



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 148**

51 Int. Cl.:
C12N 15/87 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **95914173 .0**
96 Fecha de presentación : **23.03.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **0752005**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.1997**

54 Título: **Ácidos nucleicos compactados y su suministro a células.**

30 Prioridad: **23.03.1994 US 216534**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **Ohio University
Edison Biotechnology Institute
Wilson Hall/West Green
Athens, Ohio 45701-2979, US
Case Western Reserve University**

72 Inventor/es: **Hanson, Richard W.;
Perales, Jose C. y
Ferkol, Thomas W., Jr.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 316 148 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

Ácidos nucleicos compactados y su suministro a células.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la compactación de ácidos nucleicos y al suministro de ácidos nucleicos exógenos compactados a células de organismos multicelulares, *in vivo*.

Descripción de la técnica anterior

15 Pueden introducirse genes exógenos funcionales en células de mamíferos *in vitro* mediante una variedad de métodos físicos, incluyendo transfección, microinyección directa, electroporación y coprecipitación con fosfato de calcio. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas no son prácticas para suministrar genes a células dentro de animales intactos.

20 *Suministro de ADN no compactado mediado por receptor in vivo*. Se ha demostrado que la transferencia génica mediada por receptor es satisfactoria en la introducción de transgenes en células receptoras adecuadas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Este procedimiento implica unir el ADN a una proteína policatiónica (habitualmente poli-L-lisina) que contiene un ligando unido covalentemente, que se selecciona para seleccionar como diana un receptor específico en la superficie del tejido de interés. El gen se capta por el tejido, se transporta al núcleo de la célula y se expresa durante tiempos variables. El nivel global de expresión del transgén en el tejido diana depende de varios factores: la estabilidad del complejo de ADN-portador, la presencia y el número de receptores específicos en la superficie de la célula seleccionada como diana, la interacción receptor-portador-ligando, la endocitosis y el transporte del complejo al núcleo, y la eficacia de la transcripción génica en los núcleos de las células diana.

30 Wu, *et al.*, documento USP 5.166.320, da a conocer el suministro de ADN específico de tejido usando un conjugado de un agente de unión a ácido polinucleico (tal como polilisina, poliarginina, poliornitina, histona, avidina o protamina) y un ligando de proteína específico de receptor de tejido. Para seleccionar como diana células hepáticas, Wu sugiere "ligandos de asialoglicoproteína (galactosa-terminal)". Estos pueden formarse, dice Wu, o bien mediante desialización de glicoproteínas apropiadas o bien acoplando lactosa a proteínas que no llevan galactosa. La razón molar de ácido polinucleico con respecto a conjugado está en el intervalo de 1:10 a 10:1, más normalmente de 1:5 a 5:1, más preferiblemente de 1:2 a 3:1. Aunque no se estableció por Wu *et al.*, en manos de los inventores, el método de Wu dio como resultado estructuras con un diámetro de al menos 80 nm.

40 Low, *et al.*, documento USP 5.108.921 dan a conocer la unión de biotina a ADN para transformar una célula usando endocitosis mediada por receptor.

Stomp, *et al.*, patente estadounidense 5.122.466 y McCabe, *et al.*, patente estadounidense 5.120.657 dan a conocer la unión de ADN a un gránulo metálico uniendo covalentemente polilisina al material y permitiendo luego que el ADN se acompleje con él. El producto resultante se usa entonces para la transformación balística de una célula. Véase Stomp, *et al.*, columna 7, líneas 29-37 y McCabe, *et al.*, columna 7, líneas 49-65.

45 Wagner, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:4255-4259 (1991) dan a conocer la acomplejación de un conjugado de transferrina-polilisina con ADN para suministrar ADN a células mediante endocitosis mediada por receptor. Wagner, *et al.*, enseñan que es importante que haya suficiente policatión en la mezcla para garantizar la compactación del ADN de plásmido en estructuras toroidales de 80-100 nm de diámetro, que, especulan, facilitan el acontecimiento endocítico. Wagner *et al.* no reconocen el valor de conseguir estructuras de diámetro más pequeño ni enseñan como obtener un mayor grado de compactación. Se cree que las estructuras de Wagner *et al.* son complejos multimoleculares, que tienen la desventaja de que son más vulnerables a la fagocitosis por macrófagos y menos susceptibles de captarse por tejidos diana.

55 *Inyección directa de ADN desnudo, no compactado*. La posibilidad de detectar expresión génica inyectando directamente ADN desnudo en tejidos animales se demostró por primera vez por Dubenski *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:7529-33 (1984), que mostraron que el ADN de plásmido o viral inyectado en el hígado o el bazo de ratones se expresaba a niveles detectables. El ADN se precipitó usando fosfato de calcio y se inyectó junto con hialuronidasa y colagenasa. Se demostró que el gen transfectado se replicaba en el hígado del animal huésped. Benvenisty y Reshef, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:9551-55 (1986) inyectaron ADN precipitado con fosfato de calcio por vía intraperitoneal en ratas recién nacidas y observaron expresión génica en los hígados de los animales 48 h tras la transfección. En 1990, Wolff *et al.*, Science, 247:1456-68 (1990), notificaron que la inyección directa de vectores de expresión de ADN o ARN en el músculo de ratones daba como resultado la expresión detectable de los genes durante periodos de hasta 2 meses. Esta técnica se ha extendido por Acsadi *et al.*, New Biologist, 3:71-81 (1991) para que incluya la inyección directa de ADN desnudo en corazones de rata; los genes inyectados se expresaron en el corazón de los animales durante hasta 25 días. Otros genes, incluyendo el gen para la distrofina, se han inyectado en el músculo de ratones usando esta técnica. Este procedimiento forma la base de un amplio enfoque para la generación de respuesta inmunitaria en un animal mediante la administración de un gen mediante inyección directa en el tejido diana. El gen se

expresa de manera transitoria, produciendo un antígeno específico (véase Donnelly *et al*, The Immunologist, 21, págs. 20-26 (1994) para una revisión reciente). Sin embargo, el ADN usado en estos experimentos no se ha modificado o compactado para mejorar su supervivencia en la célula, su captación en el núcleo o su velocidad de transcripción en el núcleo de las células diana.

5

Comportamiento del ADN en disolución. El ADN es una molécula similar a una varilla en disolución, debido a la naturaleza sumamente cargada de manera negativa de su estructura principal de fosfato, y su estructura básica puede perturbarse mediante la modificación de la capa de hidratación asociada a la hélice. Esta perturbación puede provocarse de dos formas; en primer lugar, un cambio en el grado de neutralización de cargas de las moléculas de ADN que da como resultado una compactación extensa y finalmente la separación de la fase de ADN (precipitación) en forma de estructuras compactas, y en segundo lugar, un cambio en la constante dieléctrica de la hélice de ADN que conduce a la formación de estructuras compactas. Estas perturbaciones dan como resultado un cambio en la conformación de la molécula de ADN que permite que el polímero flexible se pliegue y se compacte, alterando marcadamente las propiedades hidrodinámicas de la molécula de ADN. Se cree que las estructuras resultantes son de naturaleza similar a la que adopta el ADN en los cromosomas de eucariotas superiores y dentro de las cápsidas virales.

El ADN en el núcleo de un eucariota superior está íntimamente asociado con proteínas nucleares básicas (es decir, las histonas y las protaminas) con un alto contenido en lisina y arginina (histonas) o arginina (protaminas). El complejo de ADN con estas proteínas básicas es responsable del control de la compactación del ADN que se produce tras la formación de los cromosomas y se cree que desempeña un papel en la regulación de la expresión génica. La compactación del ADN, que se produce fisiológicamente en virus, bacterias y núcleos eucariotas, ha sido extremadamente difícil de reproducir en el laboratorio. Teóricamente, debido a la naturaleza sumamente cargada de manera negativa de la estructura principal del ADN, un cambio en el grado de neutralización de cargas del ADN da como resultado una compactación extensa y finalmente la separación de la fase de ADN (precipitación) en forma de estructuras compactas. Sin embargo, el comportamiento de los complejos de ADN-polición en disolución depende del método para acomplejar el ADN con la proteína policiónica.

Estudios realizados por Olins, Olins y von Hippel (J. Mol. Bio. 24, 157-176, 1967) usando homopolipéptidos catiónicos como modelos para la formación de complejos de nucleoproteína presentaron pruebas de la formación de complejos específicos de ADN con polipéptidos catiónicos (poli-L-lisina, poli-L-arginina y poli-L-ornitina) tras el "apareamiento" de ambos componentes en disolución. Este procedimiento implicaba la diálisis descendente desde concentraciones de NaCl de 2 M hasta 0,010 M.

Pueden hacerse varios comentarios sobre este estudio. En primer lugar, la desnaturalización térmica de complejos formados mediante la adición de polición a ADN estableció que se producía unión del polición al ADN en cada caso estudiado, y dio como resultado la estabilización de la estructura bicatenaria del ADN. Es importante indicar que este sistema difiere de aquél en el que un cambio en la constante dieléctrica (es decir, deshidratación con alcohol) da como resultado que el ADN se colapse sin cambios en las características de desnaturalización térmica del ADN. En segundo lugar, estudios espectrofotométricos indicaron que la absorbancia máxima a 260 nm se desplazaba ligeramente hacia el rojo con un aumento progresivo en la turbidez a longitudes de onda superiores a 300 nm (una región en la que ni el polición ni el ADN muestran ninguna absorbancia). Se creyó que estas características indicaban que estaba detectándose un pequeño cambio conformacional, que se producía posiblemente a través de la interacción entre el ADN y el polipéptido, mediante unos espectros de absorción anómalos. En tercer lugar, los complejos formados mediante la adición de polipéptidos básicos a ADN dieron como resultado la agregación molecular y la formación de precipitados.

Se aplicaron la dispersión rotatoria óptica y el dicroísmo circular al estudio de la interacción entre homopolipéptidos básicos y ADN en disolución. Shapiro, Leng y Felsenfeld (Biochemistry, 8:3219-3232, 1969) dilucidaron los cambios en la estructura secundaria asociados con la formación de complejos de ADN examinando su rotación óptica, usando un protocolo para acomplejar polilisina con ADN esencialmente diferente al de aparear ambos componentes en una diálisis salina descendente. Mezclaron directamente polilisina y ADN en un disolvente con alto contenido en sal (NaCl 1 M), lo que dio como resultado la formación de complejo "soluble". Se asocia un alto grado de turbidez al complejo en disolución, lo que indica la agregación de los componentes. Se produjo agregación en las muestras usadas para determinar las propiedades rotatorias ópticas del complejo ya que los espectros de dicroísmo circular se aproximaban al nivel inicial de manera asintótica a longitudes de onda en el intervalo de 320 a 360 nm. El espectro anómalo se asoció siempre a la turbidez. Se ha deducido que los cambios en la actividad óptica surgen de la formación de complejos moleculares de orden superior tras la agregación.

Los complejos de ADN obtenidos en las condiciones de experimentación descritas anteriormente tienen un coeficiente de sedimentación medio que varía entre aproximadamente 5000 y 10000 unidades. La partícula promedio tenía un diámetro de 340 nm, (calculado usando información proporcionada mediante dispersión de luz) y las partículas tenían una masa seca promedio correspondiente a aproximadamente 70 unidades moleculares de ácido nucleico/polipéptido. La información proporcionada por estos estudios, aunque no es absolutamente cuantitativa, traza los cambios estructurales que experimenta el ADN tras su unión a un polipéptido básico.

Se han investigado varios aspectos de la estructura de los complejos de ADN-polibase en disolución (Haynes, Garrett y Gratzner, Biochemistry, 9:4410-4416, 1970). La microscopía electrónica confirmó la estructura ordenada de

los complejos descrita por Shapiro *et al.*; estructuras de ADN formadas como toroides con forma de rosquilla, con un diámetro externo de 300 nm. Las características de microscopía electrónica y D.C. de los complejos de ADN-polibase corresponden a factores estructurales que residen en la hélice de ADN de Watson-Crick, ya que los complejos de polibase-polinucleótidos monocatenarios, es decir, ARNr, poli(A), poli(U), etc. no muestran actividad óptica anómala. Además, pueden detectarse estructuras ordenadas en el microscopio electrónico. Con el fin de clarificar si podría observarse en los complejos un cambio en la inclinación de las bases y/o el paso de hélice, se determinó el patrón de difracción de rayos X de los complejos. La doble hélice está en la forma B normal obtenida para ADN libre en disoluciones acuosas; no se encontraron transiciones obvias a las formas C o A de ADN, lo que sugiere la existencia de una forma estructural diferente cuando se acompleja el ADN con polipéptidos básicos en disolución. Hay también una asociación de complejos de ADN-polibase que implica el apareamiento directo de cargas, tal como se muestra mediante el desplazamiento progresivo de contraiones en complejos de ADN-polilisina a medida que disminuye la concentración salina. Por tanto, cualquier interacción fuerte del grupo amino cargado con una base es muy improbable. Así, la fuerza rotatoria anómala del ADN en disolución surge del empaquetamiento quiral, la clase de fenómeno asociado con la aparición de una gran periodicidad en el empaquetamiento asimétrico de moléculas en el mismo plano.

Lerman *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68:1986-90 (1971) notifican que cuando una disolución diluida de ADN de fago se mezcla con una concentración suficientemente alta de un polímero neutro sencillo (poli(óxido de etileno)) en presencia de alta concentración de NaCl (un entorno intracelular simulado), las moléculas de ADN de fago se colapsan en partículas que se aproximan a la compactibilidad del contenido de cápsides de fago. La estructura de los complejos de ADN se resolvió por Gosule y Schellman (Nature 259: 333-335, 1976). Su publicación junto con un informe más detallado (Gosule, L., Chatteraj. D.K., y Schellman. J., Advances in Poliamine Research 1: 201-215, 1978), mostraron que la compactación del ADN (en una disolución muy diluida) mediante polipéptidos básicos (espermina y espermidina), en las condiciones descritas por primera vez por Li, Biopolymers, 12: 287 (1973), dio como resultado estructuras de toroide. Los complejos generados por Gosule y Schellman tenían una estructura unimolecular que consistía en una única unidad de ADN de ADN de fago compactado hasta un radio máximo de aproximadamente 50 nm. Los autores indican que se sabe que existen poliaminas en células bacterianas. La compactación del ADN también se trata por Laemmli, PNAS 72: 4288-92 (1975) y Post y Zimm, Biopolymers, 21:2123-32 (1982).

Bunnell, B.A., *et al.* (Som. Cell Mol. Genet., 18:559-569 (1992)) tratan una técnica para suministrar oligonucleótidos antisentido en células usando complejos moleculares. Se describen complejos específicos de nucleótidos antisentido con cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y proteína poli(L-lisina)-asialoorosumucoide como estructuras similares a rosquillas que oscilan desde 50 hasta 150 nm de diámetro. Se muestra posteriormente que estos complejos inhiben la expresión de CAT en un 54% en células NIH 3H3.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende complejos de ácido nucleico no agregados, consistiendo esencialmente cada complejo en una única molécula de ácido nucleico y una o más moléculas portadoras, comprendiendo dicha única molécula de ácido nucleico un gen sintético expresable o un ADNc, y teniendo dicha molécula portadora un resto de unión a ácido nucleico a través del cual el ácido nucleico se acompleja con el ácido nucleico, en la que dicho complejo se compacta hasta un diámetro que es inferior a 30 nm.

El ácido nucleico compactado puede suministrarse eficazmente a través de la membrana de una célula viva, especialmente en un organismo multicelular. El ADN condensado en pequeñas partículas puede ser más adecuado para translocación nuclear a través de los poros nucleares y puede protegerse frente a nucleasas. Cuando el ácido nucleico incluye un gen expresable, ese gen puede expresarse en la célula.

En algunas realizaciones, se prepara una molécula portadora específica de tejido, que es una molécula bifuncional que tiene un resto de unión a ácido nucleico y un resto de unión a tejido diana. Entonces se compacta el ácido nucleico a altas concentraciones con la molécula portadora a una concentración salina crítica. Luego se administra la molécula portadora cargada con el ácido nucleico al organismo. Cada molécula portadora lleva una única molécula de ácido nucleico.

En otras realizaciones, no se usa una molécula portadora de unión a tejido diana. Sin embargo, el ácido nucleico se compacta todavía complejándose con una molécula portadora que comprende un resto de unión a ácido nucleico que reduce las interacciones entre el ácido nucleico y el disolvente. Los complejos compactados se administran al organismo.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - Caracterización física de los complejos de galactosa-poli-L-lisina/ADN.

La figura 1A muestra los espectros de DC asociados con ADN normal en disolución y con ciertos complejos de poli-L-lisina/ADN. Se agitaron con vórtex sesenta microgramos de plásmido de β -galactosidasa de CMV libre de ARN (disuelto en tampón TE, pH 8), 150 μ l de NaCl 700 mM a velocidad media en un aparato VIBRAX (IKA-VIBRAX-VXR). Se añadieron gota a gota diecinueve microgramos de biconjugado de fenilisotiocianato de α -galac-

ES 2 316 148 T3

topiranosilo/poli-L-lisina en 150 μ l de NaCl 700 mM a la disolución agitada con vórtex de ADN. La adición lenta del policatión da como resultado la formación de una disolución turbia que se disuelve mediante la adición lenta, progresiva de alícuotas de 3 μ l de NaCl 5 M. Se monitorizó la desaparición de la turbidez visualmente y se investigaron mediante DC las disoluciones de complejos de ADN/poli-L-lisina. En este punto (NaCl 0,97 M), el espectro de DC era el característico del ADN agregado. La adición adicional de alícuotas de 2 μ l de NaCl 5 M (dando como resultado una concentración de NaCl 1,031 M) produjo el espectro de DC esperado para un complejo de ADN condensado (o relajado). También se tomó el espectro de DC de ADN bicatenario no acomplejado a NaCl 1 M. Los espectros se obtuvieron usando un espectropolarímetro JASCO-600 con una cubeta de 0,1 cm. Se restó en cada caso el espectro del tampón.

Las figuras 1B-1G son micrografías electrónicas (ME). 1B-1D, 1F y 1G se toman a 300.000x. La barra en 1D representa 33,3 nm. La figura 1E se tomó a 600.000x y la barra es de 16,6 nm de longitud. Se realizó la tinción con acetato de uranilo tal como se describió anteriormente. (Ennever, *et al.*, Biochem. Biophys. Acta, 826: 67 (1985)). En resumen, se sometió la rejilla al descargo de DC de ADN bicatenario no acomplejado a NaCl 1 M. Los espectros se obtuvieron usando un espectropolarímetro JASCO-600 con una cubeta de 0,1 cm. Se restó en cada caso el espectro del tampón.

Para los estudios de ME mostrados en las figuras 1B-1F, se agitaron con vórtex 60 μ g de ADN de plásmido PEPCK-hFIX (disuelto en tampón TE, pH 8), en 150 μ l de NaCl 700 mM a velocidad media en un aparato VIBRAX (IKA-VIBRAX-VXR). Se añadieron gota a gota diecinueve microgramos de biconjugado de fenilisotiocianato de α -galactopiranosilo/poli-L-lisina en 150 μ l de NaCl 700 mM a la disolución agitada con vórtex de ADN. La adición lenta del policatión da como resultado la formación de una disolución turbia que se disuelve mediante la adición lenta, progresiva de alícuotas de 3 μ l de NaCl 5 M. Se monitorizó la desaparición de la turbidez visualmente y se investigó mediante ME la disolución de complejos de ADN/poli-L-lisina (figura 1C). La adición adicional de alícuotas de 2 μ l de NaCl 5 M dio como resultado cambios estructurales tal como se muestra en las figuras 1D y 1E.

La figura 1B es una ME de ADN no acomplejado (1 μ g/ml a NaCl 1 M). La figura 1C representa un complejo de ADN a la concentración subóptima de NaCl (760 mM). El ADN está en el estado agregado; son visibles agrupaciones de toroides unimoleculares. En la figura 1D, el complejo de ADN está a una concentración óptima de NaCl para el complejo en cuestión (968 mM). El ADN está apropiadamente condensado; sólo pueden observarse toroides individuales. Para la figura 1E, se seleccionaron cuatro complejos de ADN de la figura 1D y se imprimieron a más aumentos. En la figura 1F, se observa un complejo de ADN, a una concentración de NaCl 1,068 M, que es superior a la óptima para la condensación de este complejo. El ADN está en el estado relajado. Obsérvense los toroides unimoleculares ramificados en los que es visible un núcleo de condensación y las fibras de ADN similares a varillas.

Las diferencias en la concentración de NaCl requerida para los estados agregado, condensado y relajado en los experimentos anteriores representan diferencias específicas de ADN o policatión.

En un tercer experimento, se formaron complejos de β -galactosidasa de CMV y poli-L-lisina galactosilada esencialmente como en Wu *et al.* Brevemente, se combinaron ADN de plásmido y poli-L-lisina galactosilada en NaCl 3 M. Se incubaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se dializaron frente a NaCl 0,15 M durante 16 h a través de membranas con un límite de masa molecular de 3.500 dalton. En la inspección visual, no estaban presentes precipitados en el dializado.

La figura 1G es una micrografía electrónica del complejo de ADN resultante, que está en el estado agregado multimolecular. Obsérvese que los toroides en este caso son más grandes que en 1C o 1D (la escala es la misma). La figura 1H muestra el espectro de DC desde 240 hasta 300 nm para ADN no acomplejado y para complejos de ADN multimolecular agregado/poli-L-Lys, de modo que se destaca la inversión del máximo del espectro del ADN normal a 269 nm. Esta inversión es característica de la agregación multimolecular.

En otro experimento, se agitaron con vórtex sesenta microgramos de ADN de plásmido de PEPCK-hFIX (disuelto en tampón TE, pH 8), en 150 μ l de NaCl 200 mM a velocidad media en un aparato VIBRAX (IKA-VIBRAX-VXR). Se añadieron gota a gota diecinueve microgramos de biconjugado de fenilisotiocianato de α -galactopiranosilo/poli-L-lisina en 150 μ l de NaCl 200 mM a la disolución agitada con vórtex de ADN. La adición del policatión dio como resultado la formación de precipitados en la inspección visual.

La figura 1I es un espectro de DC, proporcionado por un complejo de ADN precipitado. Es esencialmente plano desde 240 hasta 300 nm. La figura 1J es una micrografía electrónica del ADN precipitado.

Figura 2 - *Relevancia funcional y especificidad del sistema de transferencia de genes.* (A) Se evaluó la concentración relativa de factor IX humano en la sangre de animales tratados con el complejo de ADN midiendo la actividad procoagulante de factor IX humano. Se usó una modificación del tiempo de tromboplastina parcial, activado por caolín, de una fase. Se obtuvieron muestras de sangre de animales de experimentación mediante punción venosa. Se añadió una quincuagésima parte del volumen de citrato de sodio 500 nM, pH 5,0, para evitar la coagulación y se almacenó el plasma a -20°C. Se sometieron a ensayo las muestras por duplicado, y se comparó su actividad con la actividad funcional del plasma reunido de 24 hombres adultos normales. En todos los cálculos, una unidad de actividad del factor IX en un ml de plasma humano normal es equivalente al 100% de actividad funcional o aproximadamente 3 μ g de factor IX por ml. Se restó la actividad inicial del factor IX humano en el plasma de la rata antes de la representación gráfica. (B) Se alimentaron los animales transfectados con una dieta libre de hidratos de carbono/con alto contenido en

proteínas durante una semana. Se tomaron muestras de sangre al inicio del tratamiento y tras una semana con la dieta y se analizaron mediante hibridación por inmunotransferencia de tipo Western. Se compararon los animales a los 8 y 12 días con ratas transfectadas alimentadas con una dieta comercial convencional. Se obtuvieron los datos mediante análisis desitométrico de películas fotográficas de inmunotransferencias de tipo Western e indican el aumento en veces de proteína de factor IX humano tras el tratamiento dietético.

Figura 3.- *Especificidad tisular de complejo de ADN manosilado en el transporte dirigido de ADN a los macrófagos in vivo.* Se conjugó poli-L-lisina manosilada con ADN de SV40/luciferasa. Se introdujeron 300 μ g de complejo de ADN en la vena cava caudal de ratas. Cuatro días tras la inyección, se prepararon extractos de tejido y se sometieron a ensayo para determinar la actividad luciferasa. Se representa gráficamente la actividad luciferasa como unidades de luz integradas por miligramo de extracto de proteína de bazo, hígado y pulmón. En otros tejidos no se encontró actividad. Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media (EEM). Las barras claras son los controles no transfectados (n=4), y las barras oscuras, los animales transfectados con complejos de poli-L-lisina manosilada/ADN (n=5).

Figura 4.- *Especificidad del complejo de ADN manosilado en el transporte dirigido de ADN a cultivo primario de macrófagos in vitro.* Se transfectaron cultivos primarios de macrófagos peritoneales o bien con poli-L-lisina galactosilada (barras claras) o bien con poli-L-lisina manosilada (barras oscuras) conjugada con un ADN de SV40/luciferasa. A los tiempos indicados (2, 4, 8 y 24 horas), se lavaron las células. Veinticuatro horas tras la transfección, se recogieron las células y se sometieron a ensayo para determinar la actividad luciferasa. Se representa gráficamente la actividad luciferasa como actividad luciferasa relativa tras normalizarse mediante la actividad encontrada en controles no transfectados. Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media (EEM).

Figura 5.- *Competición entre el complejo de ADN manosilado y albúmina sérica bovina manosilada por la unión al receptor de manosa de macrófagos.* Se transfectaron cultivos primarios de macrófagos peritoneales con poli-L-lisina manosilada conjugada con ADN de SV40/luciferasa (T). Antes de la adición del complejo de ADN, se añadió un exceso de 100 veces de albúmina sérica bovina manosilada a un conjunto de placas (Tc). También se sometieron a ensayo controles no transfectados (NT) para determinar la actividad luciferasa 24 horas tras la transfección. Se representa gráficamente la actividad luciferasa como actividad luciferasa relativa tras normalizarse en relación con la actividad encontrada en controles no transfectados. Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media (EEM).

Figura 6.- *Transferencia génica in vivo usando el complejo de ADN conjugado con Fab-poli-L-lisina anti-plg-R de rata.* Se conjugó Fab-poli-L-lisina con ADN de SV40/luciferasa y se introdujo en la vena cava caudal de ratas (transfectadas) (n=3). Se procesaron como controles, controles no transfectados (control) (n=3), animales a los que se les inyectó un complejo de Fab-poli-L-lisina-ADN que contenía un fragmento Fab obtenido de una IgF irrelevante (FabI) (n=3) y animales a los que se les inyectó un complejo de ADN que no contiene un gen de SV40/luciferasa (ADNI) (n=3). Dos días tras la inyección, se prepararon extractos de tejido y se sometieron a ensayo para determinar la actividad luciferasa. Se representa gráficamente la actividad luciferasa como unidades de luz integradas por miligramo de extracto de proteína. Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media (EEM).

Figura 7.- *Transcurso de tiempo de la expresión en pulmón e hígado de animales inyectados usando el complejo de ADN conjugado con Fab-poli-L-lisina anti-plg-R de rata.* Se conjugó Fab-poli-L-lisina con ADN de SV40/luciferasa y se introdujo en la vena cava caudal de ratas (n=9). Se sacrificaron las ratas 2 (n=3), 4 (n=3) y 6 (n=3) días tras la inyección. Se prepararon extractos de pulmón e hígado y se sometieron a ensayo para determinar la actividad luciferasa. Se representa gráficamente la actividad luciferasa como unidades de luz integradas por miligramo de extracto de proteína usando una escala logarítmica. Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media (EEM).

Figura 8.- *Competición entre el complejo de ADN galactosilado y asialoorosomucoide por la unión al receptor de ASGP de células HepG2.* Se transfectaron células de hepatoma HepG2 con poli-L-lisina galactosilada conjugada con ADN de PEPCK-hFIX. Antes de la adición del complejo de ADN, se añadió un exceso de 100 veces de asialoorosomucoide a un conjunto de placas (+ Comp.). Se monitorizó la internalización de ADN mediante hibridación por ranuras del medio de cultivo que contenía el complejo de ADN. Los datos se expresan como el porcentaje de ADN internalizado por el receptor a diferentes tiempos tras la transfección.

Figura 9 *Inyección directa al músculo e hígado de ADN desnudo frente a ADN condensado.* Se inyectaron cien microgramos de ADN desnudo que codifica luciferasa de SV40 en el hígado y músculo abdominal de dos ratas. Se inyectó la misma cantidad del plásmido pSV40-luciferasa acompañado con poli-L-lisina y condensado tal como se describió en el ejemplo 1, tanto en el hígado como el músculo abdominal de otros dos animales. Las ratas se sacrificaron 48 horas tras la inyección. Se homogeneizó un trozo de hígado y músculo abdominal en tampón de lisis y se analizaron los lisados celulares para determinar la actividad luciferasa. Se realizaron todas las mediciones de luciferasa por triplicado, se expresaron como un promedio de los valores y se normalizaron para la proteína total. La figura 9 muestra las unidades de luciferasa integradas por mg de proteína en dos conjuntos diferentes de animales.

Figura 10 *Inyección directa en el tectum del cerebro de ADN desnudo frente a ADN condensado.* Inyecciones intratecales de ADN de plásmido condensado con poli-L-lisina y desnudo pueden lograr altos niveles de expresión en

el cuerpo celular de la neurona a lo largo de 20 días. Actividad β -galactosidasa en retinas de ratas a cuyos cerebros se inyectó en las zonas tectales y se les administró o bien pCMV-lacZ desnudo o pCMV-lacZ condensado (pCMV-lacZ + lys) a las concentraciones mostradas. Cuando el ADN no está condensado con poli-L-lisina el nivel de expresión retorna al inicial tras 10 días tras la inyección.

5

Figura 11 *Cambios en la absorbancia de los complejos de ADN durante el proceso de condensación*. Se condensó un plásmido que contenía el gen del receptor de hLDL de CMV quimérico con poli-L-lisina, usando el procedimiento descrito en detalle en el ejemplo 1. Tras la adición de poli-L-lisina, se determinó la absorbancia de la disolución a 260 nm. Entonces se añadió NaCl concentrado progresivamente y se determinó la absorbancia. Se indica la absorbancia esperada para el ADN contenido en el complejo mediante la línea de puntos. La concentración de NaCl inicial usada en la reacción de condensación fue de 500 mM.

10

Figura 12 *Relación entre la estructura del complejo de ADN y su función en ratas adultas*. Se prepararon complejos de ADN-poli-lisina galactosilada que corresponden a diversos estados de condensación/agregación mostrados en la figura 1B-1G. El ADN consistía en el promotor de SV40 unido al gen estructural para el gen de luciferasa de *P. pyralis*. Se inyectaron a las ratas 300 μ g de los diversos complejos de ADN en la vena cava caudal y se determinó la actividad luciferasa en extractos del hígado y el bazo 48 h tras la inyección. Cada barra representa la media \pm EEM para tres ratas; no se inyectó a las ratas control el complejo de ADN.

15

Figura 13 *Introducción de 3 mg de PEPCK-hLDLr en su forma relajada (no acomplejada) frente a la condensada*. Con el fin de introducir el complejo de ADN en el animal, se realizó una inyección única de 3-10 ml de la disolución de complejo de ADN (NaCl \sim 400-900 mM) en la vena marginal de la oreja del conejo. Se extrajeron aproximadamente 1,5 ml de sangre a los tiempos indicados de la arteria de la oreja a las 4 p.m. Se realizó la determinación de la concentración de colesterol sérico en el Laboratorio Clínico de Hospitales Universitarios de Cleveland a partir de 300 μ l de suero. La administración de una disolución de complejo de ADN que contenía 3 mg del plásmido pPEPCK-hLDLr en un estado relajado al conejo n° 676 no dio como resultado una disminución significativa (primera flecha) en los niveles de colesterol sérico total. Una segunda inyección de complejos de ADN apropiadamente condensados que contenía 3 mg del mismo ADN (segunda flecha) produjo una reducción del 20% de los niveles de colesterol en la sangre. Cuatro semanas tras esta segunda administración, el colesterol retornó a aproximadamente los niveles anteriores al tratamiento, alcanzando un pico a aproximadamente 35 días.

20

25

30

Figura 14 *Inyección del complejo de poli-L-lisina/ADN que contiene 9 mg del gen de PEPCK-hLDLr quimérico*. En el segundo experimento, se administraron 9 mg del gen de PEPCK-hLDLr apropiadamente condensado con poli-L-lisina galactosilada al conejo n° 737. Tal como se muestra en la figura 14, el tratamiento dio como resultado una reducción del 38% de los niveles de colesterol sérico total que duraron aproximadamente 5 semanas. Por tanto, un aumento de 3 veces en la dosis de complejo de ADN dio como resultado una reducción de 2 veces en los niveles de colesterol sérico total.

35

Figura 15 *Inyección del complejo de poli-L-lisina/ADN que contiene 3 mg del gen de hLDLr de CMV quimérico*. La administración de una disolución de complejo de ADN que contenía 3 mg del gen del receptor de hLDL de CMV quimérico al conejo n° 16 dio como resultado una reducción máxima del 30% en los niveles de colesterol sérico total (figura 15). Once semanas tras la inyección, los niveles de colesterol son todavía el 20% inferiores a los observados antes del tratamiento.

40

Figura 16 *Inyección de dosis múltiples del complejo de poli-L-lisina/ADN que contiene 3 mg del gen de hLDLr de CMV quimérico*. Se inyectó a los conejos n° 775 (figura 16A) y n° 774 (figura 16B) 3 mg del complejo pCMV-hLDLr. En el conejo n° 775, esto provocó una reducción máxima del 24% en la concentración de colesterol en la sangre, 3 semanas tras el tratamiento. Dos inyecciones adicionales no dieron como resultado una reducción significativa adicional en el colesterol sérico. En el conejo n° 774, se observó una disminución del 36% en los niveles de colesterol en la sangre (figura 16B) tras la inyección inicial. Se realizaron cuatro nuevas inyecciones una vez cada 2 semanas con la misma cantidad de complejo de ADN. Dos de ellas dieron como resultado un efecto mínimo mientras que las otras dos dieron como resultado una reducción nula de los niveles de colesterol sérico total. Sin embargo, tras cinco administraciones de la disolución de complejo de ADN que contenía 3 mg de pCMV-hLDLr, la concentración de colesterol había bajado aproximadamente un 48% con respecto a niveles anteriores al tratamiento.

45

50

55

El conejo n° 774 se trató entonces con 10 mg de lovastatina (barra rayada) por día durante 10 semanas. Se ha observado una reducción del 20% adicional en los niveles de colesterol. Por tanto, la inhibición de la ruta endógena para la síntesis de colesterol ha llevado la concentración de colesterol del conejo n° 774 hasta el 40% de la anterior para la primera transferencia génica (figura 16B).

60

Figura 17 *Inyección simulada del complejo de poli-L-lisina/ADN que contiene 3 mg del gen de luciferasa de SV40 quimérico (ADN irrelevante)*. Con el fin de controlar una posible reducción no específica en los niveles de colesterol sérico total inyectando a los conejos los complejos de poli-L-lisina galactosilada/ADN en una disolución con alta concentración de NaCl (\sim 900 mM), se ha administrado una disolución de complejo de ADN que contiene un ADN irrelevante tal como el gen de luciferasa en el conejo n° 775. La figura 17 muestra que la inyección da como resultado una reducción no significativa (\leq 12%) y transitoria (\leq 5 días) en la concentración de colesterol sérico. Por tanto, se ha confirmado que la reducción en los niveles de colesterol sérico total tras la inyección de partículas de ADN

65

apropiadamente condensadas que codifican para el gen del receptor de LDL humano no son un resultado de o bien la alta concentración de NaCl de la disolución o bien de la presencia de partículas de poli-L-lisina galactosilada/ADN.

