

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 480**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2013 PCT/EP2013/000902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13143683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2013 E 13713356 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2830593**

54 Título: **Formulación de ARN para inmunoterapia**

30 Prioridad:

26.03.2012 WO PCT/EP2012/001319

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2019

73 Titular/es:

**BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH
(50.0%)**

**An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE y**

**TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ,
GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;
HAAS, HEINRICH;
KREITER, SEBASTIAN;
DIKEN, MUSTAFA;
FRITZ, DANIEL;
MENG, MARTIN;
KRANZ, LENA, MAREEN y
REUTER, KERSTIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 719 480 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación de ARN para inmunoterapia.

Campo técnico de la invención

5 La presente invención está en el campo de la inmunoterapia, en particular la inmunoterapia de tumores. La presente invención se refiere al suministro de formulaciones farmacéuticas para administrar ARN con alta selectividad a células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas (CD) en el bazo después de una administración sistémica. En particular, las formulaciones descritas en este documento permiten inducir una respuesta inmune después de la administración sistémica de ARN codificante de antígeno.

Antecedentes de la invención

10 Los ácidos nucleicos como el ADN, siARN o ARN son de interés para diversas intervenciones terapéuticas en pacientes. Un enfoque inmunológico relativamente nuevo en la terapia tumoral se basa en la expresión del antígeno tumoral mediante la codificación del ARN en las células presentadoras de antígeno (APC) para inducir una respuesta de las células T al tumor (Weide, B. et al. (2008) *Journal of Immunotherapy* 31(2):180-188; Weide, B. et al. (2009) *Journal of Immunotherapy* 32(5): 498-507; Kreiter, S. et al. (2010) *Cancer Res* 70(22): 9031-9040; Kuhn, A. N. et al. (2010) *Gene Ther* 17(8): 961-971). Las células diana para dicha intervención son células dendríticas (DC) que residen, por ejemplo, en los ganglios linfáticos (LN) o en el bazo.

20 A fin de proporcionar una captación suficiente del ARN por parte de las CD, la administración local de ARN a los ganglios linfáticos ha demostrado ser exitosa. Sin embargo, dicha administración local requiere habilidades específicas por parte del médico. Por lo tanto, existe una necesidad de formulaciones de ARN que puedan administrarse sistémicamente, por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.), por vía subcutánea (s.c.), por vía intradérmica (i.d.) o por inhalación. De la bibliografía, se conocen varios enfoques para la administración sistémica de ácidos nucleicos. En la transferencia de genes no virales, los liposomas catiónicos se utilizan para inducir la condensación de ADN/ARN y para facilitar la captación celular. Los liposomas catiónicos generalmente consisten en un lípido catiónico, como DOTAP, y uno o más lípidos auxiliares, como DOPE. Los llamados 'lipoplexos' pueden formarse a partir de los liposomas catiónicos (cargados positivamente) y el ácido nucleico aniónico (cargado negativamente). En el caso más simple, los lipoplexos se forman espontáneamente mezclando el ácido nucleico con los liposomas con un protocolo de mezcla determinado, sin embargo, se pueden aplicar diversos otros protocolos. Las interacciones electrostáticas entre los liposomas cargados positivamente y el ácido nucleico cargado negativamente son la fuerza impulsora para la formación de lipoplexos. Además de la composición lipídica, la relación de carga entre las unidades estructurales catiónicas y aniónicas desempeña un papel clave para la condensación y la transfección eficientes. En general, un exceso de carga positiva de los lipoplexos se considera necesario para una transfección eficaz (Templeton, N. S. et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15(7): 647-652; Zhdanov, R. I. et al. (2002) *Bioelectrochemistry* 58(1): 53-64; Templeton, N. S. (2003) *Current Medicinal Chemistry* 10(14): 1279-1287). La mayoría de las membranas naturales tienen carga negativa y, por lo tanto, la interacción electrostática atractiva entre los lipoplexos con carga positiva y la biomembrana con carga negativa puede jugar un papel importante en la unión celular y la captación de los lipoplexos. Los rangos típicos de las relaciones de +/- que se consideran óptimos para la transfección están entre 2 y 4. Con una carga positiva en exceso inferior, la eficacia de la transfección se reduce en forma drástica a virtualmente cero. Desafortunadamente, para liposomas y lipoplexos cargados positivamente se ha informado de una toxicidad elevada, que puede ser un problema para la aplicación de tales preparaciones como productos farmacéuticos.

35 El documento US 2011/0311584 se refiere al suministro de ARN a las células para la vacunación o la inmunoestimulación, en particular los antígenos codificantes de ARN asociados con enfermedades infecciosas o una enfermedad cancerosa. En general, se menciona que el ARN se puede administrar a través de liposomas que en general incluyen fosfolípidos neutros o cargados negativamente.

45 Martinon F. et al., 1993, *Eur. J. Immunol.* 23, 1719-1722 describen un ARNm atrapado en liposomas capaz de inducir linfocitos T citotóxicos específicos del virus.

El documento WO 2011/005799 se refiere a una molécula de ARN autorreplicante atrapada en un liposoma cargado positivamente que puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, para terapia génica o vacunación.

50 El documento US 5.580.859 se refiere a moléculas de ADN y ARN que pueden administrarse en asociación con un liposoma cargado positivamente.

El documento WO 2012/006378 se refiere al ARN que codifica un inmunógeno administrado en un liposoma para los fines de la inmunización.

El documento WO 2013/113502 A1 se refiere a ácidos nucleicos cargados negativamente que comprenden complejos para la inmunoestimulación.

55 El documento WO 2010/037539 A1 se refiere a composiciones que comprenden un ARN(m) complejoado y un ARNm

desnudo para la inmuoestimulación.

Los lipoplexos descritos anteriormente han demostrado que son capaces de permitir la transfección en diversos órganos. La distribución de órganos detallada de la expresión depende de los parámetros de formulación y administración (composición de lípidos, tamaño, vía de administración) de una manera compleja. Hasta ahora, la expresión selectiva en un órgano diana o un resto celular dado, evitando la expresión en órganos fuera del objetivo, no se pudo realizar de manera suficiente. Se ha informado el uso de ADN o ARN de luciferasa como informante, por ejemplo, transfección en pulmón, hígado, bazo, riñones y corazón. Se ha demostrado que es particularmente difícil evitar el direccionamiento al pulmón y al hígado, ya que, en muchos casos, el direccionamiento al pulmón y al hígado son predominantes. El pulmón tiene una superficie muy grande y es el primer órgano al que los compuestos inyectados por vía i.v. pasan después de la administración. El hígado es un órgano diana típico para liposomas y formulaciones con compuestos lipofílicos como los lípidos presentes en los lipoplexos.

Para la inmunoterapia a base del ARN, el direccionamiento a los pulmones o el hígado puede ser perjudicial, debido al riesgo de una respuesta inmune contra estos órganos. Por lo tanto, para tal terapia, se requiere una formulación con alta selectividad sólo para las CD, como en el bazo. Se han propuesto ciertos ligandos para mejorar la selectividad de direccionamiento. Por ejemplo, se considera que los liposomas que comprenden lípidos funcionalizados con manosa mejoran el direccionamiento de los macrófagos. Sin embargo, tales componentes vuelven a las formulaciones más complejas, lo que hace que el desarrollo farmacéutico práctico sea más complicado. Además, la selectividad es limitada y una cierta fracción de los liposomas todavía es absorbida por otros órganos. Otro problema son las interacciones séricas y la degradación del ARN en el suero, que es favorecida por lipoplexos cargados positivamente. Además, para la aplicabilidad terapéutica, deben cumplirse los requisitos para productos farmacéuticos como la estabilidad química y física. Además, los productos para aplicación intraperitoneal deben ser estériles y cumplir con ciertos requisitos con respecto a las características de las partículas. Adicionalmente, los productos deben ser apropiados para la fabricación.

En resumen, el problema del desarrollo de una formulación de ARN inyectable con alta selectividad por el bazo, que cumple con los criterios de productos para la aplicación a pacientes, aún necesita ser resuelto.

La presente invención proporciona una solución al problema descrito con anterioridad. Sorprendentemente, se encontró que los lipoplexos cargados negativamente del ARN y los liposomas conducen a una expresión sustancial de ARN en las CD de bazo después de la administración sistémica. Se determinó una fuerte expresión del gen informante en las células diana (bazo) mientras que la expresión en otros órganos era baja. Además, podría inducirse una fuerte respuesta inmune contra un antígeno modelo. Esto fue inesperado, ya que, por lo general, el exceso de carga positiva se considera un requisito previo para la captación y expresión exitosas. Aquí hemos encontrado que, aunque la cantidad absoluta de expresión decrece al disminuir el exceso de carga positiva, la expresión es todavía lo suficientemente alta como para proporcionar la eficacia terapéutica de los lipoplexos después de la administración sistémica.

De acuerdo con la invención, fue posible formar los lipoplexos con un perfil de distribución de tamaño de partícula bien definido medido por dispersión de luz dinámica y con una fracción baja de partículas subvisibles, que se requiere para la administración intravenosa a pacientes. Si se forman mediante la incubación de liposomas con ARN por autoensamblaje, el tamaño de partícula de los liposomas originales se ve poco afectado, y no se encuentran restos no deseados de agregados grandes. Se pueden obtener diferentes tamaños seleccionando el tamaño de los liposomas precursores y las condiciones de mezcla. Esto fue sorprendente porque generalmente se observa la formación de agregados grandes en la incubación de ARN con liposomas catiónicos. Esta formación de agregados es un obstáculo importante para el desarrollo de formulaciones de lipoplexos que son aceptables para la administración intravenosa o subcutánea. Las partículas fueron estables durante al menos 24 horas y no tendían a agregarse con el tiempo. Las partículas podrían congelarse y descongelarse sin formación de agregados, manteniendo el perfil de tamaño de partícula original y manteniendo la actividad biológica. Las partículas podrían liofilizarse y reconstituirse con agua sin formación de agregados, manteniendo el perfil de tamaño de partícula original y manteniendo la actividad biológica. Las partículas pueden fabricarse mediante diferentes protocolos que son escalables y que se pueden realizar en condiciones controladas. Con tales propiedades, las formulaciones de lipoplexos de la invención cumplen requisitos importantes para formulaciones farmacéuticas para aplicación a pacientes, en términos de perfil de distribución de tamaño de partícula y estabilidad. Por otra parte, en comparación con los lipoplexos cargados positivamente, se espera que las nanopartículas de ARN descritas en este documento sean menos tóxicas y muestren menos interacciones séricas no deseadas. En particular, las formulaciones son adecuadas para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa y subcutánea.

