(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 968 843**

(51) Int. CI.:

***A61K 41/00*** (2010.01)
***A61K 31/00*** (2006.01)
***A61K 33/00*** (2006.01)
***A61P 31/00*** (2006.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2019 PCT/EP2019/051749**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2019 WO19145419**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2019 E 19702370 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3743110**

(54) Título: **Molécula de ARNm y agente fotosensibilizador para uso médico**

(30) Prioridad:

**24.01.2018 GB 201801169**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**14.05.2024**

(73) Titular/es:

**PCI BIOTECH AS (100.0%)**
**Ullernchausseen 64**
**0379 Oslo, NO**

(72) Inventor/es:

**HØGSET, ANDERS**

(74) Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

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

Molécula de ARNm y agente fotosensibilizador para uso médico

Método

La presente invención se basa en un método para introducir ARNm en células *in vivo*, preferentemente en el citosol de las células, utilizando un agente fotosensibilizador y la irradiación de las células con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, que permite la expresión de polipéptidos en la célula con fines terapéuticos.

El ARNm ofrece potencial como una clase de fármacos para diversos fines terapéuticos, que incluyen la vacunación profiláctica y terapéutica. Las terapias basadas en ARNm, en principio, pueden utilizarse también en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, por ejemplo, en inmunoterapia del cáncer y otras enfermedades, en medicina regenerativa (por ejemplo, ECV, enfermedades neurodegenerativas), cáncer (que no sea inmunoterapia), enfermedades infecciosas agudas y muchas otras. Sin embargo, hasta ahora, el uso generalizado del ARNm para estos fines se ha visto gravemente obstaculizado por problemas con la introducción del ARNm funcional en las células.

Se han utilizado vehículos para intentar superar este problema. Entre los vehículos sintéticos, la forma más común de suministrar moléculas de ARNm ha sido mediante el uso de lípidos catiónicos (Feigner y Ringold, 1989, *Nature* 337, 387-388; Malone *et al.*, 1989, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6077-6081; Lu *et al.*, 1994, *Cancer Gene Ther* 1, 245-252; Kariko *et al.*, 1999, *Gene Ther* 6, 1092-1100; Hecker *et al.*, 2001, *Mol Ther* 3, 375-384.). En cambio, solo hay unos pocos ejemplos del uso de policationes, tales como DEAE-dextrano (Malone *et al.* 1989, anteriormente citado), poli(L-lisina) (Fisher y Wilson 1997, *Biochem J.* 321 (Pt 1), 49-58), dendrímeros (Nair *et al.* 1998, *Nat Biotechnol* 16, 364-369) y polietilenimina (Bettinger *et al.* 2001, *Nucleic Acids Res* 29, 3882-389). El vehículo lipídico empleado con mayor éxito para el suministro de ARNm es la lipofectamina. Sin embargo, se han observado reacciones tóxicas utilizando lipofectamina *in vivo* que limitan el potencial de este agente para aplicaciones clínicas.

Sin embargo, sigue siendo necesario contar con métodos para suministrar ARNm *in vivo* que sean seguros, controlados y que se dirijan el ARNm a la localización requerida. Los presentes inventores han proporcionado un método para suministrar ARNm *in vivo* que no depende de vehículos, sino que utiliza un método de internalización fotoquímica que permite la liberación controlada y programada del ARNm en el sitio de interés. Se ha descubierto que el método proporciona una calidad superior de suministro de ARNm *in vivo* a células diana en relación con el uso de lipofectamina como la regla de oro para el suministro de ARNm. Esto proporciona un método adecuado para diversas aplicaciones terapéuticas.

La internalización fotoquímica (PCI, por sus siglas en inglés) es una estrategia basada en la rotura de membranas endocíticas inducida por luz, desencadenada por el uso de un compuesto fotosensibilizador que se localiza en estas membranas (Berg *et al.*, 1999, *Cancer Res* 59, 1180-1183). Tras la iluminación, el compuesto fotosensibilizador inicia un proceso oxidativo mediante la creación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que destruyen la membrana.

Los métodos de PCI proporcionan un mecanismo para introducir moléculas en el citosol de una célula de una manera que no da como resultado una destrucción o una muerte celular generalizada, si la metodología se ajusta adecuadamente para evitar la producción excesiva de especies tóxicas, por ejemplo, reduciendo los tiempos de iluminación o la dosis de fotosensibilizador. El método básico de internalización fotoquímica (PCI) se describe en los documentos WO 96/07432 y WO 00/54802. En tales métodos, la molécula a internalizar (que en la presente invención sería la molécula de ARNm) y un agente fotosensibilizador, se ponen en contacto con una célula. El agente fotosensibilizador y la molécula que se va a internalizar se absorben en un subcompartimento contenido en la membrana celular dentro de la célula, es decir, sufren un endocitosado en una vesícula intracelular (por ejemplo, un lisosoma o endosoma). Al exponer la célula a la luz de la longitud de onda apropiada, se activa el agente fotosensibilizador que genera directa o indirectamente especies reactivas de oxígeno que rompen las membranas de la vesícula intracelular. Esto permite que la molécula internalizada se libere en el citosol.

Se encontró que en tal método la funcionalidad o la viabilidad de la mayoría de las células no se veía afectada perjudicialmente.

La estrategia de la PCI se ha utilizado para suministrar una variedad de moléculas al citosol *in vitro,* por ejemplo, moléculas de ARNip (Boe *et al.*, 2007, *Oligonucleotides* 17, 166-173; Oliveira *et al.*, 2007, *Biochim Biophys Acta* 1768, 1211-1217). El efecto *in vivo* de la terapia mediada por PCI sobre el tratamiento de tumores se ha documentado con bleomicina (Berg *et al.*, 2005, *Clin Cancer Res* 11, 8476-8485), la toxina proteica gelonina (Selbo *et al.*, 2001, *Int J Cancer* 92, 761-766) y con un plásmido que codifica un gen terapéutico (Ndoye *et al.*, 2006 *Mol Ther* 13, 1156-1162), La PCI se ha desarrollado para su uso en el tratamiento de varios tipos de tumores (Selbo *et al.,* 2010, *J. Control. Release,* 148(1), 2-12; y Høgset A, *et al.,* 2004, *Adv. Drug Deliver. Rev.,* 56(1), 95-115) y actualmente se encuentra en desarrollo clínico para este propósito, utilizando bleomicina como agente activo (Sultan *et al.,* 2016, *Lancet Oncol.* 17(9):1217-1229.

La PCI se ha utilizado para el suministro de oligonucleótidos (Hogset *et al.*, 2004, *Adv Drug Deliv Rev,* 56, 95-115). Si bien el uso de métodos de PCI para internalizar moléculas de interés, que incluye oligonucleótidos tales como ARNm (WO96/07432), el uso de la PCI para internalizar ARNm presenta problemas particulares y se ha descubierto que cuando las técnicas de PCI normales se sometieron a ensayo no resultaron eficaces para internalizar el ARNm. El ARNm y las moléculas relacionadas, tales como el ARNip, se han internalizado con PCI, pero mediante el uso de vehículos (W02008/007073 y Boe y Hovig, 2013, *Methods Mol. Biol.,* 969: 89-100).

En el trabajo que conduce a la presente invención, se ha desarrollado un protocolo nuevo y específico para el suministro de ARNm inducido por luz, que da como resultado la producción de proteínas en un sitio específico. Los presentes inventores muestran por primera vez que se puede lograr una producción de proteínas potente inducida por luz combinando la transfección de ARNm y la PCI. Es importante destacar, que los presentes inventores han desarrollado un protocolo que es controlable de manera específica en el tiempo y en el lugar. Además, el método evita el uso de agentes de transfección y los efectos secundarios causados por esos agentes.

El método descrito en el presente documento es particularmente ventajoso porque no es un método complejo y puede usarse con una variedad de moléculas de ARNm y células/localizaciones diana. Además, el momento y la localización de la irradiación para liberar las moléculas se pueden controlar, de modo que se libere solo en el momento y en la localización que se desee para lograr los efectos requeridos. Como tal, se minimiza la exposición de las células a los diversos componentes y se minimizan los efectos secundarios indeseables. Esto contrasta con las técnicas estándar para el suministro de ARNm, donde no es posible controlar el momento y la localización de la liberación de los distintos componentes sin el uso de agentes específicos (lo que añade un nivel adicional de complejidad).

Como se describe en los Ejemplos en el presente documento, se ha desarrollado un protocolo específico en el que se utilizan niveles muy bajos de fotosensibilizador (aproximadamente de 25 a 25.000 veces más bajos que en los protocolos estándar) para lograr el suministro de ARNm. Según el conocimiento de los presentes inventores, esta es la primera enseñanza sobre el suministro de ARNm (desnudo) *in vivo* utilizando un método de PCI exitosa.

Por tanto, en el presente documento se divulga un método para introducir *in vivo*una molécula de ARNm en el citosol de una(s) célula(s) en un sujeto, comprendiendo dicho método
i) poner en contacto dicha(s) célula(s) con una molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador y
ii) irradiar la(s) célula(s) con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador,
en donde dicho agente fotosensibilizador es una meso-tetrafenil clorina sulfonada, tetrafenilporfina sulfonada o una ftalocianina de aluminio di o tetrasulfonada, usada en una cantidad de 0,0001 a 1 µg. Una vez activada, los compartimentos intracelulares dentro de dicha célula que contienen dicho agente fotosensibilizador liberan el ARNm contenido en estos compartimentos al citosol, donde puede expresarse el ARNm.

La invención se refiere a las aplicaciones terapéuticas de este método y por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto, mediante la expresión de un polipéptido codificado por dicha molécula de ARNm, en donde dicho ARNm está desnudo y no está unido ni conjugado ni transportado por ningún otro componente para ayudar a su internalización y en donde dicho agente fotosensibilizador es una meso-tetrafenil clorina sulfonada, tetrafenilporfina sulfonada o una ftalocianina de aluminio di o tetrasulfonada, usada en una cantidad de 0,0001 a 1 µg.

Como se hace referencia en el presente documento, dicha molécula de "ARNm" es un polímero de ribonucleótidos, cada uno de los cuales contiene el azúcar ribosa junto con un grupo fosfato y una base nitrogenada (normalmente, adenina, guanina, citosina o uracilo). Se pueden utilizar moléculas modificadas, por ejemplo, con cadenas principales modificadas o nucleótidos de origen no natural o nucleótidos de origen natural modificados, tales como pseudouridina, 2-tiouridina, 5-metiluridina, 5-metilcitidina o N6-metiladenosina, de manera que aumente su semivida siempre que esto no afecte a su funcionalidad. Por tanto, el término "ARNm" también incluye tales moléculas modificadas, es decir, abarca derivados o variantes de ARNm que presentan la misma función, es decir, interacción con un ribosoma y traducción para expresar una secuencia codificada. Las variantes preferidas incluyen en las que se ha usado una estructura principal modificada (como anteriormente) o en las que se usa una o más bases de origen no natural o nucleótidos de origen natural modificados (que pueden introducirse durante la síntesis).

Como es el caso para el ADN, el ARN puede formar puentes de hidrógeno complementarios y el ARN puede ser bicatenario (ARNbc), monocatenario (ARNmc) o bicatenario con un saliente monocatenario. Preferentemente, el ARNm usado de acuerdo con la invención es monocatenario. La molécula monocatenaria puede formar estructuras terciarias que incluyen regiones bicatenarias, por ejemplo, estructuras en horquilla, formadas mediante emparejamiento de bases internas. Preferentemente, el ARNm tiene un caperuza en 5' y una cola poli(A) en 3' (por ejemplo, 120-150 nucleótidos de longitud). Pueden estar presentes regiones flanqueantes no traducidas en el extremo 3' y/o 5'. Preferentemente, dichas moléculas de ARNm tienen entre 50 y 10.000 nucleótidos de longitud, más preferentemente 50-1000 o 1000-5000, por ejemplo, 100-500 o 1500-2500 nucleótidos de longitud (cuando se considera la cadena codificante).

El ARNm no se asocia con un vehículo u otra molécula, es decir, no se une, ni se conjuga ni se transporta por ningún otro componente para ayudar a su internalización. Dicha asociación incluye cualquier conexión mediante unión, atrapamiento estérico u otro método que conecte las moléculas entre sí, de modo que permanezcan asociadas en condiciones adecuadas. Por tanto, no se utiliza ningún agente o vehículo de transfección. En este sentido, el ARNm que se utiliza está desnudo, es decir, sin moléculas asociadas que afecten a su internalización. El agente fotosensibilizador que se usa con el ARNm en los usos descritos en el presente documento no constituye un vehículo o agente de transfección para el ARNm.

Preferentemente el ARNm codifica un polipéptido, es decir, lleva suficientes codones codificantes consecutivos que si se tradujeran formarían un polipéptido. El polipéptido puede incluir un péptido señal para permitir el procesamiento y/o transporte una vez traducido. El polipéptido puede comprender una única entidad funcional o contener múltiples entidades funcionales, por ejemplo, el polipéptido puede contener uno o más antígenos peptídicos, que pueden usarse para vacunación. El ARNm puede codificar más de un polipéptido, de modo que el resultado de la traducción sea más de un polipéptido. Los codones no codificantes, por ejemplo, de terminación, también puede estar presente en la molécula de ARNm. Como se hace referencia en el presente documento, el "polipéptido" (que abarca un péptido) comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos. En un aspecto preferido, el polipéptido tiene al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de longitud y menos de 3000, 2000, 1000, 700, 500, 200 o 100 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 10-100, 200, 500, 700, 1000, 2000 o 3000 aminoácidos de longitud.

En un aspecto preferido, el polipéptido debe expresarse en la célula. El ARNm, una vez internalizado en la célula, se une mediante un ribosoma y el ARNm se traduce en una secuencia de aminoácidos utilizando la maquinaria de expresión genética de la célula. El polipéptido es preferentemente una molécula terapéutica, es decir, un polipéptido con propiedades terapéuticas, tal como un polipéptido de vacuna, un anticuerpo, una enzima, una citocina, un factor de crecimiento o una hormona peptídica, por ejemplo.

El uso de la invención se puede utilizar para introducir más de un tipo de molécula de ARNm en una célula. Dicho de otra manera, se pueden introducir simultáneamente en una célula moléculas de ARNm que tengan diferentes secuencias. Las moléculas que expresan pueden actuar de diferentes maneras o interactuar entre sí.

