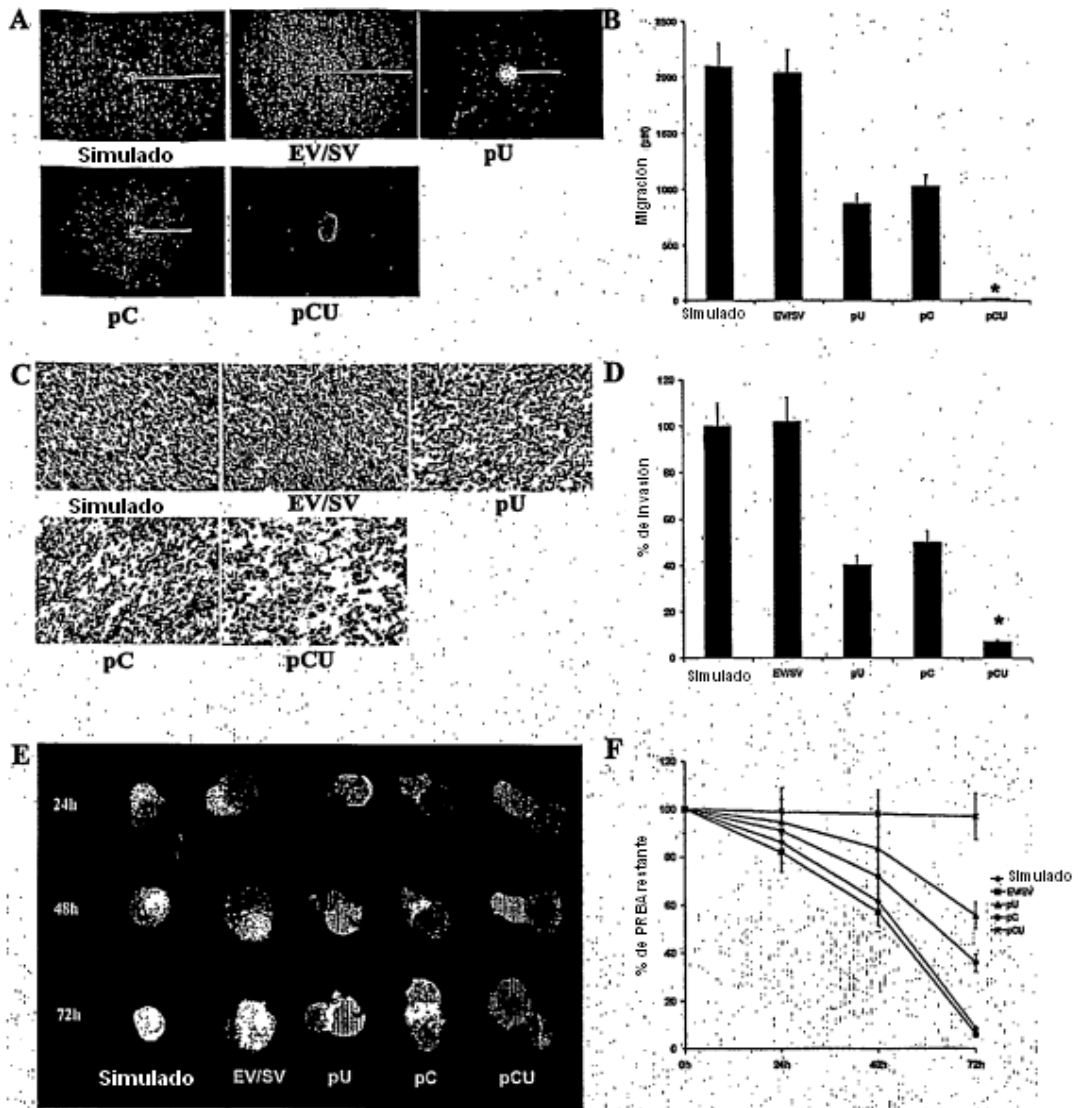


FIG. 20



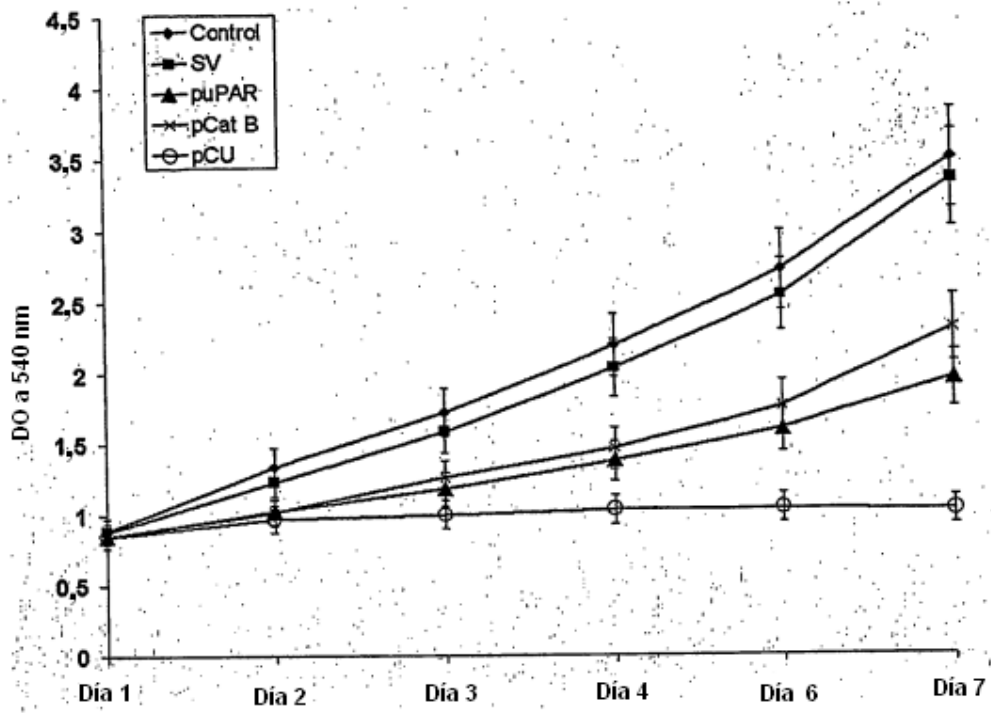