Figura 18 *Relación de la turbidez con la concentración de NaCl*. La figura muestra el efecto de la concentración de NaCl inicial y actual sobre la turbidez de una disolución de ADN/polil-lisina. Cada línea representa una concentración inicial diferente.

Figura 19 *Efecto de la longitud de la poli-L-lisina sobre la concentración de NaCl*.

Figura 20 *Espectros de DC para diferentes complejos*. Se tomaron espectros de DC en una cubeta con una longitud de trayectoria de 0,1 cm. Se complejó el ADN con poli-L-lisina a razones molares idénticas de grupos amino con respecto a grupos fosfato y se compararon diversos espectros de DC: (A) control convencional para ADN en NaCl 1 M; (B) Ψ -ADN tal como se observa a una concentración de NaCl a la que se produce agregación multimolecular; (C) el ADN agregado muestra turbidez y disminución de la elipticidad; (D) complejos de ADN condensado, unimolecular; (E) espectro del complejo de ADN relajado. Los espectros se tomaron a iguales concentraciones de polímero y se restó la señal para el tampón en cada caso. Se presentan detalles del ensayo en los Métodos.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 *El organismo multicelular*

Cualquier organismo multicelular en el que puede ser deseable introducir ácido nucleico exógeno es un posible objeto de la presente invención. El organismo multicelular puede ser una planta o un animal, preferiblemente este último. El animal es preferiblemente un animal vertebrado, y más preferiblemente un vertebrado superior, es decir, un mamífero o un ave, prefiriéndose especialmente el primero. Entre los mamíferos, los sujetos preferidos son los seres humanos y otros primates, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos y hámsteres, animales de compañía tales como perros y gatos, y animales de granja tales como caballos, vacas, cabras, cerdos y ovejas. Se observará que estos animales provienen de cuatro órdenes de la clase *Mammalia*: *Primata*, *Rodenta*, *Carnivora* y *Artiodactyla*.

30 *La célula diana*

Las células diana pueden pertenecer a tejidos (incluyendo órganos) del organismo, incluyendo células que pertenecen a (en el caso de un animal) su sistema nervioso (por ejemplo, el cerebro, la médula espinal y células nerviosas periféricas), el sistema circulatorio (por ejemplo, el corazón, tejido vascular y glóbulos rojos y blancos), el sistema digestivo (por ejemplo, el estómago y los intestinos), el sistema respiratorio (por ejemplo, la nariz y los pulmones), el sistema reproductor, el sistema endocrino (el hígado, bazo, tiroides, paratiroides), la piel, los músculos o el tejido conjuntivo.

Alternativamente, las células pueden ser células de cáncer derivadas de cualquier órgano o tejido del organismo diana, o células de un parásito o patógeno que infecta al organismo, o células del organismo infectadas víricamente.

Un procedimiento útil para la terapia génica hepática requiere un enfoque eficaz y relativamente no invasivo para la introducción de genes de interés en el hígado. Se han usado con algo de éxito varias técnicas que emplean transferencia génica mediada por receptor. Sin embargo, hay una necesidad de un procedimiento fácilmente reproducible que dé como resultado la expresión prolongada del transgén en el hígado, incluso en ausencia de hepatectomía parcial, y que por tanto podría usarse para terapia génica en seres humanos. Se ha introducido ADN exógeno en hepatocitos de animales adultos seleccionando como diana el receptor de asialoglicoproteína (ASGP) por medio de un biconjugado de ligando-poli-L-lisina. Para que la técnica de transporte dirigido del ligando sea eficaz, el ADN debe estar en una forma que permita que permanezca intacto en la sangre y debe ser lo suficientemente pequeño para que se reconozca por el receptor de ASGP en la superficie de los hepatocitos. Wagner, *et al.* (1991) han dirigido genes al receptor de transferrina en células de hepatoma condensando el ADN con un conjugado de poli-L-lisina/transferrina, en un complejo con un diámetro de 80-100 nm. Este tamaño de conjugado de ADN es apropiado para su reconocimiento por el receptor de transferrina en células de hepatoma, pero el receptor de ASGP de hepatocitos discrimina a ligandos mayores de 10-20 nm de diámetro.

Se ha desarrollado un procedimiento para la introducción de genes en el hígado de animales adultos mediante captación mediada por receptor que dio como resultado la expresión del gen durante 140 días (la duración del experimento). Este procedimiento tiene potencial para su aplicación a terapia génica en seres humanos. Las ventajas principales de este método son (i) la facilidad de preparación del complejo de ADN; (ii) la capacidad de dirigir genes a tejidos específicos; (iii) la expresión prolongada del gen en el hígado; (iv) la seguridad relativa del complejo, dado que carece de ADN viral infeccioso; y (v) el mantenimiento episómico del gen introducido.

Transporte dirigido

65 *A. En general*

El "transporte dirigido" es la administración del ácido nucleico compactado de tal manera que entra en las células diana en cantidades eficaces para lograr el propósito clínico. A este respecto, debe indicarse que el ADN y el ARN

pueden replicarse en el núcleo de la célula diana, y en consecuencia el nivel final del ácido nucleico en la célula puede aumentar tras la captación. Además, si el efecto clínico está mediado por una proteína expresada por el ácido nucleico, debe indicarse que el ácido nucleico actúa como molde, y por tanto pueden lograrse altos niveles de expresión de proteína incluso si el número de copias del ácido nucleico en la célula es bajo. No obstante, es deseable compactar altas concentraciones de ADN para aumentar el número de células diana que captan el ADN y el número de moléculas de ADN captadas por cada célula.

La vía y el sitio de administración pueden elegirse para potenciar el transporte dirigido. Por ejemplo, para seleccionar como diana células musculares, la inyección intramuscular en los músculos de interés sería una elección lógica. Podrían seleccionarse como diana células pulmonares administrando el ADN compactado en forma de aerosol. Podrían seleccionarse como diana células endoteliales vasculares recubriendo un catéter de balón con el ADN compactado e introduciendo mecánicamente el ADN.

En algunos casos, el resto de unión a ácido nucleico, que mantiene el ácido nucleico en estado compactado, también puede servir como agente de transporte dirigido. Se sabe que polímeros de aminoácidos cargados positivamente actúan como señales de localización nuclear (NLS) en muchas proteínas nucleares. Se inyectó *in situ* un ADN de luciferasa de pSV40 condensado con poli-L-lisina, en el músculo abdominal de ratas. A pesar de la ausencia de un resto de unión a célula diana explícito, se observó una actividad luciferasa 20 veces superior en ratas a las que se inyectó el ADN acompañado que en ratas a las que se inyectó ADN desnudo. No obstante, en algunas realizaciones, puede mejorarse el transporte dirigido si se emplea un resto de unión a célula diana.

B. Uso de un resto de unión a célula diana

Si se usa un TBM, debe unirse específicamente a una estructura accesible (el "receptor") de las células diana previstas. No es necesario que sea absolutamente específico para esas células, sin embargo, debe ser suficientemente específico para que el conjugado sea terapéuticamente eficaz. Preferiblemente, su reactividad cruzada con otras células es inferior al 10%, más preferiblemente inferior al 5%.

No hay una afinidad mínima absoluta que el TBM deba tener por una estructura accesible de la célula diana, sin embargo, cuanto mayor sea la afinidad, mejor. Preferiblemente, la afinidad es al menos de 10^3 litros/mol, más preferiblemente, al menos 10^6 litros/mol.

El TBM puede ser un anticuerpo (o un fragmento de unión específico de un anticuerpo, tal como un Fab, Fab, V_M , V_L o CDR) que se une específicamente a un epítipo en la superficie de la célula diana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos frente a células, membranas celulares o antígenos de la superficie celular aislados:

a. *Producción de células inmunitarias del bazo: inmunización con antígenos solubles* **Hurrell, J. G. R. (1982)** Monoclonal Antibodies: Techniques and Applications. *CRC Press, Boca Raton, Florida.*

b. *Inmunización con antígenos complejos: membranas, células completas y microorganismos.* **Hurrell, J. G. R. (1982)** Monoclonal Antibodies: Techniques and Applications. *CRC Press, Boca Raton, Florida.*

c. *Producción de sobrenadantes monoclonales y líquidos ascíticos.* **Andrew, S. M. y Titus, J. A. (1991).** Purification of Immunoglobulin G. in Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H.J. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, ed.) págs. A.3.9-A.3.12. *Greene Publishing Wiley-Interscience, Nueva York.*

d. *Producción de antisuero policlonal en conejos.* Garvey J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H (eds) (1977) Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction and Research, tercera edición. W. A. **Benjamin, North Hampton, Mass.**

e. *Producción de anticuerpos anti-péptido mediante acoplamiento químico de péptidos sintéticos con proteínas portadoras* **Jemmerson, R., Morrow, P. I., Klinman, N. I y Patterson, Y. (1985).** Analysis of an evolutionary conserved site on mammalian cytochrome C using synthetic peptides. *Proc. Natl Acad. Sci, U.S.A.* 82, 1508-1512.

El TBM puede ser una lectina, para la que hay una estructura de hidrato de carbono análoga en la superficie celular.

El resto de unión a la diana puede ser un ligando que se une específicamente por un receptor portado por las células diana.

Una clase de ligandos de interés son los hidratos de carbono, especialmente los mono y oligosacáridos. Los ligandos adecuados incluyen galactosa, lactosa y manosa.

Otra clase de ligandos de interés son péptidos (que en este caso incluyen proteínas), tales como insulina, factor/factores de crecimiento epidérmico(s), factor de necrosis tumoral, prolactina, gonadotropina coriónica, FSH, LH, glucagón, lactoferrina, transferrina, apolipoproteína E, gp120 y albúmina.

ES 2 316 148 T3

La siguiente tabla enumera restos de unión a la diana preferidos para diversas clases de células diana:

5	<u>Células diana</u>	<u>Resto de unión a la diana</u>
	Células hepáticas	galactosa
	Células de Kupffer	manosa
10	Macrófagos	manosa
	Pulmón	fragmento Fab frente a receptor de
15		inmunoglobulina polimérica (Pig R)
	Tejido adiposo,	insulina
	Linfocitos	fragmento Fab frente a CD4 o gp120
20	Enterocito	Vitamina B12
	Músculo	insulina
	Fibroblastos	manosa-6-fosfato
25	Células nerviosas	Apolipoproteína E

30 El resto de unión a la diana no es estrictamente necesario en el caso de inyección directa del complejo condensado de NABM/NA. La célula diana en este caso es accesible de manera pasiva al complejo condensado de NABM/NA mediante la inyección del complejo en la proximidad de la célula diana.

C. Transferencia génica mediada por liposomas

35 La posibilidad de detectar la expresión génica encapsulando ADN en un liposoma (cuerpo contenido por una bicapa lipídica) usando diversas condiciones de lípidos y disolvente, e inyectando el liposoma en tejidos animales, se ha demostrado ampliamente (1-7). Sin embargo, a pesar del potencial de esta técnica para una variedad de sistemas biológicos, el ADN usado en estos experimentos no se ha modificado o compactado para mejorar su supervivencia en la célula, su captación en el núcleo o su tasa de transcripción en el núcleo de las células diana. Por tanto, estos procedimientos han dado como resultado habitualmente sólo la expresión transitoria del gen portado por el liposoma (4, 5).

45 Se han usado satisfactoriamente lípidos catiónicos para transferir ADN. El componente catiónico de tales lípidos puede compactar ADN en disolución (1-3, 7). Se ha demostrado que este método da como resultado complejos de ADN agregado de manera pesada (1, 2) que, cuando se usan para transfectar el ADN *in vitro*, dan como resultado un aumento de la eficacia de la expresión y la transferencia génicas (en relación con el ADN desnudo). Aunque la formación de estos complejos puede estimular la transferencia génica *in vitro*, la inyección de tales complejos *in vivo* no da como resultado una transferencia génica eficaz y de larga duración. Por tanto, el procedimiento de condensación podría proporcionar características estructurales al complejo de ADN/lípido catiónico que lo harán más susceptible a una expresión *in vivo* prolongada. Se cree que la combinación de tales métodos podría conseguirse mediante cualquiera de dos procedimientos:

- 55 1. Formación de complejo de ADN condensado que se encapsula más tarde usando lípidos neutros en cuerpos de liposoma, o
2. Usando el procedimiento descrito en esta patente, podría conseguirse la formación de complejos unimoleculares de ADN sumamente condensado tras la condensación con lípidos catiónicos. Estos complejos deben proporcionar una eficacia superior de la transferencia génica en tejidos de animales *in vivo*.

60 El procedimiento para la condensación de ADN, si se acopla a la encapsulación del ADN compactado resultante en un cuerpo de liposoma, podría proporcionar una variedad de ventajas para la transfección en animales:

- 65 1. El liposoma estimula la fusión pasiva con la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática de células de mamíferos en tejidos.
2. El ADN condensado podría transferir entonces la información genética con una alta eficacia a través de los compartimentos de la célula hasta el núcleo para su expresión.

ES 2 316 148 T3

3. El ADN condensado podría protegerse contra la degradación en el interior de la célula, aumentando así la duración de la expresión del gen recién introducido.
4. Podría evitarse la posible respuesta inmunológica frente al ADN condensado con polimerización mediante la encapsulación con la bicapa lipídica inmunológicamente inerte.

Bibliografía

1 **Ghirlando, R., Wachtel, E. J., Arad, T. y Minsky, A. (1992)** ADN packaging induced by micellar aggregates: A novel *in vitro* ADN condensation system. *Biochemistry*, 31, 7110-7119.

2 **Braulin, W. H., Strick, T. J., y Record, M. T., Jr. (1982)** *Biopolymers* 21, 1301-1309.

3 **Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y., Debs, R. (1993)** Systemic gene expression after intravenous ADN delivery into adult mice. *Science*, 261, 209-211.

4 **Alino, S. F., Bobadilla, M., Garcia-Sanz, M., Lejarreta, M., Unda, F. e Hilario, E. (1993)** *In vivo* delivery of human α 1-antitrypsin gene to mouse hepatocytes by liposomes. *Biochem. Biophys. Research Communications* 192, 174-181.

5 **Takeshita, S., Losordo, D. W., Kearney, M., Rossow, S. T. e Isner, J. M. (1994)** Time course of recombinant protein secretion after liposome-mediated gene transfer in a rabbit arterial organ culture model. *Lab. Invest.* 71, 387-391.

6 **Jarnagin, W. R., Debs, R. J., Wang, S. S. y Bissell, D. M. (1992)** *Nucleic Acids Res.* 20, 4205-4211.

7 **Phillip, R., Liggitt, D., Phillip, M., Dazin, P., Debs, R. (1993)** *In vivo* gene delivery. Efficient transfection of T lymphocytes in adult mice. *J. Biol. Chem.* 268, 16087-16090.

El resto de unión a ácido nucleico

Cualquier sustancia que se una reversiblemente a un ácido nucleico puede servir como resto de unión a ácido nucleico (NABM), siempre que (1) se una de manera suficientemente fuerte y específica al ácido nucleico para retenerlo hasta que el conjugado alcanza y entra en la célula diana, y, a través de su unión, no daña o altera sustancialmente el ácido nucleico y (2) reduzca las interacciones entre el ácido nucleico y el disolvente, y de ese modo permita que se produzca la condensación. El último criterio es uno de eficacia terapéutica del conjugado.

Preferiblemente, el NABM es un polimerización. Sus grupos cargados positivamente se unen iónicamente al ADN cargado negativamente, y la neutralización de la carga resultante reduce las interacciones ADN-disolvente. Un polimerización preferido es la polilisina. Otros restos de unión a ácido nucleico potenciales incluyen polímeros mixtos de Arg-Lys, poliarginina, poliornitina, histonas, avidina y protaminas.

El ácido nucleico

Se dan a conocer procedimientos básicos para construir moléculas de ADN y ARN recombinantes según la presente invención por Sambrook, J. *et al.*, en: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), referencia que se incorpora al presente documento como referencia.

El ácido nucleico puede ser un ADN, ARN o un derivado de ADN o ARN tal como un derivado resistente a la degradación *in vivo*, tal como se trata a continuación. Dentro de esta memoria descriptiva, las referencias a ADN se aplican, cambiando lo que se deba cambiar, a otros ácidos nucleicos también, a menos que se prohíba claramente por el contexto. El ácido nucleico puede ser mono o bicatenario. Tiene preferiblemente de 100 a 1.000.000 bases (o pares de bases), más preferiblemente de 100 a 100.000, y las bases pueden ser iguales o diferentes. Las bases pueden ser las bases "normales" adenina (A), guanina (G), timidina (T), citosina (C) y uracilo (U), o bases anómalas tales como las enumeradas en 37 CFR § 1,822 (p) (1). El ácido nucleico puede prepararse mediante cualquier procedimiento deseado. El ácido nucleico debe comprender un gen sintético expresable o un ADNc.

En una realización preferida, el ácido nucleico comprende un gen expresable que es funcional en la célula diana. Por ejemplo, el gen puede codificar para factores de coagulación, (tales como el factor IX), enzimas implicadas en defectos metabólicos específicos, (tales como enzimas del ciclo de la urea, especialmente ornitina transcarbamilasa, argininosuccinato sintasa y carbamil fosfato sintasa); receptores, (por ejemplo, receptor de LDL); toxinas; timidina cinasa para destruir células o tejidos específicos; canales iónicos (por ejemplo, canal de cloruro de la fibrosis quística); transportadores de membrana (por ejemplo, transportador de glucosa); proteínas citoesqueléticas, (por ejemplo, distrofina). El gen puede ser de origen sintético, de ADNc o genómico, o una combinación de los mismos. El gen puede ser uno que se produce en la naturaleza, un gen que se produce de manera no natural que no obstante codifica

un polipéptido que se produce de manera natural, o un gen que codifica un mutante reconocible de tal polipéptido. También puede codificar para un ARNm que será “antisentido” con respecto al ADN encontrado o un ARNm que se transcribe normalmente en la célula huésped, pero ARN antisentido que no puede traducirse por sí mismo en una proteína funcional.

5 Para que el gen sea expresable, la secuencia codificante debe unirse operativamente a una secuencia promotora funcional en la célula diana. Se dice que dos secuencias de ADN (tales como una secuencia de región promotora y una secuencia codificante) están operativamente unidas si la naturaleza del ligamiento entre las dos secuencias de ADN (1) no da como resultado la introducción de una mutación de desplazamiento del marco de lectura en la
10 secuencia de la región para dirigir la transcripción de la secuencia génica deseada, o (3) interfiere con la capacidad para transcribirse de la secuencia génica por la secuencia de región promotora. Una región promotora estaría operativamente unida a una secuencia de ADN si el promotor pudiese afectar a la transcripción de esa secuencia de ADN. Con el fin de estar “operativamente unido” no es necesario que dos secuencias estén inmediatamente adyacentes entre sí. Se dice que una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, “puede expresar” un ARNm si contiene secuencias
15 de nucleótidos que contienen información reguladora de la transcripción y tales secuencias están “operativamente unidas” a secuencias de nucleótidos que codifican para el ARN. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar de un organismo a otro, pero en general incluyen un promotor que dirige la iniciación de la transcripción del ARN. Tales regiones pueden incluir aquellas secuencias no codificantes en 5’ implicadas en la iniciación de la transcripción tales como la caja TATA.

20 Si se desea, puede obtenerse la región no codificante en 3’ para la secuencia génica que codifica el producto de ARN deseado. Esta región puede conservarse por sus secuencias reguladoras de la terminación de la transcripción, tales como aquellas que proporcionan terminación y poliadenilación. Por tanto, conservando la región 3’ contigua de manera natural a la secuencia codificante, pueden proporcionarse señales de terminación de la transcripción. Cuando
25 las señales de terminación de la transcripción no son satisfactoriamente funcionales en la célula huésped de expresión, entonces puede sustituirse una región 3’ funcional en la célula huésped.

El promotor puede ser un promotor “ubicuo” activo esencialmente en todas las células del organismo huésped, por ejemplo, para mamíferos, el promotor de beta-actina, o puede ser un promotor cuya expresión es más o menos
30 específica para las células dianas. En términos generales, se prefiere el último caso. Puede usarse para este fin un promotor nativo para un gen que se expresa de manera natural en la célula diana, por ejemplo el promotor de PEPCK (fosfoenol piruvato carboxicinas) para su expresión en células hepáticas de mamíferos. Otros promotores adecuados incluyen albúmina, metalotienina, tensioactivo, apoE, piruvato cinasa, receptor de LDL, HMG CoA reductasa o cualquier promotor que se ha aislado, clonado o se ha demostrado que tiene un patrón apropiado de regulación y expresión
35 específica de tejido mediante factores (hormonas, dieta, metales pesados, etc.) requerido para controlar la transcripción del gen en el tejido diana. Además, puede usarse una amplia variedad de promotores virales; estos incluyen MMTV, SV-40 y CMV. Un “vector de expresión” es un vector que (debido a la presencia de secuencia de control de la transcripción y/o traducción apropiadas) puede expresar una molécula de ADN o (ADNc) que se ha clonado en el vector y de ese modo producir un producto de proteína o ARN. La expresión de las secuencias clonadas se produce cuando
40 el vector de expresión se introduce en una célula huésped apropiada. Si se emplea un vector de expresión procariota, entonces la célula huésped apropiada sería cualquier célula procariota que pueda expresar las secuencias clonadas. De manera similar, cuando se emplea un vector de expresión eucariota, entonces la célula huésped apropiada sería cualquier célula eucariota que pueda expresar las secuencias clonadas.

45 Además o en vez de un gen expresable, el ácido nucleico puede comprender secuencias homólogas al material genético de la célula diana, mediante lo cual puede insertarse por sí mismo (“integrarse”) en el genoma mediante recombinación homóloga, desplazando de ese modo una secuencia codificante o de control de un gen, o delecionando un gen totalmente.

50 En otra realización, la molécula de ácido nucleico es “antisentido” con respecto a una secuencia de ADN genómico u otro del organismo diana (incluyendo virus y otros patógenos) o con respecto a un ARN mensajero transcrito en células de los organismos, que se hibrida suficientemente a la misma para inhibir la transcripción del ADN genómico diana o la traducción del ARN mensajero diana. La eficacia de tal hibridación es una función de la longitud y la estructura de las secuencias que se hibridan. Cuando más larga sea la secuencia y más cercana la complementaria a la
55 perfección, más fuerte será la interacción. A medida que aumenta el número de apareamientos erróneos de pares de bases, la eficacia de la hibridación caerá. Además, el contenido en GC de la secuencia de ADN de empaquetamiento o el ARN antisentido también afectará a la eficacia de la hibridación debido al puente de hidrógeno adicional presente en un par de bases GC en comparación con un par de bases AT (o AU). Por tanto, es preferible una secuencia diana más rica en contenido en GC como diana.

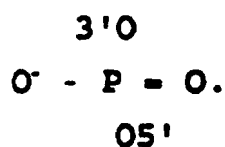
60 Es deseable evitar secuencias antisentido que formarían una estructura secundaria debido a hibridación intramolecular, dado que esto haría al ácido nucleico antisentido fuese menos activo o inactivo para su fin previsto. Un experto habitual en la técnica apreciará fácilmente si una secuencia tiene una tendencia a formar una estructura secundaria. Las estructuras secundarias pueden evitarse seleccionando una secuencia diana diferente.

65 Puede sintetizarse un oligonucleótido, de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 bases de longitud y complementario a la secuencia diana a partir de mononucleósidos naturales o, alternativamente, a partir de mononucleósidos que tienen sustituciones en los oxígenos unidos a fósforo que no forman puentes. Un análogo preferido

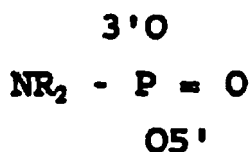
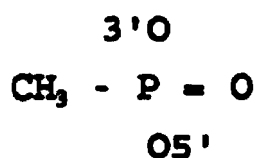
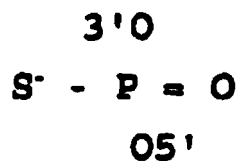
ES 2 316 148 T3

es un análogo de metilfosfonato de los mononucleósidos que se producen de manera natural. Más generalmente, el análogo de mononucleósido es cualquier análogo cuyo uso dé como resultado oligonucleótidos que tienen las ventajas de (a) una capacidad mejorada para difundir a través de membranas celulares y/o (b) resistencia a digestión con nucleasa dentro del cuerpo de un sujeto (Miller, P.S. *et al.*, *Biochemistry* 20:1874-1880 (1981)). Tales análogos de nucleósido se conocen bien en la técnica. La molécula de ácido nucleico puede ser un análogo de ADN o ARN. La presente invención no se limita al uso de cualquier análogo de ARN o ADN particular, siempre que pueda cumplir su fin terapéutico, tenga resistencia adecuada a nucleasas y biodisponibilidad y captación celular adecuadas. El ADN o ARN pueden hacerse más resistentes a degradación *in vivo* por enzimas, por ejemplo, nucleasas, modificando enlaces internucleosídicos (por ejemplo, metilfosfonatos o fosfortioatos) o incorporando nucleósidos modificados (por ejemplo, 2'-O-metilribosa o 1'-alfa-anómeros).

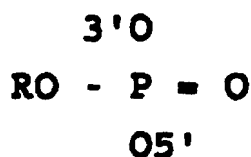
El enlace que se produce de manera natural es



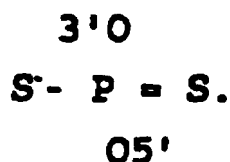
Los enlaces alternativos incluyen los siguientes:



(en los que los R son hidrógeno y/o alquilo)



(en el que R es hidrógeno o alquilo)



También es posible sustituir el 3'O-P-O5' por otros enlaces tales como 3'O-CH₂C(O)-O5', 3'O-C(O)-NH5' y 3'C-CH₂CH₂S-C5'.

La molécula de ácido nucleico entera puede estar formada de tales enlaces modificados, o sólo ciertas partes, tales como los extremos 5' y 3', pueden estar así afectadas, proporcionando de ese modo resistencia a exonucleasas.

Por tanto, las moléculas de ácido nucleico adecuadas para su uso en la presente invención incluyen pero no se limitan a didesoxirribonucleósidos metilfosfonato, véase Mill, *et al.*, *Biochemistry*, 18:5134-43 (1979), oligodesoxinucleótidos fosforotioato, véase Matsukura, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84:7706-10 (1987), oligodesoxinucleótidos unidos covalentemente a un agente de intercalación, véase Zerial, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 15:9909-19 (1987), oligodesoxinucleótido conjugado con poli(L-lisina), véase Leonetti, *et al.*, *Gene*, 72:32-33 (1988) y oligómeros unidos a carbamato ensamblados a partir de subunidades derivadas de ribosa, véase Summerton, J., *Antisense Nucleic Acids Conference*, 37:44 (Nueva York 1989).

Compactación del ácido nucleico

Es deseable que el complejo del ácido nucleico y el resto de unión a ácido nucleico se compacten hasta un tamaño de partícula que es suficientemente pequeño para lograr la captación mediante endocitosis mediada por receptor, internalización pasiva, permeabilización de membrana mediada por receptor u otros mecanismos aplicables. De manera deseable, el complejo del ácido nucleico compactado, el resto de unión a la diana y el resto de unión a ácido nucleico es pequeño, por ejemplo, inferior a 100 nm, porque los sistemas capilares sinusoidales del pulmón y el bazo atraparán agregados de ese tamaño, y más preferiblemente inferior a 80 ó 90 nm, ya que éste es el diámetro interno típico de vesículas endocíticas de depresiones recubiertas.

Dado que complejos mayores de 30 nm pueden ser propensos a captación no específica por macrófagos en el bazo y el hígado, el conjugado también es preferiblemente más pequeño de 30 nm.

En el caso del receptor de ASGP del hígado, los complejos mayores de 15-23 nm se excluyen de la captación. Esta limitación de tamaño *in vivo* para el receptor está directamente relacionada con la existencia de otro receptor para proteínas galactosiladas en las células de Kupffer del hígado. El receptor de las células de Kupffer es muy eficaz en la captación y degradación de moléculas galactosiladas de mayor tamaño *in vivo* y por tanto, competiría por la captación del complejo de ADN galactosilado con el receptor de ASGP en la superficie de los hepatocitos. Lo más preferiblemente, para el suministro al hígado, el complejo es menor de 23 nm, más preferiblemente menor de 15 nm, todavía más preferiblemente no mayor de 12 nm de diámetro.

La presente invención requiere que el complejo del ácido nucleico y el portador de unión a ácido nucleico se compacten sin producir agregación o precipitación, y preferiblemente hasta un estado condensado (véase la figura 12). Para el fin de la presente invención, es útil caracterizar el ADN como que tiene uno de los siguientes estados: normal (no condensado); condensado; relajado, uniagregado (agrupaciones de toroides unimoleculares); multiagregado (agrupaciones de toroides multimoleculares); y precipitado. Estos estados se definen en cuanto a su aspecto bajo microscopía electrónica (véase la tabla 103).

El ADN condensado está en un estado en el que la interacción con el disolvente es mínima y por tanto el ADN está en forma de esferas o toroides aislados. No es fibroso en un grado apreciable. El ADN relajado, formado normalmente por la disociación del policatión del ADN, forma fibras. El ADN agregado forma toroides multimoleculares o aglutinados.

El tamaño teórico de un complejo de ADN unimolecular puede calcularse mediante las fórmulas expuestas en las leyendas "b" y "c" de la tabla 106. Preferiblemente, los complejos de esta invención tienen un diámetro que es inferior al doble del tamaño calculado mediante una o ambas de estas fórmulas. Complejos más grandes corresponden probablemente a ADN agregado de manera multimolecular.

El ADN puede compactarse hasta un estado condensado neutralizando su carga, por ejemplo, mediante la adición de un policatión, o de otra manera reduciendo sus interacciones con el disolvente. Sin embargo, el policatión puede producir agregación o precipitación del ADN si no se emplea un agente caotrópico para evitarlas. Por tanto, la compactación puede conseguirse mediante el uso acertado tanto del policatión (para condensar el ADN) como (según se necesite) de un agente caotrópico (para evitar la agregación o la precipitación).

Sin embargo, el uso excesivo del agente caotrópico puede dar como resultado la relajación del ADN. Preferiblemente, el complejo tiene una estructura de toroide unimolecular, no agregada condensada hasta menos de 23 nm de diámetro; el grado de compactación puede determinarse mediante microscopía electrónica. Por ejemplo, se ha compactado un complejo del gen de PBPCk-hFIX con polilisina galactosilada hasta un toroide unimolecular con un diámetro medio de aproximadamente 12 nm, tal como se muestra en la tabla 106.

La expresión “toroide unimolecular” indica que el toroide contiene sólo una molécula de ácido nucleico; el toroide puede contener muchas moléculas portadoras (por ejemplo, poli-Lys galactosilada). Una razón típica es una molécula de ADN con respecto a aproximadamente 100 moléculas portadoras, por toroide “unimolecular”. Alternativamente, y quizá de manera más precisa, esta estructura puede denominarse toroide de ácido mononucleico. Los toroides unimoleculares y multimoleculares (cada uno de estos últimos contiene más de una molécula de ADN) pueden distinguirse por el diferente tamaño de cada uno de los complejos cuando se observan mediante el microscopio electrónico, indicando la composición multi o unimolecular (contando sólo las moléculas de ADN) de los toroides.

También se han usado otras técnicas para identificar cambios estructurales en el ADN tras la unión a poli-L-lisina. La primera de éstas es la determinación espectrofotométrica de la turbidez en la disolución usando la absorbancia a 400 nm. La turbidez es principalmente un indicador de la agregación. La agregación se confirma mediante un valor de dicroísmo circular (DC) mayor de 0 a longitudes de onda de desde 300 hasta 340 nm.

La figura 18 ilustra el efecto sobre la turbidez de la adición de la poli-L-lisina a la disolución de ADN a diferentes concentraciones de partida de NaCl. La turbidez aumenta a medida que aumenta la concentración inicial de sal (esto podría confirmarse fácilmente a simple vista), indicando que la condensación del complejo de ADN a fuerza iónica inferior da como resultado una suspensión de partículas compuesta por complejos de ADN-poli-L-lisina unimoleculares que interactúan entre sí. Se observó que las disoluciones de ADN condensado a concentración salina inferior eran transparentes, con presencia de materia particulada en suspensión. Se analizaron disoluciones que contenían el complejo de ADN con diferentes grados de turbidez mediante ME para visualizar las estructuras de ADN formadas en cada situación. Apropiadamente condensados, se encontraron complejos de ADN unimoleculares tanto en disoluciones transparentes como ligeramente turbias. Esto no era cierto para la condensación de complejos de ADN a fuerza iónica inicial baja, a la que se observó una absorbancia mínima a 400 nm (figura 18) porque las disoluciones que contienen partículas en suspensión no absorbían a 400 nm. Sin embargo, cuando se analizaron estas disoluciones usando ME, se observaron las estructuras de transición esperadas mostradas en la figura 1. Cuando las partículas en suspensión se dispersaron totalmente, las estructuras identificadas mediante ME eran esencialmente idénticas a complejos unimoleculares de ADN condensado. Por tanto, la turbidez de la disolución que contiene los complejos de ADN depende de la concentración inicial de sal usada para la condensación del complejo. Aunque los mecanismos responsables de las diferencias observadas en la condensación de ADN a fuerza iónica inicial alta y baja no están claros, se adaptó este protocolo para condensar apropiadamente ADN, evitando la formación de disoluciones turbias.

Una técnica más fiable para diagnosticar la transición estructural de complejos de ADN-poli-L-lisina en disolución es la absorbancia del complejo en condensación a 260 nm a medida que aumenta la concentración de NaCl. El complejo de ADN uniagregado en suspensión tiene sólo un 10-30% de la absorbancia esperada porque la materia particulada no absorbe a 260 nm. La adición de NaCl dispersa el complejo de ADN uniagregado en suspensión que da como resultado el aumento brusco observado en la absorbancia observado en la figura 11. En este punto, la disolución es transparente y no hay estructuras particuladas visibles en suspensión. Esta característica de la condensación de ADN-poli-L-lisina se correlaciona claramente con las estructuras mostradas en la figura 1. A una concentración de NaCl que produce un aumento brusco en la absorbancia a 260 nm, se observaron complejos condensados, no agregados mediante ME; antes de que se lograra esta concentración crítica de NaCl, el complejo de ADN parecía agregarse y a concentraciones de NaCl superiores, el complejo de ADN se relajaba. Una segunda transición en absorbancia a 260 nm, como resultado de la relajación del complejo de ADN condensado que estaba en suspensión, indica la solubilización completa del complejo de ADN.

Puede usarse el dicroísmo circular (DC) para monitorizar la condensación del ADN. Cuando el espectro es idéntico al del ADN solo, entonces se supone que el complejo de ADN está correctamente compactado, es decir, en complejos unimoleculares. En otras palabras, el espectro positivo a 220 nm es cuantitativamente similar al espectro a 220 nm del ADN solo, y el cruce (la longitud de onda a la que el espectro del complejo cruza el punto 0) es esencialmente idéntico al del ADN solo. Cuando el ADN se agrega en complejos multimoleculares, el espectro positivo a 270 nm se invierte en un espectro negativo a esa longitud de onda (esto se denomina estructura de ψ -ADN o Ψ -ADN).