Se conocen en la técnica métodos adecuados para preparar ARNm e incluyen síntesis química, transcripción *in vitro*, vectores de expresión de ARNm y casetes de expresión de PCR. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Pon *et al.*, 2005, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acid.* 24(5-7), 777-81, Du *et al.,* 2006, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345(1), 99-105 y Katoh *et al.,* 2003, *Nucleic Acids Res Suppl.* (3), 249-50, Sahin *et al.,* 2014, *Nat. Rev. Drug Discov.,* 13(10), 759-780. El ARNm para usar en la invención también puede aislarse de células o tejidos. En particular esto permite un trato personalizado, por ejemplo, utilizando ARNm aislado del tumor de un sujeto para permitir la expresión de antígenos tumorales específicos del/de la paciente en inmunoterapia contra el cáncer.

El uso de la invención consigue la translocación de la molécula de ARNm al citosol. Sin embargo, se apreciará que no se puede lograr la captación de todas y cada una de las moléculas que entran en contacto con la célula. Sin embargo, es posible lograr una captación significativa y mejorada en relación con niveles de fondo, en los que no se utiliza PCI.

Preferentemente, los usos de la invención permiten la captación de moléculas de ARNm a niveles suficientes para que su efecto sea evidente en los productos expresados de esas células. La concentración adecuada de ARNm a poner en contacto con la célula puede ajustarse para lograr este objetivo, por ejemplo, para lograr la expresión de la secuencia codificada a los niveles deseados después de la incubación con células, por ejemplo, durante 24, 48, 72 o 96 horas (por ejemplo, 24 a 48 horas). El tipo y/o concentración del agente fotosensibilizador y el tiempo de irradiación también se pueden ajustar para lograr la expresión requerida.

Tal como se utiliza en el presente documento "y/o" se refiere a una o ambas (o más) de las opciones enumeradas que están presentes, por ejemplo, A, B y/o C incluye las opciones i) A, ii) B, iii) C, iv) A y B, v) A y C, vi) B y C y vii) A, B y C.

Los niveles de expresión se pueden medir determinando el nivel de proteína en la célula, usando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como transferencia Western.

La expresión puede evaluarse en relación con la expresión lograda sin el uso de PCI. Se pueden hacer comparaciones entre los niveles de expresión de proteínas que se observan a determinadas concentraciones de ARNm (y/o fotosensibilizador), en presencia y en ausencia de PCI. Por ejemplo, el uso de la invención preferentemente permite una expresión mejorada de polipéptidos de al menos un 10 %, por ejemplo, al menos un 20, un 30, un 40, un 50, un 60, un 70, un 80 o 90 % o más, por ejemplo, al menos un 100, un 200, un 300, un 400 o un 500 %, en comparación con la expresión de polipéptidos conseguida llevando a cabo el uso en ausencia de la etapa de irradiación de la técnica de PCI. En un aspecto particularmente preferido, el uso de la invención mejora la expresión en relación con el suministro que utiliza lipofectamina sin PCI en al menos un 10 %, por ejemplo, al menos un 20, un 30, un 40, un 50, un 60, un 70, un 80 o 90 % o más, por ejemplo, al menos un 100, un 200, un 300, un 400 o un 500 %. De manera conveniente, el polipéptido codificado debe expresarse de manera que se produzcan cantidades de 1-100 µg en el

sujeto. Estas cantidades son suficientes para la vacunación y la inmunoterapia. Se pueden generar cantidades mayores, por ejemplo, 1-100 mg cuando el polipéptido se utiliza con fines terapéuticos directos, por ejemplo, en métodos de terapia con proteínas.

En los usos de la invención, una o más células de dicho sujeto deben ponerse en contacto con dicha molécula de ARNm y el agente fotosensibilizador y deben irradiarse con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador. La "célula" o "células" están en dicho sujeto. El término "célula" o "células" se usa indistintamente en el presente documento. Por tanto, las "células" representativas incluyen todos los tipos de células de animales mamíferos y no mamíferos y de insectos. Preferentemente, sin embargo, las células son de mamífero, por ejemplo células de monos, gatos, perros, caballos, burros, ovejas, cerdos, cabras, vacas, ratones, ratas, conejos, cobayas, pero mucho más preferiblemente de seres humanos. Como alternativa, las células pueden ser células de pez.

El "sujeto" se refiere a un mamífero, reptil, ave, insecto o pez. Preferentemente el sujeto es un mamífero, particularmente un primate (preferentemente un ser humano), animal doméstico o de compañía, ganado o animal de laboratorio. En un aspecto preferido alternativo el sujeto es un pez. Por tanto, los animales preferidos incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas, gatos, perros, monos, cerdos, vacas, cabras, ovejas, burros, caballos y peces.

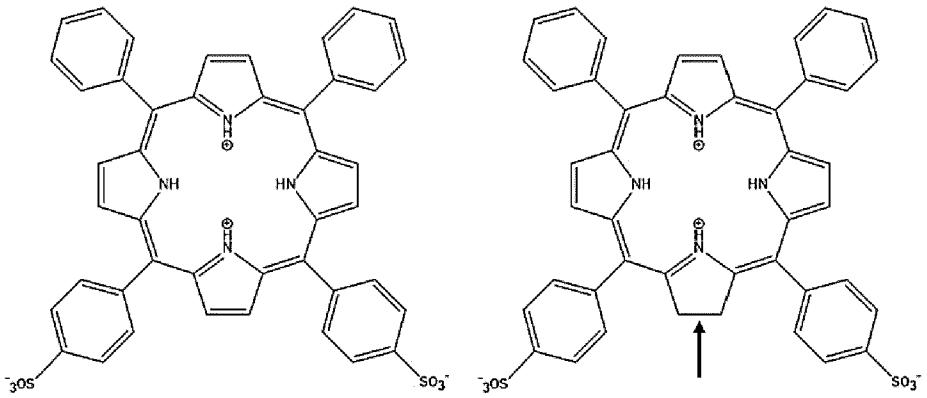
Como se utiliza en el presente documento "poner en contacto" se refiere a poner en contacto físico las células y el agente fotosensibilizador y/o el ARNm entre sí en condiciones adecuadas para la internalización en las células, por ejemplo, preferiblemente a 37 °C en un medio nutricional apropiado, por ejemplo, de 25 a 39 °C. En los usos de la invención el contacto se produce *in vivo.* A continuación, se analizan los usos preferidos para realizar la invención, incluidos el momento y las opciones para la etapa de contacto.

El agente fotosensibilizador es un agente que se activa con la iluminación a una longitud de onda e intensidad adecuadas para generar una especie activada.

Convenientemente, tal agente puede ser uno que se localice en compartimentos intracelulares, particularmente endosomas o lisosomas. En la técnica se conoce una variedad de tales agentes fotosensibilizadores y se describen en la bibliografía, que incluye el documento WO96/07432. De acuerdo con la invención, el agente fotosensibilizador que se utiliza es una meso-tetrafenil clorina sulfonada, tetrafenilporfina sulfonada o una ftalocianina de aluminio di o tetrasulfonada.

En un aspecto preferido, la meso-tetrafenil clorina es $TPCS_{2a}$ (tetrafenil clorina disulfonato) o $TPBS_{2a}$ (tetrafenil bacterioclorina disulfonato), la tetrafenilporfina sulfonada es $TPPS_n$, por ejemplo, $TPPS_4$ o $TPPS_{2a}$ (tetrafenilporfina sulfonato o disulfonato) y la ftalocianina de aluminio di o tetrasulfonada es $AlPcS_{2a}$ (ftalocianina de aluminio disulfonato). Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

$TPCS_{2a}$ y $TPPS_{2a}$ son particularmente preferidas, cuyas estructuras se proporcionan a continuación.




$TPPS_{2a}$ (Tetrafenil porfirina disulfonato)  $TPCS_{2a}$ (Tetrafenil clorina disulfonato)

La flecha indica la diferencia estructural entre las dos moléculas.

Opcionalmente, el agente fotosensibilizador puede estar unido, asociado o conjugado con una o más moléculas de vehículo o moléculas diana, que pueden actuar para facilitar o aumentar la captación del agente fotosensibilizador. Por tanto, el agente fotosensibilizador puede estar unido a un vehículo. Por ejemplo, el agente fotosensibilizador puede proporcionarse en forma de un conjugado, por ejemplo, un conjugado a base de quitosano, por ejemplo, un conjugado divulgado en el documento WO2013/189663.

Si bien la especificidad de la localización se puede lograr mediante administración local y activación mediante irradiación en el sitio de interés, si se desea, el agente fotosensibilizador puede dirigirse a células o tejidos específicos (por ejemplo, células cancerosas), asociándose o conjugándose con moléculas de direccionamiento específicas que promoverán la captación celular específica de la molécula del agente fotosensibilizador en las células o tejidos deseados.

Se pueden emplear muchas moléculas de direccionamiento diferentes, por ejemplo, como se describe en Curiel, 1999, *Ann. New York Acad. Sci.* 886, 158-171; Bilbao *et al.*, 1998, en Gene Therapy of Cancer (Walden *et al.,* eds., Plenum Press, Nueva York); Peng y Russell, 1999, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 454-457; Wickham, 2000, *Gene Ther.* 7, 110-114.

La "irradiación" de la célula para activar el agente fotosensibilizador se refiere a la administración de luz directa o indirectamente como se describe en lo sucesivo en el presente documento. Por tanto, las células pueden iluminarse con una fuente de luz, por ejemplo directa o indirectamente, por ejemplo, *in vivo* cuando las células están debajo de la superficie de la piel o están en forma de una capa de células que no están todas directamente iluminadas, es decir, sin la pantalla de otras células. Los métodos preferidos de irradiación son los que se describen a continuación.

De manera conveniente, el uso puede llevarse a cabo como se describe ahora. Cuando se vaya a utilizar un vehículo para el agente fotosensibilizador, el vehículo puede asociarse, unirse o conjugarse con el agente fotosensibilizador, simplemente mezclando los dos componentes en condiciones y concentraciones adecuadas y permitiendo que los componentes interactúen. La persona experta en la materia puede determinar fácilmente las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo esta etapa de contacto y las concentraciones adecuadas para cada vehículo y agente fotosensibilizador, mediante la realización de pruebas de rutina.

En el uso de la invención, la molécula de ARNm y el agente fotosensibilizador (opcionalmente con un vehículo y/o una molécula de direccionamiento) se aplican simultáneamente, por separado o secuencialmente a las células *in vivo,* después de lo cual el agente fotosensibilizador y la molécula de ARNm sufren un endocitosado o se translocan de otras maneras a endosomas, lisosomas u otros compartimentos restringidos de la membrana intracelular.

La molécula de ARNm y el compuesto fotosensibilizador se pueden aplicar a las células juntas o secuencialmente. Convenientemente, el ARNm debe administrarse a la célula simultáneamente con el agente fotosensibilizador (aunque pueden administrarse por separado, por ejemplo, secuencialmente). La molécula de ARNm y el agente fotosensibilizador pueden captarse por la célula en el mismo o en diferentes compartimentos intracelulares (por ejemplo, pueden translocarse conjuntamente).

A continuación, el ARNm se libera mediante la exposición de las células a luz de longitudes de onda adecuadas para activar el agente fotosensibilizador, lo que a su vez conduce a la alteración de las membranas del compartimento intracelular y a la posterior liberación del ARNm, que puede estar situado en el mismo compartimento que el agente fotosensibilizador, al citosol. Por tanto, en estos usos, la etapa final de exponer las células a la luz da como resultado que el ARNm se libere del mismo compartimento intracelular que el agente fotosensibilizador y se presente en el citosol.

El documento WO 02/44396 describe un método en el que el orden de las etapas podría cambiarse, de modo que, por ejemplo, el agente fotosensibilizador se pone en contacto con las células y se activa mediante irradiación antes de que la molécula que se va a internalizar (en este caso ARNm) entre en contacto con las células. Este método adaptado aprovecha el hecho de que no es necesario que la molécula a internalizar esté presente en el mismo subcompartimento celular que el agente fotosensibilizador en el momento de la irradiación.

Por tanto, en una realización preferida, dicho agente fotosensibilizador y dicha molécula de ARNm deben aplicarse a la célula juntos o dicho agente fotosensibilizador debe aplicarse por separado con respecto a dicha molécula de ARNm. Como consecuencia, la célula puede absorberlos en el mismo compartimento intracelular y a continuación, puede realizarse dicha irradiación. Se denomina a esto un uso de un "ligero después".

En una realización alternativa, dicho uso puede realizarse poniendo en contacto dicha célula con un agente fotosensibilizador, poniendo en contacto dicha célula con la molécula de ARNm que se va a introducir e irradiando dicha célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador, en donde dicha irradiación debe realizarse antes de la captación celular de dicha molécula de ARNm en un compartimento intracelular que contiene dicho agente fotosensibilizador, preferentemente, antes de la captación celular de dicha molécula de ARNm en cualquier compartimento intracelular.

Dicha irradiación se puede realizar después de la captación celular de la molécula de ARNm en un compartimento intracelular, estén la molécula de ARNm y el agente fotosensibilizador localizados o no en los mismos compartimentos intracelulares en el momento de la exposición a la luz. Sin embargo, en una realización preferida, la irradiación debe realizarse antes de la captación celular de la molécula que se va a internalizar (molécula de ARNm). Este es el llamado uso de un "ligero antes".

La "internalización", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al suministro citosólico de moléculas. En el presente caso, "internalización" incluye por tanto la etapa de liberación de moléculas desde compartimentos intracelulares/unidos a membranas hacia el citosol de las células.

Como se utiliza en el presente documento, "captación celular" o "translocación" se refiere a una de las etapas de internalización en la que las moléculas externas a la membrana celular se introducen en la célula de manera que se encuentran en el interior de la membrana celular externa, por ejemplo, por endocitosis u otros mecanismos de captación adecuados, por ejemplo, en o asociadas con compartimentos restringidos por membrana intracelular, por ejemplo, el retículo endoplásmico, cuerpo de Golgi, lisosomas, endosomas, etc.

La etapa de poner en contacto las células con un agente fotosensibilizador y con la molécula de ARNm puede realizarse de cualquier forma conveniente o deseada. Como se ha analizado anteriormente, estos agentes se pueden aplicar a las células juntas, por separado, simultánea o secuencialmente.

El agente fotosensibilizador debe ponerse en contacto con las células en una concentración adecuada y durante un período de tiempo adecuado, que puede determinarse fácilmente por una persona experta usando técnicas rutinarias y dependerá de factores tales como el agente fotosensibilizador particular usado, el modo de administración, el tipo de célula diana y su localización, el curso del tratamiento, la edad y el peso del/de la paciente/sujeto, la indicación médica, el cuerpo o el área del cuerpo a tratar, y puede variarse o ajustarse según se elija. La concentración del agente fotosensibilizador debe ser tal que, una vez captado por la célula, por ejemplo, en o asociado con uno o más de sus compartimentos intracelulares y activado por irradiación, una o más estructuras celulares se alteran, por ejemplo, uno o más compartimentos intracelulares se lisan o se alteran.