FIG. 21

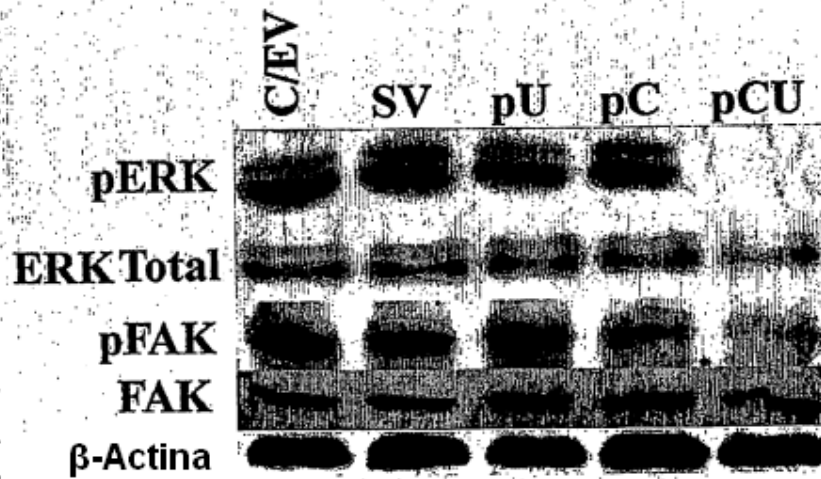
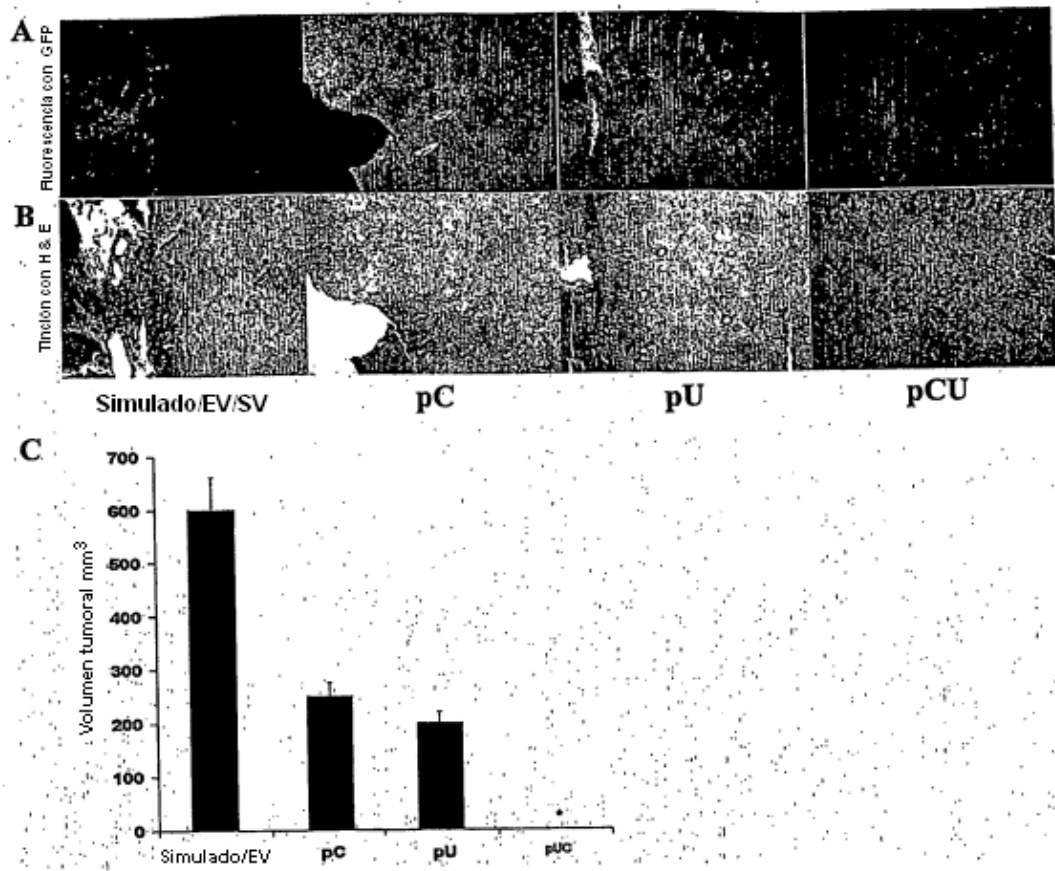