La tabla 103 muestra las características de cada estado tal como se determina mediante observación a simple vista, espectroscopía de dicroísmo circular, microscopía electrónica y absorbancia a 260 nm. Debe observarse que puede usarse cualquier otra técnica que pueda identificar complejos de ADN condensados en lugar de o en combinación con los tratados anteriormente.

Para compactar el ácido nucleico, se añade el portador a la disolución de ácido nucleico, por lo que el portador rompe el ácido nucleico: interacciones con el disolvente que permiten que el ácido nucleico se condense. Preferiblemente, al menos se monitoriza la turbidez de la disolución cuando se añade el portador, de modo que se detecta inmediatamente un cambio en el estado. Una vez que aparece la turbidez, puede analizarse adicionalmente el estado del ADN mediante espectroscopía de DC para determinar si el ADN está en el estado condensado o en el agregado. (La preci-

ES 2 316 148 T3

pitación también debe ser detectable a simple vista). Preferiblemente, el portador se añade de manera suficientemente lenta a la disolución de ácido nucleico de modo que se minimizan la precipitación y la agregación. Si se produce precipitación o agregación, debe añadirse lentamente una sal caotrópica y el resultado debe examinarse de nuevo mediante espectroscopía de DC. La sal preferida es NaCl. Pueden usarse otras sales caotrópicas siempre que se toleren por el animal (o las células) al que se administrarán. Los agentes adecuados incluyen sulfato de sodio (Na₂SO₄), sulfato de litio (Li₂SO₄), sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), sulfato de potasio (K₂SO₄), sulfato de magnesio (MgSO₄), fosfato de potasio (KH₂PO₄), fosfato de sodio (NaH₂PO₄), fosfato de amonio (NH₄H₂PO₄), fosfato de magnesio (MgHPO₄), cloruro de magnesio (MgCl₂), cloruro de litio (LiCl) cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cesio (CaCl), acetato de amonio, acetato de potasio, acetato de sodio, fluoruro de sodio (NaF), fluoruro de potasio (KF), cloruro de tetrametilamonio (TMA-Cl), cloruro de tetrabutilamonio (TBA-Cl), cloruro de trietilamonio (TEA-Cl) y cloruro de metiltrietilamonio (MTEA-Cl)

Se han investigado las variables que afectan a la condensación del ADN *in vitro* y la relevancia funcional de estos parámetros para el suministro eficaz de los complejos de ADN a animales mediante endocitosis mediada por receptor. Se ha observado una fuerte correlación entre la fuerza iónica a la que el complejo de ADN condensado-poli-L-lisina permanece estable en disolución y la concentración de ADN. Estos experimentos se realizaron utilizando un plásmido de 4,5 kb que contenía el promotor del gen para PEPCK unido al gen estructural para hFIX, usando una razón de ADN con respecto a poli-L-lisina que dio como resultado una razón de 1 a 1 de cargas negativas con respecto a positivas en la disolución. La variación en la concentración final de NaCl necesaria para solubilizar las partículas es una función logarítmica de la concentración de ADN, en la que se produce la condensación de complejos de ADN-poli-L-lisina altamente concentrados con sólo un ligero aumento en la fuerza iónica. Esta característica física de la condensación del ADN tiene claras ventajas para el suministro de partículas de ADN a tejidos de animales adultos *in vivo*, puesto que tiene poco efecto sobre la carga iónica en la sangre del animal.

El ajuste lineal de los datos usando el método de mínimos cuadrados se describe mediante la siguiente función:

$$\log_{10}(\text{NaCl, mM}) = b_0 * (\text{ADN, } \mu\text{M de fosfato}) + b_1 \quad r^2 = 0,97$$

en la que $b_0 = 2,52 \times 10E - 3$, $b_1 = 0,577$

Se han observado variaciones en la función descrita por la ecuación anterior cuando se usaron plásmidos de ADN diferentes y preparaciones de ADN diferentes durante el proceso de condensación. Estas diferencias probablemente están relacionadas con la variación en la afinidad de poli-L-lisina por el ADN de diferentes fuentes y composiciones. Para una afinidad de unión máxima, generalmente se usa ADN precipitado dos veces con acetato de sodio y 2,5 volúmenes de etanol a -40°C (véase Métodos). No se ha encontrado ninguna diferencia evidente en la afinidad de unión de poli-L-lisina por ADN de diferentes formas (es decir, superenrollado, mellado y lineal) y por ADN extraído usando cromatografía de intercambio aniónico o centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Esto puede indicar la presencia de un contaminante en las preparaciones de ADN de diferentes fuentes que tiene actividad de unión a poli-L-lisina, que se elimina mediante la precipitación secuencial del ADN.

También se ha investigado el efecto de la longitud de la poli-L-lisina sobre la concentración de NaCl necesaria para la condensación eficaz del ADN (figura 19). La correlación entre estas variables se evaluó utilizando una concentración fija de ADN de diferentes fuentes. Se ha usado un amplio intervalo de longitudes de poli-L-lisina; esencialmente los tamaños de poli-L-lisina comercialmente disponibles. Sin embargo, la longitud de la poli-L-lisina es un promedio de diversos tamaños de la proteína tal como se determina mediante análisis de dispersión de la luz de ángulo reducido de lotes individuales de poli-L-lisina sintetizada químicamente. La distribución real de tamaños dentro de cada muestra varía desde el 60% hasta el 80% del material que se está distribuyendo, que es +/- el 20% del tamaño promedio. Esta amplia distribución dentro de un único tamaño constituye una fuente de error en las determinaciones. No obstante, puede observarse una clara correlación en la figura 19 entre la longitud de la poli-L-lisina y la concentración necesaria de NaCl que se necesita para la condensación del complejo de ADN en la disolución. Esta correlación es una función lineal de la longitud de la poli-L-lisina hasta un tamaño de 150 residuos de lisina, tras lo que la función alcanza la saturación y no hay aumento en la concentración de NaCl necesaria para la condensación del ADN con poli-L-lisina más larga. Estos datos concuerdan con una unión cooperativa entre la poli-L-lisina y la estructura principal de fosfato del ADN. Así, mediante la reducción de la longitud de las moléculas de poli-L-lisina utilizadas para condensar el ADN, la disolución de complejo de ADN inyectada en los animales será menos hipertónica. También es importante considerar la disolución del complejo de ADN en la sangre del animal para evaluar la importancia funcional de estos cambios en la fuerza iónica sobre la eficacia de este método para la terapia génica. Se han inyectado a ratas complejos de ADN que contienen un intervalo mayor de longitudes de poli-L-lisina que las mostradas en la figura 19 y a conejos con el intervalo menor de tamaños de poli-L-lisina, y se ha observado la expresión positiva y persistente de los genes transfectados en ambos casos.

La concentración de sal inicial mínima preferida depende de la actividad de compactación del portador y de la actividad caotrópica de la sal. Si el NABM era (Lys)₈, o (Lys)₂₇, la concentración inicial de NaCl podría ser cero. Sin embargo, con cadenas de poliLys más largas, en ausencia de NaCl, la precipitación sería inmediata. Con (Lys)₅₀, la concentración inicial de NaCl es preferiblemente de al menos aproximadamente 300 mM. No obstante, si el TBM es una proteína que afecta a la condensación, la concentración inicial de sal podría ser de tan sólo cero.

ES 2 316 148 T3

El portador puede añadirse continuamente, o en pequeñas etapas diferenciadas. Se puede comenzar con una velocidad de flujo más alta, o con alícuotas mayores, y reducir la velocidad de flujo o el tamaño de las alícuotas cuando el punto final deseado de la reacción está cerca. Normalmente se añade del 0,1 al 10% de la disolución de portador de una vez a la disolución de ADN. Cada adición se realiza preferiblemente cada de 2 segundos a 2 minutos, con agitación con vórtex constante. Sin embargo, pueden permitirse tiempos de asentamiento más largos.

En una realización, se mezcla un ácido nucleico, contenido en una disolución salina, que es preferiblemente de NaCl de al menos 0,5 M, pero inferior a 1,5 M, con poli-L-lisina (109 lisinas) que contiene el resto de unión a célula diana unido covalentemente (por ejemplo, galactosa), que está contenido en una disolución de NaCl en la misma concentración (por ejemplo, NaCl de 0,5 a 1,5 M). Preferiblemente, la razón molar del grupo fosfato del ácido nucleico con respecto al grupo cargado positivamente del resto de unión a ADN está en el intervalo de 4:1 a 1:4, y más preferiblemente es de aproximadamente 1,5:1,73

Algunos resultados experimentales de los solicitantes se muestran en la tabla 104. Se han tomado 16 ejemplos (marcados con asterisco en la primera columna de la tabla 104) que se han sometido a prueba y con los que se ha trabajado *in vivo*, y se ha experimentado un retroceso en la concentración final de NaCl (la variable independiente) frente a la concentración de ADN y la longitud de poli-L-Lys (las variables dependientes), con los resultados facilitados en la tabla 105.

La conjugación

En las realizaciones que se basan en la molécula portadora de unión a diana, el resto de unión a ácido nucleico se conjugará, covalente o no covalentemente, directa o indirectamente, al resto de unión a célula diana. La conjugación puede realizarse tras, o más habitualmente antes, de la carga del resto de unión a ácido nucleico con el ácido nucleico de interés. De cualquiera de las formas, la conjugación no debe interferir sustancialmente con la unión del ácido nucleico al resto de unión a ácido nucleico o, en realidad, con la capacidad del resto de unión a célula diana para unirse a la célula diana.

Composiciones farmacéuticas y métodos

El ácido nucleico compactado, conjugado opcionalmente con un TBM, puede mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable para la administración a un ser humano o a otro sujeto animal. Se apreciará que es posible que una disolución de ADN contenga tanto ADN condensado como ADN relajado. Las composiciones de esta invención preferiblemente son suficientemente ricas en complejos condensados de modo que la absorbancia a 260 nm es inferior al 50% que la del ADN desnudo de igual concentración. Tal como estableció en la tabla 103, el ADN condensado normalmente tiene una absorbancia del 20-30%, y el ADN relajado, del 80-100%, que la del ADN desnudo.

La administración puede ser mediante cualquier vía de administración adecuada. La forma farmacéutica debe ser apropiada para esa vía. Las vías de administración y las formas farmacéuticas adecuadas incluyen la vía intravascular (disolución inyectable), subcutánea (disolución inyectable, implante de liberación lenta), tópica (pomada, bálsamo, crema) y oral (disolución, comprimido, cápsula). Con algunas vías de administración, la forma farmacéutica debe formularse para proteger el conjugado de la degradación, por ejemplo, mediante la inclusión de un recubrimiento protector o de un inhibidor de la nucleasa.

La dosificación puede determinarse mediante pruebas sistemáticas de dosis alternativas, como es convencional en la técnica.

Las ratas (200-300 g) toleran hasta dosis de 600 μg del complejo de ADN del ejemplo 1 sin ningún efecto perjudicial evidente sobre el crecimiento o la salud. Se ha inyectado a ratones (25 g) 150 μg de ese complejo de ADN sin ningún problema evidente.

En los seres humanos, una dosis de ensayo típica sería de 60-120 mg de ADN; si esta dosis es demasiado baja para ser eficaz o si es demasiado alta para ser tóxica, puede aumentarse o disminuirse, respectivamente, de una manera sistemática, hasta que se identifique una dosis adecuada.

Para las células de vida corta, por ejemplo, los macrófagos, un programa de dosificación típico podría ser una dosis cada dos semanas. Para las células de vida larga, por ejemplo, los hepatocitos, podría ser preferible una dosis cada dos meses.

Pueden usarse adyuvantes para disminuir el tamaño del complejo de ADN (por ejemplo, MgCl 2-10 mM), para aumentar su estabilidad (por ejemplo, sacarosa, dextrosa, glicerol), o para mejorar la eficacia del suministro (por ejemplo, agentes lisosomotrópicos tales como cloroquina y monensina). Los complejos pueden estar encerrados en un liposoma para protegerlos y para facilitar su entrada en la célula diana (mediante la fusión del liposoma con la membrana celular).

La invención se ilustra, pero no se limita, mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

5

Introducción

La enfermedad de Christmas o hemofilia B, es un trastorno hemorrágico recesivo asociado al sexo debido a una deficiencia del factor IX de coagulación funcional en la circulación. El factor IX humano (hFIX) es una glicoproteína plasmática sintetizada normalmente en el hígado, que desempeña un papel integral en la ruta de coagulación intrínseca. Una vez que se ha convertido a su forma serina proteasa (IXa) mediante el precursor de la tromboplastina plasmática activada (factor XIa), la proteína activada interacciona con el factor VIIIa de coagulación, con iones calcio y con fosfolípidos para producir un complejo que convierte el factor X en Xa. El factor IX experimenta varias modificaciones post-traduccionales en el hígado que son esenciales para su función antes de la secreción en la sangre. Estas incluyen γ -carboxilación dependiente de vitamina K de residuos de ácido glutámico amino-terminales y β -hidroxilación de ácido aspártico.

La enfermedad de Christmas representa aproximadamente del 10 al 20 por ciento de todos los trastornos de coagulación heredados. Los individuos afectados muestran un amplio intervalo de gravedad clínica que generalmente se correlaciona con el nivel de factor IX circulante. Los pacientes con deficiencias graves de factor IX funcional pueden sangrar espontáneamente en los tejidos blandos y las articulaciones o tras un traumatismo menor. Las transfusiones de plasma o concentrados ricos en factor IX se utilizan para abortar los episodios hemorrágicos corrigiendo temporalmente la deficiencia. Desgraciadamente, el tratamiento clínico se ha frustrado por la contaminación viral del plasma recogido. Las infecciones portadas por la sangre, tales como la hepatitis y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, se han convertido en problemas significativos en el tratamiento de los trastornos de coagulación hereditarios. Estas complicaciones acentúan la importancia de desarrollar tratamientos alternativos.

Se ha identificado y secuenciado el gen para el factor IX de coagulación humano; de 1.248 pares de base de longitud, el ADN complementario predice una proteína de 416 aminoácidos, y, tras las modificaciones post-traduccionales, la proteína madura tiene un peso molecular de aproximadamente 54.000 Da. Puede usarse un gen que codifica el factor IX de coagulación humano para la corrección genética de la hemofilia B.

Se condensó un gen P-enolpiruvato carboxicinasas - factor IX humano (PEPCK-hFIX) quimérico (50% superenrollado/50% circular abierto) con poli-L-lisina galactosilada (longitud promedio de 50 ó 109 aminoácidos) mediante la titulación con NaCl. Este proceso se monitorizó utilizando espectroscopía de DC y microscopía electrónica y dio como resultado la formación de un complejo de ADN-portador de 10-12 nm de diámetro en una concentración de NaCl crítica. Se ha introducido el gen de PEPCK-hFIX, conjugado utilizando este procedimiento, en los hígados intactos de ratas adultas y se ha demostrado que el complejo de ADN-portador dirige específicamente el gen a este órgano y que el ADN de hFIX, el ARNm y la proteína hFIX pueden demostrarse hasta 140 días (la duración del experimento) tras la administración del complejo de ADN-portador. El gen está presente como un episoma tal como se determina mediante el análisis de tipo Southern del ADN aislado del hígado de un animal 32 días tras la inyección del conjugado de ADN. Se controló la transcripción del gen PEPCK-hFIX mediante la dieta durante todo el transcurso de tiempo del experimento; la alimentación de los animales con una dieta libre de hidratos de carbono durante una semana dio como resultado la inducción pronosticada de hFIX en la sangre, tal como se detectó mediante hibridación por inmunotransferencia tipo Western.

45

Métodos

A. Galactosilación

Se sometieron a galactosilación polímeros de L-lisina-HBr o L-lisina-Cl con una longitud de cadena promedio de 109 (Sigma) esencialmente tal como se describe por Monsigny, *et al.* (1984) Biol. Cell., 51, 187. Brevemente, se hicieron reaccionar 2 mg de poli-L-lisina con 89 g de fenil-isotiocianato de α -D-galactopiranosilo (Sigma G-3266) disuelto en N,N-dimetilformamida (5 mg/ml). Se ajustó la disolución hasta pH 9,0 mediante la adición de un volumen 1/10 de carbonato de sodio 1 M, pH 9,0. Dado que la reacción es eficaz en un 10%, el 0,8% de los grupos ϵ -NH₃ presentes en la disolución están glicosilados. El tubo se protegió de la luz mediante lámina de aluminio y se mezcló durante 6 horas a temperatura ambiente. Entonces se dializó la disolución, utilizando tubos de diálisis Spectra-Por (Fisher de punto de corte 3500 de PM) frente a 500 ml de tampón de NaCl 5 mM durante 2 días con cambios frecuentes de tampón (2 cambios/día).

60

B. Análisis del ligando

La disolución dializada se analizó entonces espectrofotométricamente a 205 Å y 250 Å para determinar la concentración de la poli-L-lisina y la concentración de residuos de fenil-galactosa, respectivamente. Esta etapa garantiza que no se han producido pérdidas significativas durante la diálisis y que la reacción de galactosilación fue completa, dado que en la disolución sólo la galactosa modificada absorberá a 250 Å.

65

ES 2 316 148 T3

C. Formación de complejos

Se preparó ADN de plásmido utilizando técnicas convencionales. El ADN se resuspendió en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, que contenía EDTA 1 mM y se determinó espectrofotométricamente la concentración del ADN. Se digirió la preparación de ADN dos veces con ARNasas A+T1. Esta etapa garantiza que el ARN no está presente en la disolución (el ARN inhibe la condensación del ADN mediante la poli-L-lisina). Se utilizó una disolución que contenía una alta concentración de ADN (1,5-2 mg/ml) en etapas adicionales. Un ejemplo de un protocolo típico para la condensación del ADN se describe de la siguiente forma:

a) Se agitaron con vórtex 300 μg de ADN en 200 μl de NaCl 0,75 M (añadidos de una disolución de NaCl 5 M) a velocidad media, utilizando una máquina VIBRAX (IKA-VIBRAX-VXR). Este procedimiento es deseable para aumentar la longitud eficaz del polímero de ADN en altas disoluciones salinas, logrando así la unión eficaz del resto de poli-L-lisina a la estructura principal del ADN.

b) Se añaden gota a gota 84 μg de poli-L-lisina-galactosa en 200 μl de NaCl 0,75 M (añadidos de una disolución de NaCl 5 M) durante un periodo de 30 minutos a 1 hora en alícuotas de 20 μl . Esta cantidad se traduce en una razón molar de 1 grupo PO_4^- del ADN con respecto a 0,7 grupos NH_3^+ del portador.

c) La disolución se vuelve turbia en final del proceso. Se añaden gota a gota alícuotas de 3 μl de NaCl 5 M a la disolución agitada con vórtex hasta que desaparece la turbidez tal como se monitoriza visualmente. Este proceso es lento, permitiendo 30 segundos entre la adición de cada nueva alícuota de NaCl 5 M. Entonces se somete la disolución a monitorización espectroscópica de DC mientras se añaden gradualmente alícuotas de 2 μl de NaCl 5 M. El proceso de condensación se completa cuando se observa el espectro de diagnóstico del complejo de ADN. Para las preparaciones posteriores de complejo de ADN que consiste en el mismo ADN de plásmido a la misma concentración del nucleótido, puede seguirse el protocolo sin monitorizar mediante DC y los resultados serán completamente reproducibles. Cuando se utiliza una concentración diferente de ADN o un plásmido diferente, debe repetirse la monitorización mediante DC.

Se ha encontrado que una técnica alternativa para monitorizar la formación del complejo de ADN da resultados similares. Esta técnica consiste en las siguientes etapas:

a) y b) Ídem.

c) La disolución se vuelve turbia al final del proceso. Se añaden gota a gota alícuotas de 3 μl de NaCl 5 M a la disolución agitada con vórtex hasta que desaparece la turbidez tal como se monitoriza visualmente. Este proceso es lento, permitiendo 30 segundos entre la adición de cada nueva alícuota de NaCl 5 M. Entonces se centrifuga la disolución a velocidad completa (12000x g) durante 30 segundos utilizando una microcentrífuga y se monitoriza el aspecto del precipitado. Si se observa un precipitado, se añaden alícuotas de 2 μl de NaCl 5 M. La disolución se agita con vórtex adicionalmente durante 0,5 minutos y se repite la etapa de centrifugación. El aspecto de un precipitado se debe a la agregación del complejo de ADN en la disolución e indica que el ADN no se ha colapsado completamente.

Resultados y discusión

Al desarrollar el procedimiento descrito en el presente documento, se ha monitorizado la estructura física del conjugado de ADN/ligando-poli-L-lisina utilizando difracción circular (DC) y microscopía electrónica y se han estudiado las condiciones en las que se genera un complejo funcional. Entonces se ha determinado la relevancia funcional de la estructura física del conjugado de ADN/ligando-poli-L-lisina usando animales intactos. Se condensó el ADN mediante la adición del ligando-poli-L-lisina en presencia de diversas concentraciones de NaCl. Se agitaron con vórtex o bien 60 μg de β -galactosidasa del CMV libre de ARN (A) o bien pHFIX (B, C, D y E), diluidos hasta un volumen final de 150 μl en NaCl 700 mM a velocidad media en un aparato VIBRAX (IKA-VIBRAX-VXR). Se diluyeron 19 μg del biconjugado de fenil-isocianato de α -galactopiranosilo/poli-L-lisina (Sigma) de la misma forma y se añadieron gota a gota a la disolución agitada con vórtex de ADN. Para los estudios *in vivo*, se condensaron 300 μg de ADN (disueltos en tampón TE, pH 8) en 150 μl de NaCl 700 mM con 95 μg de biconjugado de fenil-isotiocianato de α -galactopiranosilo/poli-L-lisina en 150 μl de NaCl 700 mM. La lenta adición del policatión da como resultado la formación de una disolución turbia que se disuelve mediante la adición progresiva de alícuotas de 3 μl de NaCl 5 M. Se monitorizó visualmente la desaparición de la turbidez y en el punto de no turbidez se investigaron las disoluciones de complejos de ADN/poli-L-lisina tanto mediante microscopía electrónica (M.E.) como mediante espectroscopía de DC. La adición continua de alícuotas de 2 μl de NaCl 5 M dio como resultado cambios estructurales tal como se muestra en las figuras 1A-1F. En la figura 1 se presentan espectros representativos que demuestran diferentes conformaciones estructurales del complejo de ADN a diversas concentraciones de NaCl y en presencia y ausencia de poli-L-lisina añadida. La unión del policatión al ADN da como resultado un espectro específico caracterizado por un desplazamiento del cruce hasta mayores longitudes de onda; este desplazamiento puede estar correlacionado con el empaquetamiento quiral de los conjugados de ADN/poli-L-lisina en orden alto, estructuras asimétricas similares a la forma Y del ADN. Tal como se muestra en la figura 1A, el ADN bicatenario (en NaCl 1 M) tiene un espectro característico que se modificó marcadamente mediante la adición de poli-L-lisina a diversas fuerzas iónicas (figura

1a). Cuando se aumentó la fuerza iónica del conjugado ADN/ligando-poli-L-lisina, el complejo continuó a través de una transición de un estado agregado (figura 1C) a uno condensado (figura 1D y figura 1E). Esto corresponde a un desplazamiento en el espectro del complejo tal como se muestra en la figura 1A. El cambio en los espectros de DC a 220 nm y el desplazamiento en el cruce (línea 0 en la figura 1A) que se produce con el aumento de la fuerza iónica de la disolución es de particular importancia en la monitorización de la formación del complejo de ADN condensado por medio de espectroscopía de DC. Si la fuerza iónica aumenta por encima del intervalo crítico requerido para la condensación del complejo de ADN, el complejo adopta una conformación relajada, no condensada (figura 1F). Esta transición en la conformación del complejo de ADN no puede monitorizarse mediante espectroscopía de DC de modo que una titulación rigurosa de NaCl resulta crítica para el éxito de este procedimiento. Es importante observar que el diámetro del complejo de ADN observado en la figura 1D (aproximadamente 10 nm) se ajusta al intervalo de discriminación deseable para la internalización de los ligandos moleculares mediante el receptor hepático para asialoglicoproteínas.

Por tanto, se verificó la relevancia funcional de las estructuras de ADN observadas como vehículos para transferir el ADN a hepatocitos *in vivo* mediante endocitosis mediada por receptor. Con el fin de establecer la naturaleza del proceso de captación, se siguió con la eliminación del complejo de ADN de los medios mediante las células HepG2, que contienen el receptor de asialoglicoproteína. La captación del complejo de ADN se inhibió completamente cuando se utilizó un exceso molar de 100 veces de asialofetúina como un competidor, lo que indica que el complejo se estaba captando mediante endocitosis mediada por receptor a través de la ASGP.

Se utilizó un plásmido (pPFIX) que contenía un gen quimérico compuesto por el promotor del gen para la forma citosólica de P-enolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) de la rata, unido al ADNc para el factor IX de coagulación humano (hFIX) (Perkol, *et al.*, FASEB J., 7:1081 (1993)) para seguir el suministro y la expresión del ADN en el hígado. Se determinó el transcurso de tiempo de la expresión del gen hFIX en los animales transfectados mediante hibridación por inmunotransferencia de tipo Western, utilizando un anticuerpo monoclonal frente al péptido hFIX maduro.

Se anestesiaron con éter ratas Sprague-Dawley macho adultas, de aproximadamente 250 g de peso. Se infundieron 300-400 μ l de una disolución que contenía 300 μ g de pPFIX acomplejado tal como se describió anteriormente con galactosa-poli-L-lisina, en la vena cava caudal. Se sacrificaron las ratas a los 0, 4, 8, 12, 32, 72 y 136 días tras la transfección y se tomaron muestras de tejidos y sangre.

Se sometieron a electroforesis muestras de plasma (1 μ l) de animales transfectados y una dilución 1:4 de un control de plasma humano en geles de SDS/poliacrilamida al 10% y se transfirieron en filtros de membrana de nitrocelulosa utilizando técnicas convencionales. Las transferencias se bloquearon con 1x PBS, pH 7,4, monolaurato de polioxietilensorbitano al 0,03% (Tween 20), y leche desnatada en polvo al 10% (p/v) durante dos horas a temperatura ambiente, seguido por incubación con una dilución 1/1000 de un anticuerpo monoclonal murino anti-factor IX humano (3 μ g/ml) durante dos horas a temperatura ambiente. El Dr. Kenneth Smith (United Blood Services, Albuquerque, Nuevo Méjico) facilitó amablemente el anticuerpo monoclonal. Se lavó tres veces la membrana en 1x PBS, pH 7,4 y Tween 20 al 0,03%, luego se incubó con una dilución 1/500 de conjugado de Igg de cabra anti-murina (H+L) - peroxidasa de rábano. Entonces se lavó vigorosamente la membrana cuatro veces con 1x PBS, pH 7,4 y Tween 20 al 0,03% y se aplicaron 10 ml de disolución de detección por quimioluminiscencia potenciada mediante inmunotransferencia de tipo Western durante un minuto. Se detectó la luminiscencia emitida por el filtro mediante una exposición de 20 segundos a película fotográfica. Se detectó una banda que hibridaba específicamente con el anticuerpo monoclonal anti-hFIX durante hasta 140 días. No se detectó ninguna banda de hibridación en los controles no transfectados.

Se extrajo el hígado de un animal 32 días tras la transfección y se aisló el ADN genómico utilizando técnicas convencionales. Se digirieron 5 μ g del ADN total del animal transfectado y de un control no transfectado o bien con EcoRI o bien con BglII durante la noche. Se realizó electroforesis con transferencia tipo Southern mediante métodos establecidos. El ADN del animal transfectado sólo hibridó con sondas de BglII de 4,5 kb y EcoRI de 2,6 kb.

Se obtuvieron tejidos de bazo, pulmón, corazón e hígado de una rata transfectada con 300 μ g del complejo de ADN. Se llevó a cabo un análisis de PCR en el ADN genómico total aislado de estos tejidos. Sólo el hígado de la rata transfectada, y no su bazo, pulmón o corazón, o el hígado de un animal control, fue positivo para la sonda de 720 pb.

Se determinó la presencia de transcritos de ARNm para el factor IX humano en hígados de ratas transfectadas con pFIX tras el tratamiento de ARN hepático celular total con transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney y la amplificación del ADNc resultante mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Brevemente, se trató 1 μ g de ARN de hígado de rata total con 10 U de ADNasa I (libre de ARNasa) y se añadió a una disolución que contenía 500 nM de cebador de oligonucleótido (dT)₁₆ y 500 nM de cada dNTP, y se calentó hasta 42°C, y 1 μ l del conjunto de ADNc se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, usando cebadores que extienden la región UTR en 5' del promotor de PEPCK y el ADNc para hFIX. Como control, también se usaron las mismas muestras de ARN no convertidas en ADNc mediante la transcriptasa inversa como moldes de la reacción en cadena de la polimerasa para garantizar que el ADN de plásmido contaminante no se hubiera amplificado. Se separaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa e hibridación por transferencia de tipo Southern usando una sonda de ADNc de factor IX humano radiomarcada. Se observó una banda que hibridaba específicamente con la sonda de

hFIX sólo en los animales transfectados. No se detectaron bandas ni en los controles no transfectados ni en las muestras transfectadas no convertidas a ADNc mediante la transcriptasa inversa.

Se analizó la actividad funcional de hFIX en el plasma de los animales transfectados midiendo la actividad procoagulante del factor IX humano. Se utilizó una modificación del tiempo de tromboplastina parcial, activado por caolín, de una fase, con plasma humano deficiente en factor IX. Se obtuvieron muestras de sangre de animales de experimentación mediante venopunción. Se añadió una quincuagésima parte del volumen de citrato de sodio 500 mM, pH 5,0, para evitar la coagulación y se almacenó el plasma a 20°C. Se sometieron a ensayo las muestras por duplicado y se comparó su actividad con la actividad funcional del plasma reunido de 24 machos adultos normales. En un ser humano normal, el plasma tiene una actividad funcional equivalente en un 100% o aproximadamente a 3 µg de factor IX humano por ml. Se restó la actividad inicial del factor IX en el plasma de rata (aproximadamente 0,15 unidades/ml de actividad de factor IX en suero de rata) de cada valor de factor IX humano determinado en animales individuales. Los valores iniciales constituyen la actividad cruzada no específica del factor IX de rata determinados en el ensayo del factor IX humano utilizado en este análisis. Se obtuvieron muestras de sangre de animales de experimentación mediante venopunción. Se añadió una quincuagésima parte del volumen de citrato de sodio 500 mM, pH 5,0, para evitar la coagulación y se almacenó el plasma a 20°C. La concentración normal de hFIX en el plasma humano es de 3 µg/ml. Se produjeron aproximadamente de 15 ng/ml (72 días tras la transfección) a 1050 ng/ml (48 días tras la transfección) de factor IX humano activo en los animales individuales a los que se inyectó el complejo de ADN (tabla 102). No está claro si las pequeñas variaciones en la concentración del hFIX recombinante encontradas en los animales representan una diferencia en la eficacia de suministro o en la expresión del gen recién introducido. El gen de hFIX se expresó en los animales durante hasta 140 días (la duración del experimento), observándose el mayor nivel inicial a los 48 días (tabla 102).

Utilizando animales transgénicos se ha establecido (McGrane, *et al.*, 1988, 1990; Short, *et al.* 1992) que puede inducirse la transcripción del promotor de PEPCK mediante la administración de una dieta con alto contenido en proteínas - con bajo contenido en hidratos de carbono. Con el fin de demostrar la expresión regulada del transgén, se analizó la sangre de los animales transfectados para determinar la presencia de hFIX mediante hibridación de tipo Western antes y después de una alimentación con alto contenido en proteínas - con bajo contenido en hidratos de carbono o una dieta comercial normal durante 1 semana. Se observó una inducción de hasta 3 veces de la expresión del gen de PFIX en los animales que contenían el gen de PFIX durante hasta 140 días tras la inyección del complejo de ADN. El mismo gen de PEPCK-hFIX, introducido en los hígados de ratas usando un método alternativo de transferencia génica mediada por receptor que selecciona como diana la ASGE, fue activo durante sólo dos días (Ferkol, *et al.*, 1993); esto sugiere que el uso de un complejo de ADN altamente compactado puede ser responsable de la expresión prolongada del transgén observada en el presente estudio.

La detección de niveles mantenidos de la proteína hFIX en puntos de tiempo de hasta 140 días es una prueba de la expresión a lo largo de todo el transcurso de tiempo experimental. Se detectó un transcrito específico de 800 pb de FIX humano mediante amplificación por FCR de ADNc generado a partir de ARN celular total mediante transcriptasa inversa, en los hígados de animales que expresan la proteína hFIX funcional (figura 3A). La presencia de ARNm a lo largo del transcurso de tiempo experimental indicaría que existe un conjunto mantenido de ADN transcripcionalmente activo en estos animales, persistencia que explicaría la expresión y detección prolongada de hFIX y ARNm específico.

También se ha establecido la presencia del ADN transfectado en el hígado de animales 32 días tras la transfección, y se ha investigado su estado físico. Se sometió el ADN extraído a análisis mediante enzimas de restricción con Bgl II que lineariza el plásmido (4,5 Kb) y con EcoR I que libera el gen quimérico de 2,6 Kb del plásmido. La hibridación por transferencia de tipo Southern utilizando una sonda específica para hFIX demostró que el ADN transfectado permanece en estado episómico en los hígados transfectados, puesto que Bgl II producía una única banda coherente con el tamaño del plásmido lineal en contraste con la hibridación por extensión esperada cuando se produce la integración aleatoria (figura 3B). No puede descartarse la posibilidad de que una pequeña proporción del ADN transfectado pueda haber experimentado la integración aleatoria en el genoma de los animales transfectados. Sin embargo, se cree que este caso es improbable puesto que el hígado no se ha sometido a estimulación de mitosis (es decir, hepatectomía parcial).

El receptor de asialoglicoproteína sólo está presente en células de parénquima del hígado. No obstante, se ha demostrado que las asialoglicoproteínas y otros ligandos con galactosa-terminal pueden captarse por macrófagos mediante un mecanismo dependiente del tamaño del ligando molecular. Véase Schlepper-Schäfer, J. *et al.*, Exp. Cell. Res. 165:494 (1986); Bijsterbosch, M.K., *et al.*, Mol. Pharmacol 36:484 (1989); y Bijsterbosch, M.K., *et al.*, Mol. Pharmacol 41:404 (1992). El tamaño del complejo de ADN/ligando-poli-L-lisina en los experimentos sería compatible con el intervalo de discriminación del receptor de asialoglicoproteína. Con el fin de investigar la especificidad del complejo de ADN, se ha obtenido ADN de diferentes tejidos en un animal transfectado y se ha amplificado el ADN transfectado mediante PCR. Los resultados muestran la ausencia de ADN amplificable en tejidos distintos al hígado, lo que indicaría la captación específica por los hepatocitos. Resulta especialmente interesante que no hay captación detectable en tejidos que contienen macrófagos como el pulmón y el bazo. En contraposición, se ha detectado ADN transfectado en el pulmón y el bazo en animales transfectados usando el método descrito por Wu, *et al.* para endocitosis mediada por receptor por medio del receptor de asialoglicoproteína. Se cree que el pequeño tamaño del ligando molecular logrado en los experimentos es responsable de la especificidad de la captación notificada en el presente documento.