Descripción de la invención

Compendio de la invención

Las estrategias inmunoterapéuticas son opciones prometedoras para el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades infecciosas y enfermedades cancerosas. La identificación del nuevo número de antígenos asociados a patógenos y a tumores (también denominados antígenos tumorales en este documento) condujo a una amplia colección de objetivos adecuados para la inmunoterapia.

La presente invención generalmente abarca el tratamiento inmunoterapéutico de enfermedades dirigiéndose a células enfermas. La invención proporciona la erradicación selectiva de células que expresan un antígeno, minimizando así los efectos adversos para las células normales que no expresan dichos antígenos. Por lo tanto, las enfermedades preferidas para una terapia son aquellas en las que se expresan uno o más antígenos, tales como enfermedades cancerosas o enfermedades infecciosas.

La presente invención tiene como objetivo dirigirse específicamente a las células que expresan antígeno mediante inmunización activa induciendo y expandiendo células T en el paciente, que son capaces de reconocer específicamente y matar células enfermas. Específicamente, la presente invención permite la incorporación selectiva de un antígeno representado como ARN en células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas in vivo. El antígeno puede procesarse para producir un compañero peptídico para la molécula de MHC o puede presentarse sin la necesidad de un procesamiento adicional, si puede unirse a las moléculas de MHC. Se da preferencia a formas de administración en las que el antígeno completo se procesa in vivo por las células presentadoras de antígeno, ya que esto también puede producir respuestas de células T auxiliares que son necesarias para una respuesta inmune eficaz. Por lo tanto, las composiciones proporcionadas de acuerdo con la invención cuando se administran a un paciente proporcionan uno o más epítopos presentados por MHC para estimular, cebar y/o expandir células T dirigidas contra células que expresan antígenos de los que se derivan los epítopos presentados por MHC.

Por consiguiente, las composiciones descritas en el presente documento son preferiblemente capaces de inducir o promover una respuesta celular, preferiblemente actividad de células T citotóxicas, contra una enfermedad caracterizada por la presentación de antígenos con MHC de clase I.

En particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que comprenden al menos un lípido catiónico, al menos un lípido auxiliar neutro y ARN que codifica al menos un antígeno para usar en un método para administrar el al menos un antígeno al antígeno profesional que presenta células en el bazo de un sujeto, donde dicho método comprende administrar en forma sistémica la composición farmacéutica al sujeto,

en donde el antígeno es un antígeno asociado a la enfermedad o provoca una respuesta inmune contra un antígeno asociado a la enfermedad o células que expresan un antígeno asociado a la enfermedad, y en donde las nanopartículas son lipoplexos que comprenden

(i) DOTMA y DOPE en una relación molar de 8:2 a 3:7, preferiblemente de 7:3 a 5:5, en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTMA a las cargas negativas en el ARN es de 1,6:2 a 1:2, preferiblemente 1,4:2 a 1,1:2; o

(ii) DOTMA y colesterol en una relación molar de 8:2 a 3:7, preferiblemente de 7:3 a 5:5, en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTMA a las cargas negativas en el ARN es de 1,6:2 a 1:2, preferiblemente 1,4:2 a 1,1:2; o

(iii) DOTAP y DOPE en una relación molar de 8:2 a 3:7, preferiblemente de 7:3 a 5:5, en donde la relación de carga de cargas positivas en DOTAP a cargas negativas en el ARN es de 1,6:2 a 1:2, preferiblemente 1,4:2 a 1,1:2.

Preferiblemente, las nanopartículas descritas en el presente documento son coloidalmente estables durante al menos 2 horas en el sentido de que no hay agregación, precipitación o aumento de tamaño e índice de polidispersidad en más del 30% según lo medido por la dispersión dinámica de la luz.

En una realización, el potencial zeta de las nanopartículas es de -5 o menos, de -10 o menos, de -15 o menos, de -20 o menos o de -25 o menos. En diversas realizaciones, el potencial zeta de las nanopartículas es de -35 o superior, de -30 o superior o de -25 o superior. En una realización, las nanopartículas tienen un potencial zeta de 0 mV a -50 mV, preferiblemente de 0 mV a -40 mV o de -10 mV a -30 mV.

El lípido catiónico puede ser monocatiónico o policatiónico. Cualquier molécula anfifílica catiónica, por ejemplo, una molécula que comprende al menos una unidad estructural hidrófila y lipofílica es un lípido catiónico en el sentido de la presente invención. El lípido auxiliar neutro puede ser un lípido natural, como un fosfolípido o un análogo de un lípido natural, o un lípido completamente sintético, o una molécula similar a un lípido, sin similitudes con los lípidos naturales. En una realización, el lípido catiónico y/o el lípido auxiliar neutro es un lípido formador de bicapa.

En diversas realizaciones, los lípidos no están funcionalizados como funcionalizados por manosa, histidina y/o imidazol, las nanopartículas no comprenden un ligando de direccionamiento tal como lípidos funcionalizados por manosa y/o las nanopartículas no comprenden uno o más de los siguientes: compuestos dependientes del pH, polímeros catiónicos tales como polímeros que contienen histidina y/o polilisina, en donde los polímeros pueden opcionalmente PEGilarse y/o histidilarse, o iones divalentes tales como Ca^{2+} .

En una realización, las nanopartículas tienen un diámetro promedio en el intervalo de 50 nm a 1000 nm, preferiblemente de 50 nm a 400 nm, preferiblemente de 100 nm a 300 nm, tal como de 150 nm a 200 nm. En una realización, las nanopartículas tienen un diámetro en el intervalo de 200 a 700 nm, de 200 a 600 nm, preferiblemente

de 250 a 550 nm, en particular de 300 a 500 nm o de 200 a 400 nm.

En una realización, el índice de polidispersidad de las nanopartículas descritas en el presente documento según se mide por dispersión dinámica de la luz es de 0,5 o menos, preferiblemente de 0,4 o menos o incluso más preferiblemente 0,3 o menos.

- 5 En una realización no de acuerdo con la invención, las nanopartículas descritas en el presente documento pueden obtenerse mediante uno o más de los siguientes: (i) incubación de liposomas en una fase acuosa con el ARN en una fase acuosa, (ii) incubación del lípido disuelto en un disolvente orgánico miscible con agua, como el etanol, con el ARN en solución acuosa, (iii) técnica de evaporación en fase inversa, (iv) congelación y descongelación del producto, (v) deshidratación y rehidratación del producto, (vi) liofilización y rehidratación del producto, o (vii) secado por aspersión y rehidratación del producto.

- 10 En una realización no de acuerdo con la invención, las nanopartículas se producen mediante un proceso que comprende una etapa de incubación del ARN con cationes bivalentes, preferiblemente a una concentración de entre 0,1 mM a 5 mM, tal como de 0,1 mM a 4 mM o de 0,3 mM a 1 mM antes de la incorporación en dichas nanopartículas y/o incubación del ARN con iones monovalentes, preferiblemente a una concentración de entre 1 mM y 500 mM, tal como de 100 mM a 200 mM o de 130 mM a 170 mM antes de la incorporación en dichas nanopartículas y/o incubación del ARN con reguladores antes de la incorporación en dichas nanopartículas.

En una realización no según la invención, después de la incubación de los cationes bivalentes al ARN, está implicada una etapa de dilución mediante la adición de liposomas y/u otras fases acuosas por al menos un factor de más de 1,5, preferiblemente por un factor de más de 2, o por un factor de más de 5.

- 20 En una realización, los cationes bivalentes son iones calcio, donde la concentración final de dichos iones calcio es menor que 4 mM, preferiblemente menor que 3 mM e incluso más preferiblemente, de 2,2 mM o menos.

En una realización no de acuerdo con la invención, las nanopartículas descritas en el presente documento se producen mediante un proceso que comprende una etapa de extrusión y/o una etapa de filtración y/o una etapa de liofilización de las nanopartículas.

- 25 En una realización, después de la administración sistémica de las nanopartículas, se produce la expresión de ARN en el bazo. En una realización, después de la administración sistémica de las nanopartículas, no se produce o prácticamente no se produce una expresión de ARN en el pulmón y/o el hígado. En una realización, después de la administración sistémica de las nanopartículas, la expresión de ARN en el bazo es al menos 5 veces, preferiblemente al menos 8 veces, preferiblemente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, preferiblemente al menos 50 veces, preferiblemente al menos 100 veces, preferiblemente al menos 1000 veces o incluso más la cantidad de expresión de ARN en el pulmón. En una realización, después de la administración sistémica de las nanopartículas, se produce la expresión de ARN en células presentadoras de antígeno, preferiblemente células presentadoras de antígeno profesionales en el bazo.

- 35 Las nanopartículas, cuando se administran sistémicamente, se dirigen o se acumulan en el bazo. En particular, las nanopartículas cuando se administran sistémicamente suministran el ARN a células presentadoras de antígenos profesionales, como las células dendríticas y/o macrófagos en el bazo. Preferiblemente, las nanopartículas liberan el ARN en el órgano o tejido objetivo y/o ingresan en las células en el órgano o tejido objetivo, en donde el órgano o tejido objetivo es el bazo y las células en el órgano o tejido objetivo son células presentadoras de antígenos profesionales, como las células dendríticas. En una realización, las nanopartículas cuando se administran sistémicamente no se dirigen o no se concentran esencialmente en el pulmón y/o el hígado. En una realización, la cantidad de nanopartículas dirigidas o acumuladas en el bazo es de al menos 5 veces, preferiblemente de al menos 8 veces, preferiblemente de al menos 10 veces, preferiblemente de al menos 20 veces, preferiblemente de al menos 50 veces, preferiblemente de al menos 100 veces, preferiblemente de al menos 1000 veces o incluso más que la cantidad dirigida o acumulada en el pulmón.

- 45 De acuerdo con la invención, la administración sistémica es preferiblemente por administración parenteral, preferiblemente por administración intravenosa, administración subcutánea, administración intradérmica o administración intraarterial.

- 50 La composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de la invención puede comprender además al menos un adyuvante.

La composición farmacéutica de la invención se puede formular para administración sistémica.

- 55 La composición farmacéutica de la invención se puede usar para inducir una respuesta inmune, en particular una respuesta inmune contra un antígeno asociado a la enfermedad o células que expresan un antígeno asociado a la enfermedad, tal como una respuesta inmune contra el cáncer. Por consiguiente, la composición farmacéutica se puede usar para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que implica un antígeno asociado a la enfermedad o células que expresan un antígeno asociado a la enfermedad, tal como el cáncer. Preferiblemente,

dicha respuesta inmune es una respuesta de células T. En una realización, el antígeno asociado a la enfermedad es un antígeno tumoral.

5 En una realización, el ARN comprendido en las nanopartículas descritas en este documento no comprende residuos de pseudouridina y preferiblemente no comprende nucleósidos modificados. Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

10 Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no está limitada a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir sólo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención.