FIG. 22



**FIG. 23**

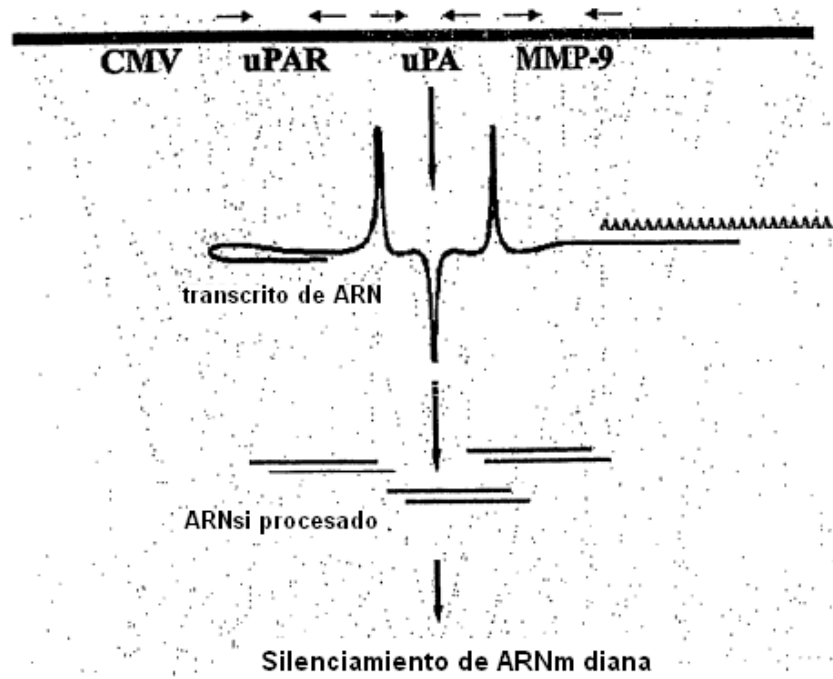


FIG. 24

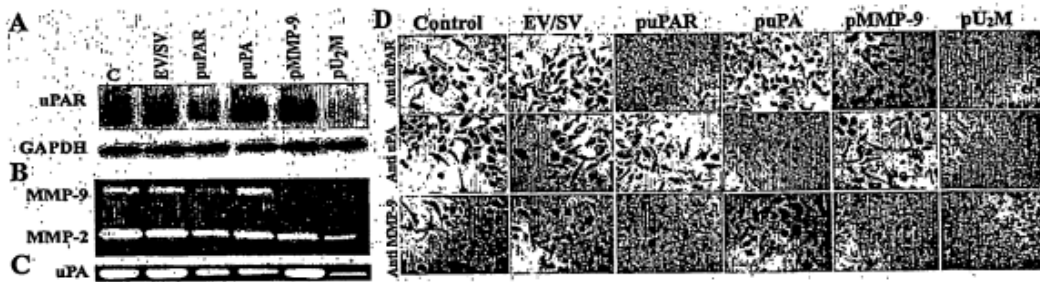
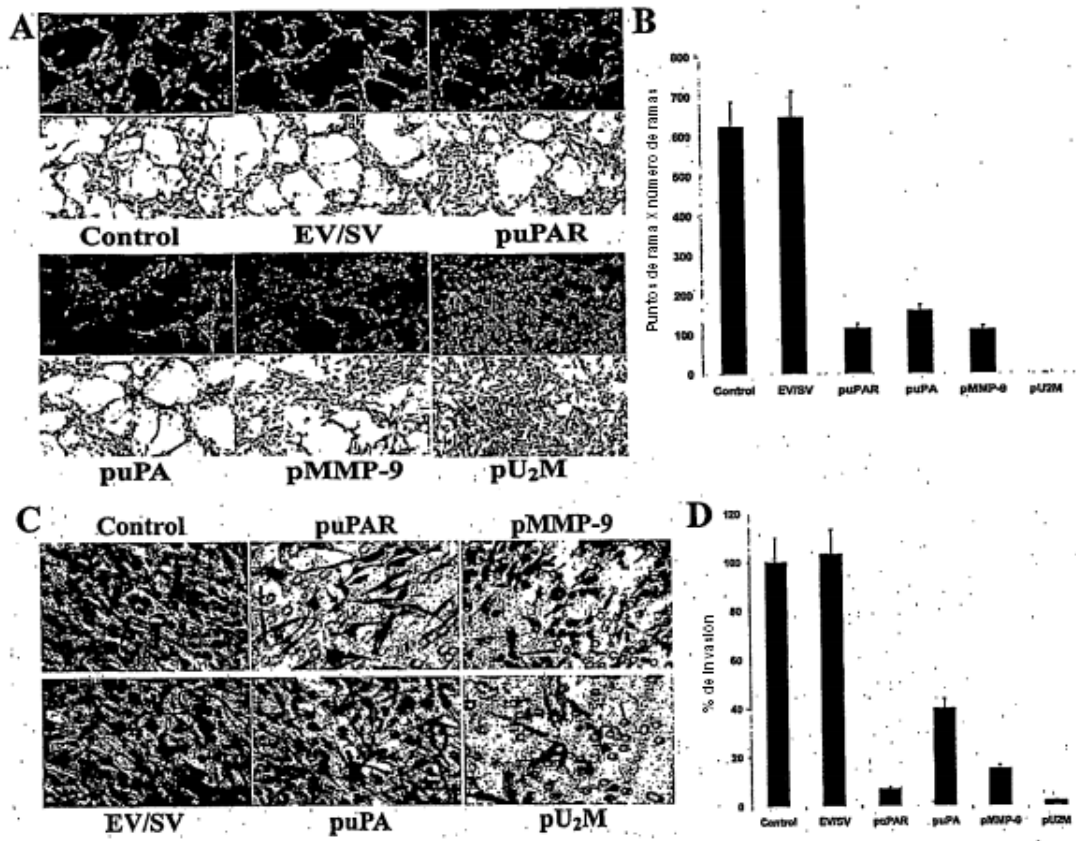