Ejemplo 2

En este ejemplo se administra una construcción génica-promotor diferente (SV40/luciferasa) a un tipo de células diferente (macrófagos) por medio de un resto de unión a célula diana diferente.

Introducción

El reconocimiento y la captación de glicoproteínas circulantes por células específicas se determinan por la naturaleza de los residuos de azúcar expuestos presentes sobre la superficie de la molécula. Los sistemas de aclaramiento de las glicoproteínas específicas son relativamente exclusivos y están mediados por tipos de células específicos. El receptor de manosa reconoce glicoproteínas con residuos de manosa, glucosa, fucosa, y N-acetilglucosamina en partes no reductoras expuestas. Diversos conjugados de glicoproteína y proteínas que portan estos residuos de hidratos de carbono se unen a macrófagos alveolares aislados, y las células de Kupffer *in vivo* eliminan glicoproteínas con manosa-terminal infundidas en la circulación de ratas. A la inversa, estas células no reconocen las glicoproteínas con galactosa-terminal, que se eliminan por el receptor de asialoglicoproteína en hepatocitos. Este receptor de la superficie celular se expresa por una variedad de subtipos de macrófagos, pero no por los monocitos circulantes, y media el suministro y la internalización de glicoproteínas con manosa-terminal. El receptor de manosa se recircula constitutivamente de un compartimento prelisosómico a la superficie celular, y la expresión del receptor está regulada por los macrófagos.

Los macrófagos están presentes en diversos órganos (es decir, hígado, bazo, pulmón y médula ósea) que se unen a las glicoproteínas con manosa-terminal y por tanto pueden ser una célula diana para la transferencia génica mediada por receptor. Se sometió a prueba esta hipótesis examinando la capacidad para suministrar genes exógenos funcionales que expresan el receptor de manosa. En este informe, se sintetizó y se empleó un portador de neoglicoproteína con manosa-terminal como ligando para la transferencia génica mediada por receptor a macrófagos murinos primarios aislados de exudados peritoneales, que expresan abundantemente el receptor sobre su superficie. Además, se transfirieron con éxito los genes indicadores a los macrófagos presentes en el hígado y el bazo de ratas intactas usando el portador de neoglicoproteína con manosa-terminal.

Métodos

Materiales: Se adquirieron enzimas que modifican ADN, nucleótidos y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido de Boehringer Mannheim (Indianápolis, Indiana, EE.UU.). Todos los compuestos químicos, incluyendo poli(L-lisina), fenilisocianato de a-D-manopiranosilo, albúmina y fenilisocianato de a-D-galactopiranosilo, se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, EE.UU.). El sistema de ensayo de luciferasa se obtuvo de Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.). El anticuerpo de conejo anti- β -galactosidasa y la IgG de cabra anti-conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína se obtuvieron de 5 Prime to 3 Prime, Inc. Todos los medios, sueros y antibióticos se obtuvieron de Gibco Laboratories (Grand Island, Nueva York, EE.UU.).

Preparación de portador de glicoproteína con manosa-terminal: Se construyeron portadores de glicoproteína sintéticos en los que la poli(L-lisina), de longitud de cadena promedio 100 (PM 20.000 Da), se glicosiló utilizando un fenilisotiocianato de a-D-manopiranosilo disuelto en N,N-dimetilformamida. Se ajustó la disolución a pH 9,5 mediante la adición de carbonato de sodio 1 M, pH 9,5. Protegida de la luz e incubada durante 16 horas a 22°C, la disolución se dializó frente a cloruro de sodio 5 mM durante dos días. Se glicosilaron aproximadamente del 0,8 al 1,0% de las cadenas laterales de amina en la polilisina, tal como se determinó mediante espectroscopía de absorbancia a 250 nm. Como control, se sintetizó un portador de glicoproteína alternativo sustituyendo el fenilisocianato de a-D-manopiranosilo con fenilisotiocianato de a-D-galactopiranosilo.

Preparación de genes indicadores y plásmido: El plásmido de expresión pGEMluc contenía el promotor y elementos potenciadores virales de SV40 ligados al gen de la luciferasa de *P. pyralis*. También se usaron como genes indicadores los plásmidos pCMVZ y pCMVIL2r, que consistían en el promotor de citomegalovirus (CMV) unido a los genes de lacZ de *E. coli* y el receptor de interleucina 2, respectivamente. Los plásmidos se hicieron crecer en *E. coli* DH5a, se extrajeron y se purificaron mediante técnicas convencionales (14). Las digestiones de los plásmidos con endonucleasas de restricción dieron fragmentos del tamaño apropiado y la pureza se estableció mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. Los tamaños de los plásmidos son los siguientes: pGEMluc, 6,0; pCMVlacZ, 10,9; y pCMVIL2r, 5,4 kB. No hubo ADN genómico bacteriano presente en las preparaciones de plásmido.

Preparación de complejos de portador de glicoproteína con manosa-terminal - ADN. Los complejos se formaron de manera análoga al ejemplo 1, sin embargo, el ADN era superenrollado en aproximadamente el 80% y circular abierto en el 20%.

Células y cultivo celular. Se aislaron macrófagos primarios de la cavidad peritoneal de ratones cuatro días después de la inyección intraperitoneal de un mililitro de medio de tioglicolato de Brewer. Se recogieron los macrófagos del exudado peritoneal tal como se describió anteriormente y se mantuvieron en medio RPMI 1640. Este método dio aproximadamente 5×10^6 células por ratón, de las que el 40-75% eran fagocitos mononucleares basándose en las características morfológicas de las células y en la identificación citoquímica. Se realizaron transfecciones uno o dos días tras la recogida. Las células aisladas eran confluentes en aproximadamente el 30-60% en el momento de la transfección. Se determinó la viabilidad de las células mediante recuentos de células en serie y exclusión mediante azul trípango.

ES 2 316 148 T3

Suministro de ADN a macrófagos en cultivo: Un día tras el aislamiento, se lavaron las células aisladas de los exudados peritoneales de ratones una vez con PBS (pH 7,4) y los medios se cambiaron inmediatamente antes de la transfección. Se aplicó el complejo de conjugado-ADN, que contenía 5 μg (0,4 - 0,7 pmol) de plásmido, al medio de cultivo y se permitió que permaneciera en las células durante 24 horas a menos que el experimento dictara otra cosa. Entonces o bien se recogieron las células para la extracción de proteínas o bien se fijaron para realizar ensayos de β -galactosidasa *in situ* en varios puntos de tiempo tras la transfección.

Animales: Se anestesiaron con éter ratas Sprague-Dawley macho, adultas, que pesaban aproximadamente 250 g. Utilizando una técnica aséptica, se inyectaron de 0,3 a 0,6 ml de una disolución que contenía 300 μg (20,8 - 42,0 pmol) de un plásmido de expresión acompañado con el portador en la vena cava caudal. Se sacrificaron las ratas a diferentes intervalos tras la infusión de los complejos y se extrajeron los hígados, pulmones y bazo de los animales transfectados para su análisis. Además, se aislaron los macrófagos de los alvéolos, la médula ósea y el bazo. Se obtuvieron células de médula ósea de fémur de rata. El fémur se extirpó quirúrgicamente una vez sacrificado el animal de experimentación y se infundió un mililitro de los medios en y se aspiró de la cavidad medular. Se preparó una suspensión de una única célula de la médula aspirando suavemente las células con una pipeta Pasteur. Las células extraídas de la médula ósea se mantuvieron en medio RPMI 1640 durante 8 - 12 horas y se permitió que se unieran a portaobjetos de vidrio, momento en el que se fijaron las células adherentes para la tinción inmunocitoquímica. Se utilizaron como controles animales no transfectados y transfectados de manera simulada en todos los análisis. El Institutional Animal Care Committee de la Case Western Reserve University revisó y aprobó el protocolo de investigación con animales.

Ensayo citoquímico para determinar la actividad de β -galactosidasa: Se identificaron células individuales que expresaban β -galactosidasa tras la incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido (X-gal) tal como se describió anteriormente. Brevemente, se fijaron las células con una disolución de glutaraldehído al 1% en PBS durante 15 minutos y después se incubaron con una disolución que contenía X-gal al 0,5% durante 12 horas a 37°C. Las células también se tiñeron para determinar la actividad esterasa no específica, que produce un colorante de color gris-negro insoluble. Se contó un mínimo de 100 células en el cultivo tisular para determinar el porcentaje de células que expresan β -galactosidasa.

Se identificaron células individuales que expresaban β -galactosidasa en tejidos tras la incubación con X-gal tal como se describió anteriormente. Brevemente, las células se fijaron con una disolución de glutaraldehído al 0,5% en PBS durante 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS, pH 7,5 y luego se incubaron con una disolución que contenía X-gal al 0,5%, ferricianato de potasio 5 mM, ferrocianato de potasio 5 mM y cloruro de magnesio 1 mM en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) durante 6 horas a 37°C. Los tejidos teñidos se fijaron en paraformaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,5% en PBS durante la noche a 4°C, se embebieron en parafina mediante el procedimiento convencional y se cortaron para dar cortes de 5 μm . Los cortes se contratiñeron con rojo rápido nuclear al 0,1%. Los cortes tisulares adyacentes también se tiñeron para determinar la actividad esterasa no específica, que aparece de color marrón-negro. Las células coloreadas de azul se identificaron mediante microscopía óptica.

Identificación citoquímica de macrófagos. Se tiñeron cortes de tejido y células para determinar la actividad esterasa no específica, que es relativamente específica para los fagocitos mononucleares. Se fijaron los frotis celulares tal como se describió anteriormente, y se incubaron con una disolución filtrada que contenía acetato de a-naftilo y sal de azul rápido BB durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se tiñeron los cortes de tejido con esta disolución durante 1-3 horas, y se contratiñeron con rojo rápido nuclear al 0,1%.

Tinción inmunocitoquímica para la determinación de beta-galactosidasa: Se determinó la expresión del transgén en células aisladas de tejidos (bazo y médula ósea) transfectadas *in vivo* con el plásmido pCMVZ mediante inmunofluorescencia indirecta. Se fijaron los frotis celulares con metanol/acetona durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se incubaron las células con un anticuerpo de conejo policlonal anti- β -galactosidasa durante una hora a 37°C. Se diluyó el anticuerpo primario 1:100 en PBS para la inmunodetección en los frotis de células fijadas. Se utilizó inmunoglobulina G anti-conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína diluida 1:100 en PBS como el anticuerpo secundario. Las células también se contratiñeron con yoduro de propidio, que produce fluorescencia roja en el núcleo celular. Entre cada incubación, se lavaron las células tres veces durante cinco minutos con PBS. Se examinaron las células teñidas mediante microscopía fluorescente.

Ensayos para determinar la actividad luciferasa: Se recogieron, lisaron y analizaron las células en cultivo para determinar la actividad luciferasa tal como se describió anteriormente. Los tejidos se recogieron de ratas transfectadas y control una vez sacrificados los animales y perfundidos *in situ* con 50 mililitros de PBS frío, pH 7,5. Se homogeneizaron los tejidos en tampón de lisis y se permitió que se incubaran a 22°C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron los lisados celulares durante 5 minutos a 4°C, y se analizaron los extractos de proteínas para determinar la actividad luciferasa. Los lisados se sometieron a ensayo para determinar el contenido en proteínas y se normalizaron las unidades de luz integradas medidas para determinar el contenido en proteínas total. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se expresaron como un promedio de los valores.

Análisis estadístico: Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media (SEM), y se evalúan mediante un análisis de varianzas utilizando la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK).

*Resultados**Transfección in vitro de Macrófagos primarios utilizando el portador de glicoproteína con manosa-terminal*

5 Utilizando un plásmido de expresión (pCMVZ) que codifica el gen lacZ de *E. coli* como gen indicador, se aplicaron complejos del plásmido y el portador de glicoproteína con manosa-terminal a células de exudados peritoneales celulares aislados de ratón. Veinticuatro horas tras la transfección, se examinaron las células para determinar la actividad β -galactosidasa. El número de células transfectadas varió desde el 5 hasta el 26 por ciento de todas las células examinadas. Además, la proporción de células con actividad esterasa no específica, un marcador citoquímico característico de monocitos y macrófagos, que expresaban el transgén osciló desde el 40% hasta el 75%. Las transfecciones utilizando complejos que consistían en un plásmido irrelevante (pGEMluc) unido al portador o el plásmido de expresión (pCMVZ) unido a un portador de glicoproteína con galactosa-terminal no mostraron actividad β -galactosidasa significativa en las células de exudado. Se observó tinción débil de color azul en estas células control, que se debía lo más probablemente a actividad β -galactosidasa endógena. No obstante, el porcentaje y la intensidad de las células teñidas de azul en los controles fue marcadamente inferior que en las placas transfectadas. El complejo de portador de glicoproteína con manosa-terminal - ADN pareció no ser tóxico para las células, dado que el porcentaje de células viables, basado en los recuentos de células y en la tinción con azul tripano tras el tratamiento no fue significativamente diferente de los controles.

20 Se aplicaron los complejos del portador de glicoproteína con manosa-terminal y el plásmido de expresión pGEMluc a células aisladas de los exudados peritoneales durante periodos de tiempo crecientes, y se midió la actividad luciferasa en los extractos de proteínas de las células transfectadas 24 horas tras la transfección. Tal como se observó en los experimentos anteriores, varió el nivel de expresión del gen transferido. Estaba presente un aumento de ocho veces en la actividad luciferasa relativa en las células transfectadas ($p < 0,01$), mientras que los extractos de proteínas obtenidos de las células tratadas con un complejo formado utilizando un portador de glicoproteína con galactosa-terminal no expresaron actividad significativamente diferente de la del control no transfectado. Además, la adición de un exceso molar de cien veces de albúmina sérica bovina manosilada con respecto al complejo a los medios de cultivo inmediatamente antes de la transfección, que debe competir con el portador por el receptor de manosa, inhibió completamente la captación y la expresión del gen indicador ($p < 0,01$). También se examinó la duración de la expresión del transgén en estas células. Se aplicaron los complejos del portador de glicoproteína con manosa-terminal y el plásmido de expresión pGEMluc a las células durante 24 horas, y se sometieron a ensayo extractos de proteínas para determinar la actividad luciferasa en varios puntos de tiempo tras la transfección. Se detectó la expresión del transgén óptima un día tras el tratamiento y la actividad luciferasa disminuyó hasta niveles control ocho días tras la transfección.

35

Transfección de macrófagos in vivo utilizando el portador de glicoproteína con manosa-terminal

40 Se utilizó el portador de glicoproteína con manosa-terminal para transferir genes indicadores en el bazo y los hígados de animales intactos. Se anestesiaron las ratas y se acomplejaron 300 μ g de plásmido (pGEMluc) con el portador de glicoproteína con manosa-terminal y se infundieron lentamente en la vena cava caudal durante varios minutos. También se realizaron en paralelo transfecciones control y simuladas de animales utilizando complejos que consistían en un plásmido irrelevante (pCMVlacZ) unido al portador. Todos los animales a los que se inyectó el complejo sobrevivieron. Se realizaron ensayos de luciferasa cuatro días tras la infusión de los complejos en homogeneizados de tejidos extraídos del hígado, los pulmones y el bazo. Se observaron niveles significativos de expresión del transgén en los extractos de proteínas del bazo obtenido de animales transfectados. Se encontraron niveles inferiores de actividad luciferasa en el hígado y el pulmón. Las ratas no transfectadas y los animales tratados con los complejos que consistían en un plásmido irrelevante (pCMVlacZ) unido al portador de glicoproteína con manosa-terminal no tuvieron actividad luciferasa significativa en extractos de proteínas de ningún tejido. Doce días tras la transfección, la actividad luciferasa se aproximaba a los niveles iniciales en todos los tejidos examinados.

55 Se examinó la distribución celular de la expresión del transgén en cortes de bazo e hígado tres días tras la inyección de los complejos que contenían pCMVlacZ. Se analizaron los tejidos para determinar la actividad β -galactosidasa mediante una tinción citoquímica. Un animal tratado con complejos obtenidos utilizando un plásmido irrelevante (pCMVIL2r) sirvió como control. Se detectó la expresión de beta-galactosidasa en varias células pequeñas en el bazo situadas en la región subcapsular, que se ajustaba a la distribución de las células que expresaban actividad esterasa no específica basándose en tinción citoquímica. No se encontró actividad beta-galactosidasa en las células correspondientes del bazo control. En los cortes hepáticos del animal transfectado estaban presentes células teñidas de azul poco frecuentes, y las células endoteliales hepáticas, que también tienen receptores de manosa de superficie, expresaron el transgén. También se aislaron células nucleadas del bazo y se tiñeron *in vitro*. Además, las células extraídas de la médula ósea y del líquido de lavado broncoalveolar de los animales transfectados y control también se trataron con una disolución que contenía X-gal y se examinaron para determinar actividad beta-galactosidasa. Aproximadamente el 10-20 por ciento de las células nucleadas obtenidas del bazo se tiñeron de azul. Las células poco frecuentes de los animales transfectados simulados también se tiñeron débilmente de azul, lo más probablemente debido a una β -galactosidasa endógena. No obstante, el porcentaje y la intensidad de las células teñidas de azul en los controles fueron significativamente inferiores que los encontrados en el animal control.

65

Se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra la beta-galactosidasa bacteriana para la localización inmunocitoquímica del producto transgénico para establecer que las células teñidas de azul en el bazo no se deben a la beta-galactosidasa endógena ni a la hidrólisis no específica de X-gal. Las células nucleadas aisladas del bazo y la médula ósea de los animales descritos anteriormente se teñieron con el anticuerpo dirigido contra la beta-galactosidasa y con el anticuerpo anti-conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína y se examinaron para determinar la inmunofluorescencia. Varias de las células aisladas, que eran morfológicamente similares a las células teñidas de azul demostradas en el ensayo citoquímico, presentaban tinción inmunofluorescente. Además, estas células tenían actividad esterasa no específica.

Discusión

Se ha desarrollado un complejo de glicoproteína sintético que puede mediar la transferencia de genes funcionales en macrófagos en cultivo y en los hígados de animales completos. Pueden introducirse plásmidos de expresión unidos no covalentemente a un portador de glicoproteína con manosa-terminal de manera eficaz en células que expresan el receptor de manosa. El suministro de ADN mediante un sistema de transferencia génica mediada por receptor depende de la presencia de receptores sobre la superficie de las células seleccionadas como diana. Las células que no expresan el receptor de asialoglicoproteína no se transfectaron mediante este sistema. Además de los macrófagos, no se transfectaron otros tipos celulares presentes en el exudado peritoneal que no expresan el receptor de manosa, es decir, granulocitos, linfocitos y fibroblastos. La expresión del gene indicador se localizó en células que tenían o bien actividad peroxidasa o bien esterasa no específica, marcadores citoquímicos fidedignos utilizados para la identificación de macrófagos.

La especificidad y la afinidad del ligando para el receptor específico son de importancia considerable para el suministro de genes exógenos. Los macrófagos se unen a glicoproteínas con manosa-terminal con alta afinidad y especificidad. El portador de glicoproteína con manosa-terminal introdujo satisfactoriamente genes indicadores en macrófagos en cultivo y en animales intactos, mientras que no se detectó la expresión del transgén en células transfectadas utilizando un portador de glicoproteína con galactosa-terminal. La captación no parece deberse a un aumento no específico en pinocitosis o fagocitosis derivada de la presencia de glicoproteína en el medio de cultivo. El suministro y la expresión del plásmido se inhiben mediante la adición de albúmina sérica bovina manosilada al medio de cultivo, que presumiblemente compite por el/los sitio(s) de unión sobre el receptor de manosa. Finalmente, la sustitución de un monosacárido alternativo para la manosa podría aumentar la afinidad del complejo de ADN-portador, dado que el receptor de manosa también reconoce glicoproteínas con residuos de glucosa, fucosa y N-acetilglucosamina en posiciones expuestas. Además, podría mejorarse potencialmente la eficacia de transferencia génica mediante la alteración del residuo de hidrato de carbono en un oligosacárido, es decir, oligomanosa, puesto que los monosacáridos son peores ligandos para el receptor que las glicoproteínas polivalentes.

Un factor principal en la determinación del nivel de expresión de los genes transferidos en las células dianas implica la supervivencia y el suministro de ADN exógeno al núcleo. La expresión de los genes introducidos mediante mecanismos mediados por receptor puede limitarse mediante el atrapamiento y la degradación del complejo en compartimentos endosómicos. Se introducen glicoproteínas con manosa-terminal en macrófagos mediante endocitosis mediada por receptor, suministrados a un compartimento ácido pre-lisosómico y posteriormente se transportan a los lisosomas secundarios. Aparentemente, una parte del conjugado introducido evita la destrucción dado que el ADN transferido debe escapar de la degradación una vez que el complejo ha entrado en la célula con el fin de que se exprese el transgén. El estado físico del ADN transferido en las células mediante estos sistemas de suministro también puede contribuir a su supervivencia y expresión posterior y la forma altamente compacta del ADN puede ser más resistente a la digestión por nucleasas. Además, el pequeño tamaño del complejo de portador-ADN también puede permitir la introducción del plásmido en las células del sistema reticuloendotelial específicamente mediante el receptor de manosa y no mediante fagocitosis.

Este estudio ilustra el potencial de dirigir específicamente la transferencia génica en macrófagos seleccionando como objetivo el receptor de manosa, y podría proporcionar teóricamente un enfoque para el tratamiento de diversos errores innatos del metabolismo, como la enfermedad de Gaucher. Se ha demostrado que las terapias farmacológicas que también seleccionan como objetivo el receptor de manosa son eficaces en pacientes con enfermedad de Gaucher. Los tratamientos repetidos de individuos afectados con glucocerebrosidasa humana modificada, en la que los restos de hidratos de carbono externos se escinden para exponer los residuos de manosa terminales, han tenido una mejora clínica sustancial en su enfermedad, tal como se demuestra mediante la reducción en hepatoesplenomegalia y la resolución de anemia. Desgraciadamente, el coste de esta terapia ha resultado prohibitivo para muchos pacientes. Se ha demostrado que el trasplante de médula ósea es curativo en la forma no neuropática de la enfermedad, aunque las complicaciones potenciales del trasplante descartan este procedimiento en muchos pacientes, particularmente en aquellos individuos con enfermedad leve. Sin embargo, dado que la enfermedad de Gaucher puede corregirse mediante trasplante de médula ósea, un posible enfoque que se ha propuesto para la terapia génica de la enfermedad de Gaucher implica la transferencia *ex vivo* del gen de glucocerebrosidasa normal en células madre hematopoyéticas autólogas y su introducción posterior en el paciente. Alternativamente, podrían recogerse linfoblastos del individuo afectado, infectado con retrovirus recombinantes incompetentes para la replicación que contenían el gen de tipo natural, y devolverse al paciente. La enzima secretada entraría en los macrófagos mediante el receptor de manosa, convirtiéndose así en los objetivos secundarios de la terapia. En el sistema que se describe en este original, el macrófago sería la diana principal para la corrección genética. Es necesario tratar cuestiones prácticas con respecto a la eficacia del suministro

de genes, la duración y el nivel de expresión logrados utilizando esta técnica, y las propiedades inmunológicas de los complejos de ADN-portador. No obstante, la terapia génica mediada por receptor tiene el potencial de proporcionar un enfoque no invasivo al tratamiento de tales enfermedades.

5 Ejemplo 3

También se ha utilizado un fragmento Fab de anticuerpo monoclonal dirigido frente al receptor de inmunoglobulina polimérica de rata que se expresa en los epitelios de las vías respiratorias. El péptido de Fab se acopló covalentemente a poli-L-lisina y se complejó con un vector de expresión de SV40-luciferasa utilizando el procedimiento descrito más adelante. Las ratas a las que se inyectó el complejo de ADN tuvieron actividad luciferasa durante hasta 8 días (la duración del experimento) sólo en tejidos que expresaban el receptor. Estos hallazgos subrayan la flexibilidad de este sistema para suministrar ADN a tejidos específicos de un animal adulto.

15 *Introducción*

Se han desarrollado varios métodos de transferencia génica en el tracto respiratorio que permiten la introducción de genes funcionales en células *in vivo*. Sin embargo, muchos de estos enfoques han carecido de especificidad y son citotóxicos. Se han utilizando adenovirus recombinantes, deficientes en la replicación, para suministrar los genes indicadores a células epiteliales respiratorias en una variedad de modelos animales. Sin embargo, los efectos fisiológicos del tratamiento con adenovirus no se entienden bien y la evidencia reciente sugiere que los vectores adenovirales de primera generación administrados a altos títulos virales a animales producen una respuesta inflamatoria sustancial en el pulmón. También se han usado liposomas para transferir genes funcionales al epitelio de las vías respiratorias, pero este enfoque generalmente ha sido tóxico para las células y carece de especificidad.

La transferencia génica mediada por receptor puede proporcionar un método para suministrar ADN a dianas celulares específicas utilizando un vector no tóxico no infeccioso. Esta forma de transferencia génica permite la selección como diana de tejido específico con plásmidos de ADN de tamaño considerable, que permiten el suministro no sólo del transgén, sino también de elementos de promotor y potenciador. En el caso de los sistemas mediados por receptor, el suministro de ADN exógeno es dependiente de la estabilidad del complejo de ADN-portador, de la presencia y el número de receptores específicos sobre la superficie de la célula seleccionada como diana, de la afinidad y la interacción del receptor-ligando y de la internalización eficaz del complejo. Además, la expresión de los genes transferidos se basa en su escape de las vesículas endosómicas y del transporte al núcleo de la célula diana. La duración de la expresión del transgén en animales completos a los que se ha administrado mediante el aprovechamiento de la endocitosis mediada por receptor ha sido generalmente transitoria, volviendo a niveles iniciales en el plazo de setenta y dos horas tras el tratamiento. Esto ha sido el caso para genes indicadores introducidos en células epiteliales de las vías respiratorias mediante la vía intratraqueal utilizando vectores de adenovirus-polilisina y transferrina-adenovirus-polilisina.

Se ha demostrado que en cultivos primarios de células epiteliales de tráquea humana, la selección como diana del receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) permite el suministro eficaz del transgén específicamente a células que portan el receptor. El receptor de inmunoglobulina polimérica se expresa sólo en células epiteliales de la mucosa, incluyendo las células de la glándula submucosa y las células epiteliales de las vías respiratorias y está adaptado específicamente para la internalización y la transferencia no degradativa de moléculas grandes. En este informe, se demuestra que la selección como diana del receptor de inmunoglobulina polimérica *in vivo* da como resultado la expresión del transgén en tejidos que contienen células que portan el receptor que era máxima seis días tras la transfección.

50 *Metodología*

Materiales. Las enzimas que modifican ADN, los nucleótidos y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido se adquirieron de Boehringer Mannheim (Indianápolis, Indiana, EE.UU.). El sistema de ensayo de luciferasa se obtuvo de Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.). Las columnas de proteína A - MAPS - agarosa se adquirieron de BioRad (Richmond, California, EE.UU.). La papaína y la poli(L-lisina) se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, EE.UU.), y el N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato era de Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois, EE.UU.). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-receptor de la interleucina 2 humano se obtuvo de Dako Corporation (Carpenteria, California, EE.UU.), y el anticuerpo de cabra anti-ratón secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína era de Sigma Immunochemicals (St. Louis, Missouri, EE.UU.). El método Vectastain ABC, utilizado en el procedimiento de tinción con inmunoperoxidasa, se adquirió de Vector Laboratories (Burlingame, California, EE.UU.). Todos los medios, sueros y antibióticos se obtuvieron de Gibco Laboratories (Grand Island, Nueva York, EE.UU.).

Preparación de fragmentos Fab. Anteriormente se ha descrito el aislamiento y la digestión con papaína de anticuerpos derivados de conejos inmunizados con componente de secreción de rata. Brevemente, se aisló el anticuerpo policlonal del suero de conejo utilizando una columna de proteína A - MAPS - agarosa tal como describe el fabricante. Se trató la inmunoglobulina G (2 mg) aislada con 20 μ g de papaína durante 12 horas a 37°C en presencia de acetato

ES 2 316 148 T3

de sodio 100 mM (pH 5,5), cisteína 50 mM y EDTA 1 mM. El fragmento Fab se separó del anticuerpo intacto y los fragmentos Fc mediante cromatografía de proteína A. Se generó un Fab irrelevante (FabI) mediante digestión con papaína de IgG de suero de conejo preinmunizado.

5 *Preparación de conjugados de Fab-polilisina.* El fragmento Fab de la inmunoglobulina G anti-pIgR se unió covalentemente a poli(L-lisina) (PM 10.000 Da) utilizando el reactivo de reticulación heterobifuncional 3-(2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo (SPDP). Se incubó el fragmento Fab con un exceso molar de setenta y cinco veces de SPDP en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,5, a 22°C durante 60 minutos. Tras la introducción de estructuras de disulfuro de 2-piridilo en el fragmento Fab, se eliminaron mediante diálisis el SPDP sin reaccionar y productos de reacción de bajo peso molecular. Los puentes disulfuro del fragmento Fab modificado se escindieron con ditiotreitól 25 mM. Tanto la poli(L-lisina) como el SPDP se añadieron en un exceso molar de quince veces al fragmento Fab modificado, y la reacción se llevó a cabo a 22°C durante 24 horas. Se dializó el conjugado para eliminar los productos de reacción de bajo peso molecular y se analizó mediante la separación de las proteínas resultantes en una electroforesis en gel de SDS al 0,1% - poli(acrilamida) al 7,5%. Tal como se describió anteriormente, el análisis del conjugado demostró una proteína que migraba lentamente, correspondiente a una proteína superior a 200 kDa en tamaño.

10 *Genes indicadores y preparación de plásmido.* El plásmido de expresión pGEMluc contenía el promotor viral de SV40 ligado al gen de luciferasa de *P. pyralis*. También se usaron los plásmidos pCMVZ y pCMVIL2r, que consisten en el promotor de citomegalovirus (CMV) unido a los genes de lacZ de *E. coli* y el receptor de interleucina 2, respectivamente, como genes indicadores. Para los estudios de la actividad luciferasa, se emplearon estos plásmidos como controles de ADN irrelevante (ADNI). Los plásmidos se hicieron crecer en *E. coli* DH5a, se extrajeron y se purificaron mediante técnicas convencionales. Las digestiones de los plásmidos con endonucleasas de restricción dieron los fragmentos del tamaño apropiado y la pureza se estableció mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0%. Los tamaños de los plásmidos son los siguientes: pGEMluc, 6,0; pCMVlacZ, 10,9; y pCMVIL2r, 5,4 kB. No se observó contaminación con ADN o ARN genómico bacteriano presente en la preparación de plásmidos.

25 *Preparación de complejos de Fab-polilisina-ADN.* Se formaron los complejos de portador-ADN utilizando un método descrito anteriormente.

30 *Animales:* Se utilizó el portador de polilisina - anticuerpo Fab anti-componente de secreción de rata para transferir genes indicadores a las vías respiratorias y los hígados de animales intactos. Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho, adultas, que pesaban aproximadamente 250 g. Utilizando una técnica aséptica, se inyectaron en la vena cava caudal de 0,3 a 0,6 ml de una disolución que contenía 300 µg de un plásmido de expresión acomplejado con el portador. Se sacrificaron las ratas en varios tiempos diferentes tras la infusión de los complejos y se extrajeron diversos órganos para su análisis. También se realizaron en paralelo transfecciones simuladas de animales utilizando complejos que consistían en un plásmido irrelevante unido al portador o el plásmido de expresión unido a un portador obtenido con un fragmento Fab irrelevante. El Institutional Animal Care Committee de la Case Western Reserve University revisó y aprobó el protocolo de investigación con animales.

35 *Ensayo citoquímico para la actividad β-galactosidasa:* Se identificaron células individuales que expresaban β-galactosidasa en tejidos tras la incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-gal) tal como se describió anteriormente. Brevemente, las células se fijaron con una disolución de glutaraldehído al 0,5% en PBS durante 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS, pH 7,5, y luego se incubaron con una disolución que contenía X-gal al 0,5%, ferricianato de potasio 5 mM, ferrocianato de potasio 5 mM y cloruro de magnesio 1 mM en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) durante 4 horas a 37°C. Los tejidos teñidos se fijaron en paraformaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,5% en PBS durante la noche a 4°C, se embebieron en parafina mediante el procedimiento convencional y se cortaron para dar cortes de 5 µm. Los cortes se contratiñeron con rojo rápido nuclear. Se identificaron las células coloreadas de azul mediante microscopía óptica. Se contó un mínimo de 100 células para determinar el porcentaje de células por corte que expresan β-galactosidasa. Además, se tiñeron cortes adyacentes con azul alcian/ácido peryódico-Schiff o hematoxilina/eosina utilizando protocolos convencionales.

40 *Ensayos para determinar la actividad luciferasa:* Se recogieron, se lisaron y se analizaron las células en cultivo para determinar la actividad luciferasa tal como se describió anteriormente. Se recogieron los tejidos de ratas transfectadas y control una vez sacrificados los animales y perfundidos *in situ* con PBS frío, pH 7,5, durante cinco minutos. Se homogeneizaron los tejidos en tampón de lisis y se permitió incubarlos a 22°C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron los lisados de células durante 5 minutos a 4°C, y se analizaron los extractos de proteínas para determinar la actividad luciferasa. Se sometieron a ensayo los lisados para determinar el contenido en proteínas y se normalizaron las unidades de luz integradas medidas (intervalo de 10 segundos) para determinar el contenido en proteínas total. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se expresaron como un promedio de los valores.

55 *Tinción inmunohistoquímica para el receptor de interleucina 2.* Se determinó la expresión del transgén en tejidos transfectados con el plásmido pCMVZ mediante inmunofluorescencia indirecta. Se fijaron cortes congelados de diversos tejidos con acetona durante 10 minutos a -20°C, y se trataron con durante diez minutos a 22°C para reducir la autofluorescencia. Entonces se incubaron los cortes con suero de cabra al 10% en PBS, pH 7,5, durante una hora a temperatura ambiente. Entonces se incubaron las células secuencialmente con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-

receptor de la interleucina 2 e IgG de cabra anti-ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Ambos anticuerpos se diluyeron 1:100 en PBS, y entre cada incubación, se lavaron las células tres veces durante cinco minutos con PBS, pH 7,5. Se examinaron las células teñidas mediante microscopía fluorescente.

5

Resultados

Transfección in vivo utilizando el portador de polilisina - anticuerpo Fab anti-componente de secreción

10 Todos los animales a los que se inyectó el complejo de ADN - portador de polilisina - anticuerpo Fab anti-com-
ponente de secreción de rata sobrevivieron. Se realizaron los ensayos de luciferasa 48 horas tras la infusión de los
complejos en homogeneizados de tejidos extraídos del hígado, los pulmones y el corazón. Se observaron niveles sig-
nificativos de expresión del transgén en los extractos de proteínas del hígado y los pulmones obtenidos de animales
15 transfectados. No se encontró actividad luciferasa detectable en el bazo y el corazón, tejidos que no expresan el pI-
gR. Además, los animales tratados con los complejos que consisten en un plásmido irrelevante (pCMVlacZ) unido al
portador o el plásmido de expresión (pGEMluc) unido a un portador basado en un fragmento Fab irrelevante dieron
como resultado actividad luciferasa no significativa en cualquiera de los tejidos examinados. Así, sólo se transfectan
los tejidos que contienen células que portan pIgR y la transfección no puede atribuirse a la captación no específica de
un complejo basado en anticuerpo Fab irrelevante.