El agente fotosensibilizador se usa en una cantidad de 0,0001 a 1 µg (o 0,5 µg), preferentemente de 0,001 (o 0,0001) a 0,1 µg. Otros intervalos preferidos incluyen 0,0001 - 0,01 µg. Esta es considerablemente menor que las cantidades utilizadas habitualmente para PCI, tal como 25 µg. Se observará en la Figura 3 que el uso de cantidades superiores a 1 µg afecta negativamente al suministro de ARNm, de hecho, tienen un efecto negativo relativo al control. La dosis puede seleccionarse dependiendo del modo de administración y de la dosis de luz. Por ejemplo, para la administración intradérmica se puede seleccionar una dosis de 0,0001 a 0,05 µg (por ejemplo, de 0,001 a 0,01 µg). Se pueden utilizar dosis iguales o superiores para el suministro intratumoral, por ejemplo, se puede seleccionar una dosis de 0,001 a 1,0 µg (por ejemplo, de 0,01 a 0,2 µg). La dosis descrita anteriormente se puede utilizar para un suministro local en áreas locales pequeñas (menos de un cm cúbico). Cuando se van a tratar áreas más grandes, la dosis se puede escalar en consecuencia.

El agente fotosensibilizador se proporciona convenientemente en una solución con una concentración de 0,005 a 200 µg/ml, preferentemente de 0,05 a 20 µg/ml. Esta concentración es adecuada para un suministro local.

Se aplican consideraciones similares al ARNm. El ARNm se usa preferentemente en una cantidad de 0,1 a 100 µg, por ejemplo, 1 a 10 µg. La dosis puede seleccionarse dependiendo del modo de administración, como se ha analizado anteriormente. La dosis descrita anteriormente se puede utilizar para un suministro local en áreas locales pequeñas (menos de un cm cúbico). Cuando se van a tratar áreas más grandes, la dosis se puede escalar en consecuencia. El ARN se proporciona convenientemente en una solución con una concentración de 5 a 5000 µg/ml, preferentemente de 50 a 500 µg/ml. Esta concentración es adecuada para un suministro local.

Una concentración adecuada también debe tener en cuenta la molécula de ARNm y el agente fotosensibilizador en cuestión, las células en cuestión y la concentración final que se desea alcanzar en las células. Un mayor tiempo de contacto suele dar como resultado una mayor captación de la molécula en cuestión. Sin embargo, unos tiempos de incubación más cortos, por ejemplo, 30 minutos a 1 hora, también pueden dar como resultado una especificidad mejorada de la captación de la molécula. Por tanto, en la selección de un tiempo de contacto para cualquier uso, debe lograrse un equilibrio adecuado entre obtener una captación suficiente de la molécula al tiempo que mantener una especificidad suficiente del tratamiento de PCI.

El tiempo de incubación de la(s) célula(s) con el agente fotosensibilizador (es decir, el tiempo de "contacto") puede variar desde unos pocos minutos hasta varias horas, por ejemplo, de 30 minutos a 4 horas, preferentemente de 45 a 90 minutos. Como alternativa, pueden utilizarse incubaciones más largas, como por ejemplo de hasta 2, 5, 10, 12, 18 o 24 horas. El tiempo de incubación debe ser tal que el agente fotosensibilizador sea captado por las células adecuadas, por ejemplo, en compartimentos intracelulares en dichas células.

La molécula de ARNm debe ponerse en contacto con las células en una concentración adecuada y durante un período de tiempo adecuado. Las concentraciones adecuadas son las discutidas anteriormente. Los tiempos de contacto son los comentados anteriormente para el agente fotosensibilizador.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha descubierto que el contacto puede iniciarse incluso varias horas después de que se haya añadido el agente fotosensibilizador y de que haya tenido lugar la irradiación. Sin embargo, de manera conveniente, el ARNm y el agente fotosensibilizador deben ponerse en contacto con la(s) célula(s) al mismo tiempo durante los tiempos de contacto indicados anteriormente, antes de la irradiación.

Para lograr un tiempo adecuado de incubación (o tiempo de contacto) mediante el cual la molécula de ARNm y el agente fotosensibilizador se ponen en contacto con las células diana *in vivo* dependerá de factores tales como el modo de administración y el tipo de molécula de ARNm y de agente fotosensibilizador. Por ejemplo, si la molécula de ARNm se inyecta en un tumor, tejido u órgano que se va a tratar, las células cercanas al punto de inyección entrarán en contacto y por tanto, tenderán a absorber la molécula de ARNm más rápidamente que las células situadas a mayor distancia del punto de inyección, que probablemente entren en contacto con la molécula de ARNm en un momento posterior y a menor concentración.

Además, una molécula de ARNm administrada a cierta distancia de las células de interés puede tardar algún tiempo en llegar a las células diana y por tanto, puede llevar más tiempo tras la administración, por ejemplo, varias horas o días, para que se acumule una cantidad suficiente u óptima de la molécula de ARNm en una célula o tejido diana. Desde luego, las mismas consideraciones se aplican al tiempo de administración necesario para la captación del agente fotosensibilizador en las células. El tiempo de administración requerido para células individuales *in vivo* es probable que varíe dependiendo de estos y otros parámetros.

No obstante, aunque la situación *in vivo* es más complicada que si se utilizara un método similar *in vitro,* el concepto subyacente es que el momento en el que las moléculas entran en contacto con las células diana debe ser de modo que antes de que se produzca la irradiación, las células diana hayan captado una cantidad adecuada del agente fotosensibilizador y: (i) antes o durante la irradiación, la molécula de ARNm se ha captado o se captará después de un contacto suficiente con las células diana, en el mismo o diferentes compartimentos intracelulares o (ii) después de la irradiación, la molécula de ARNm está en contacto con las células durante un período de tiempo suficiente para permitir su captación en las células. Dado que la molécula de ARNm se absorbe por los compartimentos intracelulares afectados por la activación del agente fotosensibilizador (por ejemplo, compartimentos en los que está presente el agente), la molécula de ARNm puede captarse antes o después de la irradiación. Convenientemente, se contempla la administración local para aplicaciones *in vivo* y por tanto, los tiempos de contacto indicados anteriormente son adecuados. Para disipar cualquier duda, el tiempo de contacto se refiere al período de tiempo en el que el(los) agente(s) está(n) en contacto directo con la célula diana. El momento de la administración puede preceder al momento del contacto, a medida que el(los) agente(s) llega(n) a las células diana. Cuando se utiliza la administración local, el contacto directo comienza inmediatamente o poco después de la administración.

La iluminación de la célula (del sujeto) o del sujeto puede producirse aproximadamente de 30 minutos a 48 horas después de la administración de los diversos componentes para usar como se define en el presente documento. Cuando se utiliza la administración local para los usos *in vivo*, la iluminación puede producirse desde 30 minutos a 4 horas, por ejemplo, después de la administración (dado que el contacto comienza inmediatamente), si bien en los usos *in vivo* en los que no se utiliza la administración local, puede requerirse un tiempo más prolongado después de la administración si el tiempo de contacto con las células diana dentro del sujeto no es inmediato (dependiendo de la vía de administración), por ejemplo, desde 30 minutos hasta 24 (o 48) horas después de la administración. En una realización preferida, el tiempo de contacto y el tiempo desde la administración a la irradiación son los mismos, es decir, el contacto comienza inmediatamente después de la administración.

La etapa de irradiación de la luz para activar el agente fotosensibilizador puede tener lugar de acuerdo con técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica. La dosis, la longitud de onda y la duración de la iluminación, deben ser suficientes para activar el agente fotosensibilizador, es decir, para generar especies reactivas. Las fuentes de luz adecuadas son bien conocidas en la técnica.

La longitud de onda de la luz a utilizar se selecciona en función del agente fotosensibilizador a utilizar. La luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador es capaz de provocar la producción de especies reactivas de oxígeno al exponer el agente fotosensibilizador a esa luz. Las fuentes de luz artificial adecuadas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, que utilizan luz de longitud de onda azul (400-475 nm) o roja (620-750 nm). Para $TPCS_{2a}$, por ejemplo, puede utilizarse una longitud de onda de entre 400 y 500 nm, más preferentemente entre 400 y 450 nm, por ejemplo, de 400-435 nm o de 420-435 nm e incluso más preferentemente aproximadamente 435 nm o 435 nm. Como alternativa, se puede utilizar luz roja para garantizar una penetración de luz más profunda, por ejemplo, para tejido tumoral. En este caso, puede utilizarse una longitud de onda de 620-750, por ejemplo, 640-660 nm. Cuando sea adecuado, el fotosensibilizador, por ejemplo, una porfirina o una clorina, puede activarse mediante luz verde, por ejemplo, el fotosensibilizador KillerRed (Evrogen, Moscú, Rusia) puede activarse con luz verde.

Las fuentes de luz adecuadas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, la lámpara LumiSource® de PCI Biotech AS. Como alternativa, se puede utilizar un dispositivo de iluminación basado en LED que tenga una potencia de salida ajustable de hasta 60 mW y un espectro de emisión de 400-435 nm. Para la luz roja, una fuente de iluminación adecuada es el láser de diodo SN576003 del sistema láser PCI Biotech AS de 652 nm, aunque se puede utilizar cualquier fuente de luz roja adecuada.

Una persona experta en la materia puede seleccionar las dosis de luz adecuadas y nuevamente dependerán del agente fotosensibilizador y de la cantidad de agente fotosensibilizador acumulado en las células o tejidos diana. Por ejemplo, la dosis de luz utilizada normalmente para el tratamiento fotodinámico de cánceres con el fotosensibilizador

Photofrin y el precursor de protoporfirina ácido 5-aminolevulínico, está en el intervalo de 50-150 J/cm$^2$ en un intervalo de fluencia de menos de 200 mW/cm$^2$ para evitar la hipertermia. Las dosis de luz son generalmente más bajas cuando se usan agentes fotosensibilizadores con coeficientes de extinción más altos en el área roja del espectro visible. Sin embargo, para el tratamiento de tejidos no cancerosos con menos fotosensibilizador acumulado, la cantidad total de luz necesaria puede ser sustancialmente mayor que para el tratamiento de cánceres. Además, si se quiere mantener la viabilidad celular, se debe evitar la generación de niveles excesivos de especies tóxicas y los parámetros relevantes se pueden ajustar en consecuencia.

Una persona experta en la materia puede seleccionar las dosis de luz adecuadas y nuevamente, dependerán del agente fotosensibilizador usado y de la cantidad de agente fotosensibilizador acumulado en las células o tejidos diana. Las dosis de luz suelen ser menores cuando se utilizan fotosensibilizadores con coeficientes de extinción más elevados (por ejemplo, en la zona roja o en la zona azul si se utiliza luz azul, dependiendo del fotosensibilizador utilizado) del espectro visible. Por ejemplo, puede usarse una dosis de luz en el intervalo de 0,24 - 7,2 J/cm$^2$ en un intervalo de fluencia de 0,05-20 mW/cm$^2$, por ejemplo, 2,0 mW/cm$^2$, cuando se emplea un dispositivo de iluminación basado en LED que tiene una potencia de salida ajustable de hasta 60 mW y un espectro de emisión de 400-435 nm o de 420-435 nm. Como alternativa, por ejemplo, si se emplea la lámpara LumiSource®, una dosis de luz es adecuada en el intervalo de 0,1-6 J/cm$^2$, en un intervalo de fluencia de 0,1-20 (por ejemplo, 13 como el proporcionado por Lumisource®) mW/cm$^2$. Para la luz roja, puede utilizarse una dosis de luz de 0,03-8 J/cm$^2$, por ejemplo, 0,03-4 J/cm$^2$, por ejemplo, 0,3 J/cm$^2$, en un intervalo de fluencia de 0,1-5 mW/cm$^2$, por ejemplo, 0,81 mW/cm$^2$.

De manera conveniente, la fuente de luz y el tiempo de irradiación se seleccionan de modo que sean para irradiar la(s) célula(s) con una dosis de luz de 0,01 a 50J/cm$^2$, tal como 0,1 a 10 J/cm$^2$, por ejemplo, de 0,4 a 5 J/cm$^2$ con una tasa de fluencia de 13 mW/cm$^2$.

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

Un periodo de tiempo preferido para la etapa de irradiación depende de factores tales como la diana, el agente fotosensibilizador, la cantidad de fotosensibilizador acumulado en las células o tejido diana y la superposición entre el espectro de absorción del agente fotosensibilizador y el espectro de emisión de la fuente de luz. En general, el periodo de tiempo para la etapa de irradiación es del orden de minutos a horas, por ejemplo, preferentemente hasta 60 minutos, por ejemplo, de 15 segundos a 60 minutos, preferentemente de 0,5 a 12 minutos, preferentemente durante 4 a 6 minutos.

Los usos de la invención pueden dar lugar inevitablemente a cierta muerte celular en virtud del tratamiento fotoquímico, es decir, mediante la generación de especies tóxicas en la activación del agente fotosensibilizador. Dependiendo del uso propuesto, esta muerte celular puede no ser una consecuencia y, de hecho, puede ser ventajosa para algunas aplicaciones (por ejemplo, tratamiento del cáncer). Preferentemente, sin embargo, se evita la muerte celular para permitir la traducción del ARNm y la expresión del polipéptido codificado. Los usos de la invención se pueden modificar de tal forma que la fracción o proporción de las células supervivientes se regule seleccionando la dosis de luz en relación con la concentración del agente fotosensibilizador. De nuevo, dichas técnicas se conocen en la materia.

En aplicaciones en las que son deseables las células viables, no se destruyen sustancialmente todas las células o una mayoría significativa (por ejemplo, al menos un 50 %, más preferiblemente al menos un 60, un 70, un 80 o un 90 % de las células). La viabilidad celular después del tratamiento PCI puede medirse mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como la prueba MTS.

Independientemente de la cantidad de muerte celular inducida por la activación del fotosensibilizador, para que la molécula de ARNm tenga un efecto en las células, es importante que la dosis de luz esté regulada de tal manera que algunas de las células individuales en las que se manifiesta el efecto de la PCI no mueran por el tratamiento fotoquímico en solitario (aunque posteriormente puedan destruirse por moléculas introducidas en las células si estas moléculas tienen un efecto citotóxico).