FIG. 25



**FIG. 26**

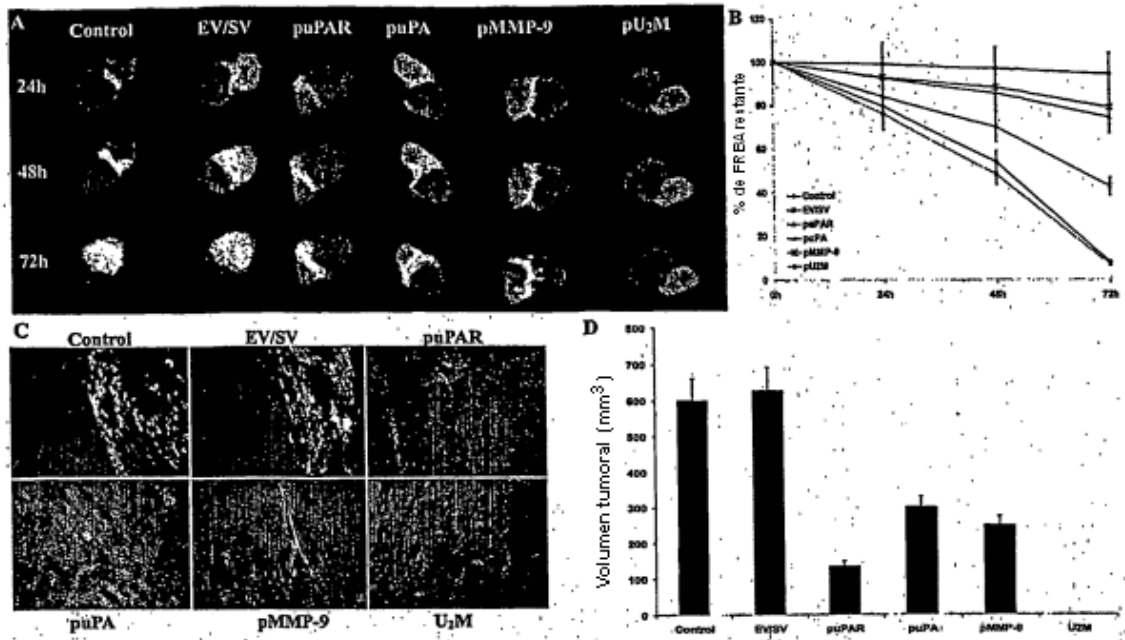


FIG. 27

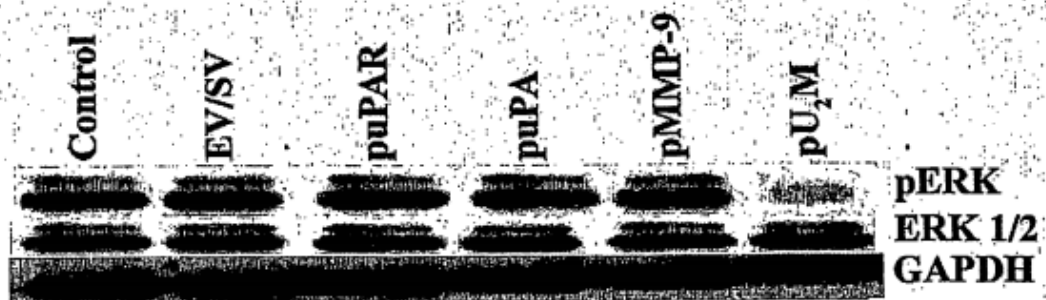
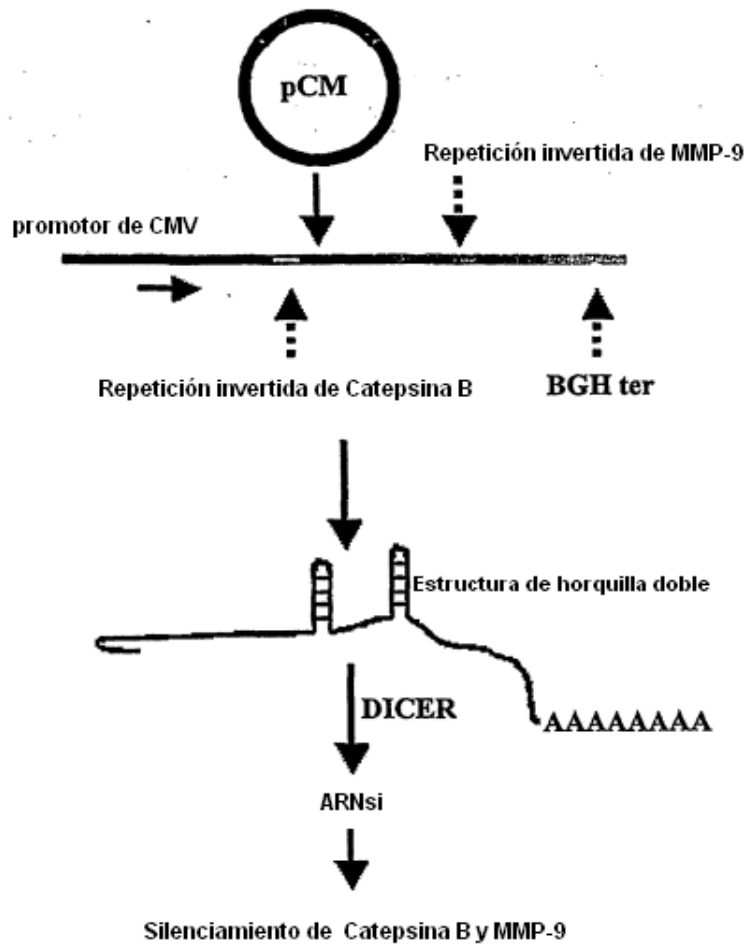