15 Preferiblemente, los términos utilizados aquí se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel y H. Kolbl, Eds., (1995) Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza.

20 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, los métodos convencionales de bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la bibliografía en este campo (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. edition, J. Sambrook et al. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

25 A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y las variaciones como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un miembro, número entero, etapa o grupo establecido de miembros, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas, aunque en algunas realizaciones se pueden excluir otros miembros, números enteros o etapas o grupos de miembros, números enteros o etapas, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas establecidos. Se debe interpretar que los términos "un" y "una" y "el" y "la" y la referencia similar utilizada en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o sea claramente contradictorio por el contexto. La mención de los intervalos de valores en este documento tiene la intención de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se hubiera mencionado individualmente en este documento.

35 Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en este documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje indicativo de ejemplo (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en este documento, pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como un indicador de ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

45 La presente invención describe agentes y composiciones que tras la administración inducen una respuesta inmune, en particular una respuesta inmune celular, dirigida contra un antígeno asociado a la enfermedad o células que expresan un antígeno asociado a la enfermedad, tales como células cancerosas. En particular, la presente invención prevé el uso de ARN que codifica proteínas o péptidos antigénicos (también denominados "antígeno" en el presente documento) que induce una respuesta inmune, en particular una respuesta de células T, contra el antígeno asociado a la enfermedad o células que expresan el antígeno asociado a la enfermedad. Estas proteínas o péptidos antigénicos pueden comprender una secuencia que corresponde esencialmente o es idéntica a la secuencia del antígeno asociado a la enfermedad o uno o más fragmentos del mismo. En una realización, la proteína o péptido antigénico comprende la secuencia de un péptido presentado por el MHC derivado del antígeno asociado a la enfermedad. La inmunización con ARN que codifica un antígeno asociado a la enfermedad intacto o sustancialmente intacto o fragmentos del mismo, como los péptidos MHC de clase I y de clase II, permite obtener una respuesta de tipo MHC de clase I y/o de clase II y, por lo tanto, estimular células T tales como linfocitos T citotóxicos CD8+ que son capaces de lisar células enfermas y/o células T CD4+. Dicha inmunización también puede provocar una respuesta inmune humoral (respuesta de células B) que resulta en la producción de anticuerpos contra el antígeno.

55 Por consiguiente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar en la vacunación genética, en donde se estimula una respuesta inmune mediante la introducción en un sujeto de una molécula de ARN adecuada que codifica una proteína o péptido antigénico. Los agentes y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse como una vacuna terapéutica o profiláctica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad tal

como una enfermedad como se describe en el presente documento. En una realización, un antígeno asociado a una enfermedad es un antígeno tumoral. En esta realización, los agentes y composiciones descritos en el presente documento pueden ser útiles para tratar el cáncer o la metástasis del cáncer. Preferiblemente, el órgano o tejido enfermo se caracteriza por células enfermas tales como células cancerosas que expresan un antígeno asociado a la enfermedad y preferiblemente presentan el antígeno asociado a la enfermedad en el contexto de las moléculas de MHC.

La expresión "respuesta inmune" se refiere a una respuesta corporal integrada a un antígeno o una célula que expresa un antígeno y, preferiblemente, se refiere a una respuesta inmune celular o una respuesta inmune tanto celular como humoral. La respuesta inmune puede ser protectora/preventiva/profiláctica y/o terapéutica.

"Inducir una respuesta inmune" puede significar que no hubo respuesta inmune contra un antígeno particular o una célula que expresa un antígeno antes de la inducción, pero también puede significar que hubo cierto nivel de respuesta inmune contra un antígeno particular o una célula que expresa un antígeno antes de la inducción y después de la inducción, dicha respuesta inmune se potencia. Por lo tanto, "inducir una respuesta inmune" también incluye "mejorar una respuesta inmune". Preferiblemente, después de inducir una respuesta inmune en un sujeto, dicho sujeto está protegido de desarrollar una enfermedad tal como una enfermedad infecciosa o una enfermedad cancerosa o la condición de la enfermedad se mejora induciendo una respuesta inmune. Por ejemplo, puede inducirse una respuesta inmune contra un antígeno viral en un paciente que tiene una enfermedad viral o en un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad viral. Por ejemplo, puede inducirse una respuesta inmune contra un antígeno tumoral en un paciente que tiene una enfermedad cancerosa o en un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad cancerosa. La inducción de una respuesta inmune en este caso puede significar que la condición de la enfermedad del sujeto se mejora, que el sujeto no desarrolla metástasis o que el sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad cancerosa no desarrolla una enfermedad cancerosa.

Una "respuesta inmune celular", una "respuesta celular", una "respuesta celular contra un antígeno" o una expresión similar pretende incluir una respuesta celular dirigida a células que expresan un antígeno y se caracterizan por la presentación de un antígeno con MHC de clase I o de clase II. La respuesta celular se refiere a células llamadas células T o linfocitos T que actúan como "auxiliares" o "asesinos". Las células T auxiliares (también llamadas células T CD4+) desempeñan un papel central al regular la respuesta inmune y las células asesinas (también llamadas células T citotóxicas, células T citolíticas, células T CD8+ o CTL) matan células enfermas como las células infectadas o células cancerosas, evitando la producción de más células enfermas. En realizaciones preferidas, la presente invención implica la estimulación de una respuesta de CTL antitumoral contra células cancerosas que expresan uno o más antígenos tumorales y, preferiblemente, presentan dichos antígenos tumorales con MHC de clase I.

Según la presente invención, el término "antígeno" comprende cualquier molécula, preferiblemente un péptido o proteína, que comprende al menos un epítipo que provocará una respuesta inmune y/o contra la cual se dirige una respuesta inmune. Preferiblemente, un antígeno en el contexto de la presente invención es una molécula que, opcionalmente después del procesamiento, induce una respuesta inmune, que es preferiblemente específica para el antígeno o células que expresan el antígeno. En particular, un "antígeno" se refiere a una molécula que, opcionalmente después del procesamiento, es presentada por las moléculas de MHC y reacciona específicamente con los linfocitos T (células T).

Por lo tanto, un antígeno o fragmentos del mismo deben ser reconocibles por un receptor de células T. Preferiblemente, el antígeno o fragmento, si es reconocido por un receptor de células T, es capaz de inducir en presencia de señales coestimuladoras apropiadas, la expansión clonal de las células T que llevan el receptor de células T que reconoce específicamente el antígeno o fragmento. En el contexto de las realizaciones de la presente invención, el antígeno o fragmento es presentado preferiblemente por una célula, preferiblemente por una célula que presenta el antígeno y/o una célula enferma, en el contexto de moléculas de MHC, que da como resultado una respuesta inmune contra el antígeno o células que expresan el antígeno.

De acuerdo con la presente invención, se prevé cualquier antígeno adecuado que sea un candidato para una respuesta inmune, en donde la respuesta inmune es preferiblemente una respuesta inmune celular.

Un antígeno es preferiblemente un producto que corresponde o se deriva de un antígeno natural. Dichos antígenos naturales pueden incluir o pueden derivarse de alérgenos, virus, bacterias, hongos, parásitos y otros agentes infecciosos y patógenos o un antígeno también puede ser un antígeno tumoral. De acuerdo con la presente invención, un antígeno puede corresponder a un producto natural, por ejemplo, una proteína viral, o una parte de la misma.

El término "patógeno" se refiere a microorganismos patógenos y comprende virus, bacterias, hongos, organismos unicelulares y parásitos. Los ejemplos de virus patógenos son el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el citomegalovirus (CMV), el virus del herpes (HSV), el virus de la hepatitis A (VHA), el VHB, el VHC, el virus del papiloma y el virus linfotrófico T humano (HTLV). Los organismos unicelulares comprenden plasmodios, tripanosomas, amebas, etc.

La expresión “antígeno asociado a la enfermedad” se refiere a todos los antígenos que son de importancia patológica e incluye “antígenos tumorales”. De acuerdo con la invención, se desea inducir una respuesta inmune a un antígeno asociado a la enfermedad o a células que expresan un antígeno asociado a la enfermedad y que preferiblemente presenten un antígeno asociado a la enfermedad en el contexto de las moléculas de MHC. Preferiblemente, un antígeno asociado a una enfermedad es un antígeno natural. En una realización, un antígeno asociado a la enfermedad se expresa en una célula enferma y se presenta preferiblemente por moléculas MHC de la célula.

Un antígeno codificado por el ARN comprendido en las nanopartículas descritas en el presente documento debe inducir una respuesta inmune que se dirige contra el antígeno asociado a la enfermedad a la que debe dirigirse o a las células que expresan el antígeno asociado a la enfermedad a la que debe dirigirse. Por lo tanto, un antígeno codificado por el ARN comprendido en las nanopartículas descritas en el presente documento puede corresponder o puede comprender un antígeno asociado a la enfermedad o uno o más fragmentos inmunogénicos de los mismos, tales como uno o más péptidos de unión a MHC del antígeno asociado a la enfermedad. Por lo tanto, el antígeno codificado por el ARN comprendido en las nanopartículas descritas en este documento puede ser un antígeno recombinante.

El término “recombinante” en el contexto de la presente invención significa “realizado mediante ingeniería genética”. Preferiblemente, un “objeto recombinante” tal como un ácido nucleico recombinante en el contexto de la presente invención no está ocurriendo naturalmente.

La expresión “que ocurre naturalmente” como se usa en este documento se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un péptido o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluidos los virus) y se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que el hombre no ha modificado intencionalmente en el laboratorio ocurre naturalmente.