Los efectos citotóxicos se pueden lograr mediante el uso de una molécula de ARNm, por ejemplo, que se internaliza en una célula tumoral mediante el uso de la invención y que expresa una molécula citotóxica.

Los usos de la invención se utilizan *in vivo* para diversos fines terapéuticos, incluida la expresión de productos genéticos específicos, por ejemplo, usos de terapia con proteínas, inmunoterapia y terapia génica.

Por tanto, en los usos de la presente invención *in vivo* la expresión de un polipéptido en una(s) célula(s) en un sujeto se logra introduciendo una molécula de ARNm en una(s) célula(s) mediante un uso como se ha definido anteriormente en el presente documento, en donde dicha molécula de ARNm codifica dicho polipéptido.

Los usos de la invención se utilizan en el tratamiento de cualquier enfermedad, trastorno o infección, que se beneficie de la expresión de un polipéptido, por ejemplo, mediante la expresión de uno o más genes para proporcionar moléculas

terapéuticas que actúen directa o indirectamente. Tales moléculas pueden actuar directamente para proporcionar un resultado terapéutico o pueden actuar indirectamente, por ejemplo, generando una respuesta inmunitaria o ayudando a la alteración de la expresión génica y por tanto, proporcionando terapia génica a un sujeto, como se analiza con más detalle a continuación en el presente documento. Tales moléculas terapéuticas incluyen anticuerpos terapéuticos (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que pueden dirigirse a sitios adecuados para tratar enfermedades, infecciones o trastornos. La molécula terapéutica también puede ser una enzima u otra molécula funcional necesaria para el metabolismo, por ejemplo, factores de crecimiento, citocinas u hormonas peptídicas. Como alternativa, se puede utilizar un inhibidor o una molécula inductora de muerte celular, por ejemplo, una molécula citotóxica. De manera conveniente, el polipéptido expresado puede proporcionar una molécula antigénica contra la que se puede generar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, para vacunación profiláctica o terapéutica. La respuesta inmunitaria puede generarse contra infecciones patógenas, por ejemplo, infecciones bacterianas o víricas o contra células aberrantes en el cuerpo, por ejemplo, células cancerosas. Por tanto, el polipéptido puede ser una molécula antigénica, tal como una vacuna contra el cáncer o un antígeno bacteriano o vírico. Los usos preferidos de la invención se analizan con más detalle a continuación.

La invención proporciona composiciones adecuadas para los usos terapéuticos. Por tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador, en donde dicho ARNm está desnudo y no está unido ni conjugado ni transportado por ningún otro componente para ayudar a su internalización y en donde dicho agente fotosensibilizador es una meso-tetrafenil clorina sulfonada, tetrafenilporfina sulfonada o una ftalocianina de aluminio di o tetrasulfonada y se proporciona en una cantidad de 0,0001 a 1 µg. También se proporciona la composición para usar en terapia. Preferentemente, dicho agente fotosensibilizador y/o dicho ARNm son como se han definido anteriormente en el presente documento. Una composición farmacéutica comprende, además del(de los) principio(s) activo(s), uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Como alternativa, el ARNm y el agente fotosensibilizador pueden estar en soluciones o composiciones separadas que permitan diferentes mecanismos o tiempos para la administración o aplicación en los usos de la invención. Como se hace referencia en el presente documento, "coadministración" y "coaplicación" se refieren al uso de ambos componentes en el mismo uso, más que al uso simultáneo (en términos de tiempo o en la misma composición).

Como se define en el presente documento, "tratamiento" se refiere a reducir, aliviar o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o infección que se está tratando, con respecto a los síntomas antes del tratamiento. "Prevención" (o que previene o profilaxis) se refiere a retrasar o prevenir la aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o infección. La prevención puede ser absoluta o eficaz solo en algunos individuos o células o durante un período de tiempo limitado.

La enfermedad, trastorno o infección a tratar o prevenir puede ser cualquier afección que se beneficiaría de la expresión de uno o más polipéptidos. Tales afecciones pueden presentar una expresión baja o nula del polipéptido, por ejemplo, cuando el polipéptido endógeno no se expresa en los niveles requeridos, está ausente o unos niveles más altos serían terapéuticos (por ejemplo, para corregir procesos metabólicos o para vacunación) o se beneficiarían del uso de un polipéptido exógeno con fines terapéuticos, por ejemplo, para vacunación o para lograr la muerte celular, por ejemplo, una molécula citotóxica. En otro aspecto y como se describe a continuación en el presente documento, la terapia puede ser una terapia génica. En algunos casos, la terapia génica puede proporcionar un gen para reemplazar un equivalente defectuoso o ausente en el sujeto. Los polipéptidos expresados pueden actuar directamente en una manera terapéutica (por ejemplo, una molécula citotóxica) o pueden iniciar una respuesta terapéutica, por ejemplo, una respuesta inmunitaria terapéutica. Las enfermedades, trastornos o infecciones particularmente preferidas a tratar incluyen cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedades autoinmunitarias, fibrosis quística, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, infecciones víricas, tales como la gripe, hepatitis (por ejemplo, B y C), VIH y herpes, infecciones con bacterias intra o extracelulares, tales como en tuberculosis, lepra, clamidia, listeria, legionela y cólera e infección por *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, Streptococcus* ssp., *N. meningitidis* y S. *pyogenes,* infecciones por parásitos, por ejemplo, en malaria y leishmaniosis y otras enfermedades, trastornos o infecciones, analizados en el presente documento.

Los usos *in vivo* se pueden dividir en usos de terapia con proteínas, inmunoterapia y terapia génica.

En los usos de terapia de proteínas, el ARNm se utiliza para producir una proteína que le falta al/a la paciente, por ejemplo, debido a una mutación heredada o expresión reducida o que tendría un efecto terapéutico. En una alternativa, esto podría ser, por ejemplo una enzima, una hormona peptídica, una citocina, un factor de crecimiento, un factor de coagulación sanguínea (en trastornos hemorrágicos) u otras proteínas importantes. En este caso, se suministra un ARNm que codifica la proteína ausente a las células adecuadas del cuerpo (por ejemplo, en la piel, músculo, hígado, etc.), para que estas células produzcan la proteína ausente que actuará dentro de la célula productora (por ejemplo, si el ARNm codifica una enzima intracelular), localmente (por ejemplo, para producir un factor de crecimiento en un determinado tejido) o sistémicamente (por ejemplo, para producir un factor de coagulación sanguínea o una hormona peptídica ausentes).

En una segunda alternativa, la proteína puede ser una proteína que tenga un efecto terapéutico, pero que no sea necesariamente de origen natural. Por ejemplo, el ARNm puede codificar uno o más anticuerpos contra un agente infeccioso. En este caso, tras el suministro del ARNm al cuerpo (en cualquier tejido capaz de producir la proteína anticuerpo y de secretarla al torrente sanguíneo), el cuerpo sintetizará rápidamente (4 a 6 horas) anticuerpos contra el agente infeccioso que pueden detener rápidamente el desarrollo de la infección. Tal terapia será muy específica para el agente infeccioso específico y no estará sujeta a problemas, por ejemplo, con resistencia a los antibióticos. Preferentemente, este uso puede utilizarse para tratar infecciones agudas (hasta que el sistema inmunitario del cuerpo pueda hacerse cargo), resultantes de patógenos, por ejemplo, virus, bacterias (particularmente bacterias extracelulares, pero también intracelulares) y parásitos. El uso también puede utilizarse para complementar la respuesta inmunitaria del cuerpo para tratar diversas enfermedades, trastornos o infecciones, incluyendo enfermedades víricas, tales como gripe, hepatitis (por ejemplo, B y C), VIH y herpes y muchas otras infecciones víricas; infecciones con bacterias (extra o intracelulares), tales como en tuberculosis, lepra, clamidia, listeria, legionela y cólera e infección por *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, Streptococcus* ssp., *N. meningitidis* y S. *pyogenes* y varias otras infecciones; infecciones por parásitos, por ejemplo, en malaria y leishmaniosis.

Los anticuerpos también pueden usarse para tratamientos en los que se sabe que las proteínas anticuerpos son útiles. Tales tratamientos incluyen el cáncer, aunque también otros grupos de enfermedades, tales como enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, etc.).

Otras proteínas terapéuticas de origen no natural incluyen moléculas citotóxicas, por ejemplo, para tratar el cáncer.

En una tercera alternativa, el ARNm puede usarse con fines regenerativos, por ejemplo, para inducir la producción local de proteínas que ayudarán a remodelar el tejido diana de la manera deseada. Por tanto, por ejemplo, puede usarse ARNm que codifica factores que promoverán la cicatrización adecuada de una herida (por ejemplo, factores de crecimiento) o factores que inducirán la formación de nuevos vasos sanguíneos en tejidos isquémicos, tales como en el corazón después de un infarto. Otro ejemplo es el uso de ARNm para generar una producción de impulsos de un factor paracrino para dirigir células progenitoras, por ejemplo, para diferenciar de una manera útil para la generación de una respuesta beneficiosa, por ejemplo, la regeneración del músculo y de los vasos cardíacos después de un infarto de miocardio (Zangi *et al.,* 2013, *Nat. Biotechnol.,* 31 (10), 898-907). Se pueden utilizar principios similares, por ejemplo, para la reparación de daños en los tejidos neuronales (por ejemplo, debido a daños físicos, trombosis cerebral o en la enfermedad de Alzheimer o en la de Parkinson), para la regeneración de tejidos en el ojo y en muchos otros tipos de daño tisular.

En una realización particularmente preferida, la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En este caso, la terapia con proteínas se puede lograr de varias maneras (la inmunoterapia se puede usar también o como alternativa, como se describe a continuación en el presente documento). Por ejemplo, el ARNm se puede utilizar para la expresión local o sistémica de proteínas que modulan las respuestas inmunitarias antitumorales, tales como inhibidores de puntos de control (por ejemplo, anticuerpos monoclonales codificados por ARNm), ligandos que activarán moléculas coestimuladoras en las células inmunitarias (por ejemplo, un ligando CD40) o factores que actúan de forma paracrina para modular el microambiente tumoral de una manera que pueda potenciar las respuestas inmunitarias antitumorales, por ejemplo, actuando sobre los macrófagos infiltrantes de tumores.

En los usos de inmunoterapia, el polipéptido expresado se utiliza para generar una respuesta inmunitaria terapéutica. Esto puede incluir los usos de la vacunación profiláctica o terapéutica. Tales usos pueden utilizarse para tratar enfermedades infecciosas. Por ejemplo, se puede utilizar una vacunación profiláctica en la que se utiliza un antígeno relevante antes de la exposición al agente infeccioso para generar una inmunidad adaptativa a la exposición posterior. Las enfermedades infecciosas diana preferidas suelen ser enfermedades en las que las respuestas de los linfocitos T son importantes. Los ejemplos incluyen: enfermedades víricas, tales como gripe, hepatitis (por ejemplo, B y C), VIH, herpes y muchas otras infecciones víricas; infecciones con bacterias (intra o extracelulares), tales como en tuberculosis, lepra, clamidia, listeria, legionela y cólera e infección por *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, Streptococcus* ssp., *N. meningitidis* y *S. pyogenes* y varias otras infecciones; infecciones por parásitos, por ejemplo, en malaria y leishmaniosis. Se seleccionan los antígenos adecuados para generar una respuesta inmunitaria profiláctica y el ARNm codificante se utiliza en los usos de la invención.

También se contempla la vacunación terapéutica, es decir, el tratamiento de sujetos infectados mediante la generación de una respuesta inmunitaria al antígeno expresado después de la internalización del ARNm. En este caso, las enfermedades diana preferidas son las infecciones crónicas por virus, bacterias (generalmente intracelulares, aunque también extracelulares) y parásitos, tales como los que se han descrito anteriormente para la vacunación profiláctica.

El uso de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer es de interés particular. Esto incluye tanto la vacunación profiláctica como la terapéutica, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

También se pueden utilizar los usos de la terapia génica. Como se hace referencia en el presente documento, se considera que los usos de la terapia génica son usos que introducen o modifican uno o más genes dentro de un sujeto o que modifican la expresión de uno o más genes en un sujeto. Por tanto, a modo de ejemplo, el ARNm puede codificar un polipéptido que ayudaría a alterar el genoma del sujeto. Por tanto, por ejemplo, puede usarse ARNm que codifique

enzimas útiles en la modificación específica de secuencia del ADN cromosómico en las células diana, por ejemplo, para corregir un gen mutado o para insertar una copia de una versión no mutada de un gen mutado que provoca una enfermedad. Entre los ejemplos de tales enzimas se incluyen Cas9 (tecnología CRISPR), nucleasas de dedo de zinc, ARNm de la nucleasa efectora similar al activador de transcripción (ARNm de TALEN) y recombinasas específicas de sitio. Según sea necesario, en algunos casos, el ARNm se utilizaría junto con un "ADN donante", por ejemplo, para insertar la secuencia de ADN "correcta" para corregir una mutación, en otros casos, el ARNm puede usarse solo, por ejemplo, para inactivar un gen. En aspectos preferidos, el uso puede utilizarse para tratar la enfermedad de Huntington, fibrosis quística y otras enfermedades hereditarias.

Como se ha analizado anteriormente, en un aspecto particularmente preferido el uso se utiliza para generar una respuesta inmunitaria, particularmente para lograr una vacunación. Como se hace referencia en el presente documento, una respuesta inmunitaria es cualquier reacción del sistema de defensa del hospedador *in vivo.* Como se cita en el presente documento, "vacunación" es el uso de un antígeno (o una molécula que contiene un antígeno) para provocar una respuesta inmunitaria que es profiláctica o terapéutica contra el desarrollo (o desarrollo posterior) de una enfermedad, trastorno o infección, en donde esa enfermedad, trastorno o infección, se asocian con la expresión o la presencia anormal de ese antígeno. Preferentemente, la enfermedad es cáncer. En una realización, la vacunación es terapéutica, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres o de infecciones crónicas de parásitos, bacterianas o víricas, como se describe en el presente documento. En una realización alternativa, la vacunación es profiláctica, por ejemplo, para prevenir un cáncer o reducir el desarrollo de más cánceres después del tratamiento de un cáncer anterior, con una vacunación terapéutica. En una realización adicional, cuando se va a generar una respuesta inmunitaria respecto a una infección, por ejemplo, una infección, como se ha analizado anteriormente en el presente documento, por ejemplo, una infección vírica, tal como hepatitis o infección por VIH, infecciones parasitarias como la malaria o infecciones bacterianas (por ejemplo, tuberculosis), la vacunación es de naturaleza profiláctica.