FIG. 28



**FIG. 29**

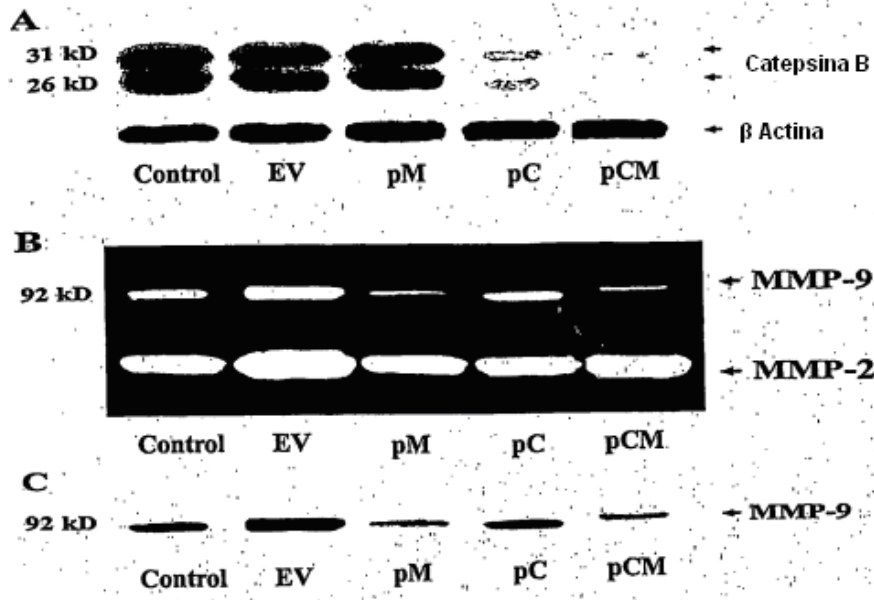


FIG. 30

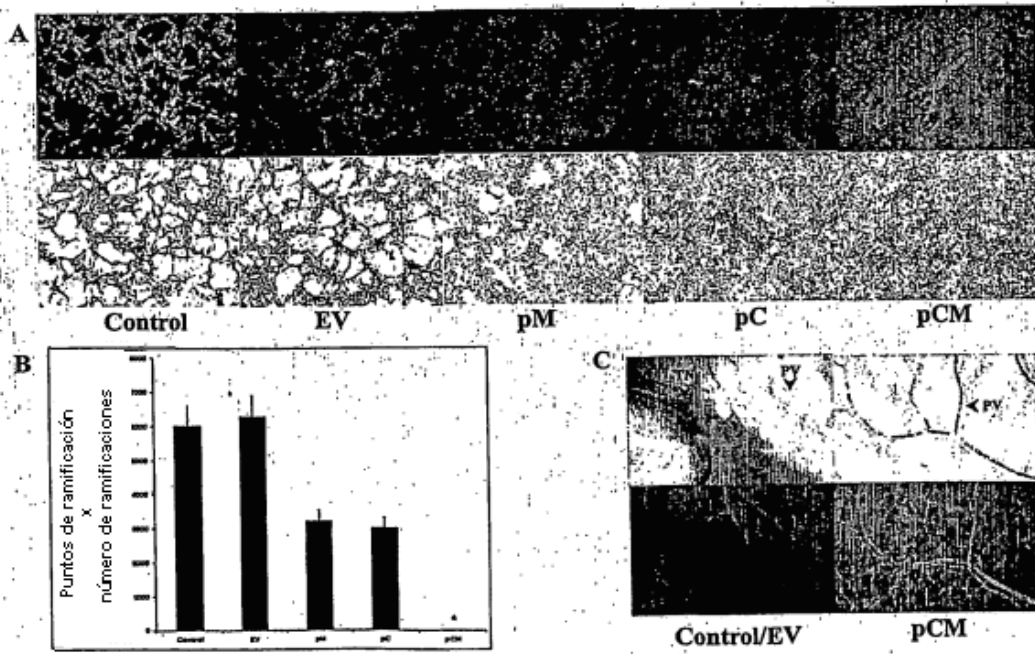
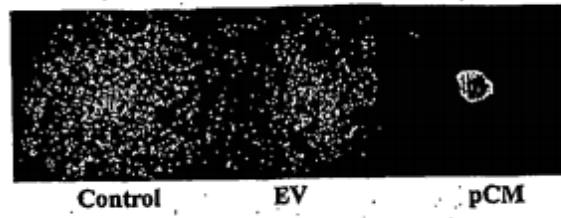
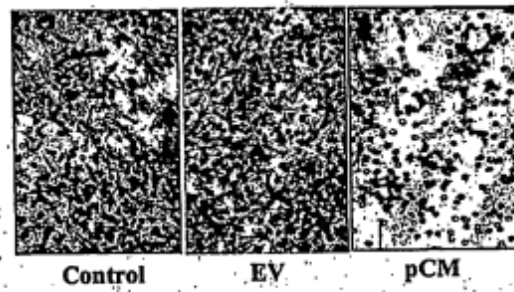