20

Se desarrolló un transcurso de tiempo de la expresión del gen transferido, en el que se midió la actividad luciferasa
en extractos de proteínas derivados de los cuatro tejidos en diferentes puntos de tiempo tras la inyección del comple-
jo. La actividad luciferasa persistió en el hígado y el pulmón, tejidos que tienen pIgR, logrando valores máximos de
13795 ± 4431 y 461402 ± 230078 unidades de luz integradas (ILU) por miligramo de extracto de proteína, respecti-
vamente, en de cuatro a seis días tras la inyección. Los tejidos que no han expresado el receptor no tuvieron expresión
25 significativa del transgén.

25

Se examinó la distribución celular de la expresión del transgén en cortes de diversos tejidos. Tres días tras la
inyección de complejos que contenían pCMVlacZ, se sometieron cortes de tejido de tráquea, pulmón e hígado a tinción
30 citoquímica para determinar la actividad b-galactosidasa. Un animal tratado con complejos obtenidos utilizando un
plásmido irrelevante (pCMVIL2r) sirvió como control. La expresión en la tráquea se limitó a las células que revisten
la superficie epitelial. No se detectó actividad beta-galactosidasa en los cortes de tráquea del animal transfectado
simulado. La expresión del transgén fue variable, y en algunas zonas del epitelio respiratorio más del 50% de las
células se tiñeron de azul. En general, la expresión osciló desde el 10 hasta el 20% de las células epiteliales de
35 tráquea. Tanto las células epiteliales respiratorias secretoras (caliciformes) como las ciliadas expresaron actividad
beta-galactosidasa, basándose en tinción con azul alcian/ácido peryódico - Schiff de los cortes adyacentes de las vías
respiratorias. No se detectó expresión del transgén en las vías respiratorias terminales ni en los alvéolos en los animales
transfectados ni en los control (datos no mostrados). Esto es conforme a la distribución de las células epiteliales que
expresan pIgR basándose en la tinción inmunohistoquímica *in situ*. Glándulas submucosas poco frecuentes fueron
40 evidentes en los cortes de tráquea y sólo se observó una débil tinción de azul. No se encontró respuesta inflamatoria
en ninguno de los cortes de tráquea de animales no transfectados, simulados y transfectados. Además, se utilizó un
anticuerpo monoclonal de ratón dirigido frente al receptor de la interleucina 2 humano, una proteína de superficie
que se ha usado como un indicador en la transducción de células epiteliales respiratorias *in vitro* pero que no se
expresa naturalmente en estas células, para la localización inmunofluorescente del producto transgénico en la tráquea
45 del animal transfectado con el plásmido pCMVIL2r. Se examinaron cortes en serie de la tráquea para determinar la
presencia de fluorescencia y la membrana apical de numerosas células epiteliales respiratorias del animal transfectado
se tiñeron apropiadamente. No se detectó tinción fluorescente específica en los epitelios de las vías respiratorias de un
animal transfectado simulado con pCMVlacZ. También se encontraron hepatocitos teñidos de azul poco frecuentes en
cortes hepáticos del animal transfectado. No se identificó la expresión del transgén en los hígados ni de las ratas no
50 transfectadas ni de las transfectadas simuladas.

50

Discusión

55 Se notifica la transferencia satisfactoria de genes indicadores en el epitelio de las vías respiratorias *in vivo* tras la
inyección de un complejo de selección como diana que consiste en la parte Fab de la inmunoglobulina G dirigida contra
el receptor de rata de la inmunoglobulina polimérica conjugado con poli(L-lisina), y unido no covalentemente a ADN
de plásmido. Esta técnica suministró específicamente el transgén al hígado y al pulmón, tejidos en los que se expresa
este receptor. No se transfectaron otros tejidos que no expresan el receptor, como el bazo y el corazón. Además, tras
60 la inyección de un conjugado preparado con los fragmentos Fab irrelevantes no se detectó expresión, y un complejo
preparado con un plásmido que contenía un gen indicador irrelevante tampoco produjo actividad luciferasa detectable.
Así, este complejo, selecciona como diana específicamente tejidos que portan el receptor y el transporte normal de los
ligandos naturales del receptor no interfiere con la captación del transgén *in vivo*.

60

65 La mayoría de las estrategias para la transferencia génica en el tracto respiratorio actualmente disponibles depen-
den de vectores virales que no se dirigen específicamente a células epiteliales respiratorias y que se basan en la vía
intratraqueal de suministro para permitir la selección como diana de las vías respiratorias. También se ha utilizado la
instilación intratraqueal para dirigir específicamente la transferencia génica mediante otros medios, como liposomas y

65

conjugados de adenovirus-transferrina-polilisina, al epitelio de las vías respiratorias. El suministro sistémico de ADN unido a liposomas catiónicos no ha sido selectivo y transfiere genes funcionales a varios tipos celulares en tejidos diferentes. La especificidad de la transferencia génica mediada por receptor para las células que portan el pIgR puede ser útil en la selección como diana de células defectuosas en las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística.

5

Ejemplo 4

Introducción

10

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad genética humana caracterizada por aterosclerosis fulminante y enfermedad cardiovascular. Una mutación en el gen para el receptor que media la captación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) es responsable de esta enfermedad. Una de cada 500 personas es heterocigota para una mutación en el gen del receptor de LDL que es responsable de la HF. Como resultado, se elimina LDL de su plasma a sólo dos tercios de la tasa normal. En la cuarta a quinta década de vida, los niveles elevados de LDL en plasma producen aterosclerosis sintomática en estos pacientes. Los homocigotos para HF (uno en un millón de personas) tienen poco o ningún receptor de LDL funcional, dependiendo del dominio de la proteína que está afectada por la mutación. Esto da como resultado aterosclerosis coronaria sintomática antes de los 20 años de edad. El tratamiento con resinas de unión a ácidos biliares e inhibidores de la síntesis de colesterol ha sido considerablemente satisfactorio en pacientes con HF heterocigotos mediante la estimulación de la producción del receptor de LDL a partir del único gen normal. En los homocigotos para HF no existe respuesta al tratamiento con fármacos. Debido a la ausencia de un gen normal que puede estimularse, la sustitución del gen mutado es el único enfoque posible para el tratamiento de pacientes con HF homocigotos. Puesto que el hígado es el órgano principal responsable del catabolismo de LDL, los dos enfoques tomados para el tratamiento de la enfermedad se dirigen a este órgano: trasplante de hígado y terapia génica. El trasplante de un hígado normal en un paciente con HF puede corregir la hiperlipidemia, lo que sugiere que la reconstitución del receptor de LDL hepático debe ser suficiente para la mejora fenotípica. Basándose en este resultado, todos los enfoques realizados usando la terapia génica para el tratamiento de HF se han dirigido a los hepatocitos.

25

Con el fin de entender el mecanismo de la enfermedad, es necesario ser consciente del metabolismo/destino del colesterol en el organismo. Cada célula necesita colesterol para la síntesis de la membrana plasmática. Las glándulas suprarrenales y el cuerpo lúteo del ovario, además, requieren colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas. El hígado es el órgano con la mayor demanda debido a la producción de ácidos biliares. El colesterol se obtiene en tejidos periféricos o bien a partir de captación mediada por receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que son los portadores principales del colesterol endógeno en la sangre, o bien mediante biosíntesis. La HMG CoA reductasa es la enzima determinante de la velocidad en la ruta. El colesterol de la dieta se porta en el torrente sanguíneo mediante partículas quilomicroónicas, que se captan mediante receptores específicos en el hígado. Con el fin de proporcionar colesterol a los diferentes tejidos, el hígado secreta partículas de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) compuestas por triglicéridos, ésteres de colesterol y apoproteínas C, E y B-100. La captación de triglicéridos de VLDL por el tejido adiposo y el músculo convierte estas partículas en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). El receptor de LDL, presente a la concentración más alta en el hígado y las glándulas suprarrenales pero también en el resto de tejidos, reconoce los componentes de apo E y apo B-100 de IDL. Por tanto, en condiciones normales, las IDL se eliminan en su mayor parte del torrente sanguíneo mediante captación mediada por el receptor de LDL. Las IDL restantes se convierten en LDL, que se captan también mediante el receptor de LDL que reconoce el componente de apo B-100. El aclaramiento del colesterol del organismo se lleva a cabo mediante el hígado, en el que se convierte en ácidos biliares y se secretan en el tubo digestivo. Aunque la mayor parte del colesterol se reabsorbe en el íleo terminal para la reutilización hepática, esta ruta proporciona la vía de salida.

45

Por tanto, la presencia de receptores de LDL no funcionales que no pueden eliminar IDL ni LDL de la sangre da como resultado niveles de LDL sérico elevados, y por tanto colesterol sérico total. Esto es responsable de la deposición de colesterol en las paredes arteriales y por tanto, de la aterosclerosis.

50

El conejo Watanabe con hiperlipidemia hereditaria (WHHL) se ha usado previamente para estudiar la eficacia de las técnicas de terapia génica para corregir la hipercolesterolemia. Una delección en marco de 12 nucleótidos en el dominio de unión a ligando del receptor de LDL, similar a una clase de mutación encontrada en pacientes con HF, da como resultado síntomas, evolución e histopatología paralelos a los de la HF.

55

Materiales y métodos

60

Construcción de los plásmidos de ADN

Los ADN de plásmidos usados en este trabajo son pLDLR-17, PCK-hLDLR, PCK-rLDLR y SV40-luciferasa. pLDLR-17 se proporcionó por el Dr. David Russell (Universidad de Texas, Medical Center, Dallas) y consiste en el potenciador/promotor del citomegalovirus (CMV) unido al ADNc del receptor de LDL humano. Contiene un fragmento de ADN que corresponde a la región no traducida en 5' (UTR) del ARN del virus del mosaico de la alfalfa 4 (VMA4) unido al ADNc del receptor de LDL humano. Esta secuencia actúa como potenciador de la traducción disminuyendo los requisitos de factores de iniciación en la síntesis de proteínas. El plásmido PCK-hLDLR se ha construido subclonando el ADNc del receptor de LDL del pLDLR-17 en un vector pTZ18R (Pharmacia) que contiene

65

ES 2 316 148 T3

el promotor de la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) (-460 a +73) y un intrón y una señal de poliadenilación del antígeno T pequeño del virus del simio 40 (SV40). En un procedimiento de dos etapas, se escindió el ADNc del receptor de hLDL con SacI y SmaI del pLDLR-17 y se formaron extremos romos usando ADN polimerasa de T4. El fragmento con extremos romos se subclonó en el sitio de HincII de un vector pTZ18R. Entonces se escindió el ADNc con XbaI y SalI y se introdujo en los sitios homólogos del plásmido pTZ18R-poliA de SV40-promotor de PEPCK. Para la construcción de pPCR-rLDLR, se subclonó el fragmento EcoRI-EcoRI de prLDLR-9 (proporcionado por el Dr. James Wilson, Universidad de Pensilvania) que contenía el ADNc del receptor de LDL de conejo en el sitio de EcoRI de un pBluescript (Stratagene). Se digirió esta construcción con SacI y se formaron extremos romos y entonces se digirió con XbaI, y se subclonó direccionalmente en los sitios de HindIII con extremos romos - XbaI de un vector pTZ18R que contenía el promotor de PEPCK (-460 a +73) y un intrón y una señal de poliadenilación del antígeno T pequeño del SV40. El plásmido SV40-luciferasa (Promega) contiene el potenciador y el promotor viral del SV40 ligado al gen de la luciferasa de *P. pyralis* insertado en el vector pUC19 (Pharmacia).

15 *Formación del complejo de poli-L-lisina-ADN*

Producción de la poli-L-Lisina galactosilada. Se trató con galactosa la poli-L-lisina tal como se describió (PNAS). Se hicieron reaccionar dos mg de poli-L-lisina-HBr (Sigma P-7890, longitud de cadena promedio, 100) con 85 mg de fenil-isotiocianato de a-D-galactopiranosilo (Sigma G-3266). Se ajustó la disolución hasta pH 9 mediante la adición de un volumen 1/10 de carbonato de sodio 1 M, pH 9. Se protegió el tubo de la luz mediante una lámina de aluminio y se mezcló durante 16 horas a temperatura ambiente, entonces se dializó usando tubos de diálisis Spectra-Por (punto de corte de 3500 de PM) frente a 500 ml de NaCl 5 mM durante 2 días con cambios frecuentes de tampón (4 cambios/día). La reacción es estequiométrica y dio como resultado la galactosilación del 0,8 al 1% de los grupos NH₃ presentes en la disolución.

Protocolo básico para la condensación de ADN. Se preparó el ADN de plásmido usando técnicas convencionales. Se resuspendió el ADN en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, que contenía EDTA 1 mM y se determinó la concentración del ADN espectrofotométricamente. Se trató la preparación de ADN dos veces con ARNasa A+T1. Esta etapa garantiza que no está presente ARN en la disolución (el ARN inhibe la condensación de ADN mediante la poli-L-lisina). Se usó en etapas adicionales una disolución que contenía una alta concentración de ADN (1,5-2 mg/ml). Un ejemplo de un protocolo típico para la condensación de ADN se describe tal como sigue:

- a) Se agitan con vórtex 300 mg de ADN en 200 ml de NaCl 0,75 M (añadidos a partir de una disolución de NaCl 5 M) a velocidad media, usando un aparato VIBRAX (IKA-VIBRAX-VXR). Esta etapa es necesaria para aumentar la longitud eficaz del polímero de ADN en disoluciones con alto contenido en sal, logrando de ese modo la unión eficaz del resto de poli-L-lisina a la estructura principal del ADN.
- b) Se añaden gota a gota 120 mg de poli-L-lisina o poli-L-lisina galactosilada (longitud de cadena promedio de 100) en 200 ml de NaCl 0,75 M (añadidos a partir de una disolución de NaCl 5 M) a lo largo de un periodo de 30 minutos a 1 hora en alícuotas de 5 μ l. Esta cantidad se traduce en una razón molar de 1 grupo PO₄⁻ de ADN con respecto a 1 grupo NH₃⁺ de portador.
- c) La disolución se vuelve turbia al final del proceso. Se añadieron gota a gota alícuotas de tres μ l de NaCl 5 M a la disolución con agitación con vórtex hasta que desapareció la turbidez tal como se monitorizó a simple vista. Este proceso es lento, permitiendo 60 segundos entre la adición de cada nueva alícuota de NaCl 5 M. Entonces se somete la disolución a monitorización espectroscópica de difracción circular (DC). También se analizaron las disoluciones de complejos de ADN/poli-L-lisina usando un microscopio electrónico JEOL-100C. Se completa el proceso de condensación cuando se observa el espectro de diagnóstico del complejo de ADN y se establece además por ME. Para las preparaciones posteriores del complejo de ADN que consiste en el mismo ADN de plásmido a la misma concentración de nucleótido, puede seguirse el protocolo sin monitorizar con DC. Cuando se usa una concentración diferente de ADN o un plásmido diferente debe repetirse la monitorización con DC.

55 *Animales*

Se usaron en estos estudios seis conejos Watanabe macho adultos (de 2,8-3,2 Kg de peso corporal). Estos animales se han adquirido de una colonia establecida en los Institutos Nacionales de Salud. Con el fin de introducir el complejo de ADN en el animal, se lleva a cabo una única inyección de 3-10 ml de la disolución de complejo de ADN (NaCl ~400-900 mM) en la vena marginal de la oreja del conejo. Se extrajeron aproximadamente 1,5 ml de sangre de la arteria de la oreja a las 4 p.m. Se llevó a cabo la determinación de la concentración del colesterol sérico en el Laboratorio Clínico de Hospitales Universitarios de Cleveland a partir de 300 μ l de suero. A diferentes puntos de tiempo tras la introducción del complejo de ADN, se sometió un conejo a una biopsia del hígado. Se aisló el ADN total a partir de la muestra hepática y se sometió a amplificación por PCR con el fin de detectar la presencia del ADN transferido. Se trató el conejo n° 774 con lovastatina (Mevacor, Merck y Dohme) por vía oral a una dosis de 10 mg por día.

ES 2 316 148 T3

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el fin de detectar la presencia del ADN transferido en el hígado del animal tratado, se aisló el ADN total a partir de la muestra hepática obtenida tras la biopsia. En el caso del conejo n° 737, se amplificó entonces el ADN de interés por PCR usando un cebador en el sentido 5' correspondiente a las posiciones 32-50 en el exón 1 de la UTR en 5' del gen de PEPCK y un cebador en el sentido 3' complementario a los nucleótidos 589-607 del ADNc del receptor de LDL humano. El fragmento amplificado corresponde a una banda de 1100 pb tras la hibridación con un fragmento de 700 pb correspondiente al extremo en 5' del ADNc del receptor de LDL humano marcado con 32P-dCTP. Se usarán cebadores apropiados correspondientes al gen del receptor de hLDL del CMV quimérico para la amplificación por PCR del plásmido transferido a partir del tejido del hígado obtenido del conejo n° 774.

Elisa

Se incubaron alícuotas de 75 µl correspondientes a 1 µg de ADN de cualquier complejo de ADN/poli-L-lisina galactosilada, ADN de plásmido o poli-L-lisina galactosilada recién preparados, durante la noche a 4°C para recubrir cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Al día siguiente se lavaron los pocillos tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), entonces se bloquearon durante 2 horas a 37°C con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en PBS y se lavaron 3 veces con el tampón de lavado que contenía BSA al 1% y Tween-20 al 0,5% en PBS. Se añadieron a los pocillos setenta y cinco µl de suero del conejo n° 774 obtenido a diferentes puntos de tiempo antes y tras la administración repetida del complejo de ADN a diluciones de 1:3 y 1:30 y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Entonces se lavaron los pocillos con tampón de lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario a dilución 1:3000. El anticuerpo secundario consiste en un anticuerpo monoclonal de ratón frente a inmunoglobulinas de conejo conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma). Tras un lavado final con tampón de lavado, se añadió el sustrato pNPP a 1 mg/ml en tampón de glicina a los pocillos para desarrollar la reacción y se tomaron lecturas espectrofotométricas a 410 nm en un lector de ELISA automatizado Dynatech. Se eligieron para la comparación los valores tomados a 120 minutos.

Resultados

1. Conejo n° 676: inyección del complejo de poli-L-lisina/ADN que contiene 3 mg del gen del PCK-hLDLR quimérico

En un primer conjunto de experimentos, se condensaron 3 mg y 9 mg de pPCK-hLDLR con poli-L-lisina galactosilada usando la técnica desarrollada en el laboratorio y se inyectaron en la circulación periférica de conejos Watanabe.

El promotor del gen para la forma citosólica de la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) de la rata se ha caracterizado en detalle. Este promotor se utilizó en estos experimentos porque se expresa a un alto nivel en el hígado y su expresión puede controlarse mediante la dieta y hormonas. La inanición y una dieta libre de hidratos de carbono, con alto contenido en proteínas estimulan la transcripción del gen de PEPCK mientras que una dieta con alto contenido en hidratos de carbono reduce la transcripción del promotor de PEPCK. Además, el AMPc y los glucocorticoides inducen, y la insulina inhibe, la expresión del gen de PEPCK en el hígado. El promotor de PEPCK es por tanto adecuado para la regulación de un gen estructural unido introducido en el hígado y se usó en los primeros experimentos para la expresión hepática del receptor de LDL.

En el primer enfoque, se inyectó el complejo de poli-L-lisina/ADN que contenía 3 mg de ADN. Se decidió esta dosis básica de ADN basándose en experimentos previos realizados en ratas. Tal como se muestra en la figura 13, la administración de una disolución de complejo de ADN que contenía 3 mg del plásmido pPCK-hLDLR en un estado relajado al conejo n° 676 no dio como resultado una disminución significativa de los niveles de colesterol sérico total. Una segunda inyección de complejos de ADN condensados apropiadamente que contenían 3 mg del mismo ADN produjo una reducción del 20% de los niveles de colesterol en sangre. Cuatro semanas tras esta segunda administración, el colesterol volvió a aproximadamente los niveles antes del tratamiento, alcanzando un pico a aproximadamente los 35 días.

Una disminución del 20% en los niveles de colesterol sérico total resultantes de la expresión del gen del receptor de PCK-hLDL será probablemente útil pero no aliviará totalmente el trastorno en los pacientes con HF. El número de complejos de poli-L-lisina/ADN correspondientes a 3 mg de ADN que se han introducido en el animal en la primera aproximación a estos experimentos representa el 0,01% del número total de receptores de asialoglicoproteínas en el hígado. En consecuencia, ha de esperarse una correlación lineal entre la concentración creciente de complejos de ADN y la expresión del gen del receptor de PCK-hLDL.

2. Conejo n° 737: inyección del complejo de poli-L-lisina/ADN que contiene 9 mg del gen del PCK-hLDLR quimérico

En el segundo experimento, se administraron al conejo n° 737 9 mg del gen del PCK-hLDLR condensado apropiadamente con poli-L-lisina galactosilada. Tal como se muestra en la figura 14, el tratamiento dio como resultado

una reducción del 38% de los niveles de colesterol sérico total que duró aproximadamente 5 semanas. Por tanto, un aumento de 3 veces de la dosis del complejo de ADN dio como resultado una reducción de 2 veces de los niveles de colesterol sérico total.

5 *3. Conejo n° 16: inyección del complejo de ADN que contiene 3 mg del gen del hLDLR del CMV*

El promotor para la forma citosólica del gen de PEPCK tiene la ventaja de dirigir la expresión en el hígado casi específicamente y de un modo regulado. Aunque ni son fisiológicos ni están regulados, los promotores virales confieren altos niveles de expresión a genes estructurales unidos. Se ha usado con éxito el potenciador/promotor del CMV quimérico para terapia génica en conejos WHHL usando adenovirus para la transferencia génica. Recientemente, Kozarsky *et al* han notificado que el potenciador/promotor del CMV y el promotor de β -actina/CMV quimérico fueron los promotores de elección con el fin de obtener la mayor expresión del gen del receptor de LDL humano transferido a conejos WHHL usando infección adenoviral. Basándose en estas observaciones, se inyectó el gen del hLDLR del CMV quimérico con el fin de aumentar el nivel de expresión del gen del receptor de LDL humano en el hígado de conejos WHHL.

La administración de una disolución de complejo de ADN que contiene 3 mg del gen del receptor de hLDL del CMV quimérico al conejo n° 16 dio como resultado una reducción máxima del 30% de los niveles de colesterol sérico total (figura 15). Once semanas tras la inyección, los niveles de colesterol siguen siendo un 20% inferiores a los observados antes del tratamiento.

25 *4. Conejo n° 775: administración repetida del complejo de ADN que contiene 3 mg del pCMV-hLDLR*

Se inyectaron tres mg del pCMV-hLDLR contenido en una disolución de complejo de ADN en el conejo n° 775, produciendo una reducción máxima del 24% de la concentración del colesterol en sangre 3 semanas tras el tratamiento (figura 16A).

Se notifica que la vida de los hepatocitos es de aproximadamente 108-150 días, de modo que la persistencia del ADN introducido es limitada. Además, puede ser de interés un efecto terapéutico más largo tras una única inyección del complejo de ADN. Por tanto, puede ser necesario inyectar a un paciente múltiples veces para garantizar el nivel apropiado de receptor de LDL en el hígado. Se sometió a prueba el efecto de inyectar el complejo de ADN varias veces en el mismo animal. Se ha vuelto a inyectar al conejo n° 775 dos veces 3 mg del complejo de ADN del pCMV-hLDLR, estando espaciadas cada inyección por 3 semanas. La administración repetida del complejo no dio como resultado una reducción significativa adicional de los niveles de colesterol sérico total.

40 *5. Conejo n° 774: administración repetida del complejo de ADN que contiene 3 mg del pCMV-hLDLR*

Se inyectaron al conejo n° 774 3 mg del complejo pCMV-hLDLR. Se observó una disminución del 36% de los niveles de colesterol en sangre (figura 16B). Hasta la fecha se han llevado a cabo cuatro inyecciones de nuevo una vez cada 2 semanas con la misma cantidad de complejo de ADN. Dos de ellas han dado como resultado un efecto mínimo mientras que las otras dos una reducción nula de los niveles de colesterol sérico total. Sin embargo, tras cinco administraciones de la disolución de complejo de ADN que contiene 3 mg del pCMV-hLDLR, la concentración de colesterol ha caído aproximadamente un 48% con respecto a los niveles antes del tratamiento.

50 *6. Administración de lovastatina al conejo n° 774: inhibición de la síntesis endógena de colesterol*

Tal como se describió en la introducción, existe una ruta para la síntesis de colesterol dentro de la célula. Si la represión de esta ruta metabólica falla incluso cuando se suministra al hepatocito colesterol a través de la captación mediante el receptor de LDL humano, podría inhibirse posiblemente el aclaramiento adicional de colesterol. La lovastatina es un inhibidor conocido de la HMG CoA reductasa, la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de colesterol. Por tanto, el tratamiento con este fármaco de un conejo al que se ha inyectado repetidas veces el complejo de ADN debe indicar si la síntesis de colesterol era el factor limitante para una reducción adicional de los niveles de colesterol sérico total. El conejo n° 774 se ha tratado con 10 mg de lovastatina por día durante 10 semanas. Se ha observado una reducción del 20% adicional de los niveles de colesterol. La inhibición de la ruta endógena para la síntesis de colesterol ha llevado por tanto la concentración de colesterol del conejo n° 774 hasta el 40% de la anterior a la primera transferencia génica (Figura 16B).

65 *7. Inyección del complejo de ADN que contiene un ADN irrelevante*

Con el fin de controlar una posible reducción artefactual de los niveles de colesterol sérico total inyectando a conejos los complejos de ADN/poli-L-lisina galactosilada en una disolución con alta concentración de NaCl (~900 mM), se ha administrado una disolución de complejo de ADN que contiene un ADN irrelevante tal como el gen de la luciferasa en el conejo n° 775. La figura 17 muestra que la inyección da como resultado una reducción no significativa

($\leq 12\%$) y transitoria (≤ 5 días) de la concentración de colesterol sérico. Además, también se inyectaron complejos de ADN inapropiadamente condensado que codifican para el gen del PCK-hLDLR. Dan como resultado también una disminución nula o mínima y transitoria de los niveles de colesterol en sangre. Por tanto, se ha confirmado que la reducción de los niveles de colesterol sérico total tras la inyección de partículas de ADN apropiadamente condensado que codifican para el gen del receptor de LDL humano no es un resultado ni de la alta concentración de NaCl de la disolución ni de la presencia de partículas de ADN/poli-L-lisina galactosilada.

8. Detección del ADN transferido en el hígado del conejo n° 774

El complejo de ADN usado en este proyecto se dirige hacia el receptor de la asialoglicoproteína hepática usando galactosa como ligando. Se sabe que los macrófagos tienen un receptor similar que puede eliminar partículas galactosiladas mayores de 15 nm del torrente sanguíneo.

Con el fin de probar que el ADN del receptor de LDL humano se suministró a los hepatocitos, se realizó una biopsia del hígado en el conejo n° 737, 60 días tras la inyección de 3 mg del gen del receptor de PEPCK-hLDLR. Se aisló el ADN total y se sometió a amplificación por PCR con los cebadores descritos anteriormente, junto con el ADN total del hígado de un conejo al que no se ha inyectado. Se detectó la banda esperada de 1.100 pb en el carril correspondiente al conejo tratado pero no en el animal sin tratar.

9. Evaluación de la respuesta inmunitaria del conejo n° 774 tras la administración repetida del complejo de poli-L-lisina/ADN

En el campo de la terapia génica, la inmunogenicidad del vehículo de suministro es a menudo un problema. Mientras que los vectores retrovirales pueden escapar de la detección por el sistema inmunitario, se ha notificado que los vectores adenovirales no lo hacen. El éxito de una segunda administración de partículas adenovirales para la transferencia en conejos Watanabe del gen del receptor de LDL humano se bloqueó mediante la aparición de una respuesta inmunitaria frente a las proteínas virales (REF Kozarsky).

El sistema para la transferencia génica mediada por el receptor no se ha estudiado en profundidad con respecto a su inmunogenicidad. Se ha notificado que tras la administración repetida de un complejo de ADN/poli-L-lisina-asialoorosomucoide en ratones, pueden detectarse anticuerpos neutralizantes frente a los componentes asialoorosomucoide y poli-L-lisina del complejo pero no frente al ADN a una dilución 1:1000 (REF). Ferkol *et al* también notificó la detección de anticuerpos circulantes a una dilución 1:2000 frente al fragmento Fab-poli-L-lisina pero no frente al resto de ADN de un complejo tras la administración repetida en ratones.

Por tanto, se necesitaba someter a prueba si el uso de poli-L-lisina galactosilada para la condensación de ADN también era inmunogénico. Para este fin, se evaluó la presencia de anticuerpos frente al complejo de ADN-poli-L-lisina galactosilada en sueros obtenidos del conejo n° 774 a diferentes puntos de tiempo antes y tras la administración repetida del complejo. En un primer experimento, la disolución del complejo de ADN que contenía 1 μ g de ADN se adsorbió a los pocillos de una placa de microtitulación y luego se incubaron con sueros a diluciones 1:3, 1:30 y 1:300. Se detectaron los anticuerpos unidos con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Hay un aumento de anticuerpos en el suero del conejo n° 774 tras la administración repetida del complejo de ADN. De hecho, empiezan a ser detectables tras la tercera inyección del complejo de ADN pero no tras la primera o la segunda. Además, ha de enfatizarse que sólo a diluciones 1:3 y 1:30 pudo detectarse una respuesta.

Se llevó a cabo un segundo experimento con el fin de establecer qué resto del complejo de ADN es responsable de la inducción de la respuesta inmunitaria débil aunque clara. Entonces se adsorbió a los pocillos de la placa de microtitulación o bien 1 μ g de ADN, complejo de ADN recién preparado que contenía 1 μ g de ADN o bien la cantidad correspondiente de poli-L-lisina galactosilada. Los resultados muestran que el resto de poli-L-lisina galactosilada explica casi por completo la inducción de una respuesta inmunitaria frente al complejo en conejos Watanabe.

Discusión

Los datos presentados en este documento sugieren fuertemente que el método ha podido corregir al menos parcialmente la hiperlipidemia en conejos WHHL.

Las figuras 13-16 muestran claramente que una única inyección del complejo de ADN que contiene el gen del receptor de LDL humano da como resultado una disminución significativa de los niveles de colesterol sérico total en conejos WHHL. Esta reducción oscila desde el 20% en el conejo n° 676 hasta el 38% en el conejo n° 737. En cambio, se muestra que la administración de un ADN de plásmido no relevante tal como pSV40-luciferasa (figura 17) o de un plásmido que codifica el receptor de LDL humano que no está apropiadamente condensado (figura 17) da como resultado una disminución nula o no significativa del colesterol sérico.

Se han usado dos regiones de promotor diferentes para la regulación de la expresión del gen del receptor de LDL humano. Esto sugiere provisionalmente que la región reguladora del CMV confiere niveles superiores de expresión en el hígado de conejos que el promotor para la forma citosólica del gen de PEPCK de rata. Esta observación puede no ser correcta para cada especie. La actividad PEPCK en el hígado de conejos se caracteriza por ser sólo del 10% debida a la isozima citosólica. Además, la estimulación del gen citosólico da como resultado sólo una inducción de 2 veces de la actividad. Por tanto, el promotor de PEPCK puede no ser la mejor elección para esta especie. Pero el uso de un promotor fisiológico y estrictamente regulado como el de para el gen de PEPCK puede ser el de elección con respecto a un promotor fuerte pero viral como el CMV en otra especie o para el tratamiento de otras enfermedades genéticas.

Con el fin de determinar el transcurso de tiempo del efecto terapéutico, se sometieron los conejos nº 676, nº 737 y nº 16 a una única inyección del complejo de ADN que contenía el gen del receptor de LDL humano. La reducción de los niveles de colesterol en sangre persistía durante 4 semanas en el conejo nº 676 y durante 5 semanas en el conejo nº 737. Basándose en experimentos previos realizados en ratas en las que se mostró la expresión del gen de pPEPCK-factor IX humano transfectado durante hasta 140 días, se esperaba una duración más larga del efecto. Diferentes factores pueden explicar esta terminación prematura del efecto correctivo de la hiperlipidemia. Se sabe bien que los conejos son altamente inmunogénicos y que las ratas no lo son. La síntesis en los conejos WHHL de una proteína humana tras la introducción del gen receptor de LDL humano pudo desencadenar posiblemente una respuesta inmunitaria frente a la proteína foránea, aunque existe un 80% de homología entre ambas especies al nivel de proteína. Además, los hepatocitos parecen tener una vida limitada. Algunos estudios en ratas indican que la vida de las células hepáticas es de 108-150 días. Basándose en esta observación, el 40% del aumento de los niveles de colesterol 5 semanas tras la introducción del complejo de ADN pudo resultar de la renovación fisiológica de las células del hígado. Sin embargo, este hecho no puede explicar el 100% del aumento. Además, sería contradictorio con la expresión a largo plazo observada en ratas a las que se inyectó pPEPCK-FIX humano. Otra posible explicación para la terminación prematura de los efectos terapéuticos resultantes de la expresión del gen del receptor de LDL humano sería la inactivación o degradación del ADN transferido.

El número teórico de complejos de poli-L-lisina-ADN que pueden formarse con 3 mg de ADN representa el 0,01% del número total de receptores de asialoglicoproteína en el hígado. En consecuencia, se esperaría que un aumento en la dosis del complejo de ADN de como resultado un efecto terapéutico potenciado. Para estudiar la relación dosis-respuesta, se han inyectado al conejo nº 676 3 mg de pPCK-hLDLR y al conejo nº 737 9 mg del mismo ADN. Tal como se muestra en las figuras 13 y 14, un aumento de 3 veces de la dosis de complejo de ADN da como resultado una reducción superior a 2 veces de los niveles de colesterol. Aunque estos datos no establecen una correlación lineal, un aumento de la dosis da como resultado claramente una respuesta potenciada.

Si se considera el complejo de poli-L-lisina/ADN como un posible fármaco, es deseable que pueda administrarse de manera repetida al mismo animal. Por este motivo, el conejo nº 774 se ha sometido a administración repetida de 3 mg del ADN del hLDLR del CMV una vez cada 2 semanas. Tras una disminución inicial del 36% de los niveles de colesterol sérico tras la primera inyección, el efecto de la administración repetida del complejo de ADN no ha sido constante. El conejo nº 775 se ha tratado 3 veces con 3 mg del ADN del hLDLR del CMV. De nuevo, tras una reducción inicial del 24% de los niveles de colesterol, los tratamientos segundo y tercero no han dado como resultado un efecto claro. Puede encontrarse tres posibles explicaciones para estos resultados. En primer lugar, que los complejos de ADN no estaban apropiadamente condensados. El ADN tras la condensación con poli-L-lisina puede dar como resultado tres estructuras diferentes: agregada (partículas condensadas fuera de la disolución), estrictamente condensada y relajada. Sólo el ADN estrictamente condensado en pequeñas partículas es eficaz para suministrar genes *in vivo*. En segundo lugar, que los conejos están produciendo anticuerpos neutralizantes frente al vehículo. Existen algunos datos preliminares con respecto a la respuesta inmunitaria del conejo nº 774 frente al complejo de poli-L-lisina-ADN. En tercer lugar, el aclaramiento adicional del colesterol de la sangre está limitado por una insuficiencia en el metabolismo endógeno del colesterol en el hepatocito del conejo Watanabe mutante. Con el fin de someter a prueba esta última hipótesis, se trató el conejo nº 774 con lovastatina (10 mg/día), un inhibidor conocido de la HMG CoA reductasa, durante 10 semanas. La observación de una reducción adicional del 20% de la concentración de colesterol sugiere que la inhibición de la síntesis de colesterol en el hepatocito no es completa incluso cuando se suministra colesterol a la célula tras la captación de LDL mediante el receptor de LDL heterólogo.