En una realización preferida, un antígeno puede ser un antígeno tumoral, es decir, un constituyente de células cancerosas tales como una proteína o péptido expresado en una célula cancerosa que puede derivarse del citoplasma, la superficie celular o el núcleo celular, en particular aquellos que se producen principalmente intracelularmente o como antígenos de superficie en las células cancerosas. Por ejemplo, los antígenos tumorales incluyen el antígeno carcinoembrionario, una 1-fetoproteína, isoferritina y sulfoglicoproteína fetal, α 2-H-ferroproteína y y-fetoproteína. De acuerdo con la presente invención, un antígeno tumoral comprende preferiblemente cualquier antígeno que se expresa en y opcionalmente característico con respecto al tipo y/o nivel de expresión para tumores o cánceres, así como para células tumorales o cancerosas. En el contexto de la presente invención, la expresión “antígeno tumoral” o “antígeno asociado a tumor” se refiere preferiblemente a proteínas que están en condiciones normales expresadas específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas de desarrollo específicas, por ejemplo, el antígeno tumoral puede estar en condiciones normales expresadas específicamente en tejido estomacal, preferiblemente en la mucosa gástrica, en órganos reproductores, por ejemplo, en testículos, en tejido trofoblástico, por ejemplo, en placenta o en células de la línea germinal, y se expresan o se expresan en forma aberrante en uno o más tejidos tumorales o cancerosos. En este contexto, “un número limitado” significa preferiblemente no más de 3, más preferiblemente no más de 2 o 1. Los antígenos tumorales en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, antígenos de diferenciación, preferiblemente antígenos de diferenciación específicos de tipo celular, es decir, proteínas que se encuentran en condiciones normales expresadas específicamente en cierto tipo de célula en cierta etapa de diferenciación, antígenos de cáncer/testículo, es decir, proteínas que se encuentran en condiciones normales expresadas específicamente en testículos y, a veces, en placenta, y antígenos específicos de la línea germinal. En el contexto de la presente invención, el antígeno tumoral preferiblemente no se expresa o raramente se expresa en tejidos normales. Preferiblemente, el antígeno tumoral o la expresión aberrante del antígeno tumoral identifica células cancerosas. En el contexto de la presente invención, el antígeno tumoral que es expresado por una célula cancerosa en un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece de una enfermedad cancerosa, es preferiblemente una autoproteína en dicho sujeto. En realizaciones preferidas, el antígeno tumoral en el contexto de la presente invención se expresa en condiciones normales específicamente en un tejido u órgano que no es esencial, es decir, tejidos u órganos que cuando se dañan por el sistema inmune no conducen a la muerte del sujeto, o en órganos o estructuras del cuerpo que no son o son difícilmente accesibles por el sistema inmune. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del antígeno tumoral es idéntica entre el antígeno tumoral que se expresa en tejidos normales y el antígeno tumoral que se expresa en tejidos cancerosos. Preferiblemente, un antígeno tumoral es presentado por una célula cancerosa en donde se expresa.

Ejemplos de antígenos tumorales que pueden ser de utilidad en la presente invención son p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, las proteínas de superficie celular de la familia claudina, tales como CLAUDIN-6, CLAUDIN-18.2 y CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferiblemente MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, Miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 minor BCR-abL, Pm1/RARa, PRAME, proteinasa 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP- 2/INT2, TPTE y WT, preferiblemente WT-1.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula tal como un antígeno, es decir, a una parte o fragmento de la molécula que es reconocida por el sistema inmune, por ejemplo, que es reconocida por una célula T, en particular cuando se presenta en el contexto de las moléculas MHC. Un epítopo de una proteína tal como un antígeno tumoral comprende preferiblemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y está preferiblemente entre 5 y 100, preferiblemente entre 5 y 50, más preferiblemente entre 8 y 30, con máxima preferencia, entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítopo puede ser preferiblemente de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud. Se prefiere particularmente que el epítopo en el contexto de la presente invención sea un epítopo de células T.

De acuerdo con la invención, un epítopo puede unirse a moléculas de MHC tales como moléculas de MHC en la superficie de una célula y, por lo tanto, puede ser un "péptido de unión a MHC". La expresión "péptido de unión a MHC" se refiere a un péptido que se une a una molécula de MHC de clase I y/o MHC de clase II. En el caso de los complejos de MHC/péptidos de clase I, los péptidos de unión tienen típicamente una longitud de 8 a 10 aminoácidos, aunque los péptidos más largos o más cortos pueden ser eficaces. En el caso de complejos de MHC de clase II/péptido, los péptidos de unión tienen típicamente una longitud de 10-25 aminoácidos y en particular una longitud de 13-18 aminoácidos, mientras que los péptidos más largos y más cortos pueden ser eficaces.

De acuerdo con la invención, un antígeno codificado por el ARN comprendido en las nanopartículas descritas en el presente documento puede comprender un fragmento inmunogénico de un antígeno asociado a la enfermedad, tal como un fragmento peptídico de un antígeno asociado a la enfermedad (también denominado péptido antigénico en este documento) que preferiblemente es un péptido de unión a MHC.

Un "fragmento inmunogénico de un antígeno" de acuerdo con la invención se refiere preferiblemente a una porción o fragmento de un antígeno que es capaz de estimular una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta celular contra el antígeno o células que expresan el antígeno y preferiblemente presentan el antígeno como células enfermas, en particular células cancerosas. Preferiblemente, un fragmento inmunogénico de un antígeno es capaz de estimular una respuesta celular contra una célula caracterizada por la presentación de un antígeno con MHC de clase I y preferiblemente es capaz de estimular una CTL sensible a antígeno. Preferiblemente, es una porción de un antígeno que se reconoce (es decir, se une específicamente) por un receptor de células T, en particular si se presenta en el contexto de las moléculas de MHC. Ciertos fragmentos inmunogénicos preferidos se unen a una molécula MHC de clase I o de clase II. Tal como se usa en el presente documento, se dice que un fragmento inmunogénico se "une" a una molécula MHC de clase I o de clase II si tal unión es detectable usando cualquier ensayo conocido en la técnica.

Preferiblemente, un fragmento inmunogénico de un antígeno de acuerdo con la invención es un péptido presentado por MHC de clase I y/o de clase II o puede procesarse para producir un péptido presentado por MHC de clase I y/o de clase II. Preferiblemente, un fragmento inmunogénico de un antígeno comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente correspondiente y preferiblemente que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de un fragmento del antígeno. Preferiblemente, dicho fragmento de un antígeno es un péptido presentado por MHC de clase I y/o de clase II.

Si un péptido se presenta directamente, es decir, sin procesamiento, en particular sin escisión, tiene una longitud adecuada para unirse a una molécula de MHC, en particular una molécula de MHC de clase I, y preferiblemente es de 7-20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 8-11 aminoácidos de longitud, en particular 9 o 10 aminoácidos de longitud.

Si un péptido es parte de una entidad más grande que comprende secuencias adicionales, por ejemplo, de un polipéptido, y se presentará después del procesamiento, en particular después de la escisión, el péptido producido por procesamiento tiene una longitud adecuada para unirse a una molécula de MHC, en particular una molécula de MHC de clase I, y preferiblemente tiene una longitud de 7-20 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de 7-12 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de 8-11 aminoácidos, en particular una longitud de 9 o 10 aminoácidos. Preferiblemente, la secuencia del péptido que se presenta después del procesamiento se deriva de la secuencia de aminoácidos de un antígeno, es decir, su secuencia corresponde sustancialmente y, con preferencia, es completamente idéntica a un fragmento de un antígeno.

Por lo tanto, un antígeno codificado por el ARN comprendido en las nanopartículas descritas en el presente documento puede comprender una secuencia de 7-20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 8-11 aminoácidos de longitud, en particular, 9 o 10 aminoácidos de longitud que corresponde sustancialmente y, con preferencia, es completamente idéntico a un fragmento presentado por un MHC de un antígeno asociado a la enfermedad y el procesamiento posterior constituye un péptido presentado.

Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden sustancialmente a una secuencia de un péptido que se presenta por MHC de clase I pueden diferir en uno o más residuos que no son esenciales para el reconocimiento del péptido por TCR presentado por MHC de clase I, o para la unión de péptidos con MHC. Tales péptidos sustancialmente correspondientes también son capaces de estimular CTL que tienen la especificidad deseada y pueden considerarse inmunológicamente equivalentes.

- Un péptido, cuando es presentado por MHC, debe ser reconocible por un receptor de células T. Preferiblemente, el péptido presentado, si es reconocido por un receptor de células T, es capaz de inducir en presencia de señales coestimuladoras apropiadas, la expansión clonal de las células T que llevan el receptor de células T que reconoce específicamente el péptido presentado. Preferiblemente, los péptidos antigénicos, en particular si se presentan en el contexto de las moléculas de MHC, son capaces de estimular una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta celular contra el antígeno del que derivan o las células que expresan el antígeno y preferiblemente presentan el antígeno. Preferiblemente, un péptido antigénico es capaz de estimular una respuesta celular contra una célula que presenta el antígeno con MHC de clase I y preferiblemente es capaz de estimular una CTL sensible a antígeno. Dicha célula es preferiblemente una célula diana a los fines de la invención.
- “Célula diana” significará una célula que es un objetivo para una respuesta inmune, como una respuesta inmune celular. Las células diana incluyen células que expresan un antígeno tal como un antígeno asociado a la enfermedad y preferiblemente presentan dicho antígeno (que, en particular, significa que el antígeno se procesa en las células y uno o más fragmentos del antígeno se presentan en el contexto de moléculas de MHC en las células). Las células diana incluyen cualquier célula indeseable, como una célula infectada o una célula cancerosa. En realizaciones preferidas, la célula diana es una célula que expresa un antígeno como se describe en el presente documento y preferiblemente presenta dicho antígeno con MHC de clase I.
- “Procesamiento de antígenos” se refiere a la degradación de un antígeno en productos en procesión, que son fragmentos de dicho antígeno (por ejemplo, la degradación de una proteína en péptidos) y la asociación de uno o más de estos fragmentos (por ejemplo, a través de la unión) con el moléculas de MHC para presentación por células, preferiblemente células presentadoras de antígeno a células T específicas.
- Una célula que presenta el antígeno (APC) es una célula que presenta, es decir, muestra el antígeno en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Esto incluye la situación en donde sólo se presentan uno o más fragmentos de un antígeno. Las células T pueden reconocer este complejo utilizando su receptor de células T (TCR). Las células presentadoras de antígenos procesan los antígenos y los presentan a las células T.
- Las células profesionales presentadoras de antígeno son muy eficientes en la internalización del antígeno, ya sea por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptor, y luego muestran un fragmento del antígeno, unido a una molécula de MHC de clase II, en su membrana. La célula T reconoce e interactúa con el complejo de moléculas de MHC de clase II-antígeno en la membrana de la célula presentadora de antígeno. Luego, la célula presentadora de antígeno produce una señal coestimuladora adicional, lo que lleva a la activación de la célula T. La expresión de moléculas coestimuladoras es una característica definitoria de las células profesionales que presentan antígenos.
- Los principales tipos de células presentadoras de antígenos profesionales son las células dendríticas, que tienen el rango más amplio de presentación de antígenos y son probablemente las células presentadoras de antígenos más importantes, macrófagos, células B y ciertas células epiteliales activadas.
- Las células dendríticas (DC) son poblaciones de leucocitos que presentan antígenos capturados en tejidos periféricos a células T a través de las vías de presentación de los antígenos de MHC de clase II y I. Es bien sabido que las células dendríticas son potentes inductores de respuestas inmunes y la activación de estas células es un paso crítico para la inducción de la inmunidad antitumoral.
- Las células dendríticas se clasifican convenientemente como células “inmaduras” y “maduras”, que se pueden utilizar como una forma sencilla de discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debe interpretarse de manera que excluya todas las posibles etapas intermedias de diferenciación.
- Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como células presentadoras de antígenos con una alta capacidad para la captación y el procesamiento de antígenos, lo que se correlaciona con la alta expresión del receptor de Fey y el receptor de manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una menor expresión de estos marcadores, pero una alta expresión de las moléculas de la superficie celular responsables de la activación de las células T, como MHC de clase I y de II, las moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11) y las moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1 BB).
- La maduración de las células dendríticas se conoce como el estado de activación de las células dendríticas en donde dichas células dendríticas que presentan antígenos conducen al cebado de las células T, mientras que la presentación de las células dendríticas inmaduras produce tolerancia. La maduración de las células dendríticas está causada principalmente por biomoléculas con características microbianas detectadas por receptores innatos (ADN bacteriano, ARN viral, endotoxinas, etc.), citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1, IFN), ligación de CD40 en la superficie de la célula dendrítica por CD40L, y sustancias liberadas de células que sufren una muerte celular estresante. Las células dendríticas pueden derivarse cultivando células de médula ósea in vitro con citoquinas, como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral alfa.
- Las células presentadoras de antígenos no profesionales no expresan en forma constitutiva las proteínas de MHC de clase II necesarias para la interacción con las células T naifs; estos se expresan solo tras la estimulación de las células presentadoras de antígenos no profesionales por ciertas citoquinas como IFN γ .