En los usos de vacunación, el ARNm expresa una molécula antigénica adecuada para fines de vacunación.

Muchos de tales antígenos o componentes de vacunas antigénicas se conocen en la técnica e incluyen todo tipo de antígenos bacterianos o víricos o, de hecho, antígenos o componentes antigénicos de cualquier especie patógena incluyendo protozoos u organismos superiores.

Aunque tradicionalmente los componentes antigénicos de las vacunas han comprendido organismos completos (vivos, muertos o atenuados), es decir, vacunas de células completas, además de vacunas de subunidades, es decir, las vacunas basadas en componentes antigénicos particulares de organismos, por ejemplo, proteínas o péptidos o incluso carbohidratos, se han investigado ampliamente e informado en la bibliografía. Se puede usar cualquier componente de vacuna basado en "subunidades" como el polipéptido expresado de acuerdo con la presente invención.

Sin embargo, la invención encuentra una utilidad particular en el campo de las vacunas peptídicas, por ejemplo, péptidos de 5-500, por ejemplo, de 10 a 250, tal como de 15 a 75 o de 8 a 25 aminoácidos.

Se ha propuesto en la bibliografía un gran número de candidatos de vacunas peptídicas, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades virales e infecciones tales como infección por VIH/SIDA o gripe, parvovirus canino, virus de la leucemia bovina, hepatitis, etc. (véanse, por ejemplo, Phanuphak *et al.,* 1997, *Asian Pac. J. Allergy. Immunol.,* 15(1), 41-8; Naruse, 1994, *Hokkaido IgakuZasshi,* 69(4), 811-20; Casal *et al.,* 1995, *J. Virol.*, 69(11), 7274-7; Belyakov *et al.,* 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 95(4), 1709-14; Naruse *et al.,* 1994, *Proc. Natl. Sci. USA,* 91(20), 9588-92; Kabeya *et al.,* 1996, *Vaccine*, 14(12), 1118-22; Itoh *et al.,* 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 83(23) 9174-8. De forma similar, pueden usarse péptidos bacterianos, como también pueden ser antígenos peptídicos derivados de otros organismos o especies.

Además de los antígenos derivados de organismos patógenos, también se han propuesto péptidos para su uso como vacunas contra el cáncer u otras enfermedades tales como esclerosis múltiple. Por ejemplo, los péptidos de oncogenes mutantes son muy prometedores como vacunas contra el cáncer que actúan como antígenos en la estimulación de linfocitos T citotóxicos. (Schirrmacher, 1995, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology,* 121443-451; Curtis, 1997, *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers,* 17, 316-327). También se ha evaluado una vacuna peptídica sintética para el tratamiento del melanoma metastásico (Rosenberg *et al.,* 1998, *Nat. Med.,* 4(3), 321-7) y las vacunas personalizadas basadas en ARNm, que se basan en epítopos peptídicos mutados en tumores de pacientes individuales, se han mostrado muy prometedoras para el tratamiento del cáncer (Sahin *et al.,* 2017, *Nature,* 257, 222-226). Se describe una vacuna peptídica del receptor de linfocitos T para el tratamiento de la esclerosis múltiple en Wilson *et al.,* 1997, *J. Neuroimmunol.,* 76(1-2), 15-28. Cualquiera de tal componente peptídico de la vacuna se puede utilizar como el polipéptido expresado de acuerdo con la invención, al igual que cualquiera de los péptidos descritos o propuestos como vacunas peptídicas en la bibliografía. El ARNm utilizado para la vacunación puede codificar un único antígeno peptídico o puede codificar varios antígenos peptídicos diferentes traducidos en un polipéptido, por ejemplo, como se describe en Sahin *et al.*, 2017, citado anteriormente.

Para la administración *in vivo* de los agentes descritos en el presente documento, puede usarse cualquier modo de administración común o estándar en la técnica, por ejemplo, vía oral, parenteral (por ejemplo, intramuscular, transdérmica, subcutánea, percutánea, intraperitoneal, intratecal o intravenosa), intestinal, bucal, rectal o tópica, tanto

para superficies internas como externas del cuerpo, etc. La invención se puede utilizar en relación con cualquier tejido que contenga células en las que se pueda localizar el agente fotosensibilizador o la molécula de ARNm (o células que contengan el mismo), incluidas las localizaciones de fluidos corporales, así como los tejidos sólidos. Todos los tejidos se pueden tratar siempre que el fotosensibilizador sea captado por las células diana y la luz se pueda suministrar adecuadamente. Los modos de administración preferidos son la administración o inyección intradérmica, intratumoral, subcutánea, intramuscular o tópica, particularmente, la administración intradérmica o intratumoral. Preferentemente, la administración es tópica (también denominada en el presente documento administración local).

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

Para lograr el resultado deseado, es decir, el tratamiento o la prevención de enfermedad, trastorno o infección, pueden repetirse los métodos subyacentes al uso o a las partes de los mismos. Por tanto, el método subyacente al uso en su totalidad puede realizarse varias veces (por ejemplo, 2, 3 o más veces) después de un intervalo adecuado o pueden repetirse partes del método, por ejemplo, la administración adicional del ARNm y/o agente fotosensibilizador, como se define en el presente documento o etapas de irradiación adicionales. Por ejemplo, el método o parte del método podrá realizarse nuevamente en cuestión de días, por ejemplo, entre 5 y 60 días (por ejemplo 7, 14, 15, 21, 22, 42 o 51 días), por ejemplo, 7 a 20 días, preferentemente, 14 días o semanas, por ejemplo, entre 1 y 5 semanas (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 semanas) después de su primera realización. Todo o parte del método puede repetirse varias veces en intervalos de tiempo adecuados, por ejemplo, cada dos semanas o 14 días. En una realización preferida, el método se repite al menos una vez. En otra realización, el método se repite dos veces.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes Ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos en los que:

La Figura 1 muestra el efecto de la PCI sobre el suministro intradérmico de ARNm. Se muestran los resultados de las imágenes de bioluminiscencia en el animal 6 del Ejemplo 1A. Al animal se le inyectó una mezcla de 2 µg de ARNm de luciferasa (TriLink L-6107, 5meC, Ψ) y de 0,003 µg de $TPCS_{2a}$ en los sitios A y D (círculos superior izquierdo e inferior derecho) y de 2 µg de ARNm solo en los sitios B y C (círculos superior derecho e inferior izquierdo). 1 h después de la inyección, todos los sitios de inyección se iluminaron durante 6 min con el dispositivo de iluminación LumiSource. 4 horas después de la iluminación, la expresión de luciferasa se analizó mediante imágenes de bioluminiscencia, utilizando el instrumento IVIS, a. Imagen del ratón que muestra los sitios de inyección y las regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés). b. Cuantificación de la bioluminiscencia en las diferentes regiones de interés; las líneas negras horizontales indican los valores de la media.

La Figura 2 muestra una comparación de la expresión de luciferasa en todos los sitios tratados para el Ejemplo 1A. A los animales se les inyectaron 2 µg de ARNm de luciferasa (TriLink L-6107, 5meC, Ψ) solo o junto con 0,003 µg de $TPCS_{2a}$, de acuerdo con la Tabla 1. Se tomaron imágenes de los animales para detectar bioluminiscencia de luciferasa en el instrumento IVIS y se cuantificó la bioluminiscencia en las diferentes regiones de interés como se describe en los Métodos. Se muestran los valores de la media +/- error típico de la media (n = 12).

La Figura 3 muestra los efectos de las diferentes dosis de fotosensibilizador. 3 µg de ARNm y diferentes cantidades de $TPCS_{2a}$ (indicado en la figura; PCI10 significa PCI con una dosis de $TPCS_{2a}$ de 10 µg, etc.) se mezclaron y se inyectaron en la piel de ratones como se describe en los Métodos. 60 min después de las inyecciones se iluminó a los ratones durante 6 (en general) o 3 min (indicado en la figura) con luz azul. A los animales se les inyectó luciferina y se tomaron las imágenes en el instrumento IVIS. Para cada animal, se comparó la luminiscencia en los sitios que recibieron ARNm + $TPCS_{2a}$ con la luminiscencia en los sitios que recibieron ARNm solo y se calculó el aumento de veces (FI, por sus siglas en inglés) en la luminiscencia en los sitios inyectados con $TPCS_{2a}$ en cada animal.

La Figura 4 muestra los efectos de diferentes dosis de luz. Se mezclaron e inyectaron 2 µg de ARNm y 0,003 µg de $TPCS_{2a}$ en la piel de ratones. 60 min después de las inyecciones, se iluminó a los ratones durante 0,5 o 4 min. A los animales se les inyectó luciferina y se tomaron las imágenes en el instrumento IVIS. La luminiscencia en regiones de interés definidas alrededor de los sitios de inyección se cuantificó en el instrumento IVIS. Para cada se comparó la luminiscencia en los sitios que recibieron ARNm + $TPCS_{2a}$ con la luminiscencia en los sitios que recibieron ARNm solo y se calculó el aumento de veces (FI) en la luminiscencia en los sitios inyectados con $TPCS_{2a}$.

La Figura 5 muestra la eficacia del método de PCI de suministro intradérmico de ARNm en relación con el uso de lipofectamina. Se trataron los animales de acuerdo con la Tabla 3. Se tomaron imágenes de los animales para detectar

bioluminiscencia de luciferasa en el instrumento IVIS y se cuantificó la bioluminiscencia en las diferentes regiones de interés como se ha descrito. Se muestran los valores de la media +/- error típico de la media. n = 4 para "PCI 0,003" y 6 para "ARNm solo de Lipo".

La Figura 6 muestra el efecto de la PCI sobre el suministro de ARNm en tumores. Los animales con tumores TC-1 se trataron como se describe en el Ejemplo 2 y en la Tabla 4. 20 horas después de la iluminación, los tumores se extirparon y homogeneizaron y se midieron la actividad luciferasa (RLU) y la concentración de proteínas en los homogeneizados de tumores. Los resultados se muestran como mediana de RLU/mg de proteína para cada grupo (n = 3).

La Figura 7 muestra el efecto de la PCI sobre el suministro de ARNm en tumores. Los animales con tumores MC-38 se trataron como se describe en el Ejemplo 3 y en la Tabla 5. 20 horas después de la iluminación, los tumores se extirparon y homogeneizaron y se midieron la actividad de luciferasa y la concentración de proteínas en los homogeneizados de tumores. A. Resultados del suministro tumoral de ARNm de luciferasa en tumores únicos. B. Resultados del suministro tumoral de ARNm de luciferasa como una media ± ETM para cada grupo experimental.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Suministro intradérmico de ARNm *in vivo*

Se realizaron experimentos para estudiar el suministro *in vivo* de ARNm desnudo en la piel en ratones.

Materiales y métodos

Se mezclaron ARNm de luciferasa de luciérnaga (1921 nucleótidos de longitud; L-6107, con bases modificadas 5-metilcitidina (5meC) y pseudouridina (Ψ); L-6307, ARNm no modificado; L-7202, con la base modificada 5-metoxiuridina (5moU) y con la modificación TriLink CleanCap™ como estructura de caperuza, adquirido de TriLink Biotechnologies, San Diego, EE. UU.) y $TPCS_{2a}$ (Amphinex®, PCI Biotech AS, Noruega), en un volumen de 20 µl de PBS y la mezcla se inyectó en la piel de ratones en el momento 0. Se utilizaron diferentes dosis en diferentes experimentos y en las muestras de control no se utilizó $TPCS_{2a}$. Las inyecciones se realizaron en 4 sitios (AD) por ratón (véanse la Fig. 1 y el diagrama y la tabla más adelante) y los sitios de inyección se iluminaron en general 60 min después de la inyección de ARNm/$TPCS_{2a}$. Con esta preparación, los dos sitios de cada animal que no recibieron $TPCS_{2a}$ actúan como controles internos de cada animal. Esto es útil para poder corregir posibles diferencias entre animales, por ejemplo, en la inyección y distribución de luciferina antes de la obtención de imágenes de bioluminiscencia.

Los sitios de inyección se iluminaron con luz azul (longitud de onda entre 400 y 540 nm, con un pico de alrededor de 435 nm) del dispositivo de iluminación LumiSource.

4-6 o 20-24 horas después de la iluminación, se analizó la actividad de luciferasa en los sitios de inyección mediante imágenes de bioluminiscencia en el instrumento IVIS (IVIS Spectrum, modelo 124375R de PerkinElmer). Se tomaron fotografías 20 min después de la inyección de luciferina y se cuantificó la bioluminiscencia en una región de interés (ROI) definida alrededor de cada sitio de inyección. El procedimiento para las imágenes de IVIS fue el siguiente:
i) A los ratones se les administró una inyección intraperitoneal de 3 mg de D-luciferina (200 µl de solución madre de 15 mg/ml).
ii) Después de aproximadamente 10 min, se anestesiaron los ratones mediante una inyección subcutánea de Zoletil (10-15 mg/kg de xilasina, 5-10 mg/kg de butorfanol y 15-20 mg/kg de Zoletil (que contiene zolazepam y tiletamina)).
iii) 20 min después de la inyección de D-luciferina, se colocó a los ratones en el instrumento IVIS y se tomaron fotografías con exposición automática de luminiscencia (cámara Andor IS0825R4582; versión de iKon Living Image: 4.5.2,18424. Factor de agrupación: 8; Filtro de excitación: Block; Filtro de emisión: Open; número f: 1)
iv) Se midió la bioluminiscencia en las ROI que cubren cada sitio de inyección para cuantificar la expresión de luciferasa. La preparación detallada de un experimento típico (Ejemplo 1) se puede encontrar en la Tabla 1.

Ejemplo 1A: La PCI mejora el suministro de ARNm

Se inyectó ARNm y $TPCS_{2a}$ a los animales, como se describe en los Métodos y se trataron como se describe en la Tabla 1, con los sitios que se muestran en el diagrama a continuación.