FIG. 31

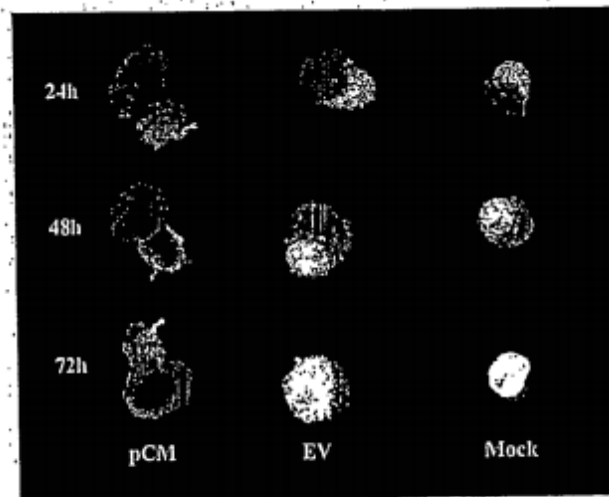
**A**



**B**



**C**



**FIG. 32**



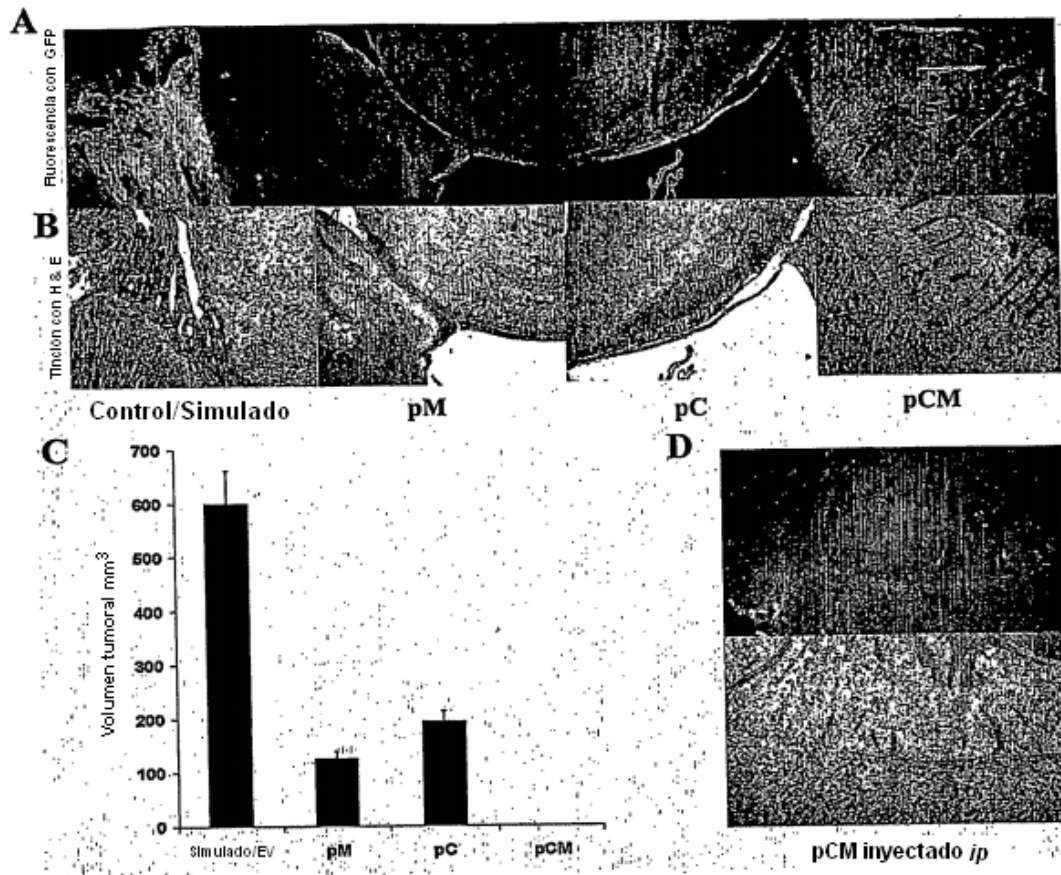


FIG. 33

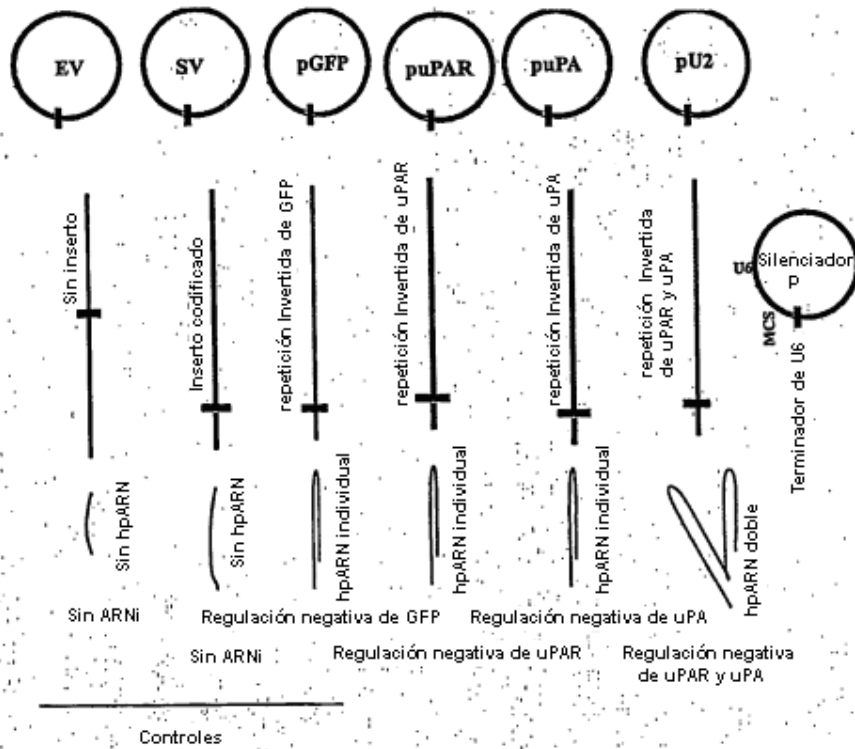


FIG. 34

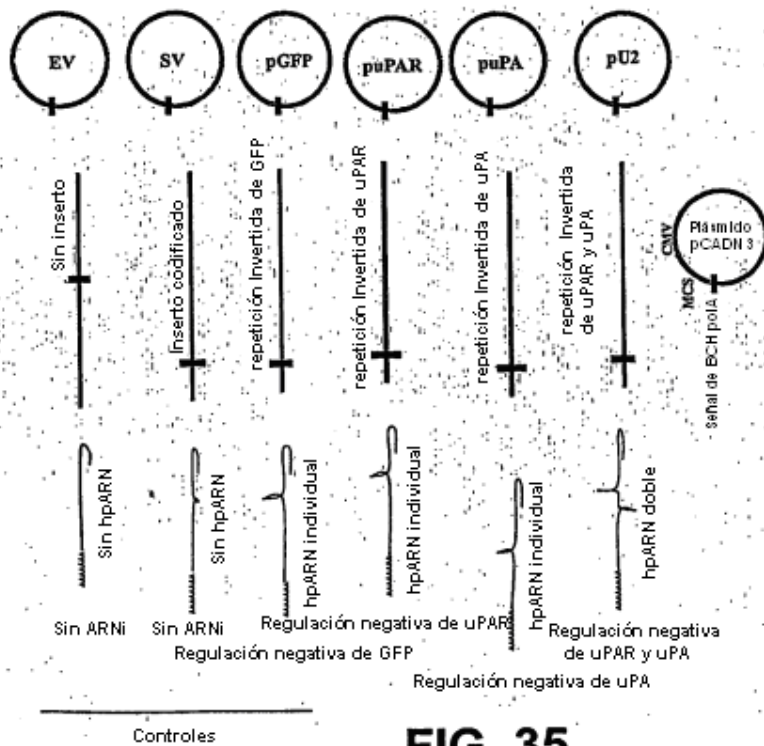