Las células presentadoras de antígeno pueden cargarse con péptidos presentados por MHC mediante la transducción de las células con ácido nucleico, como el ARN, que codifica un péptido o proteína que comprende el péptido que se presentará, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica el antígeno. La transfección de células dendríticas con ARNm es una técnica prometedora de carga de antígenos para estimular una fuerte inmunidad antitumoral.

El término “inmunogenicidad” se refiere a la eficacia relativa de un antígeno para inducir una reacción inmune.

Las expresiones “célula T” y “linfocito T” se usan indistintamente en este documento e incluyen células T auxiliares (células T CD4+) y células T citotóxicas (CTL, células T CD8+) que comprenden células T citolíticas.

Las células T pertenecen a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos y desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células. Se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, como las células B y las células natural killer por la presencia de un receptor especial en su superficie celular llamado receptores de células T (TCR). El timo es el principal órgano responsable de la maduración de las células T. Se han descubierto varios subconjuntos diferentes de células T, cada uno con una función distinta.

Las células T auxiliares ayudan a otros glóbulos blancos en procesos inmunológicos, incluida la maduración de células B en células plasmáticas y la activación de células T citotóxicas y macrófagos, entre otras funciones. Estas células también se conocen como células T CD4+ porque expresan la proteína CD4 en su superficie. Las células T auxiliares se activan cuando se les presentan antígenos peptídicos por moléculas de MHC de clase II que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Una vez activados, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citoquinas que regulan o ayudan en la respuesta inmune activa.

Las células T citotóxicas destruyen las células enfermas, por ejemplo, las células infectadas, como las células infectadas por virus y las células cancerosas, también están implicadas en el rechazo del trasplante. Estas células también se conocen como células T CD8+, ya que expresan la glicoproteína CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con MHC de clase I, que está presente en la superficie de casi todas las células del organismo.

La mayoría de las células T tienen un receptor de células T (TCR) que existe como un complejo de varias proteínas. El receptor de células T real está compuesto por dos cadenas peptídicas separadas, que se producen a partir de los genes alfa y beta (TCR α y TCR β) independientes del receptor de células T y se denominan cadenas α - y β -TCR. Las células $\gamma\delta$ T (células T gamma delta) representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor de células T (TCR) distinto en su superficie. Sin embargo, en las células $\gamma\delta$ T, el TCR está formado por una cadena γ y una cadena δ . Este grupo de células T son mucho menos comunes (2% del total de células T) que las células $\alpha\beta$ T.

Todas las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos derivados de células madre hematopoyéticas pueblan el timo y se expanden por división celular para generar una gran población de timocitos inmaduros. Los primeros timocitos no expresan ni CD4 ni CD8 y, por lo tanto, se clasifican como células doble negativas (CD4-CD8-). A medida que progresan a lo largo de su desarrollo, se convierten en timocitos doble positivos (CD4+CD8+) y, finalmente, maduran a timocitos positivos (CD4+CD8- o CD4-CD8+) que luego se liberan del timo a los tejidos periféricos.

La primera señal en la activación de las células T se proporciona mediante la unión del receptor de células T a un péptido corto presentado por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en otra célula. Esto asegura que sólo se active una célula T con un TCR específico para ese péptido. La célula asociada suele ser una célula presentadora de antígeno profesional (APC), generalmente una célula dendrítica en el caso de respuestas naífs, aunque las células B y los macrófagos pueden ser importantes APC. Los péptidos presentados a las células T CD8+ por las moléculas de MHC de clase I tienen una longitud de 8-10 aminoácidos; los péptidos presentados a las células T CD4+ por las moléculas de MHC de clase II son más largos, ya que los extremos de la hendidura de unión de la molécula de MHC de clase II están abiertos.

La expresión “expansión clonal” se refiere a un proceso en donde se multiplica una entidad específica. En el contexto de la presente invención, la expresión se usa preferiblemente en el contexto de una respuesta inmunológica en donde los linfocitos son estimulados por un antígeno, proliferan, y se amplifica el linfocito específico que reconoce dicho antígeno. Preferiblemente, la expansión clonal conduce a la diferenciación de los linfocitos.

De acuerdo con la invención, los linfocitos T citotóxicos pueden generarse in vivo mediante la incorporación de un antígeno o un péptido antigénico en células presentadoras de antígeno in vivo. El antígeno o péptido antigénico se representa como ARN. El antígeno puede procesarse para producir un compañero peptídico para la molécula de MHC, mientras que un fragmento del mismo puede presentarse sin la necesidad de un procesamiento adicional. Este último es el caso en particular, si éstos pueden unirse a las moléculas de MHC. Las células resultantes presentan el complejo de interés y son reconocidas por linfocitos T citotóxicos autólogos que luego se propagan.

La activación específica de las células T CD4+ o CD8+ puede detectarse de varias maneras. Los métodos para detectar la activación de células T específicas incluyen detectar la proliferación de células T, la producción de

citoquinas (por ejemplo, linfocinas) o la generación de actividad citolítica. Para las células T CD4+, un método preferido para detectar la activación de células T específicas es la detección de la proliferación de células T. Para las células T CD8+, un método preferido para detectar la activación de células T específicas es la detección de la generación de actividad citolítica.

5 La expresión “complejo principal de histocompatibilidad” y la abreviatura “MHC” incluyen las moléculas de MHC de clase I y MHC de clase II y se refieren a un complejo de genes que se encuentra en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas de MHC son importantes para la señalización entre linfocitos y células presentadoras de antígenos o células enfermas en las reacciones inmunes, en donde las proteínas o moléculas de MHC se unen a los péptidos y las presentan para su reconocimiento por los receptores de células T. Las proteínas codificadas por MHC se expresan en la superficie de las células y muestran tanto antígenos propios (fragmentos peptídicos de la propia célula) como antígenos no propios (por ejemplo, fragmentos de microorganismos invasores) a una célula T.

15 La región de MHC se divide en tres subgrupos, clase I, clase II y clase III. Las proteínas de MHC de clase I contienen una cadena α - y β 2-microglobulina (que no forman parte del MHC codificado por el cromosoma 15). Presentan fragmentos de antígeno a las células T citotóxicas. En la mayoría de las células del sistema inmunológico, específicamente en las células presentadoras de antígenos, las proteínas de MHC de clase II contienen cadenas α y β y presentan fragmentos de antígenos a las células T auxiliares. La región de clase III del MHC codifica para otros componentes inmunes, como los componentes del complemento y algunos que codifican las citoquinas.

20 En los seres humanos, los genes en la región de MHC que codifican las proteínas que presentan antígenos en la superficie celular se denominan genes de antígeno leucocitario humano (HLA). Sin embargo, la abreviatura MHC se usa a menudo para referirse a productos de genes HLA. Los genes HLA incluyen los nueve genes llamados MHC clásicos: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA y HLA-DRB1.

En una realización preferida de todos los aspectos de la invención, una molécula de MHC es una molécula HLA.

25 Por “célula caracterizada por la presentación de un antígeno”, “célula presentadora de antígeno”, “antígeno presentado por una célula”, “antígeno presentado” o expresiones similares se refiere a una célula, en particular una célula enferma o una célula diana como una célula infectada o una célula cancerosa, o una célula presentadora de antígeno que presenta el antígeno que expresa o un fragmento derivado de dicho antígeno, por ejemplo, mediante el procesamiento del antígeno, en el contexto de las moléculas de MHC, en particular las moléculas de MHC de clase I. De manera similar, las expresiones “enfermedad caracterizada por la presentación de un antígeno” denota una enfermedad que involucra células caracterizadas por la presentación de un antígeno, en particular con el MHC de clase I. La presentación de un antígeno por una célula puede efectuarse transfectando la célula con un ácido nucleico tal como el ARN que codifica el antígeno.

35 La expresión “inmunológicamente equivalente” significa que la molécula inmunológicamente equivalente tal como la secuencia de aminoácidos inmunológicamente equivalente exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo, con respecto al tipo de efecto inmunológico, como la inducción de una respuesta inmune humoral y/o celular, la fuerza y/o la duración de la reacción inmune inducida, o la especificidad de la reacción inmune inducida.

40 La expresión “funciones efectoras inmunes” en el contexto de la presente invención incluye cualquier función mediada por componentes del sistema inmune que resulta, por ejemplo, en la destrucción de células infectadas o células cancerosas, o en la inhibición del crecimiento del tumor y/o la inhibición del desarrollo del tumor, incluida la inhibición de la diseminación del tumor y la metástasis. Preferiblemente, las funciones efectoras inmunes en el contexto de la presente invención son funciones efectoras mediadas por células T. Dichas funciones comprenden, en el caso de una célula T auxiliar (célula T CD4+), el reconocimiento de un antígeno o un péptido antígeno en el contexto de moléculas MHC de clase II por los receptores de células T, la liberación de citoquinas y/o la activación de linfocitos CD8+ (CTL) y/o células B, y en el caso de CTL, el reconocimiento de un antígeno o un péptido antígeno en el contexto de las moléculas de clase I del MHC por los receptores de células T, la eliminación de las células presentada en el contexto de moléculas de MHC de clase I, es decir, células caracterizadas por la presentación de un antígeno con MHC de clase I, por ejemplo, mediante apoptosis o lisis celular mediada por perforina, producción de citoquinas como IFN- γ y TNF- α , y destrucción citolítica específica de células diana que expresan antígeno.