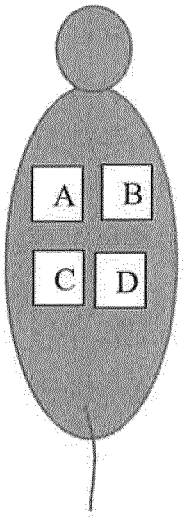



Tabla 1. Preparación del experimento en el Ejemplo 1A. Los diferentes sitios de inyección en cada animal se muestran en el diagrama anterior.

| N.º de animal/sitio | Nombre del grupo | ARNm (µg) | Cantidad de $TPCS_{2a}$ (µg) por inyección. | Iluminación (luz azul mínima) |
|---|---|---|---|---|
| 1-A | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 1-B | PCI 0,003 B | 2 | 0,003 | 6 |
| 1-C | PCI 0,003 C | 2 | 0,003 | 6 |
| 1-D | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 2-A | PCI 0,003 A | 2 | 0,003 | 6 |
| 2-B | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 2-C | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 2-D | PCI 0,003 D | 2 | 0,003 | 6 |
| 3-A | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 3-B | PCI 0,003 B | 2 | 0,003 | 6 |
| 3-C | PCI 0,003 C | 2 | 0,003 | 6 |
| 3-D | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 4-A | PCI 0,003 A | 2 | 0,003 | 6 |
| 4-B | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 4-C | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 4-D | PCI 0,003 D | 2 | 0,003 | 6 |
| 5-A | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 5-B | PCI 0,003 B | 2 | 0,003 | 6 |
| 5-C | PCI 0,003 C | 2 | 0,003 | 6 |
| 5-D | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 6-A | PCI 0,003 A | 2 | 0,003 | 6 |
| 6-B | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 6-C | Control, ARNm solo | 2 | - | 6 |
| 6-D | PCI 0,003 D | 2 | 0,003 | 6 |

Resultados

La Figura 1a muestra la formación de imágenes de bioluminiscencia para los cuatro sitios de inyección en un animal típico (animal 6 de la Tabla 1). Puede observarse que los sitios sometidos a PCI (sitios A y D) presentaron una luminiscencia significativamente más fuerte que los sitios de control que recibieron ARNm solo (B y C). Esto también se refleja en la cuantificación de la luminiscencia en las regiones de interés (panel b), que muestra que en este animal la bioluminiscencia media para los sitios tratados con PCI fue más de 5 veces mayor que para los sitios de ARNm solo.

La Figura 2 muestra los valores medios de los sitios tratados con ARNm solo y con PCI (12 sitios de cada uno) para todos los animales en el Ejemplo 1 A. Puede observarse que, en promedio, el empleo de PCI mejoró el suministro de ARNm aproximadamente 3 veces.

Ejemplo 1B: Suministro de ARNm en diferentes dosis de fotosensibilizador En el Ejemplo 1B se realizaron experimentos para explorar más a fondo las relaciones de respuesta a la dosis de $TPCS_{2a}$ para el suministro intradérmico de ARNm en detalle.

Se inyectaron 3 µg de ARNm y diferentes cantidades de $TPCS_{2a}$ (que varían entre 0,0003 µg y 10 µg) en la piel de ratones, como se describe en los Métodos. 60 min después de las inyecciones, se iluminó a los ratones durante 6 (en general) o 3 min (en un caso) con luz azul del dispositivo de iluminación LumiSource. A los animales se les inyectó luciferina y se tomaron imágenes en el instrumento IVIS como se describe en los Métodos. La luminiscencia en regiones de interés definidas alrededor de los sitios de inyección se evaluó en el instrumento IVIS. Para cada animal, se comparó la luminiscencia en los sitios que recibieron ARNm + $TPCS_{2a}$ respecto a la luminiscencia en los sitios que recibieron ARNm solo y se calculó el aumento de veces (FI) en la luminiscencia en los sitios de inyectados con $TPCS_{2a}$ en cada animal mediante la fórmula
$FI = luminiscencia_{ARNm+TPCS2a}/luminiscencia_{ARNm\ solo}$.

Resultados

Como puede observarse en la Figura 3, con una iluminación de luz azul de 6 min, la PCI en dosis de $TPCS_{2a}$ superiores a 0,3 µg tuvo un efecto perjudicial sobre el suministro de ARNm, observándose una fuerte disminución en la expresión de luciferasa (PCI10, PCI3 y PCI1). Las dosis de $TPCS_{2a}$ de 0,3 a 0,03 µg no alteraron considerablemente la expresión de luciferasa en comparación con lo que se obtuvo con ARNm solo, si bien en dosis de 0,01 µg e inferiores se observó una mejora considerable del suministro de ARNm, también de acuerdo con lo encontrado con la dosis de 0,003 µg en el Ejemplo 1A. Con la dosis de 0,003 µg también se probaron dos dosis de luz diferentes y es evidente que se obtuvo una mejora comparable del suministro de ARNm con iluminación de 6 y 3 min. Además, se puede observar que la PCI también mejoró el suministro de ARNm en dosis de $TPCS_{2a}$ aún más bajas de 0,0003 µg.

Ejemplo 1C: Suministro de ARNm a diferentes dosis de luz.

Se realizó un experimento para estudiar la relación entre la dosis de luz y el suministro de ARNm con la PCI, con 0,003 µg de $TPCS_{2a}$. El ARNm de luciferasa utilizado fue ARNm no modificado L-6307 FLuc de TriLink, 2 µg por inyección. Se mezclaron ARNm y $TPCS_{2a}$ y se inyectaron por vía intradérmica en el momento 0 en cuatro sitios por ratón (como se describe en los Métodos y en la Tabla 2). Los sitios de inyección se iluminaron 60 min después de la inyección de ARNm/$TPCS_{2a}$, con luz azul del dispositivo de iluminación LumiSource. Se utilizaron tiempos de iluminación de 0,5 a 4 min y la eficacia del suministro de ARNm se evaluó mediante la formación de imágenes de fluorescencia *in vivo*, como se describe en los Métodos. La luminiscencia en las ROI definidas alrededor de los sitios de inyección se cuantificó en el instrumento IVIS. Para cada animal, se comparó la luminiscencia en los sitios que recibieron ARNm + $TPCS_{2a}$ respecto a la luminiscencia en los sitios que recibieron ARNm solo y se calculó el aumento de veces (FI) en la luminiscencia en los sitios de inyectados con $TPCS_{2a}$ en cada animal mediante la fórmula $FI = luminiscencia_{ARNm+TPCS2a}/luminiscencia_{ARNm\ solo}$.

Tabla 2. Preparación del experimento en el Ejemplo 1C.

| N.º de animal/sitio | Nombre del grupo | ARNm (µg) | Cantidad de $TPCS_{2a}$ (µg) por inyección. | Iluminación (luz azul mínima) |
|---|---|---|---|---|
| 1-A | Control, ARNm solo | 2 | - | 0,5 |
| 1-B | PCI 0,5/0,003 B | 2 | 0,003 | 0,5 |
| 1-C | PCI 0,5/0,003 C | 2 | 0,003 | 0,5 |
| 1-D | Control, ARNm solo | 2 | - | 0,5 |
| 2-A | PCI 0,5/0,003 A | 2 | 0,003 | 0,5 |
| 2-B | Control, ARNm solo | 2 | - | 0,5 |
| 2-C | Control, ARNm solo | 2 | - | 0,5 |
| 2-D | PCI 0,5/0,003 D | 2 | 0,003 | 0,5 |

(continuación)

| N.º de animal/sitio | Nombre del grupo | ARNm (µg) | Cantidad de $TPCS_{2a}$ (µg) por inyección. | Iluminación (luz azul mínima) |
|---|---|---|---|---|
| 3-A | Control, ARNm solo | 2 | | 4 |
| 3-B | PCI 4/0,003 B | 2 | 0,003 | 4 |
| 3-C | PCI 4/0,003 C | 2 | 0,003 | 4 |
| 3-D | Control, ARNm solo | 2 | - | 4 |
| 4-A | PCI 4/0,003 A | 2 | 0,003 | 4 |
| 4-B | Control, ARNm solo | 2 | - | 4 |
| 4-C | Control, ARNm solo | 2 | - | 4 |
| 4-D | PCI 4/0,003 D | 2 | 0,003 | 4 |

Resultados

Puede observarse a partir de la Figura 4 que en una dosis de $TPCS_{2a}$ de 0,003 µg, la PCI mejoró el suministro de ARNm, también con tiempos de iluminación de 0,5 y 4 min. En conjunto con los resultados con 6 min de iluminación (Ejemplos 1A y 1B), esto muestra que con esta dosis de fotosensibilizador, la PCI puede inducir el suministro de ARNm en un intervalo de dosis de luz bastante grande, es decir, al menos de luz azul de 0,4 a 5 $J/cm^2$, calculado a partir de la salida de luz conocida de LumiSource de aproximadamente 13 $mW/cm^2$.

Ejemplo 1D: Comparación de la PCI con suministro de ARNm con lipofectamina. La lipofectamina es un agente de transfección muy eficaz comúnmente utilizado para el suministro de ARNm y otros ácidos nucleicos; y también se ha utilizado para el suministro de ARNm *in vivo* (Zangi *et al.,* 2013, citado anteriormente). Sin embargo, se han observado varios tipos de reacciones tóxicas con el uso de lipofectamina *in vivo*, limitando las posibilidades del uso clínico de este agente de transfección. En este ejemplo el suministro de ARNm *in vivo* con PCI con ARNm desnudo se comparó con lo que se logró con lipofectamina. El experimento se realizó de la siguiente manera:

- Se utilizó ARNm de luciferasa modificado de TriLink (ARNm L-7202 CleanCap™ FLuc, 5moU modificado), 2 µg por inyección.
- El ARNm se mezcló con lipofectamina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) o $TPCS_{2a}$, de acuerdo con la Tabla 3 y las mezclas se inyectaron (volumen de inyección de 20 µl) en la piel en el momento 0 en cuatro sitios por ratón. Algunos de los animales se iluminaron durante 6 min con luz azul (dispositivo LumiSource) 60 min después de la inyección de lipofectamina/ARNm/$TPCS_{2a}$ (véase la Tabla 3).
- La traducción del ARNm se detectó mediante la formación de imágenes de IVIS de bioluminiscencia de luciferasa 4 horas después del punto temporal de la iluminación y se cuantificó la bioluminiscencia en las regiones de interés (véanse los Métodos).

Tabla 3. Preparación del experimento en el Ejemplo 1D.

| N.º de animal/sitio | Nombre del grupo | ARNm (µg) | Lipofectamina (µl) | Cantidad de $TPCS_{2a}$ (µg) por inyección. | Iluminación (luz azul mínima) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1-A | Control, ARNm solo | 2 | - | - | 6 |
| 1-B | PCI 0,003 | 2 | - | 0,003 | 6 |
| 1-C | PCI 0,003 | 2 | | 0,003 | 6 |
| 1-D | Control, ARNm solo | 2 | - | - | 6 |
| 2-A | PCI 0,003 | 2 | - | 0,003 | 6 |
| 2-B | Control, ARNm solo | 2 | | - | 6 |
| 2-C | Control, ARNm solo | 2 | | | 6 |
| 2-D | PCI 0,003 | 2 | | 0,003 | 6 |
| 3-A | Control, ARNm solo | 2 | - | - | - |
| 3-B | ARNm solo de Lipo | 2 | 6 | - | - |
| 3-C | ARNm solo de Lipo | 2 | 6 | - | - |
| 3-D | Control, ARNm solo | 2 | - | - | - |
| 4-A | ARNm solo de Lipo | 2 | 6 | - | - |

(continuación)

| N.º de animal/sitio | Nombre del grupo | ARNm (µg) | Lipofectamina (µl) | Cantidad de $TPCS_{2a}$ (µg) por inyección. | Iluminación (luz azul mínima) |
|---|---|---|---|---|---|
| 4-B | Control, ARNm solo | 2 | - | - | - |
| 4-C | Control, ARNm solo | 2 | - | - | - |
| 4-D | ARNm solo de Lipo | 2 | 6 | - | - |
| 5-A | Control, ARNm solo | 2 | - | - | - |
| 5-B | ARNm solo de Lipo | 2 | 6 | - | - |
| 5-C | ARNm solo de Lipo | 2 | 6 | - | |
| 5-D | Control, ARNm solo | 2 | - | - | - |

Resultados

Puede observarse en la Figura 5 que para el suministro intradérmico de ARNm la PCI con 0,003 µg de $TPCS_{2a}$ mejoró la traducción del ARNm casi 4 veces más que lo que se logró con la lipofectamina.

Ejemplo 2: Suministro intratumoral de ARNm *in vivo* con iluminación de luz roja

Se realizó un experimento para estudiar el suministro *in vivo* de ARNm desnudo a tumores TC-1 (modelo para tumores inducidos por VPH) en ratones.

Materiales y métodos

En estos experimentos se empleó el modelo tumoral TC-1 para el cáncer inducido por VPH. El suministro de ARNm se evaluó realizando un ensayo enzimático de luciferasa en homogeneizados de tumores recolectados el día después de la iluminación. Se utilizó iluminación con luz láser de luz roja con una longitud de onda de 652 nm. El experimento se realizó de la siguiente manera:

- Se mezcló ARNm de luciferasa (ARNm de FLUC CleanCap™ L-7202 (5moll)) de TriLink, 3 µg por inyección) con $TPCS_{2a}$ y se inyectó en los tumores en un volumen de inyección de 20 µl.
- 60 min después de la inyección de ARNm/$TPCS_{2a}$, los tumores se iluminaron con diferentes dosis de luz láser roja (a 652 nm) durante 12,5-500 segundos.
- El día después de la iluminación, se extirparon todos los tumores y se congelaron para un posterior ensayo enzimático de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega, n.º de cat. E1500).
- El contenido de proteína en las muestras se midió con el kit RC DC Protein Assay (BioRad) y las cantidades relativas de luciferasa activa en cada muestra se calcularon como unidades relativas de luminiscencia (RLU, por sus siglas en inglés: unidades arbitrarias) por mg de proteína.