Resultados preliminares con respecto a la inmunogenicidad del complejo de ADN/poli-L-lisina galactosilada indican que la administración repetida desencadena la aparición de una respuesta inmunitaria en el conejo Watanabe. También muestran que los anticuerpos circulantes pueden reconocer a la poli-L-lisina galactosilada pero no al resto de ADN. Estos resultados concuerdan con informes anteriores con respecto a la inmunogenicidad de un complejo de ADN/poli-L-lisina-asialoorosomucoide y de un complejo de ADN/poli-L-lisina-Fab. Aunque está claro que el complejo diseñado en el laboratorio puede de hecho provocar una respuesta inmunitaria tras la administración repetida en el mismo animal, ha de observarse que sólo pudo detectarse anticuerpos circulantes a diluciones muy inferiores (1:3 y 1:30 en comparación con 1:1000 y 1:2000 en su caso). Esta observación podría ser indicativa de su mejor capacidad de escapar de la detección por el sistema inmunitario. No obstante, se necesita someter a prueba el suero de más animales sometidos a la administración repetida del complejo de ADN para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes frente al complejo con el fin de concluir que la inmunogenicidad es responsable de que las inyecciones repetidas no puedan disminuir adicionalmente los niveles de colesterol en los conejos Watanabe.

Ejemplo 5

*Inyección directa de ADN acomplejado frente a desnudo en el músculo*5 *Métodos*

Se utilizaron tres ratas por conjunto experimental en los experimentos que implicaban inyección directa en el tejido del complejo de ADN. Se inyectaron cien microgramos de ADN desnudo que contenía el gen de la luciferasa de SV40 en el hígado y músculo abdominal de uno de los animales. Se complejó la misma cantidad del plásmido SV40-luciferasa con poli-L-lisina y se condensó tal como se describió anteriormente y se inyectó también en el hígado y músculo abdominal de los otros dos animales. Se sacrificaron las ratas 48 horas tras la inyección. Se obtuvo un trozo de hígado y músculo abdominal para la medición de la actividad luciferasa.

15 *Resultados*

Evaluación de inyecciones directas del complejo de ADN en el hígado y músculo de ratas. Se ha notificado la transferencia satisfactoria de ADN desnudo en células musculares de ratones mediante inyección directa. Se observaron niveles de expresión altos y prolongados de un gen quimérico que contenía la región reguladora del virus del sarcoma de Roux (VSR) unida al ADNc de la luciferasa en los experimentos. Se han investigado las ventajas de utilizar ADN acomplejado con poli-L-lisina y condensado con respecto a utilizar ADN libre, cuando el ADN ha de transferirse en el hígado o el músculo mediante inyección directa. Se han usado tres ratas para estos experimentos. Se inyectaron cien microgramos de ADN desnudo que codifica la luciferasa del SV40 en el hígado y músculo abdominal de uno de los animales. Se inyectó la misma cantidad del plásmido pSV40-luciferasa acomplejado con poli-L-lisina y condensado tal como se describió anteriormente también en el hígado y músculo abdominal de los otros dos animales. Se sacrificaron las ratas 48 horas tras la inyección. Se homogeneizó un trozo de hígado y músculo abdominal en tampón de lisis y se analizaron los lisados celulares para determinar la actividad luciferasa. Todas las mediciones de la luciferasa se realizaron por triplicado, se expresaron como un promedio de los valores y se normalizaron para la proteína total. La figura 9 muestra las unidades de luciferasa integradas por mg de proteína en los dos conjuntos diferentes de animales. La eficacia de la transfección de ADN acomplejado con poli-L-lisina y condensado parece ser ligeramente mayor cuando se inyectó en el hígado. Sin embargo, parece dar como resultado una eficacia mucho mayor cuando se introdujo en el tejido muscular. Se observa una actividad luciferasa 20 veces superior en la muestra del músculo inyectado con el ADN condensado en comparación con el inyectado con el ADN desnudo. Se cree que el ADN sumamente condensado y empaquetado puede protegerse frente a nucleasas y puede ser más estable. Además, las poli-L-lisinas pueden aumentar la eficacia del transporte nuclear una vez dentro de la célula. En primer lugar, el pequeño tamaño del complejo puede permitir su paso a través de los poros nucleares y en segundo lugar, se sabe que cadenas de aminoácidos cargados positivamente como lisina y arginina son señales de localización nuclear (NLS) en diversas proteínas nucleares. Con respecto a las diferencias encontradas entre la respuesta en el hígado y en el músculo, lo más probable es que la estructura interconectada característica de las células del músculo esquelético las haga una mejor diana para la difusión pasiva de ADN de célula a célula. Esto permitiría fácilmente la distribución del complejo de ADN a lo largo del tejido muscular y su transporte a los núcleos.

45 Ejemplo 6

*Inyección directa de ADN desnudo frente a condensado en el cerebro: transferencia génica de células del ganglio retinal in vivo*50 *Introducción*

La inserción de ADN foráneo en neuronas adultas tiene potencial para el estudio de fisiología neuronal normal y para el tratamiento de enfermedades neurales. La transferencia génica en neuronas se ha logrado usando vectores virales, sin embargo requiere metodologías sofisticadas y normalmente las células transfectadas no pueden limitarse a ningún tipo de neurona particular.

El transporte retrógrado axonal es un proceso fisiológico continuo que se ha encontrado que transporta una gran variedad de diferentes tipos de moléculas. Se sabe que muchas moléculas se incorporan en la luz del axón a través de la endocitosis, ya sean partículas adsorbidas o en fase fluida. En la situación en la que se han cortado los axones, se postula que las partículas solubles del espacio extracelular pueden difundir en el axón y desplazarse hacia el soma.

En los presentes experimentos se sometió a prueba si ADN de plásmido desnudo o condensado en un esferoide compacto, aplicado al extremo cortado de los axones de células del ganglio retinal en el nervio óptico o al tectum del cerebro se transporta de nuevo al soma y se expresa para dar proteínas.

ES 2 316 148 T3

Métodos

Se utilizaron tres plásmidos bajo el control de uno de tres promotores que son eficaces en una amplia variedad de tipos de células eucariotas: RSV-lacZ, CMV-lacZ y SV40-luc. Se prepararon a diferentes concentraciones que oscilan desde 1 hasta 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. José Carlos Perales complejó pCMV-lacZ y pSV40-luc con poli-L-lisina (1:1) (PNAS, 1994).

Se realizó la evaluación del transporte retrógrado del complejo del plásmido hacia los somas de células del ganglio retinal utilizando microscopía epifluorescente. Se usó FITC-poli-L-lisina para formar complejos con pCMV-lacZ. Para evaluar el transporte retrógrado del plásmido puro, se digirió pRSV-lacZ en un sitio utilizando Hind III. Entonces se unió biotina-dUTP a los extremos OH en 3' de pRSV-lacZ mediante la reacción con desoxinucleotidil transferasa terminal. Entonces se precipitó el plásmido y se lavó con biotina-dtyrp libre y se resuspendió en 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Se anestesiaron ratas Wistar adultas y se expusieron sus nervios ópticos. Se aplicaron 1,5 μl de la disolución de plásmido (diferentes concentraciones y plásmidos) cubriendo el nervio óptico. Entonces se cortaron los axones del nervio óptico evitando el suministro de sangre retinal. Se aplicaron otros 1,5 μl de la misma disolución de plásmido en espuma de gel empapada. Entonces se cerró la conjuntiva. Se realizó el mismo procedimiento en el ojo contralateral usando plásmido no específico. Se sacrificaron los animales tres días más tarde. Para la inyección directa en la zona tectal, se anestesiaron los animales y se les inyectó estereoscópicamente en la zona tectal del cerebro ADN desnudo o ADN condensado.

- Para ensayos de β -galactosidasa líquida, se mantuvieron las retinas a -70°C hasta que se formaron lisados celulares mediante descongelación y congelación repetida. Se centrifugó el tejido a 12000 rpm durante 2 min. y se recogió el sobrenadante y se analizó para determinar el contenido en proteínas. Se incubaron volúmenes que contenían 360 μg de proteína durante la noche a 37°C en tampón A que contenía 15 mg/ml de rojo clorofenol B-D-galactopiranosido (CPRG). Se registró la absorbancia.

- Para ensayos de luciferasa, estos se realizaron en sobrenadantes de lisis de retinas a los que se añadió tampón de ensayo de luciferasa. Se pusieron las muestras en un luminómetro que se inyectó con D-luciferina y entonces se registró la luminiscencia.

- Para ensayos con β -galactosidasa *in situ* (para pRSV-lacZ y pCMV-lacZ), se fijaron las retinas en formaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,5%, PBS durante 30 min., se lavaron en PBS y se incubaron durante 6 h a 37°C en X-Gal 1 mg/ml, ferrocianuro de potasio 4 mM, ferricianuro de potasio 4 mM, MgCl_2 2 mM, PBS pH 7,3, Nonidet p-40 al 0,02%, desoxicolato al 0,01%. Entonces se enjuagó el tejido y se analizó inmediatamente. Se realizaron recuentos de las células marcadas de azul para estimar el porcentaje de células transfectadas.

Resultados

1) La administración del ADN de plásmido al extremo cortado de axones ópticos de rata da como resultado su transporte retrógrado al cuerpo celular. El campo doblemente marcado (microscopía confocal) de una retina 2 días tras la administración de complejo FITC-poli-lisina/pCMV-lacZ al extremo cortado del nervio óptico y después incubado en yoduro de propidio mostró que el FITC (verde), yoduro de propidio (rojo) y la mezcla de ambos núcleos doblemente marcados (amarillo), contados en campos aleatorizados representaban aproximadamente el 45% de la población de células del ganglio retinal.

Los campos microscópicos tomados a diferentes aumentos mostraron células coloreadas de azul en la capa de células del ganglio retinal tras el ensayo de β -galactosidasa *in situ* en la retina. Se administraron 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de pRSV-lacZ al nervio óptico cortado y se realizó una comparación con el ojo contralateral tratado con pSV40-luc. Se observó que las células positivas para la β -galactosidasa estaban en el intervalo de tamaño conocido sólo para las células del ganglio en la retina. Estas células se contaron en campos aleatorizados y se estimó que representaban el 35% de las células del ganglio totales.

2) El ADN de plásmido en células del ganglio retinal se expresa de manera dependiente de la dosis y el ADN condensado se expresa con eficacia superior.

La actividad luciferasa en retinas de ratas a cuyos nervios ópticos cortados se les administró pSV40-luc en concentraciones crecientes, en comparación con retinas simplemente axotomizadas, o tratadas con el plásmido no específico pCMV-lacZ (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), mostró un aumento de la actividad de pSV40-luc dependiente de la concentración.

Los resultados de actividad β -galactosidasa en retinas de ratas a cuyos nervios ópticos cortados se les administró pCMVlacZ, en comparación con retinas simplemente axotomizadas, o tratadas con plásmido no específico pSV40-luc (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), mostraron que la actividad más alta se registraba a partir de la concentración máxima de pCMV-lacZ. pCMV-lacZ acompañado con poli-lisina produjo actividad superior en β -galactosidasa que el plásmido no específico.

ES 2 316 148 T3

3) Este método puede usarse en la transferencia de genes específicos a tipos neuronales precisos a través de sus proyecciones.

4) Inyecciones intratectales de ADN de plásmido condensado con polilisina y desnudo pueden lograr altos niveles de expresión en el cuerpo celular de la neurona durante 20 días. Cuando el ADN no está condensado con polilisina, el nivel de expresión vuelve al inicial tras 10 días después de la inyección (figura 10).

Bibliografía

1. **Shapiro, J. T., et al., (1969)**. Deoxyribonucleic acid polylysine complexes. Structure and nucleotide specificity. *Biochemistry* 8:3219-3232.
2. **Haynes, M., et al., (1970)**. Structure of nucleic acid-polybase complexes. *Biochemistry* 9:4410-4416.
3. **Lang, D. (1973)**. Regular superstructures of purified DNA in ethanolic solutions. *J. Mol. Biol.* 78:247-254.
4. **Lerman, L. S. (1971)**. A transition to a compact form of DNA in polymer solutions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68: 1886-1890.
5. **Olins, D. E., et al., (1967)**. Model nucleoprotein complexes: Studies on the interaction of cationic homopolypeptides with DNA. *J. Mol. Biol.* 24:157-176.
6. **Miller, I. R., et al., (1969)**. *Biopolymers* 7:619.
7. **Carroll, D. (1972)**. Optical properties of deoxyribonucleic acid-polylysine complexes. *Biochemistry* 11:421-426.
8. **Cheng, S. M., et al., (1974)**. The thermal transition of "psi" DNA monitored by circular dichroism. *FEBS letters* 49: 37-42.
9. **Chenge, S. M., et al., (1975)**. Condensed states of nucleic acids. II. Effects of molecular size, base composition, and present of intercalating agents on the transition of DNA. *Biopolymers* 14:663-677.
10. **Onge, E. C., et al., (1976)**. Chromatin models. *The ionic strength dependence of model histone-DNA interactions: circular dichroism*.
11. **Moran, F., et al., (1989)**. Kinetic analysis of Ψ -DNA structure formation induced by histone H1 and its C-terminal domain. *Biophysical Chemistry* 21:133-141.
12. **Shih, T. Y., et al., (1970)**. *J. Mol. Biol.* 52:125.
13. **Cantor, K. P., et al., (1970)**. *J. Mol. Biol.* 49:213.
14. **Li, H. J. (1973)**. *Biopolymers* 12:287.
15. **Li, H. J., et al., (1973)**. *Biochemistry* 12:1763.
16. **Change, C., et al., (1973)**. Conformational studies of nucleoprotein. Circular dichroism of deoxyribonucleic acid base pairs bound by polylysine. *Biochemistry* 12:3026-3032.
17. **Gosule, L., et al., (1976)**. Compact form of DNA induced by spermidine. *Nature* 259:333-335.
18. **Gosule, L., et al., (1978)**. Condensation of phage DNA by polyamines. *Advances in polyamine research* 1: 201-215.
19. **Wu, C. H., et al., (1984)** *J. Biol. Chem.* 264 (29), 16985-16987.
20. **Wu, G. Y., et al., (1991)** *J. Biol. Chem.* 266 (22), 14338-14342.
21. **Neda, H., et al., (1991)** *J. Biol. Chem* 266 (22), 14143-14146.
22. **Wilson, J. M., et al., (1992)** *J. Biol. Chem.* 267 (2), 963-967.
23. **Chen, J., et al., (1993)** Presentado para publicación a *FASEB J.*.
24. **Ferkol, T., et al., (1993)** *FASEB J.*, 7;1081.

ES 2 316 148 T3

25. **Wagner, E., et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4255-4259.**
 26. **Laemmli, U. K. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: (11), 4288-4292.**
 5 27. **Lerman, L. S. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68 (8), 1886-1890.**
 28. **Post, C. B., et al., (1982) Biopolymers, 21, 2123-2137.**
 29. **Hatzoglou, M., et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:17285-17293.**
 10 30. **Monsigny, M., et al., (1984) Biol. Cell., 51, 187.**

15 TABLA 101

	Wu et al,	Wagner et al,	Presente invención*
[ADN] mg/ml	~ 1	~ 0,01	~ 1
Razón PO ₄ /NH ₃	~ 100	~ 1	~ 1,5
Tampón	NaCl 150 mM	Hepes 10 mM (pH 7), NaCl 150 mM	Variable [NaCl]
Método de compactación	Hibridación	Mezclado directo	Nucleación
Estructura del complejo de ADN	(Psi)	(Psi) o unimolecular	Unimolecular
Tamaño del complejo	~200 nm	80 nm	~ 10 nm
Herramientas de diagnóstico	Retardo en gel	Microscopía electrónica	Dicroísmo circular y microscopía electrónica
Expresión in vivo	Sí	No	Sí
Duración de la expresión	6 días	---	Al menos 140 días

*Realización preferida

ES 2 316 148 T3

TABLA 102

Nivel de expresión del gen de PEPCK-hFIX en los hígados de ratas a las que se inyectó el complejo de ADN

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

N° de rata	Días tras la inyección	Unidades de actividad hFIX
1	2	0,040
2	2	0,045
3	4	0,045
4	4	0,025
5	6	0,330
6	8	0,135
7	12	0,160
8	12	0,075
9	32	0,125
10	48	0,350
11	72	0,005
12	136	0,105

Tabla 103

Estado de ADN o complejo de ADN/polimeración	A simple vista (o turbidimetría a 400 nm)	Dicroísmo circular	Microscopia electrónica	Absorbancia a 260 nm
ADN normal (no acomplexado)	Sin turbidez. Disolución transparente.	Espectro de ADN normal, es decir, máximo a 220 y 269 nm; un mínimo a 245 nm y un punto cero a	Fibras muy delgadas (aproximadamente 1 nm de espesor o menos) y largas (aproximadamente 300-1.000 nm). (figura 1B)	Esta absorbancia es la referencia para los otros estados
Complejo condensado (producido por el polimeración)	Baja turbidez. Disolución casi transparente.	Idéntico al espectro de ADN bicatenario no unido (sin poli-L-lisina) en disolución; máximo positivo a 269 nm y muy poca contribución del enlace amida del péptido de poli-L-lisina al espectro a 220 nm (figura 1A)	Estructuras toroidales o esféricas aisladas individualmente. Para ADN de aproximadamente 5 kb, los toroides tienen un diámetro externo de aproximadamente 10-20 nm. Por supuesto que ADN más grande se compactará para formar toroides más grandes. Partículas electrodensas. Sin fibras. (figura 1D)	Aproximadamente el 20-30% de la absorbancia de referencia
Complejo relajado (producido por sal en exceso)	Sin turbidez. Disolución transparente.	Muy difícil de diferenciar a partir de la forma condensada. La	Fibras similares a varillas (normalmente 10-20 veces el diámetro de una fibra de	Aproximadamente el 80-100% de la absorbancia de

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

<p>Complejo precipitado (producido por el policación si existe un contenido en sal insuficiente)</p>	<p>Fibras de ADN en disolución.</p>	<p>única diferencia es que existe algo de contribución del enlace amida del péptido de poli-L-lisina al espectro a 220 nm (figura 1A)</p>	<p>ADN desnudo, es decir, normalmente 10-20 nm de espesor, y más largas de 60 nm) de ADN y estructuras toroidales ramificadas de tamaño aumentado (figura 1F)</p>	<p>referencia</p>
<p>Complejo agregado unimolecular</p>	<p>Sumamente variable desde material particulado fino hasta sumamente turbio</p>	<p>Espectro plano. (figura 1I)</p>	<p>Complejo de fibras de ADN macroscópicas (intervalo micrométrico).</p>	<p>Aproximadamente el 1% de la absorbancia de referencia</p>
<p>Complejo agregado multimolecular (producido por el policación si existe un contenido</p>	<p>Transparente</p>	<p>Desplazamiento hacia el rojo característico y elipticidad positiva en la banda de 300-320 nm</p>	<p>Estructuras toroidales unimoleculares que se aglutinan entre sí para formar cadenas aleatorias tamaño y forma heterogéneas</p>	<p>Aproximadamente el 10-20% de la absorbancia de referencia</p>
<p>Complejo agregado multimolecular (producido por el policación si existe un contenido</p>	<p>Transparente</p>	<p>Inversión característica en el máximo de espectro a 269 nm al negativo. Clara contribución del</p>	<p>Estructuras toroidales multimoleculares aisladas de tamaño variable dependiendo del número de moléculas de ADN</p>	<p>Aproximadamente el 100% de la absorbancia de referencia</p>

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

<p>existe un contenido en sal insuficiente)¹</p>		<p>Clara contribución del enlace amida del péptido de poli-L-lisina al espectro a 220 nm. (figura 1H)</p>	<p>moléculas de condensadas entre sí. Normalmente, el tamaño es de aproximadamente 10 a 70 veces el de los toroides unimoleculares (véase Wagner et al. y Shapiro et al.) (figura 1G)</p>	<p>ADN</p>
---	--	---	---	------------

¹ El ADN se agregará en complejos multimoleculares cuando la concentración de poli-L-lisina aumenta de repente en la disolución de ADN (es decir, añadiendo poli-L-lisina de manera muy rápida a la disolución de ADN con agitación con vórtex) o el mezclado directo de ADN y poli-L-lisina como en el método de Shapiro también usado por Wagner et al. La agregación en complejos multimoleculares también será el resultado del apareamiento de ambos componentes (poli-L-lisina y ADN) en un gradiente de concentración de NaCl en disolución (es decir el método de Wu y Wu).

ES 2 316 148 T3

TABLA 104

N° de Lys	ADN (% de super-enrollado)	[NaCl] inicial	[NaCl] final	[ADN] (mg/ml)	Estado físico**	Actividad†
15*	CMV-β-Gal (50)	151,6	200	0,2	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	+
20*	MT-hGH (100)	0	267	0,85	DC: ND EL: relajado Turbidez: ninguna	-
27*	PEPCK- hLDLR (100)	178	439	1	DC: ND EL: condensado Turbidez: baja	+++
56	RS-Tr (50)	803	1000	0,24	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	ND
56	CMV-β-Gal (50)	250	746	0,2	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	ND
56*	PEPCK- hFIX (50)	800	933	0,35	DC: ND EL: condensado Turbidez: baja	+++
56*	PEPCK- hFIX (50)	636	970	0,6	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	+++
109*	CMV-β-Gal	500	909	0,2	DC: +	+++

ES 2 316 148 T3

5		(50)				EL: ND Turbidez: baja	
10	109*	CMV- β -Gal (50)	689	1000	0,39	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	ND
15	109*	CMV- β -Gal (50)	616	1036	0,95	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	+++
20	109*	CMV- β -Gal (50)	735	941	0,39	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	+++
25	109*	CMV- β -Gal (50)	500	1031	0,7	DC: + EL: ND Turbidez: baja	ND
30	109	PEPCK- bGal (50)	617	1004	0,3	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	-
35	109*	PEPCK- bGal (50)	1085	1174	0,88	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	+++
40	109*	PEPCK- hFIX (50)	630	1063	0,8	DC: + EL: condensado Turbidez: baja	+++
45	109	PEPCK- hFIX (50)	636	970	0,26	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	ND
50							
55							
60							
65							

ES 2 316 148 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

109	PEPCK- hFIX (50)	750	1120	0,8	DC: ND EL: relajado Turbidez: ninguna	++
109*	PEPCK- hFIX (50)	812	1098	0,7	DC: ND EL: condensado Turbidez: baja	+++
109	PEPCK- hFIX (50)	812	1127	0,69	DC: ND EL: relajado Turbidez: ninguna	++
109*	SV40-luc (80)	1091	1144	0,9	DC: ND EL: condensado Turbidez: baja	+++
109*	SV40-luc (80)	1091	1144	0,9	DC: ND EL: condensado Turbidez: baja	+++
109*	SV40-luc (80)	961	1140	0,88	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	+++
109*	SV40-luc (80)	1091	1144	0,8	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	+++
109	SV40-luc (80)	666	1000	0,19	DC: + EL: relajado	ND

ES 2 316 148 T3

					Turbidez: ninguna		
5	109*	SV40-luc (80)	961	1121	0,8	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	+++
10							
15	109*	SV40-luc (80)	735	972	0,55	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	+++
20							
25	109*	ADN de esperma de salmón (0)	900	1231	1	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	ND
30							
35	109	PEPCK-OTC (50)	774	948	0,9	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	ND
40							
45	123	SV40-luc (100)	719	1044	0,95	DC: ND EL: relajado Turbidez: ninguna	-
50							
55	123	SV40-luc (100)	905	1086	1	DC: ND EL: relajado Turbidez: ninguna	-
60							
65	123	SV40-luc (100)	689	1019	0,95	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	-
	123	SV40-luc (100)	783	978	0,5	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	-

ES 2 316 148 T3

5	123	SV40-luc (100)	905	1149	0,57	DC: ND EL: relajado Turbidez: ninguna	-
10	123*	CMV- β -Gal (ND)	825	1020	0,76	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna	ND
15	150*	CMV- β -Gal (ND)	886	1077	0,5	DC: ND EL: condensado Turbidez: baja	+++
20	150*	SV40-luc (80)	800	972	0,36	DC: ND EL: ND Turbidez: baja	+++
25	150	SV40-luc (80)	821	868	0,3	DC: Psi ADN EL: Agregado d Turbidez: alta	-
30	150*	SV40-luc (80)	821	968	0,3	DC: + EL: condensado Turbidez: baja	+++
35	150	SV40-luc (80)	821	1071	0,3	DC: + EL: relajado Turbidez: ninguna	-
40	240*	SV40-luc (80)	711	1125	1	DC: ND EL:	+++
45							
50							
55							
60							
65							

ES 2 316 148 T3

5					condensado Turbidez: baja	
10	240	SV40-luc (80)	711	1162	1	DC: ND EL: + relajado Turbidez: baja
15	240	SV40-luc (80)	711	1280	1	DC: ND EL: relajado Turbidez: ninguna
20	240	SV40-luc (80)	800	1007	1	DC: ND EL: Agregado d Turbidez: Alta
25	240	T7-T7 (90)	708	1187	0,9	DC: + EL: condensado Turbidez: baja
30	240	T7-T7 (90)	708	1250	0,9	DC: + EL: relajado Turbidez: ninguna
35	240	PEPCK- hLDLR (100)	642	947	0,73	DC: Psi - ADN EL: Agregado d Turbidez: ninguna
40	240	PEPCK-OTC (50)	706	1174	0,35	DC: ND EL: ND Turbidez:
45						ND
50						
55						
60						
65						

ES 2 316 148 T3

					ninguna	
5	240	PEPCK-OTC (50)	898	1153	0,64	DC: ND EL: ND Turbidez: ninguna
10						ND

* Usado en la recopilación de la tabla 5.

15 ND= No determinado

** Estado físico del complejo de ADN tras la unión del polimerización.

20

1. Si se determinó el diámetro circular (DC) los resultados se indican tal como sigue: los cambios espectrales debidos a la condensación con polimerización de ADN son insignificantes (+); la condensación con polimerización dio como resultado ADN en forma de Psi debido a la agregación en complejos multimoleculares (o bien toroidales o bien similares a varillas) (Psi ADN); la aparición de un espectro aberrante asociado con un estado sumamente agregativo (-).

2. Los resultados de la microscopía electrónica se han indicado tal como sigue: la asociación del polimerización con el ADN da como resultado la agregación en complejos con aumento de tamaño (> 60 nm) (Agregado); las estructuras resultantes de la condensación son toroides relajados similares a varillas con aumento de tamaño (Relajado); la unión del polimerización da como resultado la condensación apropiada (toroides <30 nm de diámetro) (Condensado). El número de estructuras apropiadamente condensadas (toroides) por campo microscópico no se ha determinado. Existe aproximadamente una variación de 3 veces en el número de toroides visibles en el EL con diferentes preparaciones del complejo de ADN.

35

3. Las mediciones de turbidez se basan en la inspección visual de la disolución final del complejo de ADN.

† Una indicación relativa de la actividad del gen introducido tras la introducción del complejo de ADN:

40 El hFIX (factor IX humano) se mide mediante la hibridación por inmunotransferencia de tipo Western o mediante un ensayo de actividad funcional de muestras de plasma de rata.

La actividad β Gal (β -galactosidasa) se mide mediante histoquímica *in situ* en secciones de tejidos o células fijadas.

45 La actividad luc (luciferasa) se mide usando un ensayo de actividad enzimática específica con extractos de tejido.

La actividad de hLDLR (receptor de LDL humano) se midió indirectamente tras la determinación de los niveles de colesterol en suero total en un modelo de conejo para determinar la carencia del receptor LDL.

50 La actividad de hGH (hormona del crecimiento humana) se refiere a una medición directa de niveles de hGH en el suero de animales transfectados con el complejo de ADN. Se usó un radioinmunoanálisis específico para hGH.

55 La actividad concierne a todo el experimento realizado con el mismo ADN. La actividad no detectable tras la introducción del complejo de ADN se indica por "-".

60

65

Tabla 105

[NaCl] final = -555,75 + [ADN] mg/ml * 180,91 + log (longitud de lys) * y18,32

Estadísticas de regresión

R múltiple 0,881909585

R cuadrado 0,777764515

R cuadrado ajustado 0,743574441

Error estándar 135,5087624

Observaciones 16

Análisis de la varianza

	df	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Significancia F
Regresión	2	835435,3166	417717,6583	22,748254	5,6792E-05
Residual	13	238714,1209	18362,62469		
Total	15	1074149,438			

50

Coefficientes Error estándar Estadística de la Valor de Inferior al 95%

	Coefficientes	Error estándar	t	P
Ordenada en el origen	-555,757861	228,34416556	2,433887324	0,0279103
[ADN] mg/ml	180,9113279	125,4285365	1,442345841	0,1697596
log (longitud de lys)	718,3211054	117,7844848	6,098605488	2,037E-05

-1049,059922
-90,06049864
463,8632453

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

ES 2 316 148 T3

TABLA 106

Tamaño calculado y experimental de complejos de ADN condensado

5

10

15

20

25

30

ADN	Tamaño (pb)	Diámetro condensado (nm ± DE)		
		Microscopio electrónico ^a	Modelo hidratado (volumen específico parcial) ^b	Modelo hidratado (densidad de difracción por rayos X) ^c
PEPCK-hFIX	4.500	12,80 ± 1,56	18	22
PEPCK-hOTC	5.300	18,00 ± 1,83	20	23
SV40- luciferasa	5.600	16,95 ± 3,50	20	24
PEPCK-CAT	5.800	16,30 ± 2,56	20	24
CMV-hLDLr	7.400	20,70 ± 2,60	22	26
29 ^d	18.000	38 ^e	40	47

35

a, diámetro medido de al menos 10 complejos de ADN en una fotografía impresa (x240.000).

40

b, diámetro calculado de un complejo de ADN unimolecular que adopta una esfera condensada. Se consideró que el volumen específico parcial del Na-ADN era de 0,5 ml/g. Se ha añadido la contribución de la poli-L-lisina galactosilada a una razón de carga de 1:1. El peso molecular del ADN se calculó basándose en un peso molecular promedio de 6.500 dalton/10 pb. La fórmula usada es:

peso molecular de ADN (daltons)/6,023 x 10²³ x 0,5 (ml/g) = ml ocupado por una molécula de ADN de peso molecular X. Diámetro obtenido a partir de la fórmula para el volumen de una esfera.

45

c, diámetro calculado de un complejo de ADN unimolecular que adopta una esfera condensada. El cálculo adoptó una densidad hidrata de 1,25 ± 0,1 g/ml tal como se determinó por difracción de rayos X. Se ha añadido la contribución de una poli-L-lisina galactosilada a una razón de carga 1:1. El peso molecular de ADN se calculó basándose en un peso molecular promedio de 6.500 dalton/10 pb. La fórmula es:

50

peso molecular ADN (dalton)/6,023 x 10²³/1,25 (g/ml) = ml ocupado por una molécula de ADN de peso molecular X. Diámetro obtenido a partir de la fórmula para el volumen de una esfera.

d, a partir de la bibliografía.

55

e, el tamaño de la procápside del fago incluye la cubierta externa de proteína.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende complejos de ácido nucleico no agregados, consistiendo cada complejo esencialmente en una única molécula de ácido nucleico y una o más moléculas portadoras, comprendiendo dicha única molécula de ácido nucleico un gen sintético expresable o un ADNc, y teniendo dicha molécula portadora un resto de unión a ácido nucleico a través del cual se acompleja con el ácido nucleico, en la que dicho complejo está compactado hasta un diámetro que es inferior a 30 nm.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que el complejo de ácido nucleico está compactado hasta un diámetro inferior a 23 nm.
- 15 4. Composición según la reivindicación 3, en la que el complejo de ácido nucleico está compactado hasta un diámetro no superior a 12 nm.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el resto de unión a ácido nucleico es un anticuerpo o un fragmento de unión específico de un anticuerpo.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el resto de unión a ácido nucleico es un polication.
7. Composición según la reivindicación 6, en la que el polication es polilisina.
- 25 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el ácido nucleico es ADN.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que la molécula de ácido nucleico es ADNc.
- 30 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el ácido nucleico es ARN.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el ácido nucleico tiene de 100 a 100.000 bases, si es monocatenario, o de 100 a 100.000 pares de bases, si es bicatenario.
- 35 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el ácido nucleico es bicatenario.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el ácido nucleico es un análogo de ADN o ARN que es más resistente a la degradación *in vivo*.
- 40 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el ácido nucleico es un análogo de ADN o ARN que difunde más fácilmente a través de membranas celulares.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el ácido nucleico es un análogo de ADN en el que aparece el análogo de metilfosfonato del mononucleótido que se produce de manera natural.
- 45 16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que el ácido nucleico comprende un gen expresable que es funcional en una célula diana.
17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que la molécula de ácido nucleico codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en enzimas que en forma mutada están asociadas a defectos metabólicos específicos, receptores, toxinas, canales iónicos, transportadores de membrana y proteínas citoesqueléticas.
- 50 18. Composición según la reivindicación 17, en la que la molécula de ácido nucleico codifica el receptor de LDL humano.
- 55 19. Composición según la reivindicación 18, en la que la molécula de ácido nucleico codifica el factor IX humano.
20. Composición según la reivindicación 17, en la que la molécula de ácido nucleico codifica un canal de cloruro.
- 60 21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que la molécula de ácido nucleico es “anti-sentido” con respecto a una secuencia de ácido nucleico diana de la célula diana, o de un virus que puede infectar la célula diana, mediante lo cual puede hibridarse suficientemente a la misma para inhibir la transcripción o la traducción de la secuencia de ácido nucleico diana.
- 65 22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en la que dicha molécula portadora tiene un resto de unión a célula diana a través del que puede unirse a una célula diana y mediante lo cual el complejo puede entrar más rápidamente en la célula diana.

ES 2 316 148 T3

23. Composición según 22, en la que el resto de unión a célula diana es un anticuerpo o un fragmento de unión específico de un anticuerpo.

24. Composición según la reivindicación 23, en la que el anticuerpo se une específicamente a pIgR.

25. Composición según la reivindicación 23, en la que el anticuerpo se une específicamente a CD4 o gp120.

26. Composición según la reivindicación 22, en la que el resto de unión a célula diana es una lectina o un hidrato de carbono.

27. Composición según la reivindicación 26, en la que el resto de unión a célula diana es un hidrato de carbono seleccionado del grupo que consiste en galactosa, lactosa, manosa y manosa-6-fosfato.

28. Composición según la reivindicación 22, en la que el resto de unión a célula diana es un péptido o una proteína.

29. Composición según la reivindicación 28, en la que el resto de unión a célula diana se selecciona del grupo que consiste en insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de necrosis tumoral, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, glucagón, lactoferrina, transferrina, apolipoproteína E, gp120 y albúmina.

30. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 22-29, en la que el resto de unión a ácido nucleico está unido covalentemente al resto de unión a célula diana.

31. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-30, en la que el ácido nucleico está encapsulado en un liposoma.

32. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-31, para su uso como medicamento.

FIG. 1A

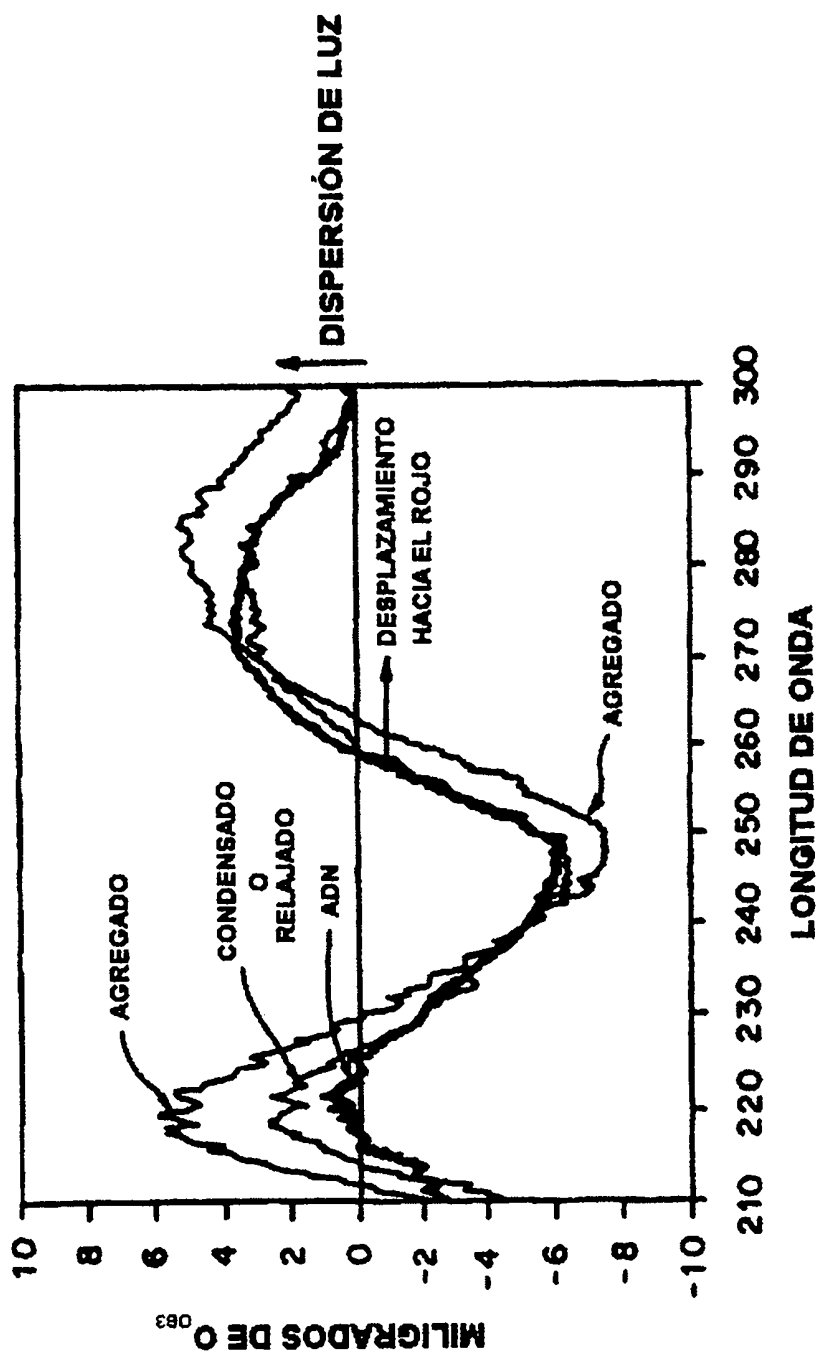


FIG. 1D

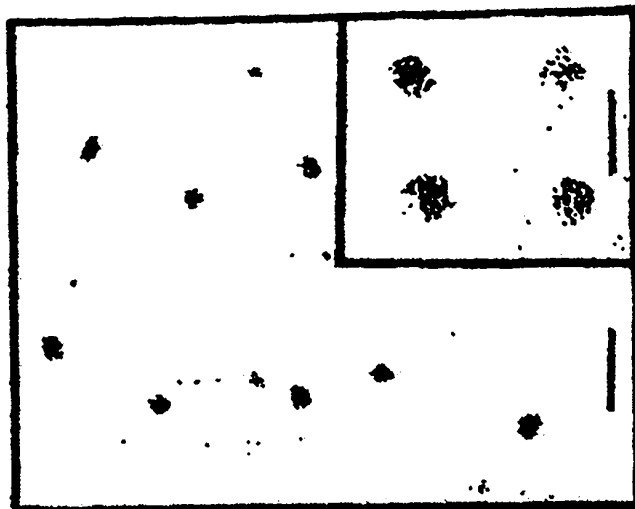


FIG. 1C



FIG. 1B

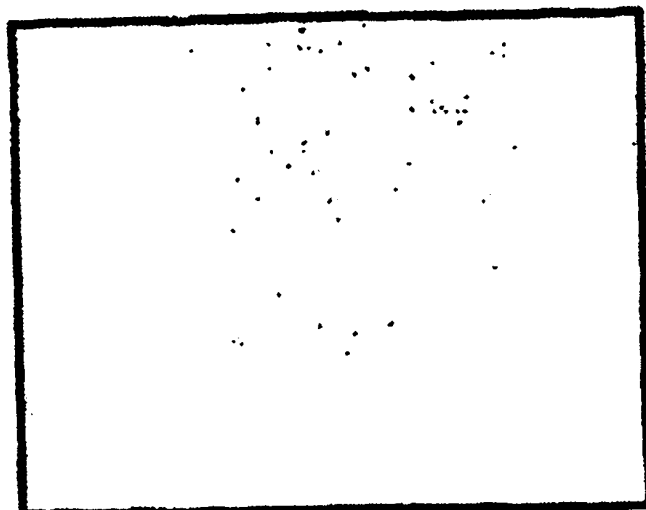


FIG. 1E

FIG. 1F

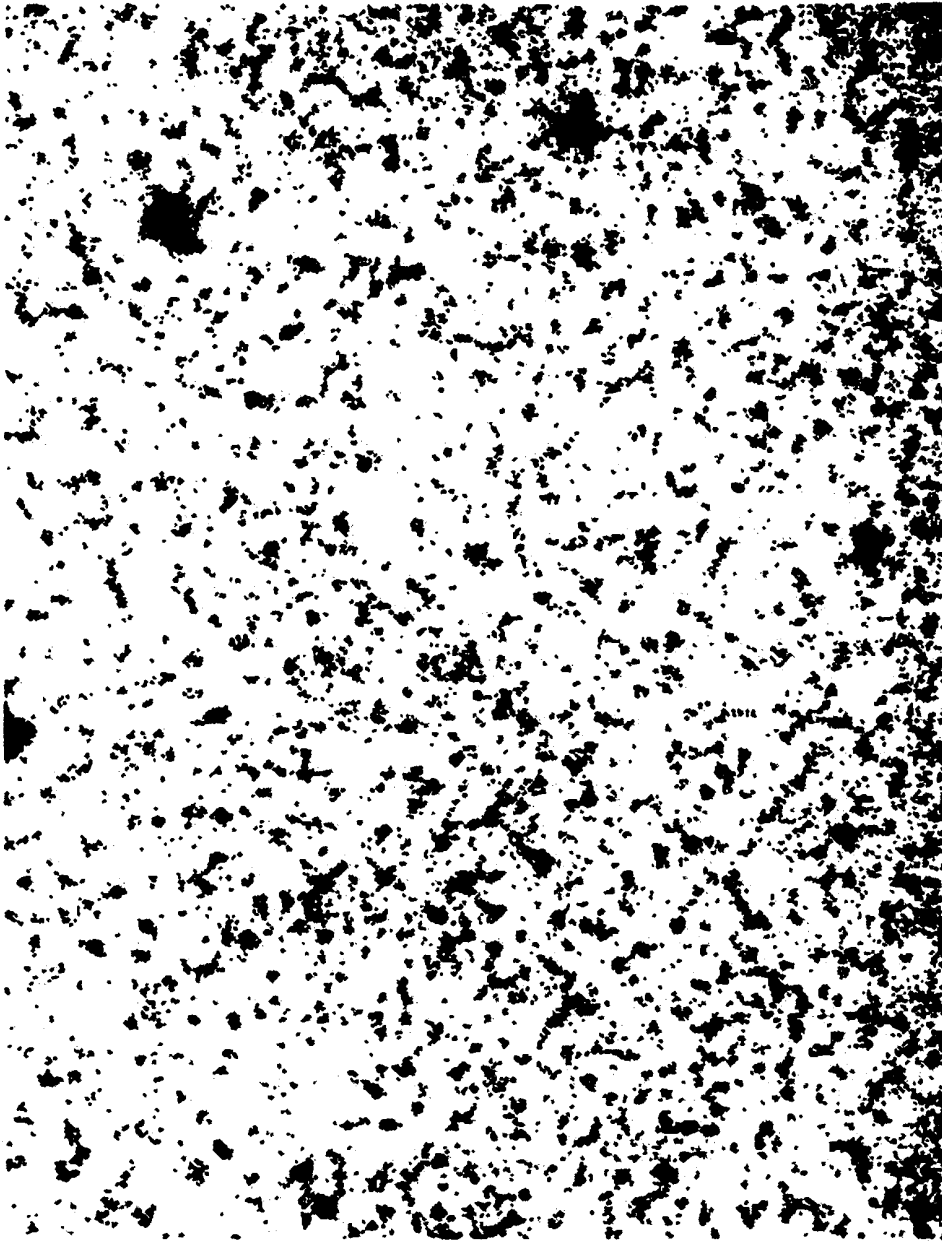


FIG. 1G

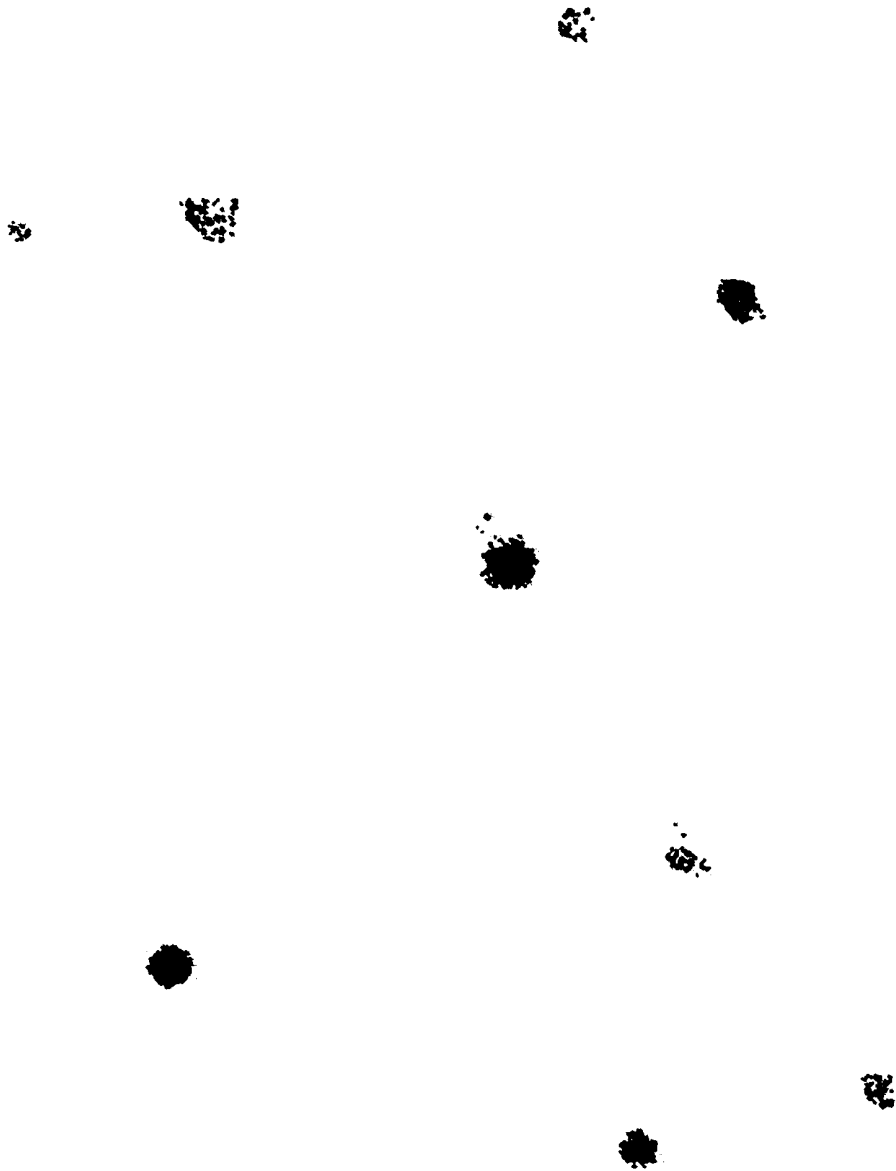


FIG. 1H

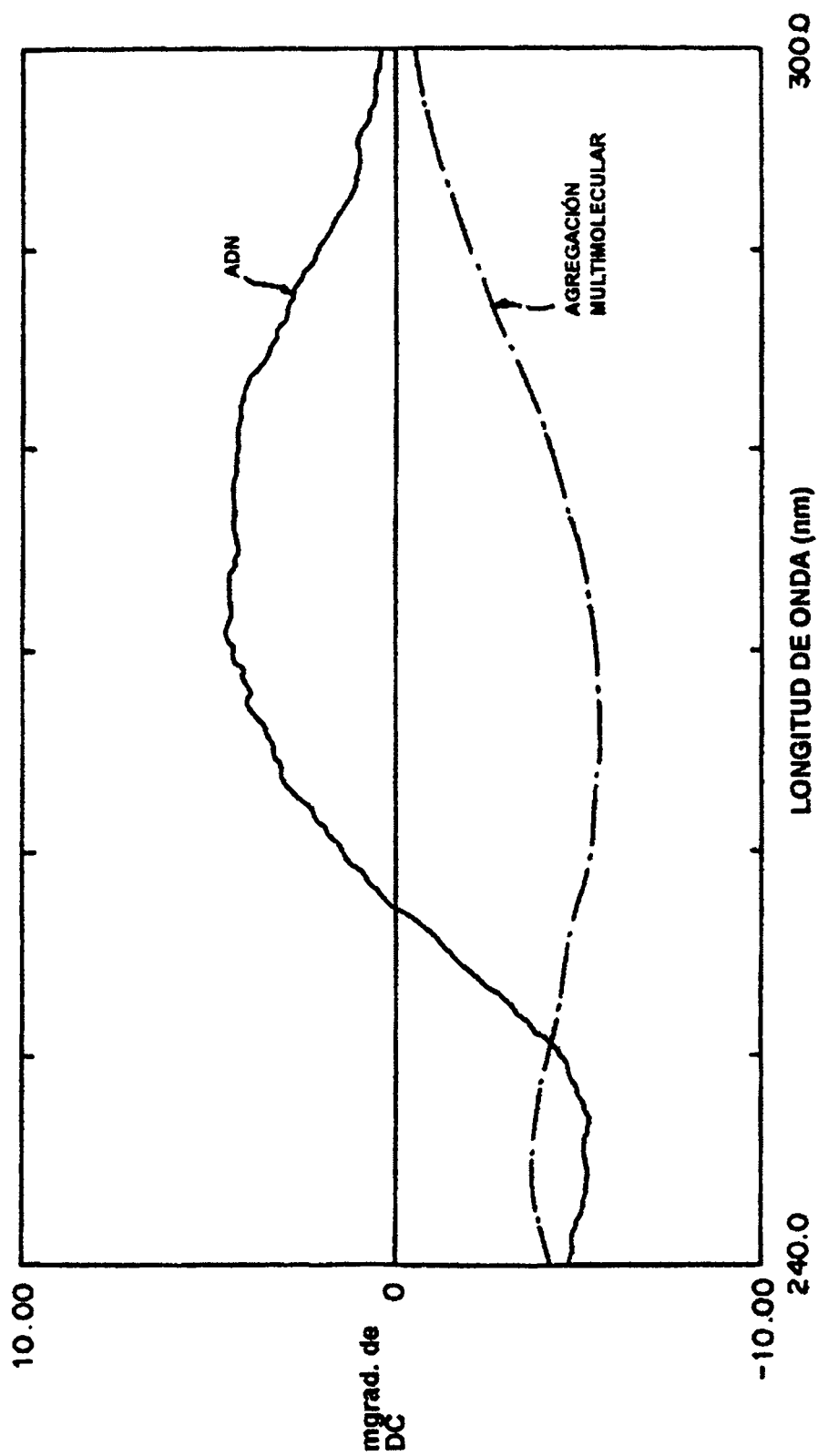


FIG.1I

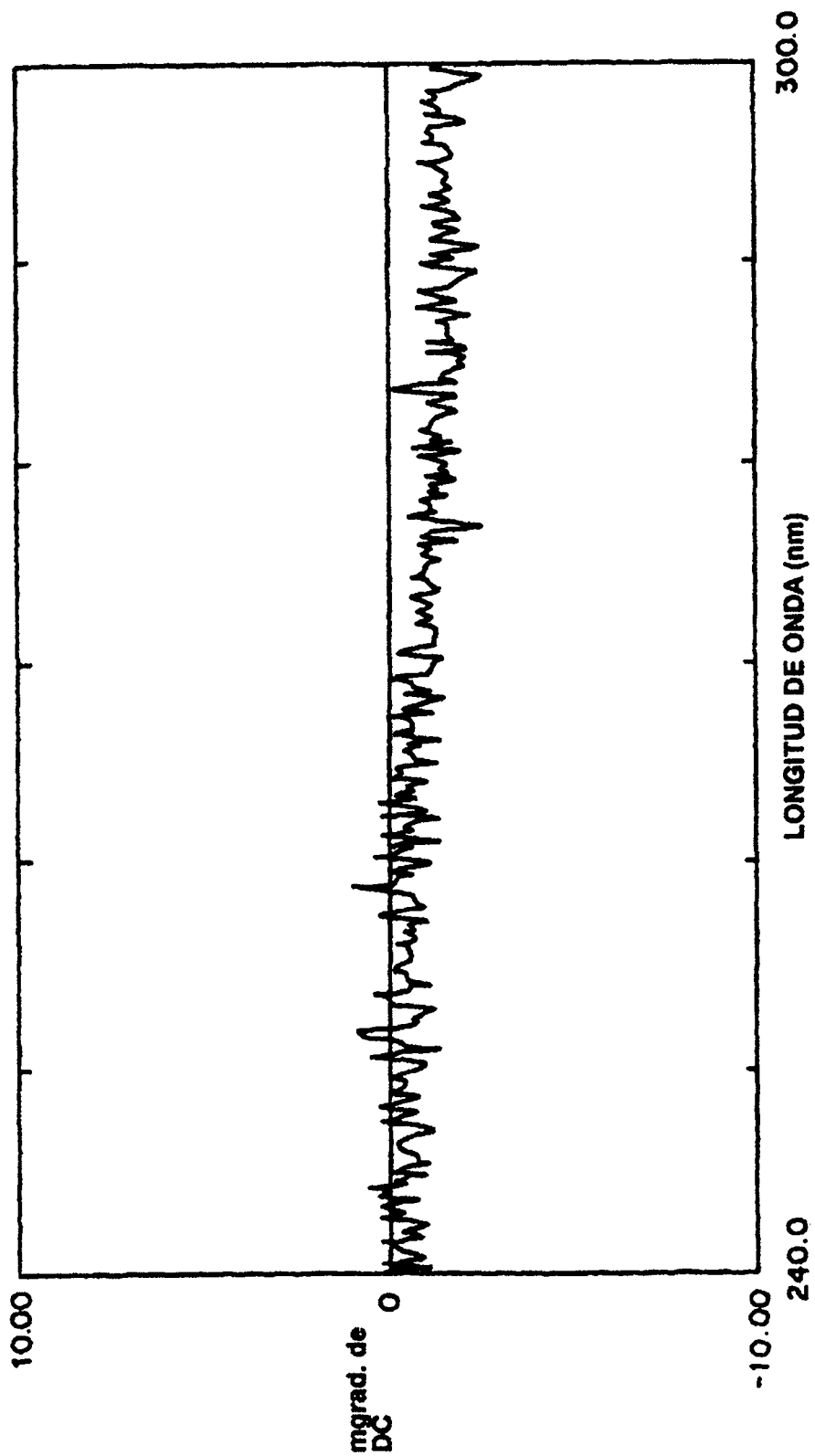


FIG. 1J



FIG. 2A

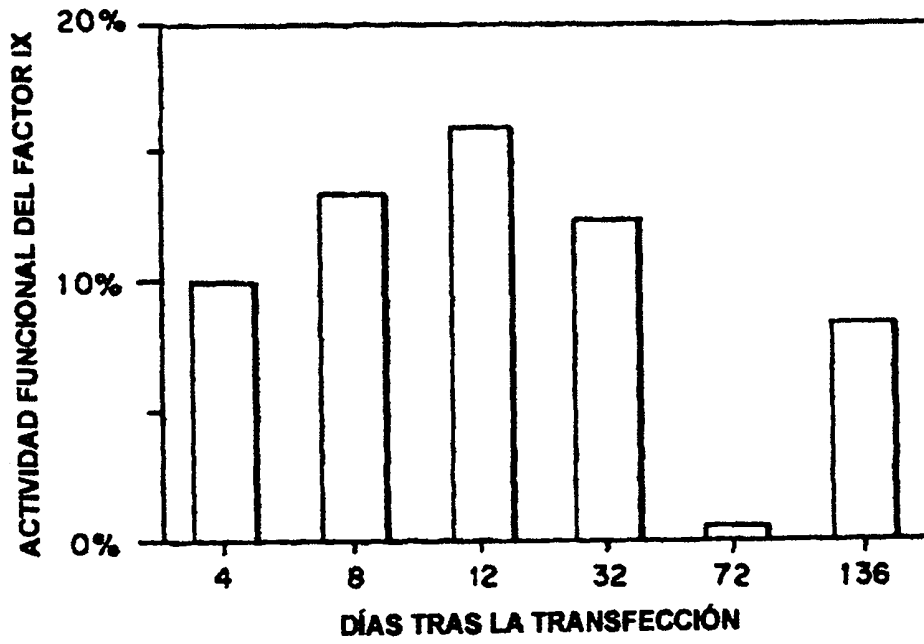


FIG. 2B

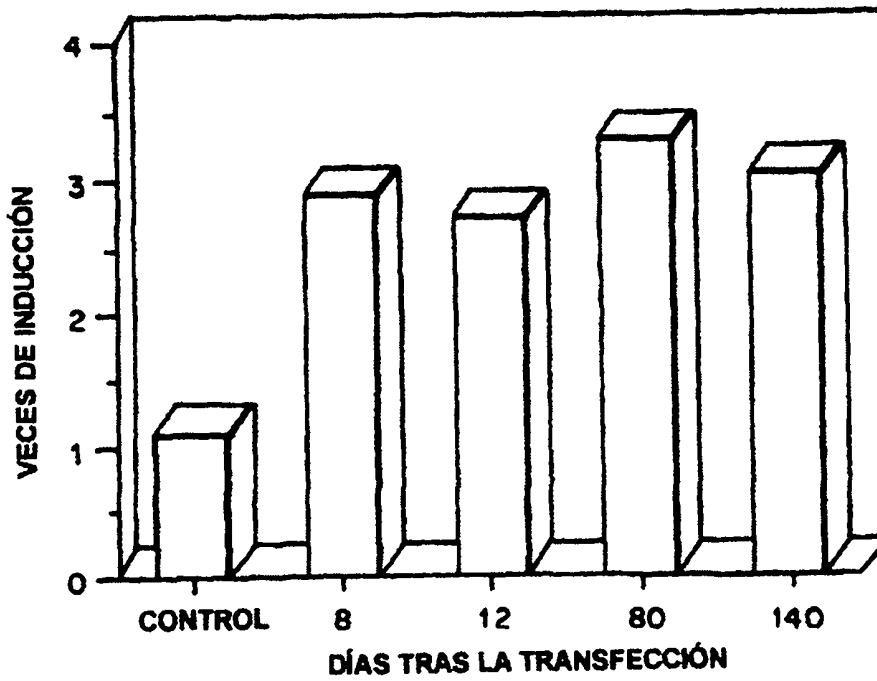


FIG. 3

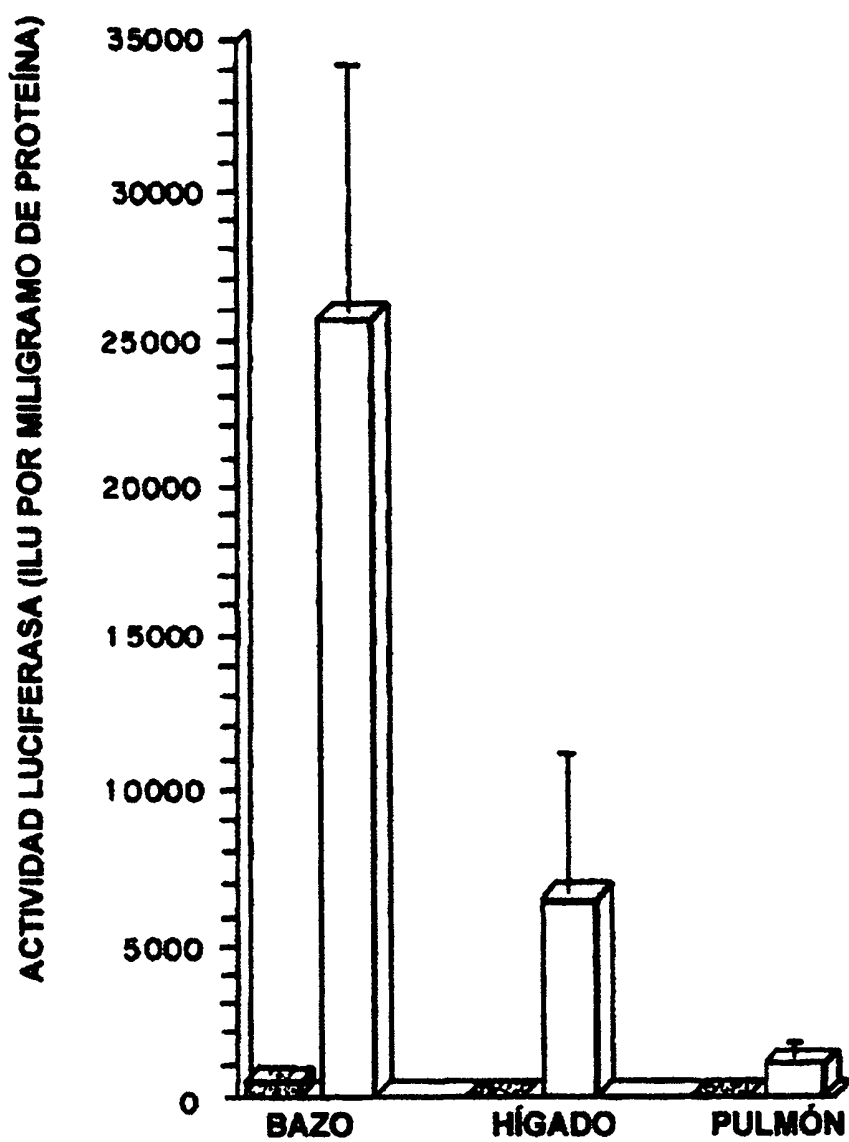


FIG. 4

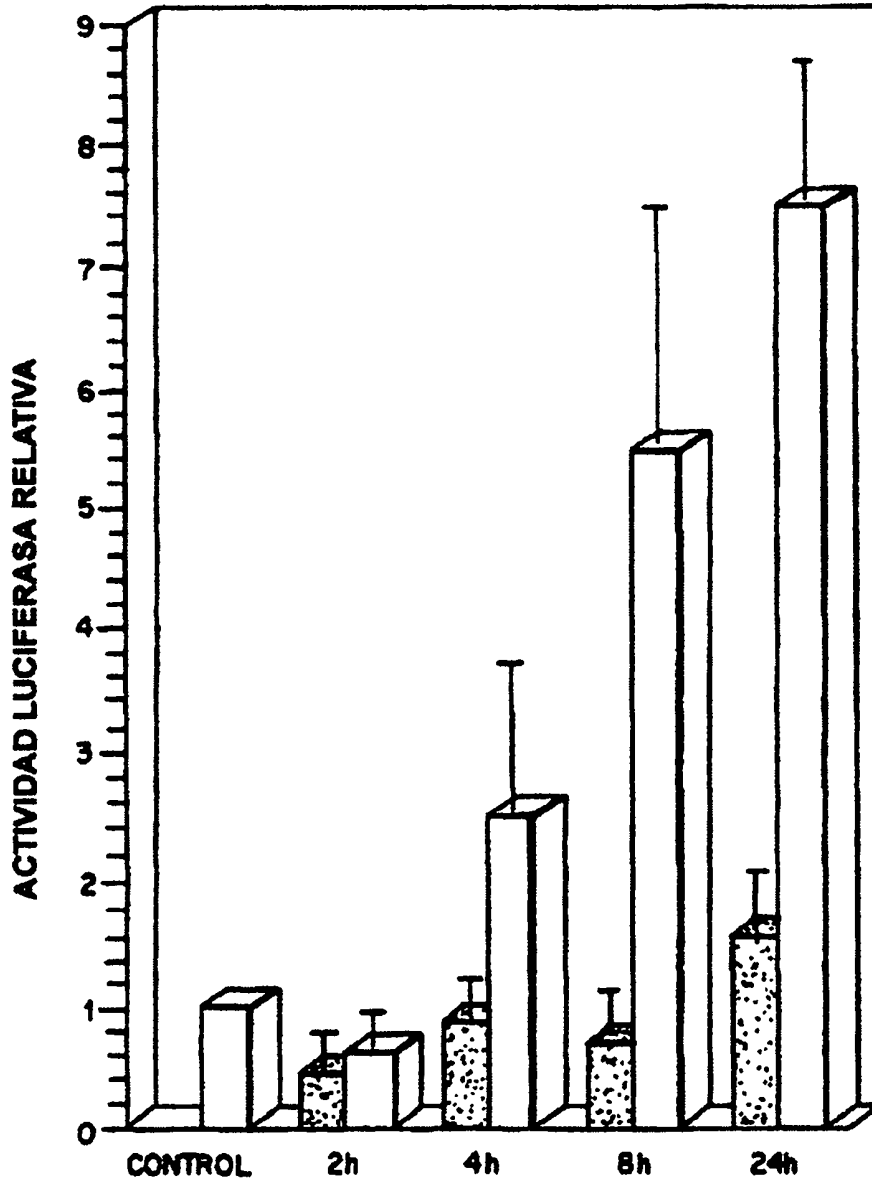


FIG. 5

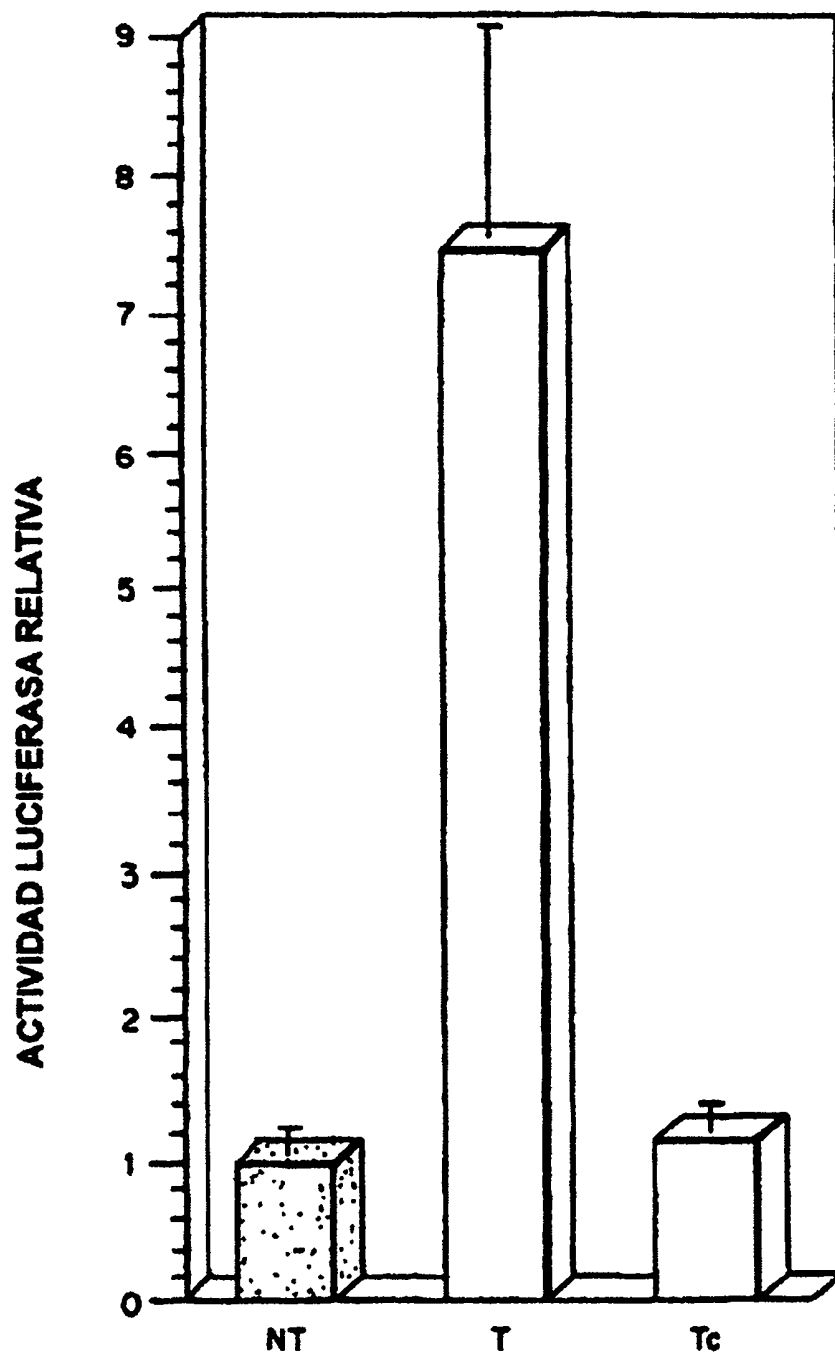