50 Un ácido nucleico es según la invención ácido ribonucleico (ARN), con máxima preferencia, ARN transcrito in vitro (ARN de IVT) o ARN sintético. Los ácidos nucleicos incluyen según la invención el ARNm. Un ácido nucleico puede estar de acuerdo con la invención en forma de una molécula que es de cadena sencilla o de doble cadena y lineal o cerrada covalentemente para formar un círculo. Se puede emplear un núcleo para la introducción, es decir, la transfección de células, por ejemplo, en forma de ARN que puede prepararse por transcripción in vitro a partir de una plantilla de ADN. Además, el ARN se puede modificar antes de la aplicación mediante la estabilización de secuencias, la limitación y la poliadenilación.

55 Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector. El término “vector”, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier vector conocido por los expertos en la técnica, incluidos vectores de plásmidos, vectores de cósmidos, vectores de fagos tales como fagos lambda, vectores virales como vectores adenovirales o

5 baculovirales, o vectores de cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), o cromosomas artificiales de PI (PAC). Dichos vectores incluyen expresión así como vectores de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos así como vectores virales y generalmente contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacterias, levaduras, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión in vitro. Los vectores de clonación se usan generalmente para diseñar y amplificar cierto fragmento de ADN deseado y pueden carecer de secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

10 En el contexto de la presente invención, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende residuos de ribonucleótidos y preferiblemente está compuesta total o sustancialmente por residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β-D-ribofuranosilo. El término incluye ARN de doble cadena, ARN de cadena sencilla, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante, así como ARN modificado que difiere del ARN natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como el o los extremos de un ARN o internamente, por ejemplo, en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos no naturales o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos o análogos de ARN de origen natural.

20 De acuerdo con la presente invención, el término "ARN" incluye y preferiblemente se refiere a "ARNm" que significa "ARN mensajero" y se refiere a un "transcripto" que puede producirse usando ADN como plantilla y codifica un péptido o proteína. El ARNm comprende típicamente una región no traducida 5' (5'-UTR), una región codificante de proteína o péptido y una región no traducida 3' (3'-UTR). El ARNm tiene una vida media limitada en las células e in vitro. Preferiblemente, el ARNm se produce por transcripción in vitro usando una plantilla de ADN. En una realización de la invención, el ARN se obtiene por transcripción in vitro o síntesis química. La metodología de transcripción in vitro es conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, hay una variedad de kits de transcripción in vitro disponibles en comercios.

30 En el contexto de la presente invención, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en donde el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. De acuerdo con la presente invención, el término "transcripción" comprende "transcripción in vitro".

35 La expresión "transcripción in vitro" se refiere a un proceso en donde el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza in vitro en un sistema libre de células, preferiblemente utilizando extractos celulares apropiados. Preferiblemente, los vectores de clonación se aplican para la generación de transcritos. Estos vectores de clonación se designan generalmente como vectores de transcripción y están de acuerdo con la presente invención abarcados por el término "vector". De acuerdo con la presente invención, el ARN se puede obtener por transcripción in vitro de una plantilla de ADN apropiada. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor para cualquier ARN polimerasa. Los ejemplos particulares de ARN polimerasas son las ARN polimerasas T7, T3 y SP6. Se puede obtener una plantilla de ADN para la transcripción in vitro mediante la clonación de un ácido nucleico, en particular el ADNc, e introduciéndolo en un vector apropiado para la transcripción in vitro. El ADNc puede obtenerse por transcripción inversa de ARN. Preferiblemente, los vectores de clonación se usan para producir transcritos que generalmente se designan como vectores de transcripción.

45 El término "expresión" se usa en el presente documento en su sentido más amplio y comprende la producción de ARN y/o de proteína o péptido. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. La expresión puede ser transitoria o puede ser estable. Según la invención, el término expresión también incluye una "expresión aberrante" o "expresión anormal".

50 "Expresión aberrante" o "expresión anormal" significa de acuerdo con la invención que la expresión está alterada, preferiblemente aumentada, en comparación con una referencia, por ejemplo, un estado en un sujeto que no tiene una enfermedad asociada con una expresión aberrante o anormal de una proteína determinada, por ejemplo, un antígeno tumoral. Un aumento en la expresión se refiere a un aumento de al menos el 10%, en particular al menos el 20%, al menos el 50% o al menos el 100%, o más. En una realización, la expresión sólo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano es reprimida.

55 La expresión "expresado específicamente" significa que una proteína se expresa esencialmente sólo en un tejido u órgano específico. Por ejemplo, un antígeno tumoral expresado específicamente en la mucosa gástrica significa que dicha proteína se expresa principalmente en la mucosa gástrica y no se expresa en otros tejidos o no se expresa de manera significativa en otros tipos de tejidos u órganos. Por lo tanto, una proteína que se expresa exclusivamente en las células de la mucosa gástrica y en un grado significativamente menor en cualquier otro tejido, como el testículo, se expresa específicamente en las células de la mucosa gástrica. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral también puede expresarse específicamente en condiciones normales en más de un tipo de tejido u órgano, como en 2 o 3 tipos de tejido u órganos, pero preferiblemente en no más de 3 tipos diferentes de tejido u órgano. En este caso, el antígeno tumoral se expresa específicamente en estos órganos. Por ejemplo, si un antígeno tumoral se

expresa en condiciones normales preferiblemente en una extensión aproximadamente igual en pulmón y estómago, dicho antígeno tumoral se expresa específicamente en pulmón y estómago.

5 El término "traducción" de acuerdo con la invención se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para producir una proteína o péptido.

De acuerdo con la invención, la expresión "codificante de ARN" significa que el ARN, si está presente en el entorno apropiado, preferiblemente dentro de una célula, como una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, puede expresarse para producir una proteína o péptido que codifica.

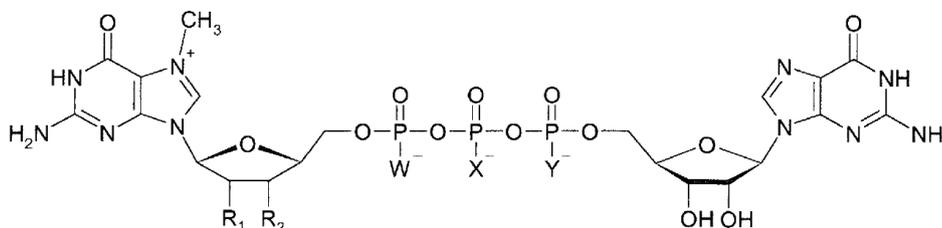
10 De acuerdo con la invención, la estabilidad y la eficiencia de traducción del ARN pueden modificarse según se requiera. El término "modificación" en el contexto de ARN como se usa de acuerdo con la presente invención incluye cualquier modificación de ARN que no esté presente en forma natural en dicho ARN.

En una realización de la invención, el ARN usado de acuerdo con la invención no tiene 5'-trifosfatos no cubiertos. La eliminación de dichos 5'-trifosfatos no cubiertos se puede lograr mediante el tratamiento del ARN con una fosfatasa.

15 El ARN de acuerdo con la invención puede tener ribonucleótidos modificados para aumentar su estabilidad y/o disminuir la citotoxicidad. Por ejemplo, en una realización, en el ARN usado de acuerdo con la invención, la 5-metilcitosina está parcial o completamente sustituida, preferiblemente completamente, por citidina. Alternativa o adicionalmente, en una realización, en el ARN usado de acuerdo con la invención, la pseudouridina está parcial o completamente sustituida, con preferencia, completamente por uridina.

20 En una realización, el término "modificación" se refiere a proporcionar un ARN con un análogo de 5'-cap o 5'-cap. El término "5'-cap" se refiere a una estructura de cubierta que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm a través de un inusual enlace trifosfato de 5' a 5'. En una realización, esta guanosina está metilada en la posición 7. El término "5'-cap convencional" se refiere a 5'-cap de ARN de origen natural, preferiblemente a la cubierta de 7-metilguanósina (m7G). En el contexto de la presente invención, el término "5'-cap" incluye un análogo de 5'-cap que se asemeja a la estructura de la cubierta de ARN y se modifica para que posea la capacidad de estabilizar el ARN y/o mejorar la traducción del ARN si se une al mismo, preferiblemente in vivo y/o en una célula.

Preferiblemente, el extremo 5' del ARN incluye una estructura de cubierta que tiene la siguiente fórmula general:



30 en donde R_1 y R_2 son independientemente hidroxilo o metoxi y W^- , X^- e Y^- son independientemente oxígeno, azufre, selenio o BH_3 . En una realización preferida, R_1 y R_2 son hidroxilo y W^- , X^- e Y^- son oxígeno. En una realización preferida adicional, uno de R_1 y R_2 , preferiblemente R_1 , es hidroxilo y el otro es metoxi y W^- , X^- e Y^- son oxígeno. En una realización preferida adicional, R_1 y R_2 son hidroxilo y uno de W^- , X^- e Y^- , preferiblemente X^- es azufre, selenio o BH_3 , preferiblemente azufre, mientras que el otro es oxígeno. En una realización preferida adicional, uno de R_1 y R_2 , preferiblemente R_2 es hidroxilo y el otro es metoxi y uno de W^- , X^- e Y^- , preferiblemente X^- es azufre, selenio o BH_3 , preferiblemente azufre mientras que el otro es oxígeno.

35 En la fórmula anterior, el nucleótido en el lado derecho está conectado a la cadena de ARN a través de su grupo de 3'.

40 La provisión de un ARN con un análogo de 5'-cap o 5'-cap se puede lograr mediante la transcripción in vitro de una plantilla de ADN en presencia de dicho análogo de 5'-cap o 5'-cap, en donde dicho 5'-cap está cotranscripcionalmente incorporado en la cadena de ARN generada, o el ARN puede generarse, por ejemplo, mediante transcripción in vitro, y 5'-cap puede unirse al ARN después de la transcripción utilizando enzimas de cobertura, por ejemplo, enzimas de cobertura del virus vaccinia.

45 El ARN puede comprender modificaciones adicionales. Por ejemplo, una modificación adicional del ARN utilizado en la presente invención puede ser una extensión o truncamiento de la cola poli(A) que se produce naturalmente o una alteración de las regiones no traducidas (UTR) 5' o 3', como la introducción de una UTR que no está relacionada con la región codificadora de dicho ARN, por ejemplo, el intercambio de la 3'-UTR existente o la inserción de una o más, preferiblemente dos copias de una 3'-UTR derivada de un gen de globina, tales como alfa2-globina, alfa1-globina, beta-globina, preferiblemente beta-globina, más preferiblemente beta-globina humana.

El ARN que tiene una secuencia de poli-A no enmascarada se traduce de manera más eficiente que el ARN que tiene una secuencia de poli-A enmascarada.