La preparación detallada del experimento se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación del experimento en el Ejemplo 2.

| N.º de animal | Nombre del grupo | $TPCS_{2a}$ (µg) | µg de ARNm | Dosis de luz ($J/cm^2$) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Sin tratar | - | - | Sin ilumin. |
| 2 | Sin tratar | - | - | Sin ilumin. |
| 3 | ARNm solo | - | 3 | Sin ilumin. |
| 4 | ARNm solo | - | 3 | Sin ilumin. |
| 5 | ARNm solo | - | 3 | Sin ilumin. |
| 6 | ARNm + 0,1 TPC | 0,1 | 3 | Sin ilumin. |
| 7 | ARNm + 0,1 TPC | 0,1 | 3 | Sin ilumin. |
| 8 | ARNm + 0,1 TPC | 0,1 | 3 | Sin ilumin. |
| 9 | PCI 0,1 J | 0,1 | 3 | 0,1 |
| 10 | PCI 0,1 J | 0,1 | 3 | 0,1 |
| 11 | PCI 0,1 J | 0,1 | 3 | 0,1 |
| 12 | PCI 0,5 J | 0,1 | 3 | 0,5 |
| 13 | PCI 0,5 J | 0,1 | 3 | 0,5 |
| 14 | PCI 0,5 | 0,1 | 3 | 0,5 |
| 15 | PCI 2 J | 0,1 | 3 | 2 |

(continuación)

| N.º de animal | Nombre del grupo | $TPCS_{2a}$ (µg) | µg de ARNm | Dosis de luz ($J/cm^2$) |
|---|---|---|---|---|
| 16 | PCI 2 J | 0,1 | 3 | 2 |
| 17 | PCI 2 J | 0,1 | 3 | 2 |
| 18 | PCI 4 J | 0,1 | 3 | 4 |
| 19 | PCI 4 J | 0,1 | 3 | 4 |
| 20 | PCI 4 J | 0,1 | 3 | 4 |

Resultados

En la Figura 6 puede observarse que con una dosis de $TPCS_{2a}$ de 0,1 µg, la PCI indujo una fuerte mejora en el suministro y traducción del ARNm. Este efecto se observó en todas las dosis de iluminación probadas (de 0,1 a 4 $J/cm^2$), pero aparentemente con un óptimo de alrededor de 2 $J/cm^2$. En comparación, la adición de 0,1 µg de $TPCS_{2a}$ sin iluminar los tumores (el grupo de ARNm + 0,1 µg $TPCS_{2a}$) no pareció mejorar considerablemente el suministro de ARNm con respecto a lo que se logró con el ARNm solo.

Ejemplo 3: Suministro intratumoral de ARNm *in vivo* con iluminación de luz azul

Se realizó un experimento para estudiar el suministro *in vivo* de ARNm desnudo a tumores de adenocarcinoma de colon (tumores MC-38) en ratones.

Materiales y métodos

El experimento se realizó con ARNm modificado que codifica la luciferasa y el efecto se analizó mediante un ensayo enzimático de luciferasa en extractos tumorales, con tumores recogidos 20 horas después de la iluminación. Cada animal tenía dos tumores (A y B) que se inyectaron y se analizaron por separado.

*Materiales*

Fotosensibilizador $TPC_{2a}$ (PCI Biotech AS).

ARNm de luciferasa modificado con TriLink (T14-GU03A), se utilizaron 3 µg por inyección.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 (Charles River). La identificación de animales y las condiciones de alojamiento, aclimatación, medio ambiente, la dieta y el agua, estuvieron de acuerdo con los procedimientos operativos estándar vigentes en las instalaciones para animales del Hospital Universitario de Oslo - The Radium Hospital.
Edad y peso al inicio de la dosificación: 5-6 semanas, 18-20 g

Las células tumorales MC-38 (adenocarcinoma de colon) se obtuvieron de Kerafast (Boston, EE. UU.).

*Procedimiento experimental*

Se inocularon 500 000 células MC-38 por tumor a los animales, 2 tumores por animal. El tamaño de los tumores en la inyección de ARNm fue de 60-150 $mm^3$. Se aleatorizaron los animales según el volumen del tumor, se excluyeron los animales con úlceras tumorales.

El ARNm se mezcló con $TPCS_{2a}$ y la mezcla (25 µl) se inyectó en los tumores en el momento 0. El ARNm puro (desnudo) se inyectó en el mismo punto temporal. Las inyecciones se realizaron con anestesia gaseosa (Sevoflurano). El objetivo de la inyección era depositar una solución en el centro del tercio exterior del tumor, evitando el núcleo central del tumor. Se utilizaron jeringas de insulina para suministrar los 25 µl de tratamiento.

Los tumores en los grupos de PCI se iluminaron (luz azul de LumiSource) 60 min después de la inyección de ARNm/$TPCS_{2a}$ de acuerdo con la Tabla 5. El día después de la administración de ARNm (es decir, alrededor de 20 horas después de la iluminación), se sacrificaron los animales y se extirparon y congelaron todos los tumores para su posterior homogeneización y ensayo enzimático de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega, n.º de cat. E1500). Después de la homogeneización, la cantidad de proteína en el extracto tumoral se determinó utilizando el ensayo de proteínas RC-DC (Bio-Rad Hercules, California, EE. UU.) y se calculó la actividad enzimática de luciferasa por mg de tumor.

Los grupos experimentales fueron los establecidos en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Preparación del experimento en el Ejemplo 3.

| N.º de animal (tumor (A o B)) | Nombre del grupo | $TPCS_{2a}$ (µg) | ARNm desnudo (µg) | Tiempo de iluminación (min) |
|---|---|---|---|---|
| 1A | ARNm solo | - | 3 | - |

(continuación)

| N.º de animal (tumor (A o B)) | Nombre del grupo | $TPCS_{2a}$ (µg) | ARNm desnudo (µg) | Tiempo de iluminación (min) |
|---|---|---|---|---|
| 1B | ARNm solo | - | 3 | - |
| 2A | ARNm solo | - | 3 | - |
| 2B | ARNm solo | - | 3 | - |
| 3A | ARNm solo | - | 3 | - |
| 3B | ARNm solo | - | 3 | - |
| 4A | ARNm PCI 0,003/6 min | 0,003 | 3 | 6 |
| 4B | ARNm PCI 0,003/6 min | 0,003 | 3 | 6 |
| 5A | ARNm PCI 0,003/6 min | 0,003 | 3 | 6 |
| 5B | ARNm PCI 0,003/6 min | 0,003 | 3 | 6 |
| 6A | ARNm PCI 0,003/6 min | 0,003 | 3 | 6 |
| 6B | ARNm PCI 0,003/6 min | 0,003 | 3 | 6 |
| 7A | ARNm PCI 0,003/6 min | 0,003 | 3 | 6 |
| 7B | ARNm PCI 0,003/6 min | 0,003 | 3 | 6 |
| 8A | ARNm PCI 0,001/6 min | 0,001 | 3 | 6 |
| 8B | ARNm PCI 0,001/6 min | 0,001 | 3 | 6 |
| 9A | ARNm PCI 0,001/6 min | 0,001 | 3 | 6 |
| 9B | ARNm PCI 0,001/6 min | 0,001 | 3 | 6 |
| 10A | ARNm PCI 0,001/6 min | 0,001 | 3 | 6 |
| 10B | ARNm PCI 0,001/6 min | 0,001 | 3 | 6 |
| 11A | ARNm PCI 0,01/6 min | 0,01 | 3 | 6 |
| 11B | ARNm PCI 0,01/6 min | 0,01 | 3 | 6 |
| 12A | ARNm PCI 0,01/6 min | 0,01 | 3 | 6 |
| 12B | ARNm PCI 0,01/6 min | 0,01 | 3 | 6 |
| 13A | ARNm PCI 0,01/6 min | 0,01 | 3 | 6 |
| 13B | ARNm PCI 0,01/6 min | 0,01 | 3 | 6 |
| 14A | ARNm PCI 0,01/6 min | 0,01 | 3 | 6 |
| 15A | ARNm PCI 0,01/6 min | 0,01 | 3 | 6 |

Resultados

Como puede observarse en la Figura 7A, el empleo de la tecnología de la PCI mejoró sustancialmente el suministro de ARNm de luciferasa en tumores MC38, manifestado por un fuerte aumento de la actividad enzimática luciferasa en los homogeneizados tumorales. La Figura 7B muestra los valores medios para los diferentes grupos experimentales, indicando mejoras inducidas por la PCI en el suministro de ARNm de aproximadamente 3 (grupo de 0,003/6 min) a aproximadamente 10 veces (grupo de 0,01/6 min), en comparación con el suministro de ARNm sin utilizar PCI.

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto, mediante la expresión de un polipéptido codificado por dicha molécula de ARNm, en donde dicho ARNm está desnudo y no está unido ni conjugado ni transportado por ningún otro componente para ayudar a su internalización y en donde dicho agente fotosensibilizador es una meso-tetrafenil clorina sulfonada, tetrafenilporfina sulfonada o una ftalocianina de aluminio di o tetrasulfonada, usada en una cantidad de 0,0001 a 1 µg.

2. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho agente fotosensibilizador
a) es $TPCS_{2a}$ o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,
b) debe utilizarse en una cantidad de 0,001 a 0,1 µg y/o
c) debe utilizarse en una concentración de 0,005 a 200 µg/ml, preferentemente de 0,05 a 20 µg/ml.

3. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la molécula de ARNm
a) tiene una longitud de 50 a 10.000 nucleótidos y/o
b) debe utilizarse en una cantidad de 0,1 a 100 µg, preferentemente en una concentración de 5 a 5000 µg/ml.

4. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho ARNm debe expresarse en dicha(s) célula(s), en donde preferentemente el polipéptido expresado por dicho ARNm es una molécula terapéutica, preferentemente un anticuerpo, un polipéptido de vacuna o una molécula citotóxica.

5. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde una o más células de dicho sujeto debe(n) ponerse en contacto con dicha molécula de ARNm y el agente fotosensibilizador y debe(n) irradiarse con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador.

6. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde
a) dicha(s) célula(s) es(son) una(s) célula(s) de mamífero o una(s) célula(s) de pez,
b) la luz tiene una longitud de onda de 400-475 nm, preferentemente 400-435 nm o una longitud de onda de 620-750 nm, preferentemente 640-660 nm.

7. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde
a) dicha etapa de contacto debe realizarse durante 30 min a 4 horas, preferentemente de 45 minutos a 90 minutos, por ejemplo, 60 minutos y/o
b) la(s) célula(s) deben irradiarse durante entre 15 segundos y 60 minutos, preferentemente durante 0,5 a 12 minutos, preferentemente durante 4 a 6 minutos.

8. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde
a) la(s) célula(s) debe(n) irradiarse con una dosis de luz de 0,01 a 50 $J/cm^2$ y/o
b) dicha(s) célula(s) debe(n) ponerse en contacto con dicho ARNm y un agente fotosensibilizador simultáneamente, por separado o secuencialmente.

9. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde
a) dicho sujeto es un mamífero o un pez, preferentemente, el mamífero es un mono, gato, perro, caballo, burro, oveja, cerdo, cabra, vaca, ratón, rata, conejo o cobaya, más preferentemente, el sujeto es un ser humano y/o
b) dicho ARNm y/o dicho agente fotosensibilizador deben administrarse localmente, preferentemente por vía intradérmica o intratumoral.

10. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha enfermedad, trastorno o infección es una que se beneficiaría de la expresión de uno o más polipéptidos, preferentemente para terapia con proteínas, inmunoterapia o terapia génica.

11. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde debe generarse una respuesta inmunitaria a dicho polipéptido expresado, preferentemente dicho tratamiento o prevención se produce mediante vacunación, en donde preferentemente dicha vacunación es profiláctica o terapéutica.

12. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde dicha enfermedad es cáncer o dicha infección es una infección vírica o bacteriana.

13. La molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde dicho ARNm y un agente fotosensibilizador deben administrarse por vía

intradérmica o intratumoral.

14. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ARNm y un agente fotosensibilizador, en donde dicho ARNm está desnudo y no está unido ni conjugado ni transportado por ningún otro componente para ayudar a su internalización y en donde dicho agente fotosensibilizador es una meso-tetrafenil clorina sulfonada, tetrafenilporfina sulfonada o una ftalocianina de aluminio di o tetrasulfonada y se proporciona en una cantidad de 0,0001 a 1 µg, en donde preferentemente dicho agente fotosensibilizador es como se define en la reivindicación 2 y/o dicho ARNm es como se define en la reivindicación 3 o 4.

15. La composición de la reivindicación 14 para usar en terapia.

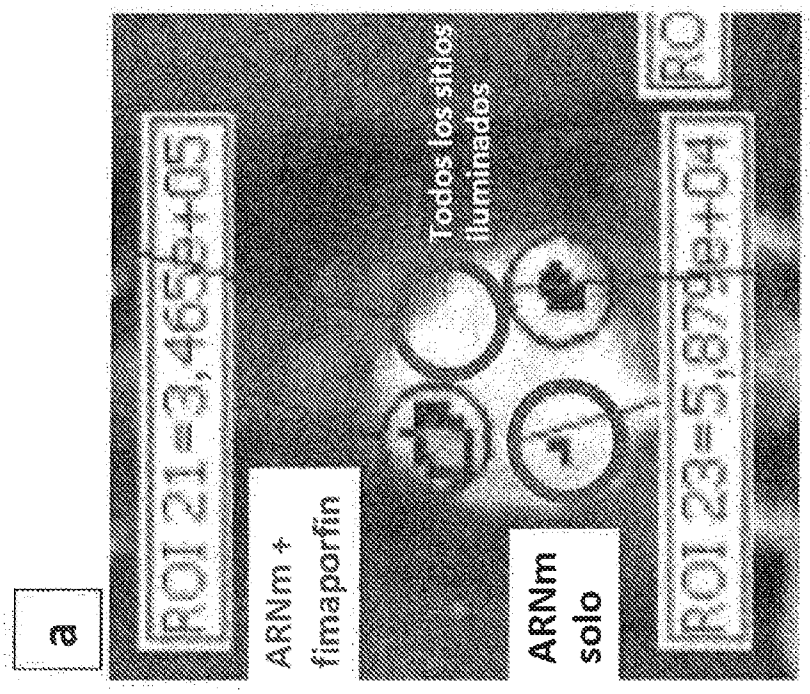

a
ROI 21=3,46E+05
ARNm + fimaporfin
Todos los sitios iluminados
ARNm solo
ROI 23=5,87E+04
RO
b
Animal 6. Bioluminescencia de las ROI.
Bioluminiscencia (unidades arbitrarias)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
A
B
C
D
Control, ARN solo
PCI 0,003 µg

Figura 1

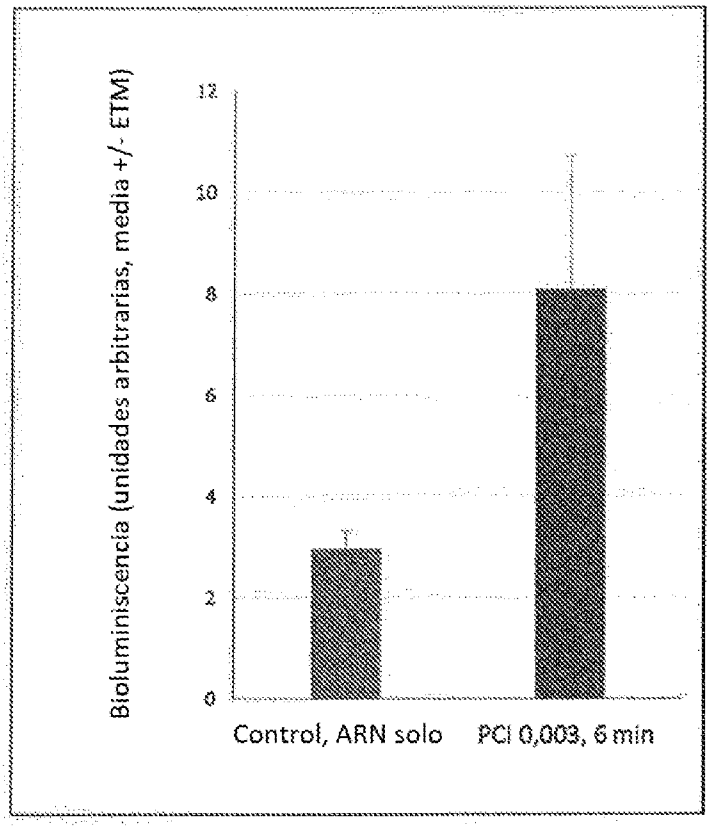

Bioluminiscencia (unidades arbitrarias, media +/- ETM)
12
10
8
6
4
2
0
Control, ARN solo
PCI 0,003, 6 min