FIG. 6

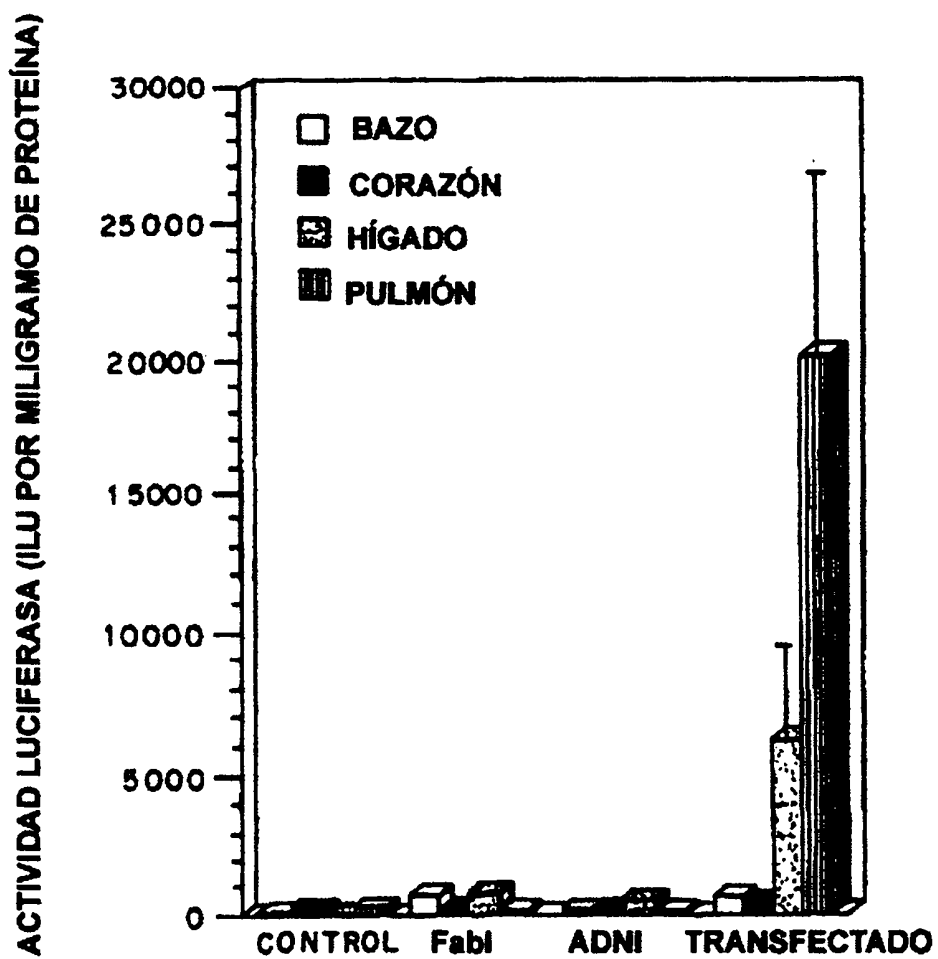


FIG. 7

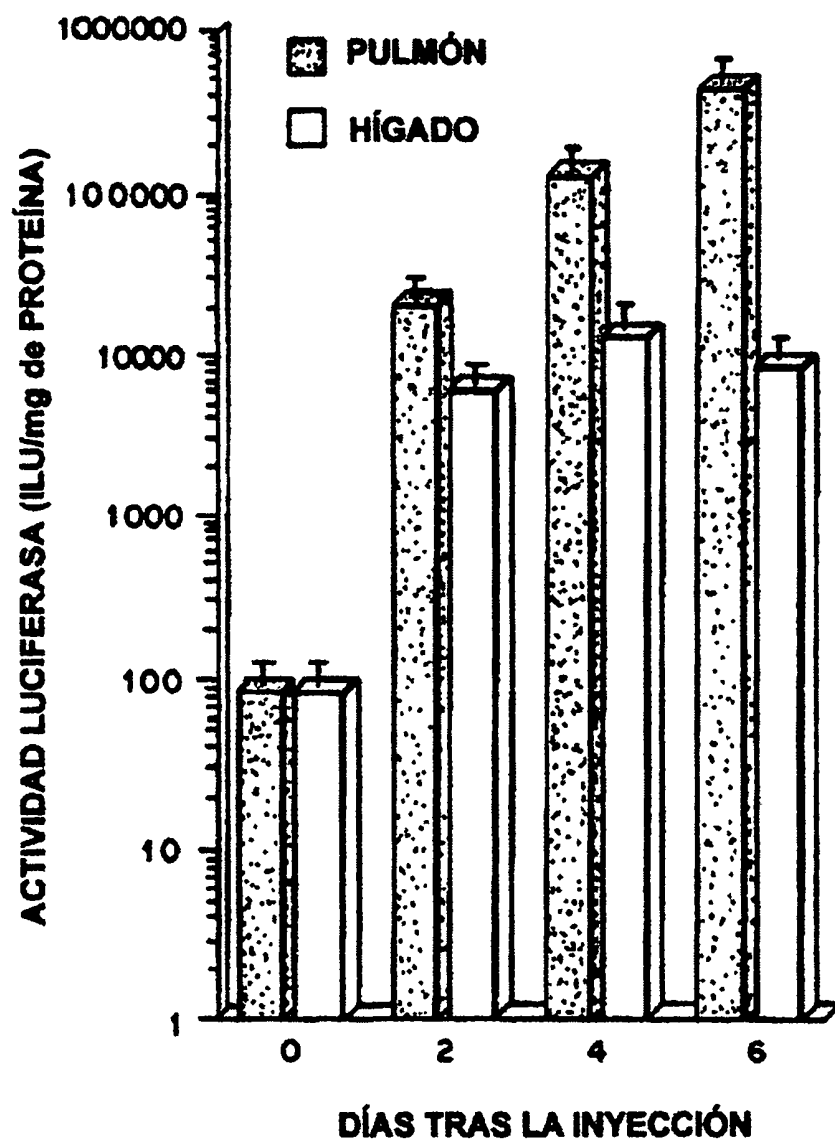


FIG. 8

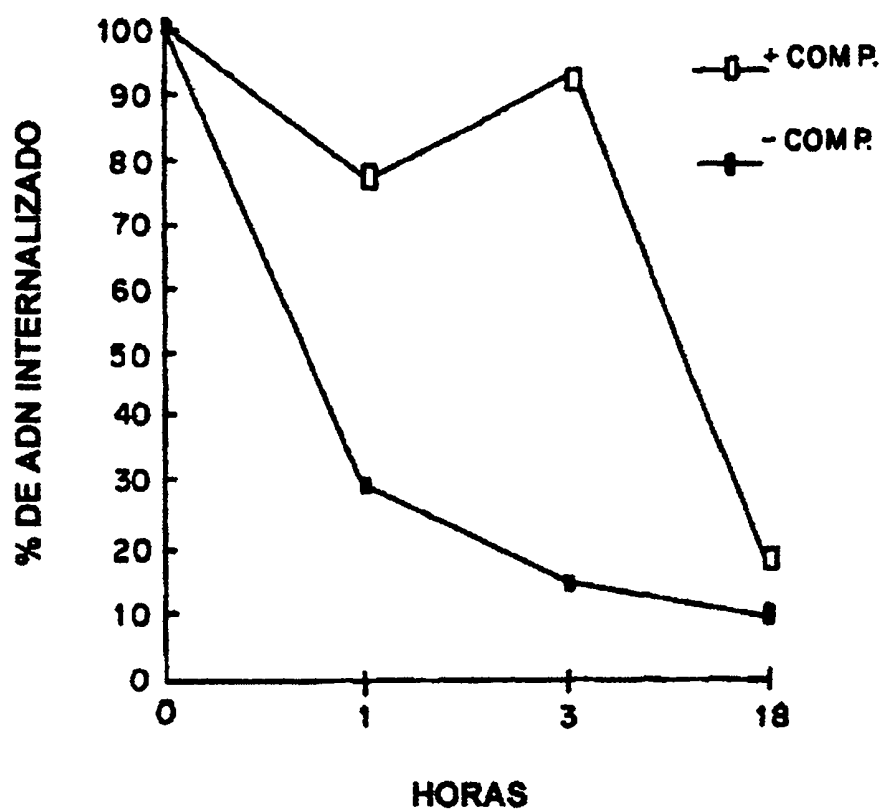


FIG. 10

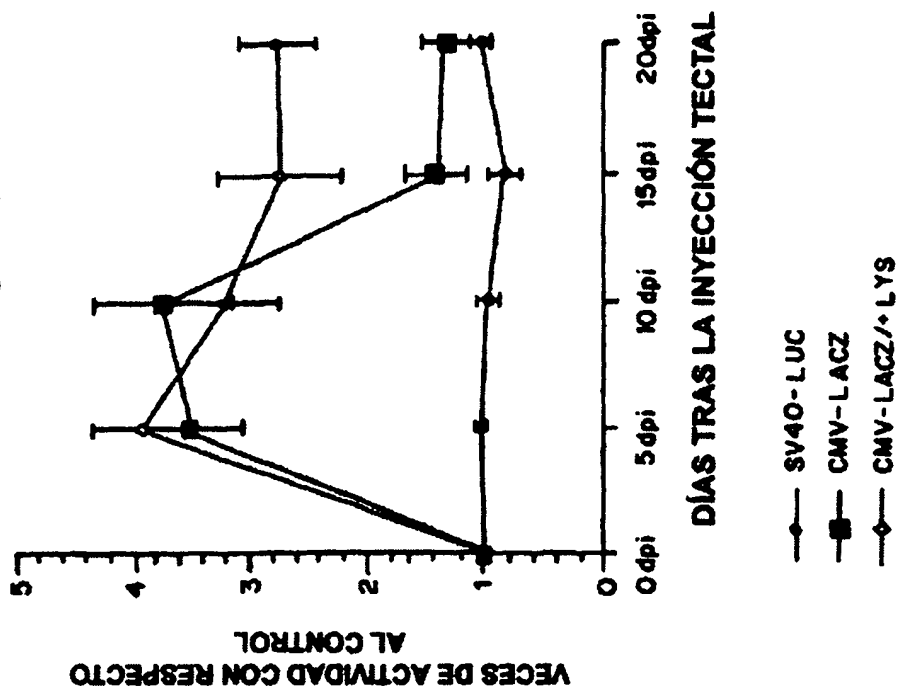


FIG. 9

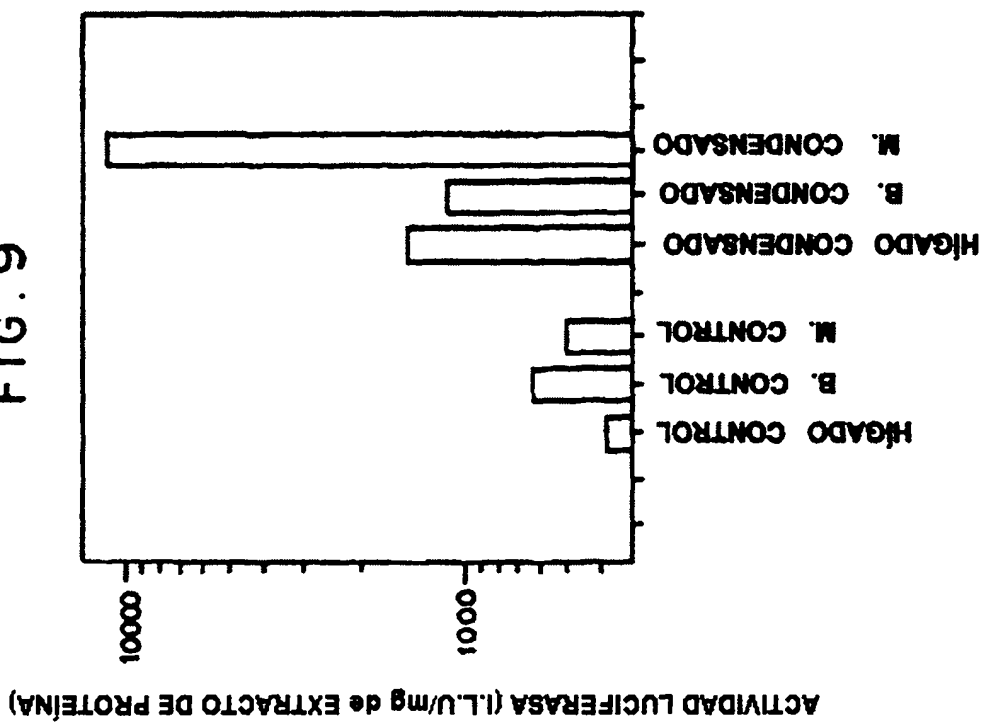


FIG. 11

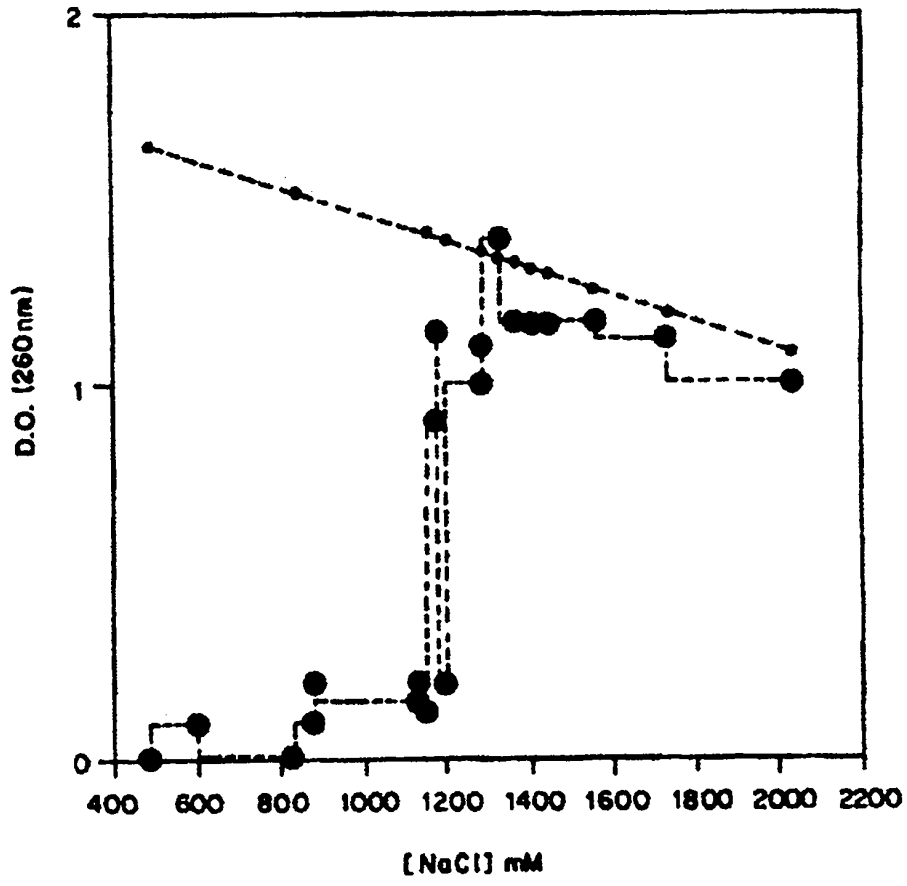


FIG.12

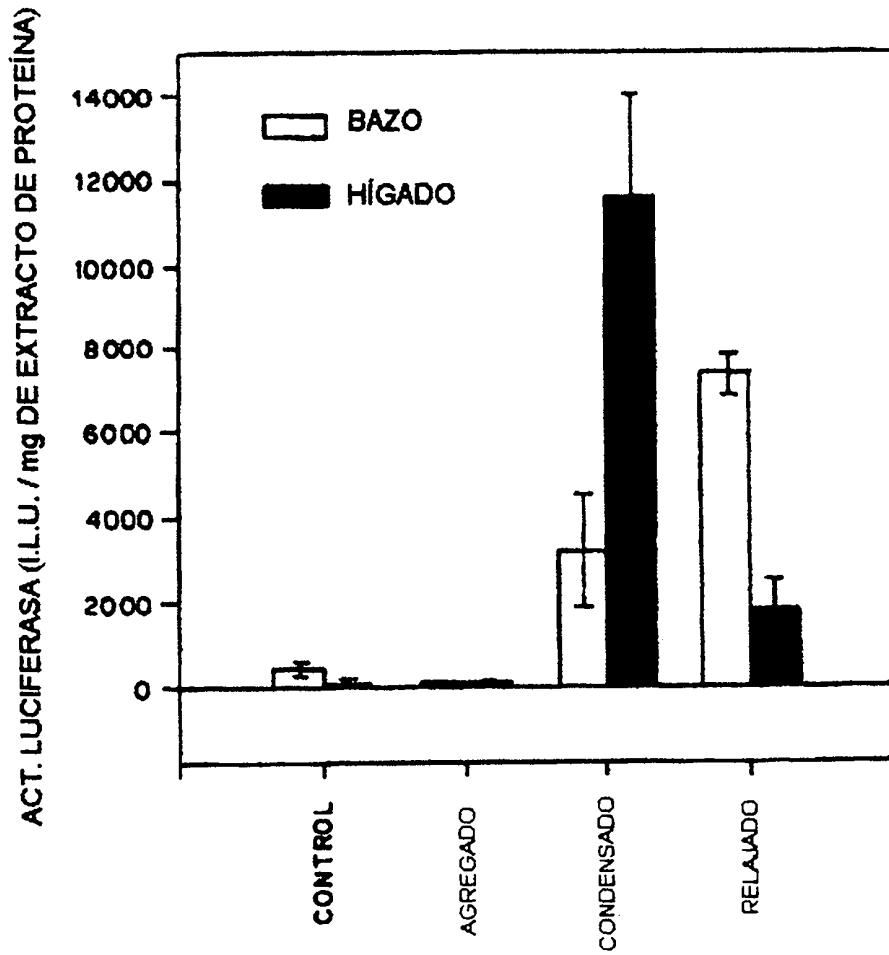


FIG. 13

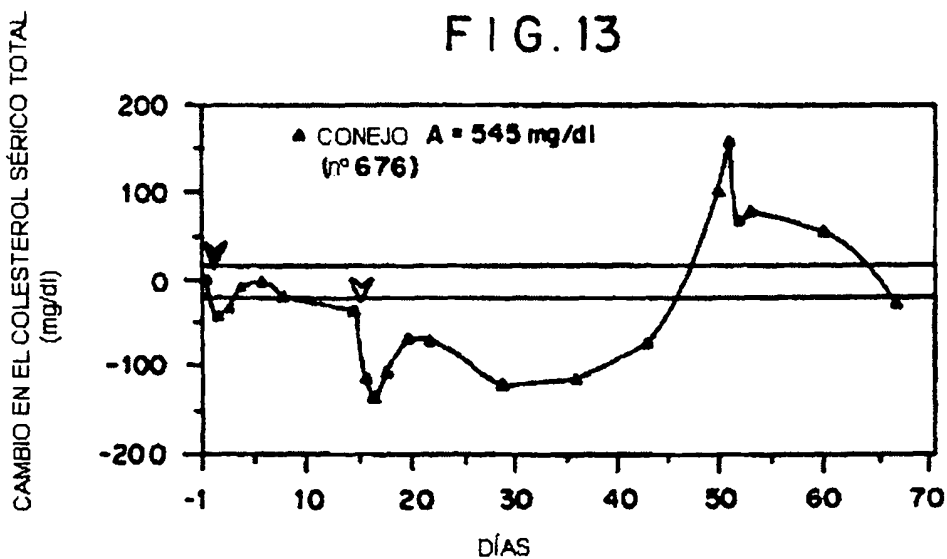


FIG. 14

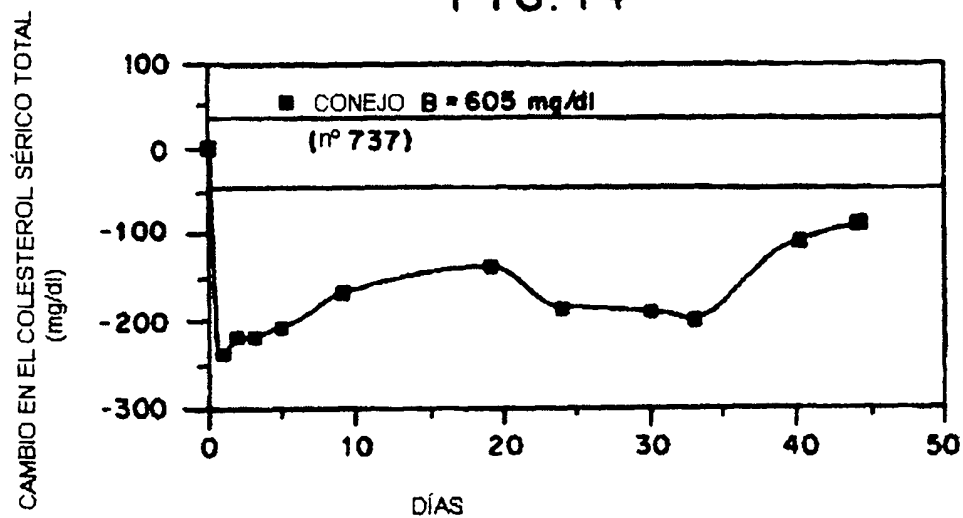


FIG. 15

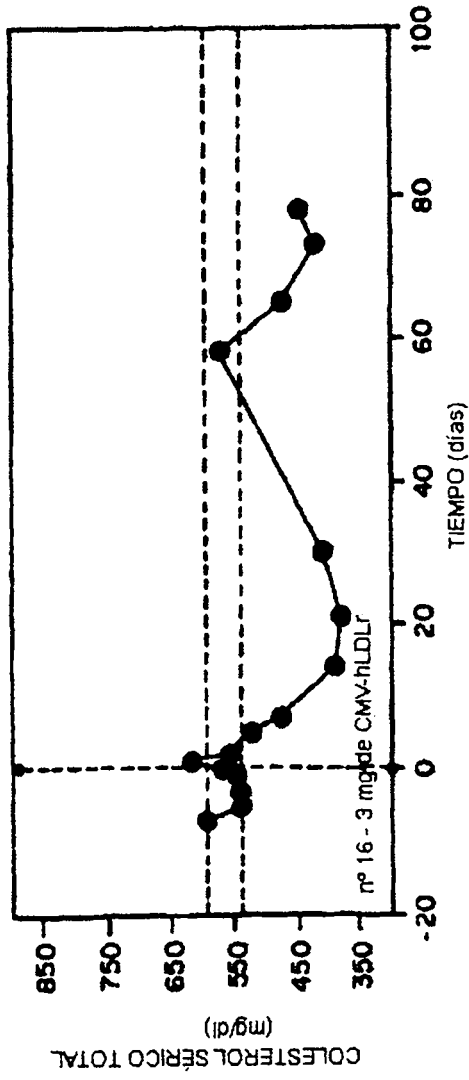
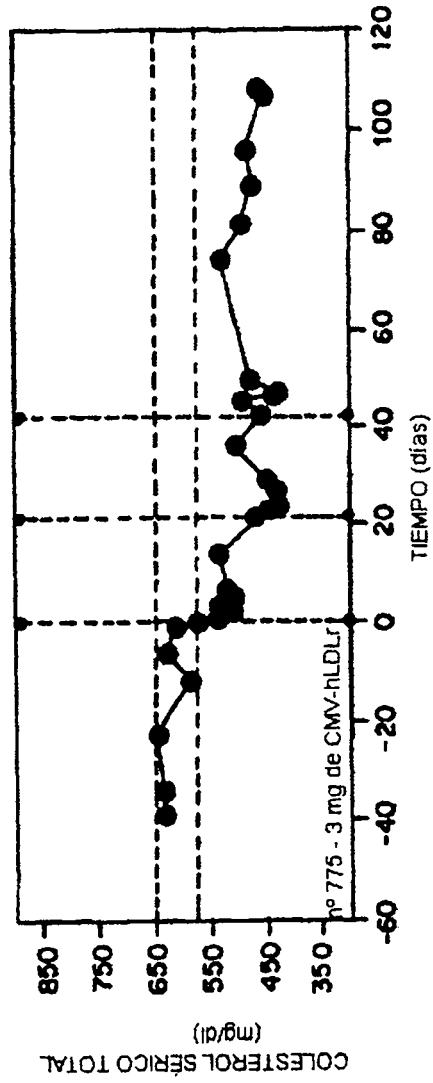


FIG. 16A



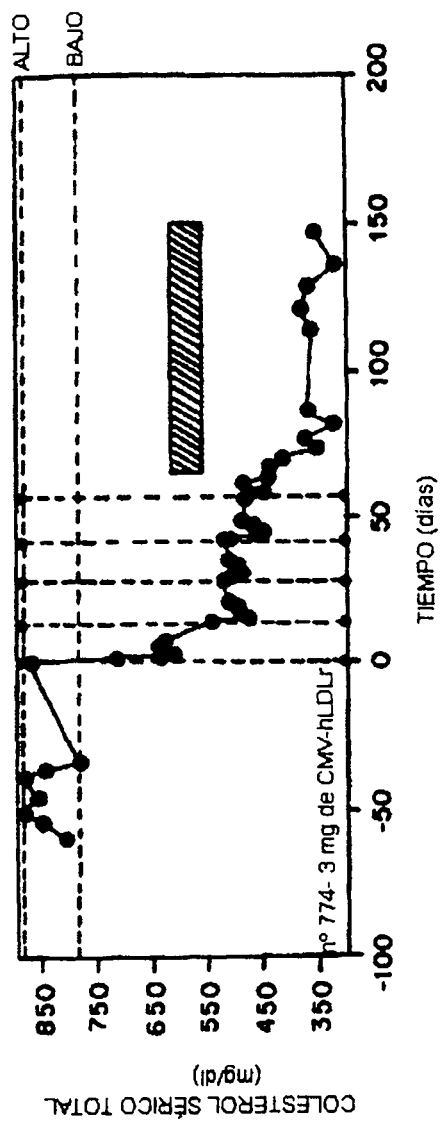


FIG. 16B

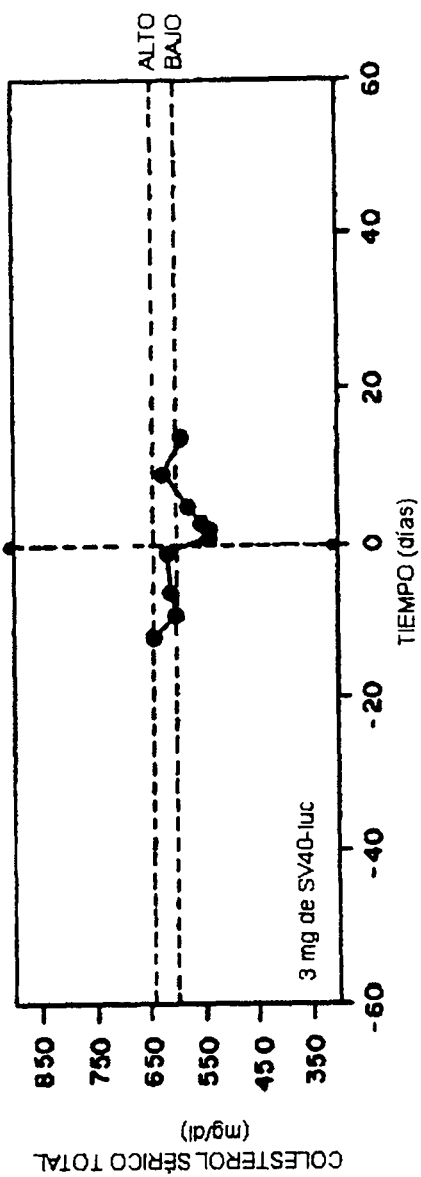


FIG. 17

FIG. 18

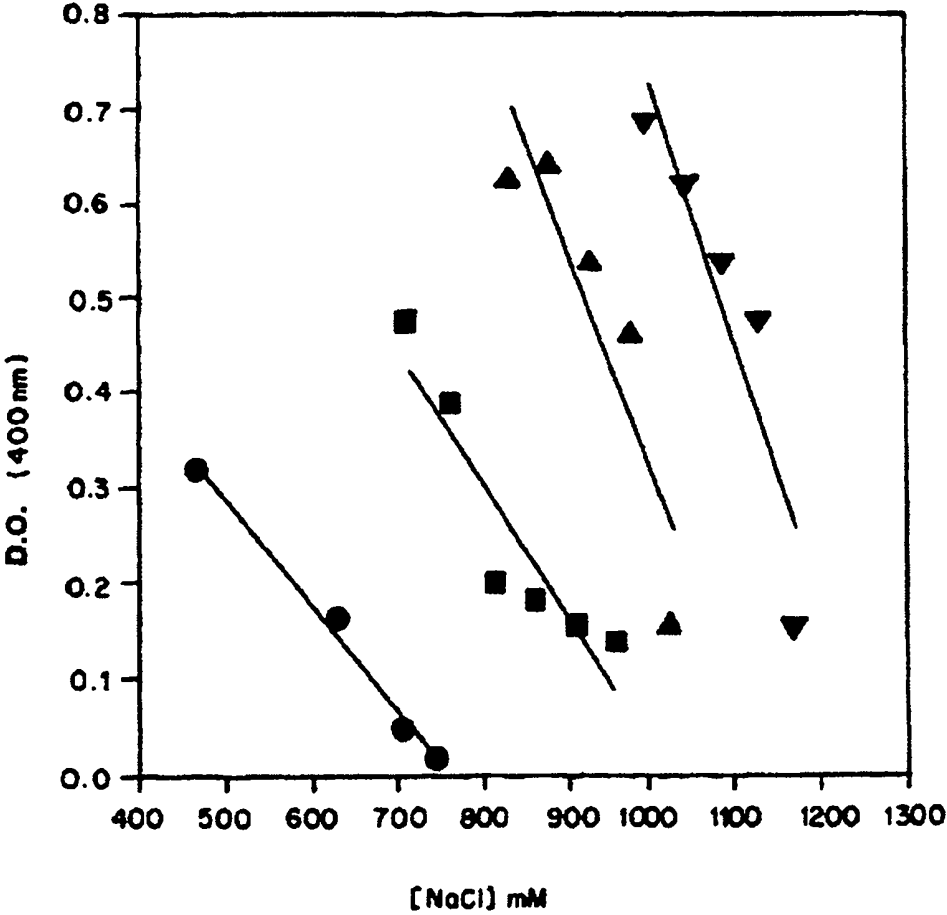


FIG. 19

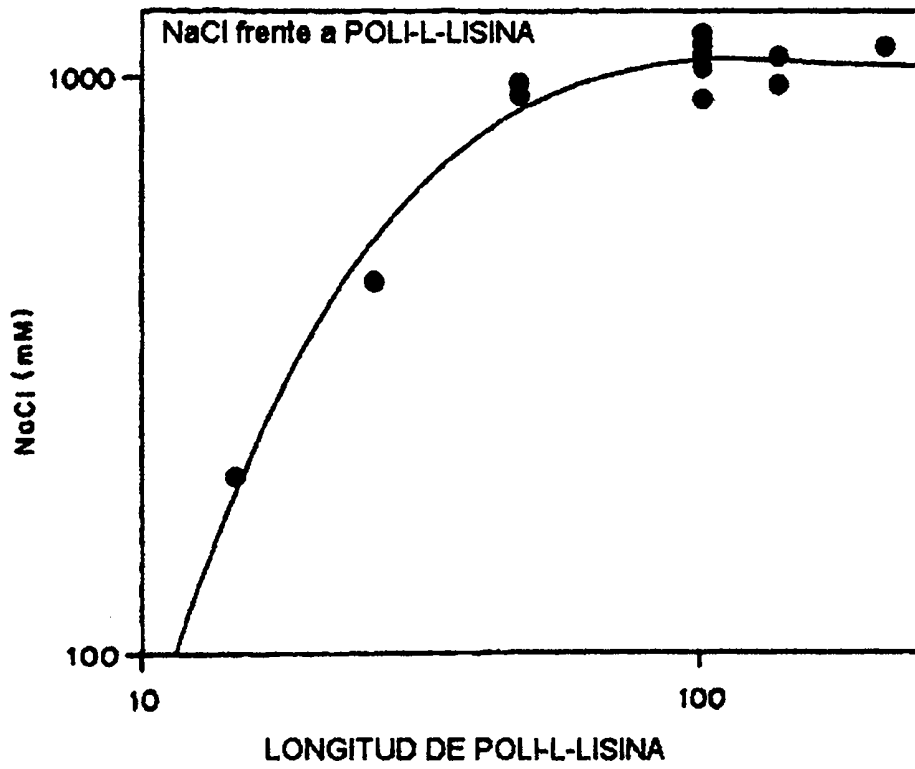


FIG. 20A

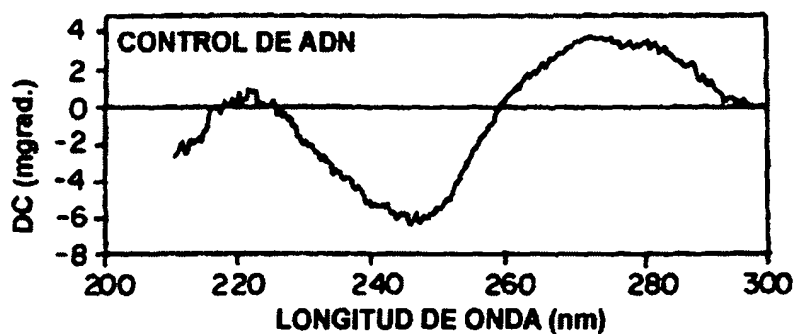


FIG. 20B

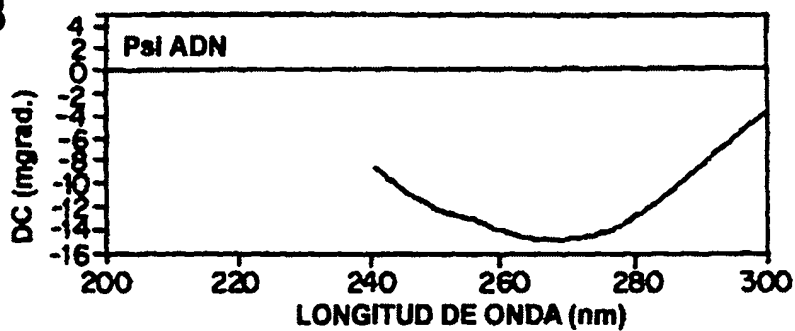


FIG. 20C

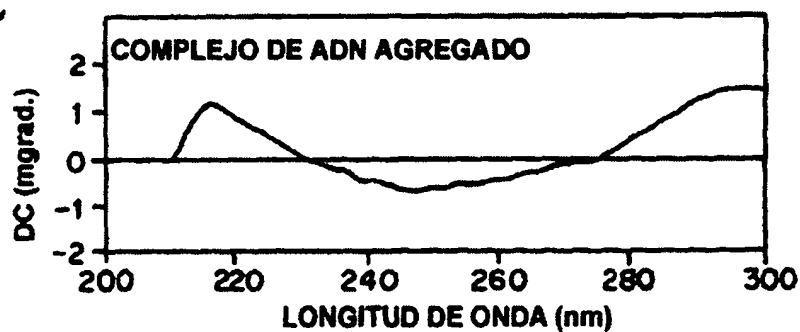


FIG. 20D

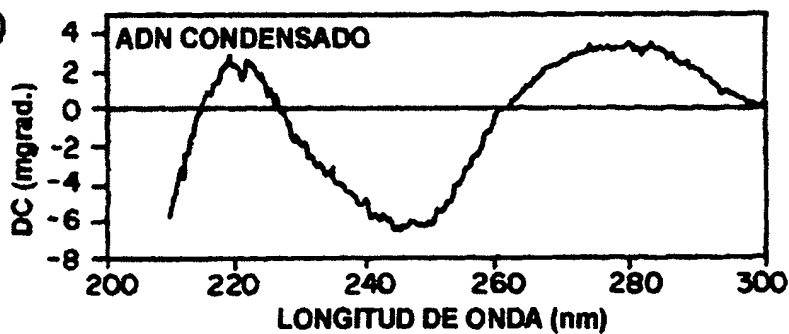


FIG. 20E