5 La expresión “cola poli(A)” o “secuencia poli-A” se refiere a una secuencia de residuos de adenilo (A) que típicamente se localiza en el extremo 3' de una molécula de ARN y “secuencia poli-A no enmascarada” significa que la secuencia de poli-A en el extremo 3' de una molécula de ARN termina con una A de la secuencia de poli-A y no es seguida por otros nucleótidos distintos de A localizados en el extremo 3', es decir, corriente abajo, de la secuencia de poli-A. Además, una larga secuencia de poli-A de aproximadamente 120 pares de bases da como resultado una estabilidad óptima de la transcripción y una eficiencia de traducción del ARN.

10 Por lo tanto, para aumentar la estabilidad y/o la expresión del ARN utilizado de acuerdo con la presente invención, se puede modificar para que esté presente junto con una secuencia poli-A, que tiene preferiblemente una longitud de 10 a 500, más preferiblemente 30 a 300, incluso más preferiblemente 65 a 200 y especialmente 100 a 150 residuos de adenosina. En una realización especialmente preferida, la secuencia de poli-A tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos de adenosina. Para aumentar aún más la estabilidad y/o la expresión del ARN utilizado de acuerdo con la invención, la secuencia poli-A puede no tener máscara.

15 Además, la incorporación de una región no traducida en 3' (UTR) en la región no traducida en 3' de una molécula de ARN puede resultar en una mejora en la eficiencia de traducción. Se puede lograr un efecto sinérgico mediante la incorporación de dos o más de tales regiones no traducidas en 3'. Las regiones no traducidas en 3' pueden ser autólogas o heterólogas al ARN en donde se introducen. En una realización particular, la región 3' no traducida se deriva del gen de la β -globina humana.

20 Una combinación de las modificaciones descritas anteriormente, es decir, la incorporación de una secuencia poli-A, el no enmascaramiento de una secuencia poli-A y la incorporación de una o más regiones 3' no traducidas, tiene una influencia sinérgica sobre la estabilidad del ARN y el aumento en la eficiencia de la traducción.

25 Con el fin de aumentar la expresión del ARN usado de acuerdo con la presente invención, puede modificarse dentro de la región codificante, es decir, la secuencia que codifica el péptido o proteína expresada, preferiblemente sin alterar la secuencia del péptido o proteína expresada, para aumentar el contenido de GC aumenta la estabilidad del ARNm y realiza una optimización del codón y, por lo tanto, mejora la traducción en las células.

30 El término “estabilidad” del ARN se refiere a la “vida media” del ARN. “Vida media” se refiere al período de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, la cantidad o el número de moléculas. En el contexto de la presente invención, la vida media de un ARN es indicativa de la estabilidad de dicho ARN. La vida media del ARN puede influir en la “duración de la expresión” del ARN. Se puede esperar que el ARN que tiene una vida media larga se exprese durante un período de tiempo prolongado.

Por supuesto, si de acuerdo con la presente invención se desea disminuir la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN, es posible modificar el ARN para interferir con la función de los elementos como se describe anteriormente, lo que aumenta la estabilidad y/o la eficiencia de traducción de ARN.

35 El “diámetro” o “tamaño” promedio de las nanopartículas descritas aquí es generalmente el “tamaño de diseño” o el tamaño deseado de las nanopartículas preparadas de acuerdo con un proceso establecido. El tamaño puede ser una dimensión medida directamente, como el diámetro promedio o máximo, o puede determinarse mediante un ensayo indirecto como un ensayo de selección por filtración. La medición directa del tamaño de partícula se realiza típicamente mediante dispersión dinámica de la luz. Con frecuencia, los resultados de las mediciones de dispersión
40 de luz dinámica se expresan en términos de Z_{promedio} (una medida para el tamaño promedio) y el índice de polidispersidad, PI o PDI (una medida para la polidispersidad). A medida que surgen pequeñas variaciones en el tamaño durante el proceso de fabricación, una variación de hasta el 40% de la medición establecida es aceptable y se considera que está dentro del tamaño indicado. Alternativamente, el tamaño puede determinarse mediante ensayos de selección por filtración. Por ejemplo, una preparación de partículas es menor que un tamaño establecido,
45 si al menos el 97% de las partículas pasan a través de un filtro “tipo pantalla” del tamaño indicado.

Preferiblemente, el ARN se administra, es decir, se transfecta en una célula, en particular una célula presente in vivo, como una célula dendrítica, que expresa la proteína, el péptido o el antígeno que codifica.

50 El término “transfección” se refiere a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula. Para los fines de la presente invención, el término “transfección” también incluye la introducción de un ácido nucleico en una célula tal como una célula presentadora de antígeno o la captación de un ácido nucleico por dicha célula, en donde la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un paciente.

De acuerdo con la invención, se prefiere que la introducción de ARN que codifica un antígeno en células dé como resultado la expresión de dicho antígeno.

55 El término “péptido” según la invención comprende oligo- y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferiblemente 3 o más, preferiblemente 4 o más, preferiblemente 6 o más, preferiblemente 8 o más, preferiblemente 9 o más, preferiblemente 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 más,

preferiblemente 21 o más y preferiblemente hasta 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El término “proteína” se refiere a péptidos grandes, preferiblemente a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos “péptidos” y “proteínas” son sinónimos y se usan de manera indistinta en el presente documento.

5 El término “célula” es preferiblemente una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta es preferiblemente una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferiblemente, dicho término se refiere de acuerdo con la invención a cualquier célula que pueda
10 transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término “célula” incluye según la invención células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) o células eucariotas (por ejemplo, células dendríticas, células B, células CFIO, células COS, células K562, células FIEK293, células HELA, células de levadura y células de insecto). El ácido nucleico exógeno se puede encontrar dentro de la célula (i) libremente dispersado como tal, (ii) incorporado en un vector recombinante, o (iii) integrado en el genoma de la célula huésped o el ADN mitocondrial. Las células de mamífero son particularmente preferidas, tales como células de humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células pueden
15 derivarse de un gran número de tipos de tejidos e incluyen células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos incluyen queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de médula ósea y células madre embrionarias. En otras realizaciones, la célula es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o macrófago.

20 Como se usa en el presente documento, el término “nanopartícula” se refiere a cualquier partícula que tiene un diámetro que hace que la partícula sea adecuada para la administración sistémica, en particular parenteral, en particular, de ácidos nucleicos, típicamente un diámetro de menos de 1000 nanómetros (nm). En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro inferior a 600 nm. En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro inferior a 400 nm.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión “formulación en nanopartículas” o expresiones similares se refieren a cualquier sustancia que contiene al menos una nanopartícula. En algunas realizaciones, una composición de nanopartículas es una colección uniforme de nanopartículas. En algunas realizaciones, las composiciones en nanopartículas son dispersiones o emulsiones. En general, se forma una dispersión o emulsión cuando se combinan al menos dos materiales inmiscibles.

30 La expresión “lipoplexo” o “lipoplexo de ARN” se refiere a un complejo de lípidos y ácidos nucleicos como el ARN. Los lipoplexos se forman espontáneamente cuando los liposomas catiónicos, que a menudo también incluyen un lípido “auxiliar” neutro, se mezclan con ácidos nucleicos.

35 El potencial zeta es un término científico para el potencial electrocinético en sistemas coloidales. Desde un punto de vista teórico, el potencial zeta es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial en la ubicación del plano de deslizamiento frente a un punto en el fluido a granel que se aleja de la interfaz. En otras palabras, el potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unido a la partícula dispersada. El potencial zeta se usa ampliamente para la cuantificación de la magnitud de la carga eléctrica en la doble capa.

40 El potencial zeta se puede calcular utilizando modelos teóricos y mediciones de movilidad electroforética determinada experimentalmente o de movilidad dinámica electroforética. Los fenómenos electrocinéticos y los fenómenos electroacústicos son las fuentes habituales de datos para el cálculo del potencial zeta.

45 La electroforesis se puede usar para estimar el potencial zeta de las partículas. En la práctica, el potencial zeta de una dispersión puede medirse aplicando un campo eléctrico a través de la dispersión. Las partículas dentro de la dispersión con un potencial zeta migrarán hacia el electrodo de carga opuesta a una velocidad proporcional a la magnitud del potencial zeta. Esta velocidad se puede medir utilizando la técnica del anemómetro láser doppler. El cambio de frecuencia o el cambio de fase de un rayo láser incidente causado por estas partículas en movimiento se puede medir como la movilidad de las partículas, y esta movilidad se puede convertir en potencial zeta al ingresar la viscosidad del dispersante y la permisividad dieléctrica, y la aplicación de las teorías de Smoluchowski.

La velocidad electroforética es proporcional a la movilidad electroforética, que es el parámetro medible. Existen varias teorías que vinculan la movilidad electroforética con el potencial zeta.

50 Se pueden usar sistemas adecuados como el sistema Nicomp 380 ZLS para determinar el potencial zeta. Tales sistemas generalmente miden la movilidad electroforética y la estabilidad de las partículas cargadas en suspensión líquida. Estos valores son un predictor de las fuerzas de repulsión ejercidas por las partículas en suspensión y están directamente relacionadas con la estabilidad del sistema coloidal. Un potencial zeta puede medirse de acuerdo con un protocolo como se describe a continuación.

55 La carga eléctrica es una propiedad física que hace que una materia experimente una fuerza cuando está cerca de otra materia cargada eléctricamente. La carga eléctrica viene en dos tipos, llamados positivo y negativo. Las partículas cargadas cuyas cargas tienen el mismo signo se repelen entre sí, y las partículas cuyas cargas tienen signos diferentes se atraen.

La carga eléctrica de un objeto macroscópico como una partícula es la suma de las cargas eléctricas de las partículas que lo componen. Las nanopartículas descritas en el presente documento pueden tener un número igual de cargas positivas y negativas, en cuyo caso sus cargas se cancelan, dando como resultado una carga neta de cero, lo que hace que las nanopartículas sean neutras. La carga neta es la carga de un objeto completo, como un compuesto.

Un ion que tiene una carga positiva neta global es un catión, mientras que un ion que tiene una carga negativa neta general es un anión.

Las nanopartículas descritas en este documento pueden formarse ajustando una carga positiva a negativa, dependiendo de la relación de carga (+/-) del lípido catiónico al ARN y mezclando el ARN y el lípido catiónico. La relación de carga +/- del lípido catiónico al ARN en las nanopartículas descritas en este documento se puede calcular mediante la siguiente ecuación (+/- relación de carga) = [(cantidad de lípidos catiónicos (mol)) * (el número total de cargas positivas en el lípido catiónico)] : [(cantidad de ARN (mol)) * (el número total de cargas negativas en el ARN)]. La cantidad de ARN y la cantidad de lípidos catiónicos pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica en vista de una cantidad de carga en la preparación de las nanopartículas.