FIG. 35

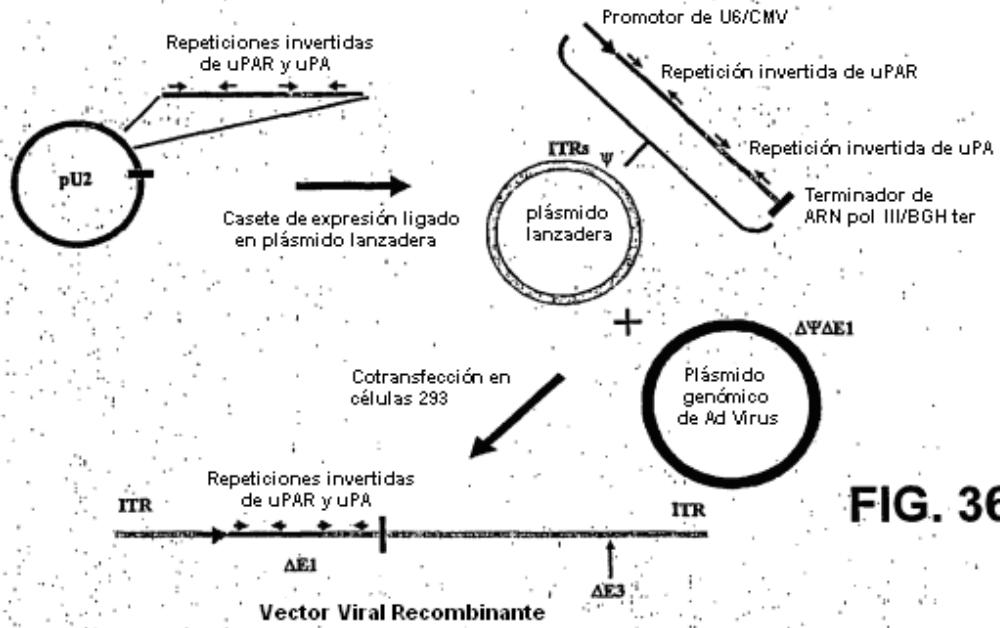
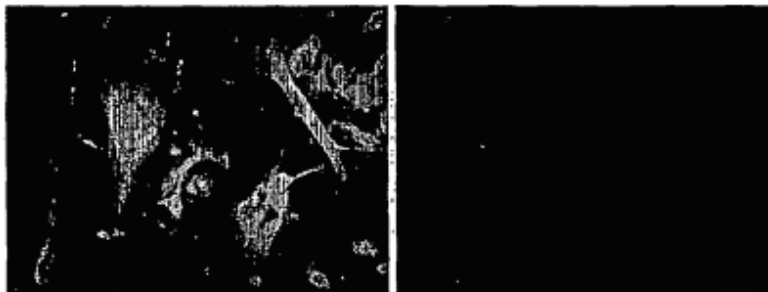


FIG. 36

Representación esquemática de producción de adenovirus recombinante



Células SHB19 GFP

Células SHB19 GFP  
(ARNi de GFP)