Figura 2

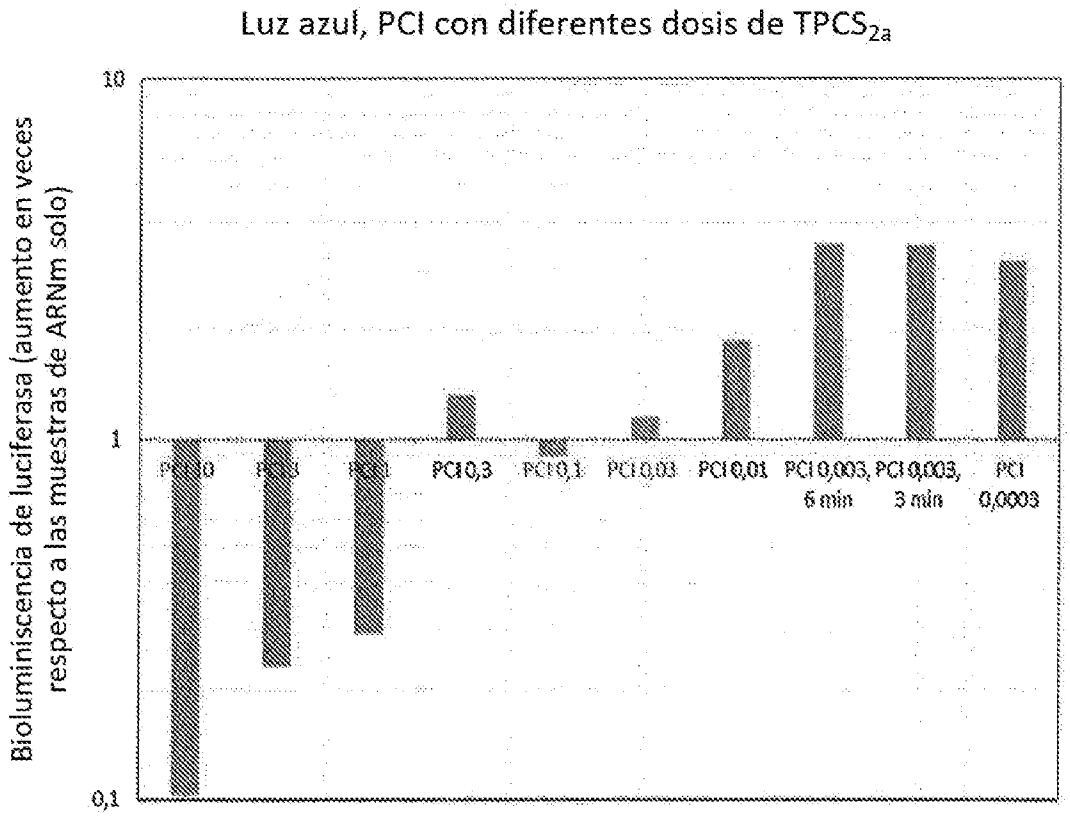

Luz azul, PCI con diferentes dosis de TPCS2a
Bioluminiscencia de luciferasa (aumento en veces respecto a las muestras de ARNm solo)
10
1
0,1
PCI 0,3
PCI 0,1
PCI 0,03
PCI 0,01
PCI 0,003, 6 min
PCI 0,003, 3 min
PCI 0,0003

Figura 3

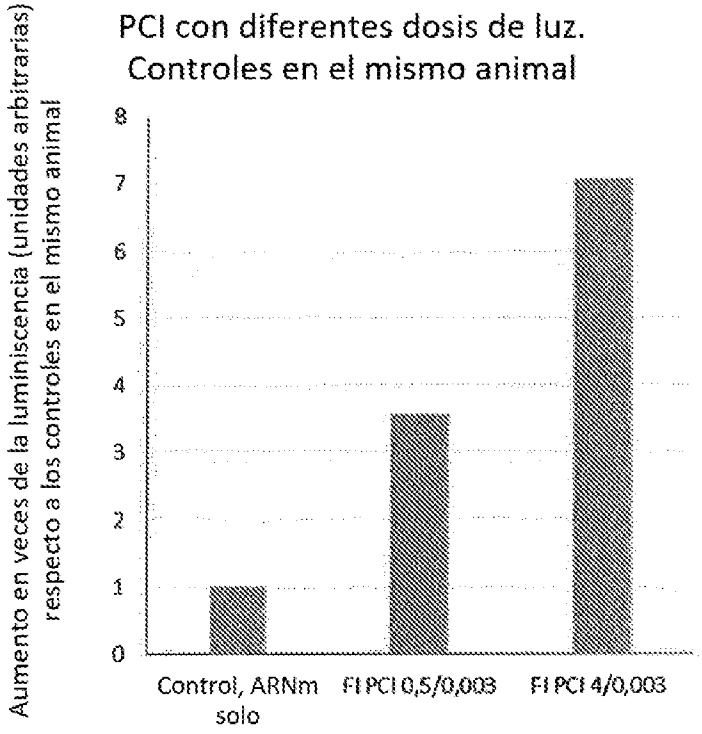



Figura 4

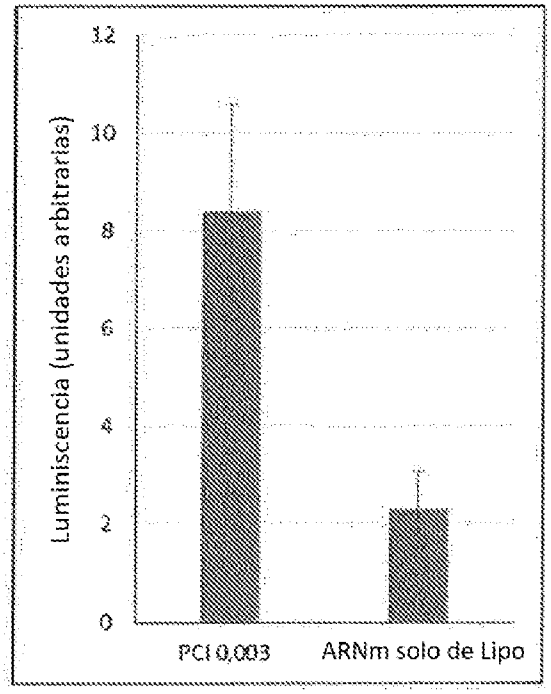



Figura 5

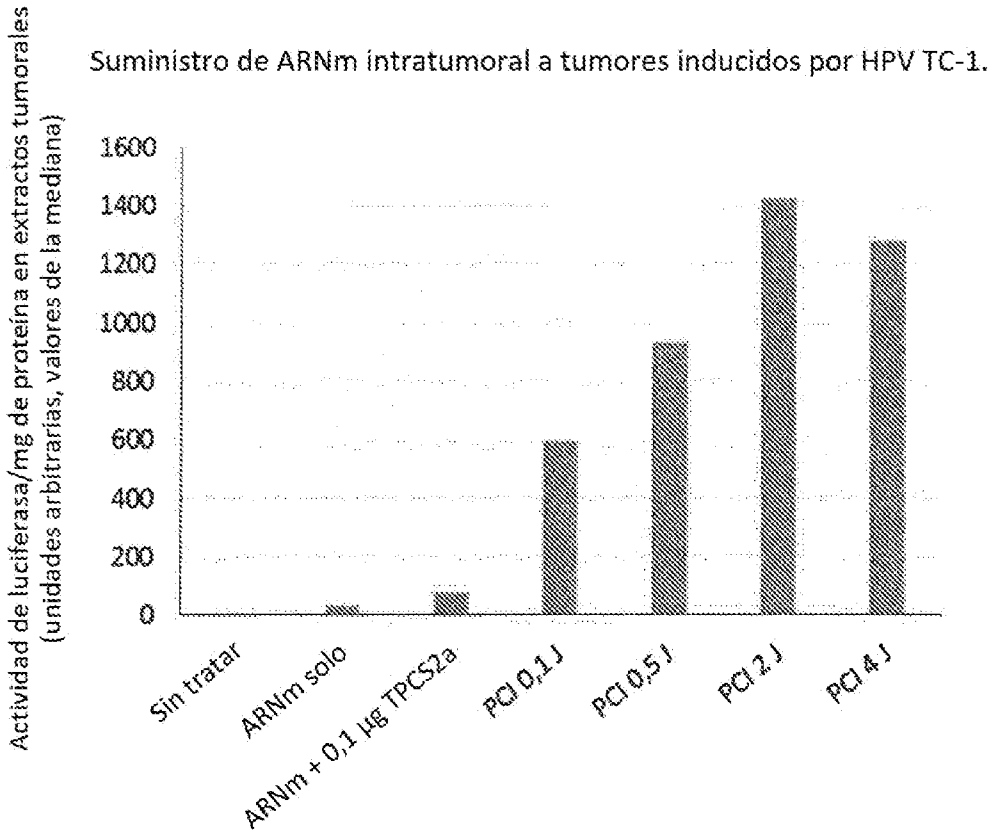

Suministro de ARNm intratumoral a tumores inducidos por HPV TC-1.
Actividad de luciferasa/mg de proteína en extractos tumorales (unidades arbitrarias, valores de la mediana)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Sin tratar
ARNm solo
ARNm + 0,1 µg TPCS2a
PCI 0,1 J
PCI 0,5 J
PCI 2 J
PCI 4 J

Figura 6

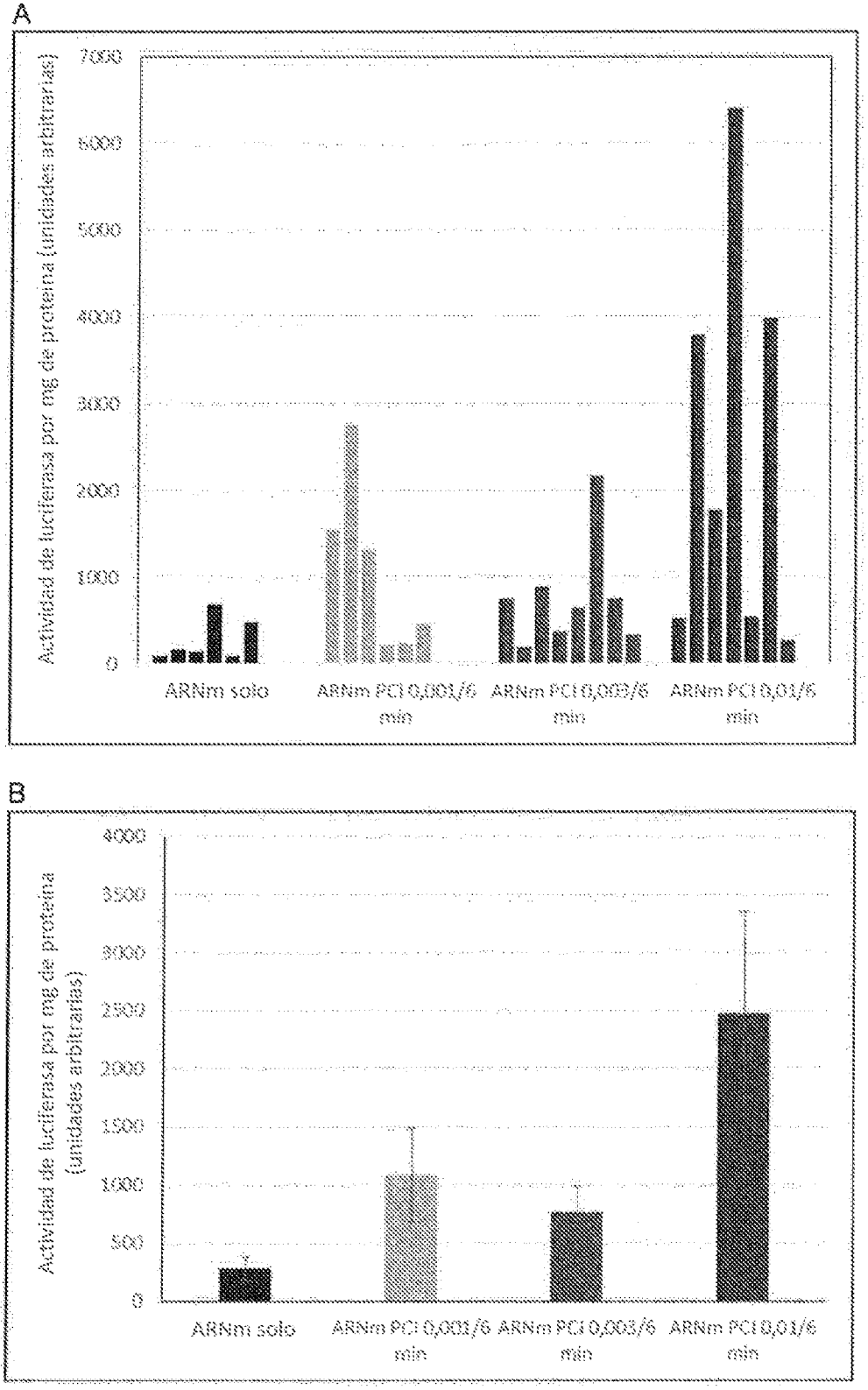

A
Actividad de luciferasa por mg de proteína (unidades arbitrarias)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
ARNm solo
ARNm PCI 0,001/6 min
ARNm PCI 0,003/6 min
ARNm PCI 0,01/6 min
B
Actividad de luciferasa por mg de proteína (unidades arbitrarias)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
ARNm solo
ARNm PCI 0,001/6 min
ARNm PCI 0,003/6 min
ARNm PCI 0,01/6 min

Figura 7