FIG. 37

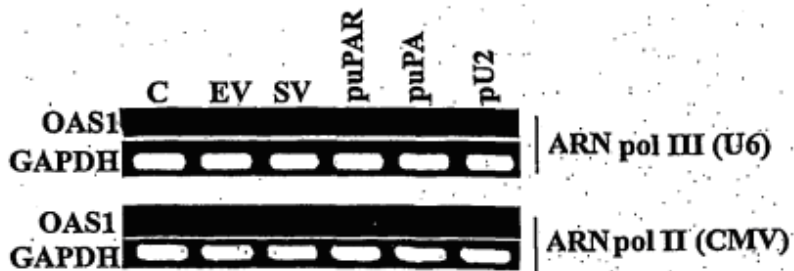


FIG. 38

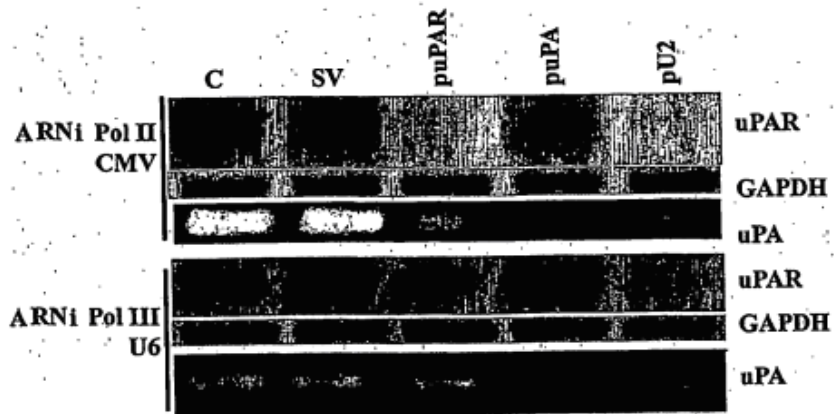


FIG. 39

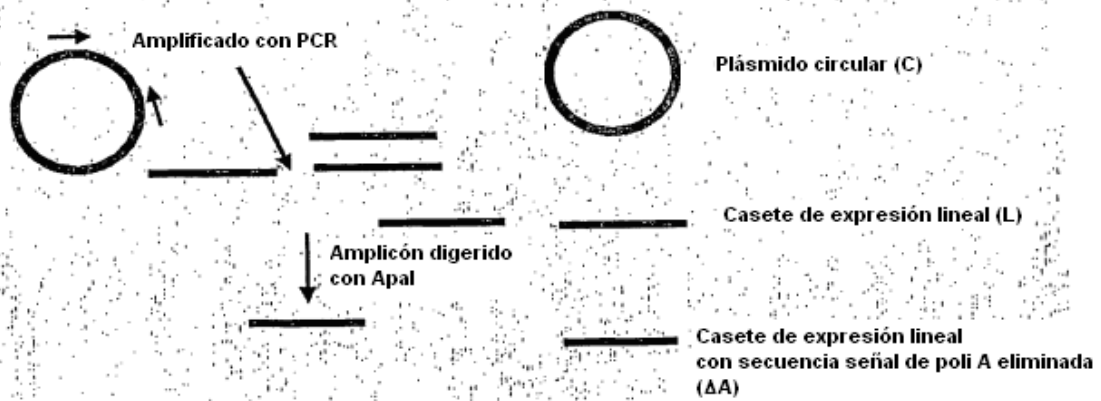


FIG. 40

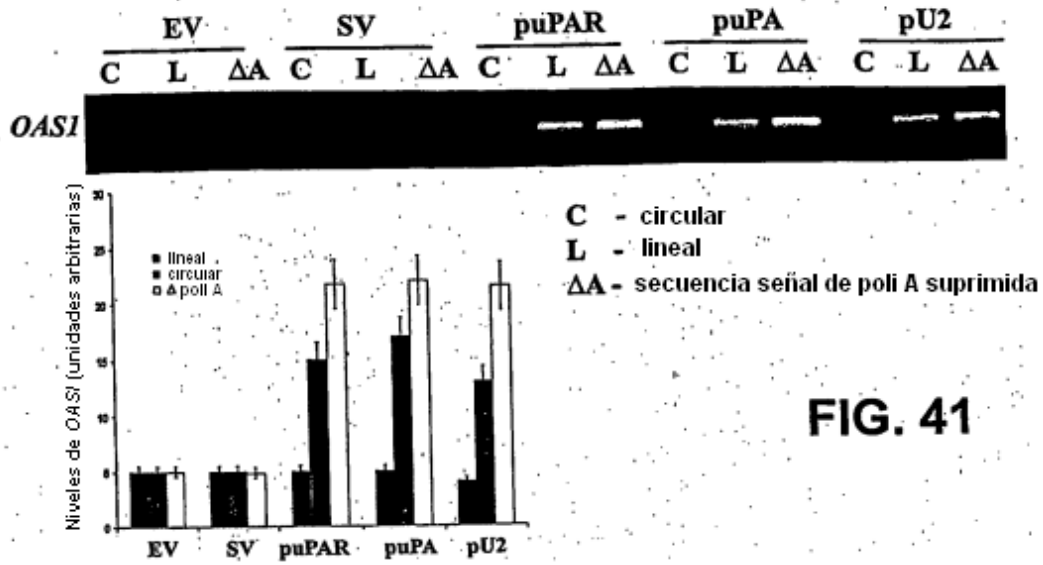


FIG. 41

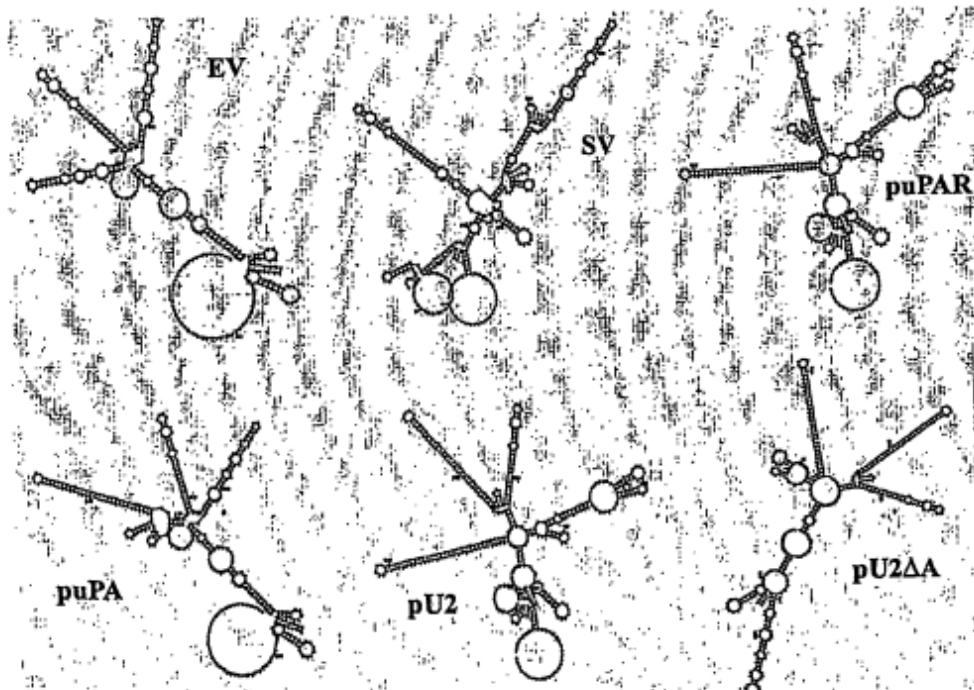


FIG. 42

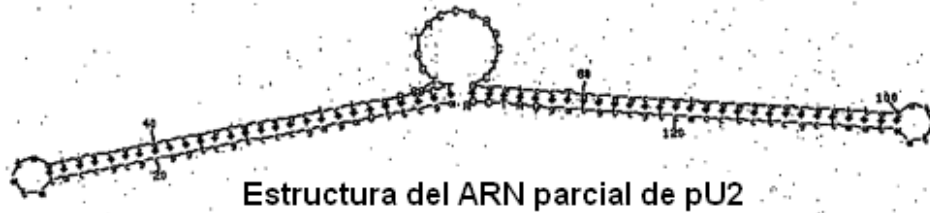


FIG. 43

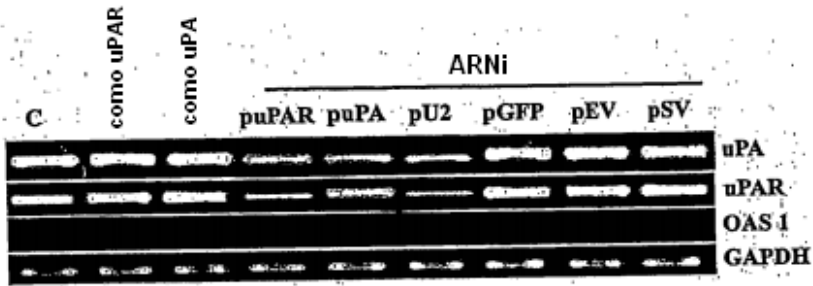


FIG. 44

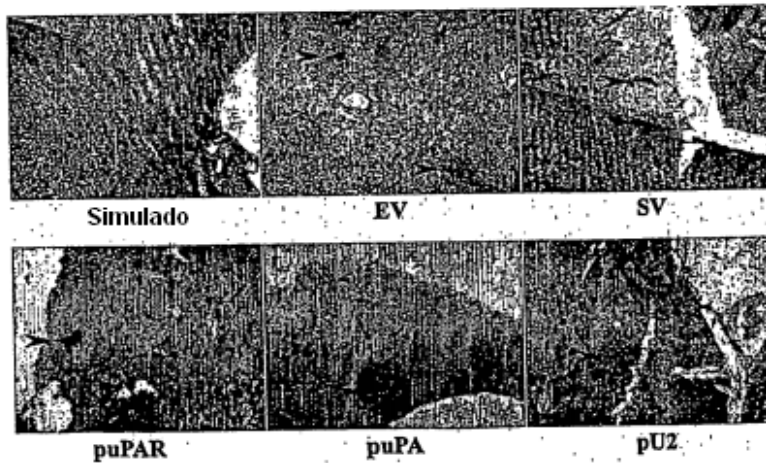


FIG. 45