Si la presente invención se refiere a una carga tal como una carga positiva, una carga negativa o una carga neutra o un compuesto catiónico, un compuesto negativo o un compuesto neutro, esto generalmente significa que la carga mencionada está presente a un pH seleccionado, como un pH fisiológico. Por ejemplo, la expresión "lípido catiónico" significa un lípido que tiene una carga neta positiva a un pH seleccionado, como un pH fisiológico. La expresión "lípido neutro" significa un lípido que no tiene carga neta positiva o negativa y puede estar presente en forma de un ion anfótero sin carga o neutro a un pH seleccionado, como un pH fisiológico. Por "pH fisiológico" en la presente memoria se entiende un pH de aproximadamente 7,5.

Los portadores de nanopartículas tales como los portadores de lípidos incluyen cualquier sustancia o vehículo con el que se pueda asociar el ARN, por ejemplo, formando complejos con el ARN o formando vesículas en las que el ARN está encerrado o encapsulado. Esto puede resultar en una mayor estabilidad del ARN en comparación con el ARN desnudo. En particular, la estabilidad del ARN en sangre puede aumentar.

Los lípidos catiónicos, polímeros catiónicos y otras sustancias con cargas positivas pueden formar complejos con ácidos nucleicos cargados negativamente. Estas moléculas catiónicas se pueden usar para complejar ácidos nucleicos, de este modo se forman, por ejemplo, los llamados lipoplejos o poliplexos, respectivamente, y se ha demostrado que estos complejos suministran ácidos nucleicos a las células.

Las preparaciones de ARN en nanopartículas se pueden obtener mediante varios protocolos y a partir de diversos compuestos complejantes de ARN. Los lípidos, polímeros, oligómeros o anfífilos son agentes complejantes típicos. En una forma de realización, el compuesto complejante comprende al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en protamina, polietilimina, una poli-L-lisina, una poli-L-arginina o una histona.

La protamina es útil como agente portador catiónico. El término "protamina" se refiere a cualquiera de varias proteínas fuertemente básicas de peso molecular relativamente bajo que son ricas en arginina y se encuentran asociadas especialmente con el ADN en lugar de histonas somáticas en las células espermáticas de varios animales (como peces). En particular, el término "protamina" se refiere a las proteínas que se encuentran en el esperma de pescado que son fuertemente básicas, son solubles en agua, no se coagulan por calor y producen principalmente arginina después de la hidrólisis. En forma purificada, se utilizan en una formulación de insulina de acción prolongada y para neutralizar los efectos anticoagulantes de la heparina.

El término "protamina", como se usa en la presente, se considera que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de protamina obtenida o derivada de fuentes nativas o biológicas, que incluyen fragmentos de estas y formas multiméricas de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento de estas. Además, el término abarca polipéptidos (sintetizados) que son artificiales y específicamente diseñados para propósitos específicos y no se pueden aislar de fuentes nativas o biológicas.

La protamina puede ser protamina sulfatada o clorhidrato de protamina. En una forma de realización preferida, la fuente de protamina utilizada para la producción de las nanopartículas descritas en la presente es protamina 5000 que contiene protamina a más de 10 mg/ml (5000 unidades neutralizantes de heparina por ml) en una solución de sal isotónica.

Los liposomas son vesículas lipídicas microscópicas que a menudo tienen una o más bicapas de un lípido formador de vesículas, tal como un fosfolípido, y son capaces de encapsular un fármaco. Se pueden emplear diferentes tipos de liposomas en el contexto de la presente invención, que incluyen, sin limitación, vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), liposomas estéricamente estabilizados (SSL), vesículas multivesiculares (MV), y vesículas multivesiculares grandes (LMV), así como otras formas bicapa conocidas en la técnica. El tamaño y la laminaridad del liposoma dependerán de la forma de preparación y la selección del tipo de vesículas para usar dependerá del modo de administración preferido. Existen varias otras formas de organización supramolecular en las que los lípidos pueden estar presentes en un medio acuoso, que comprende fases laminares, fases hexagonales y hexagonales inversas, fases cúbicas, micelas,

micelas inversas compuestas de monocapas. Estas fases también se pueden obtener en combinación con ADN o ARN, y la interacción con ARN y ADN puede afectar sustancialmente el estado de fase. Las fases descritas pueden estar presentes en las formulaciones de ARN de nanopartículas descritas en la presente.

5 Para la formación de lipoplejos de ARN a partir de ARN y liposomas, se puede utilizar cualquier método adecuado de formación de liposomas siempre que proporcione los lipoplejos de ARN previstos. Los liposomas se pueden formar usando métodos estándares tales como el método de evaporación inversa (REV), el método de inyección de etanol, el método de deshidratación-rehidratación (DRV), sonicación u otros métodos adecuados.

Después de la formación de liposomas, los liposomas pueden tener el tamaño adecuado para obtener una población de liposomas que tienen un rango de tamaño sustancialmente homogéneo.

10 Los lípidos formadores de bicapa tienen típicamente dos cadenas de hidrocarburos, particularmente cadenas de acilo, y un grupo principal, ya sea polar o no polar. Los lípidos formadores de bicapa están compuestos de lípidos naturales o de origen sintético, que incluyen los fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfático, fosfatidilinositol y esfingomielina, donde las dos cadenas de hidrocarburo generalmente tienen entre aproximadamente 14-22 átomos de carbono de longitud, y tienen diversos grados de insaturación. Otros lípidos
15 adecuados para uso en la composición descrita en la presente incluyen glicolípidos y esteroides tales como colesterol y sus diversos análogos que también se pueden usar en los liposomas.

Los lípidos catiónicos típicamente tienen una unidad estructural lipofílica, tal como un esteroil, una cadena de acilo o diacilo, y tienen una carga neta positiva general. El grupo principal del lípido normalmente lleva la carga positiva. El lípido catiónico con preferencia tiene una carga positiva de 1 a 10 valencias, con mayor preferencia, una carga
20 positiva de 1 a 3 valencias, y con mayor preferencia, una carga positiva de 1 valencia. Los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero sin limitación, 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA); dimetildioctadecilamonio (DDAB); 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP); 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP); 1,2-diaciloxi-3-dimetilamonio propanos; 1,2-dialquiloil-3-dimetilamonio propanos; cloruro de dioctadecildimetil amonio (DODAC), trifluoroacetato de 1,2-dimiristoiloxipropil-1,3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), y
25 2,3-dioleoiloxi-N-[2(esperminocarboxamida)etil-N,N-dimetil-1-propanamio (DOSPA). Los preferidos son DOTMA, DOTAP, DODAC, y DOSPA. De máxima preferencia es DOTMA.

Además, las nanopartículas descritas en la presente incluyen además en la presente con preferencia un lípido neutro en vista de la estabilidad estructural, y similares. El lípido neutro se puede seleccionar apropiadamente en vista de la eficiencia de administración del complejo ARN-lípido. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen, pero sin limitación,
30 1,2-di- (9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), diacilfosfatidil colina, diacilfosfatidil etanol amina, ceramida, esfingomielina, cefalina, esteroil y cerebrósido. Se prefiere DOPE y/o DOPC. De máxima preferencia es DOPE. En el caso de que un liposoma catiónico incluya tanto un lípido catiónico como un lípido neutro, la relación molar del lípido catiónico al lípido neutro se puede determinar de manera apropiada en vista de la estabilidad del liposoma, y similares.

35 De acuerdo con una forma de realización, las nanopartículas descritas en la presente pueden comprender fosfolípidos. Los fosfolípidos pueden ser un glicerofosfolípido. Los ejemplos de glicerofosfolípidos incluyen, sin limitación, tres tipos de lípidos: (i) fosfolípidos zwitteriónicos, que incluyen, por ejemplo, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilcolina de yema de huevo, PC derivada de soja en forma natural, parcialmente hidrogenada o completamente hidrogenada, esfingomielina (SM) de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC); (ii) fosfolípidos cargados negativamente: que
40 incluyen, por ejemplo, fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfático (PA), dipalmitoil PG fosfatidilglicerol (PG), dimiristoil osfatidilglicerol (DMPG); derivados sintéticos en los que el conjugado produce un fosfolípido zwitteriónico cargado negativamente, tal es el caso de metoxi-polietilenglicol-distearoilfosfatidiletanolamina (mPEG-DSPE); y (iii) fosfolípidos catiónicos, que incluyen, por ejemplo, fosfatidilcolina o esfingomielina en donde el fosfomonoéster estaba O-metilado para formar los lípidos catiónicos.

45 La asociación del ARN al portador lipídico se puede producir, por ejemplo, mediante el ARN que rellena los espacios intersticiales del portador, de manera que el portador atrapa físicamente el ARN, o por enlace covalente, iónico o hidrógeno, o por medio de la adsorción mediante enlaces no específicos. Cualquiera que sea el modo de asociación, el ARN debe conservar sus propiedades terapéuticas, es decir, la codificación de antígenos.

50 El "índice de polidispersidad" es una medición de la distribución de tamaño homogénea o heterogénea de las partículas individuales tal como los liposomas en una mezcla de partículas e indica la amplitud de la distribución de partículas en una mezcla. El PI se puede determinar, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "catión bivalente" se considera que significa un elemento, átomo o molécula cargado positivamente que tiene una carga de más 2. La expresión incluye iones metálicos tales como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y/o Cu^{2+} . Los cationes bivalentes de acuerdo con la invención también
55 incluyen formas de sal de los iones. Los ejemplos específicos de formas de sales bivalentes incluyen CaCl_2 , ZnCl_2 , MnSO_4 , MnCl_2 y MgCl_2 y otras combinaciones de los ejemplos de cationes divalentes anteriores en forma de sal con, por ejemplo, cloruro (Cl), sulfato (SO_4), acetato y/o fosfato. Los cationes bivalentes y formas de sal distintas de las ejemplificadas anteriormente son bien conocidos en la técnica y están incluidos en el significado del término tal como

se usa en la presente.

La expresión "ion monovalente" incluye un catión que tiene una carga de más 1. Típicamente, la expresión incluye metales alcalinos tales como litio, sodio, potasio, rubidio y cesio.

5 El término "porción" se refiere a una fracción. Con respecto a una estructura particular tal como una secuencia de aminoácidos o una proteína, el término "porción" de esta puede designar una fracción continua o discontinua de dicha estructura. Con preferencia, una porción de una secuencia de aminoácidos comprende al menos el 1%, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, con preferencia al menos el 40%, con preferencia al menos 50%, con mayor preferencia, al menos el 60%, con mayor preferencia, al menos el 70%, incluso con mayor preferencia, al menos el 80%, y con máxima preferencia al menos el 90% de los aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Con preferencia, si la porción es una fracción discontinua, dicha fracción discontinua está compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más partes de una estructura, cada parte es un elemento continuo de la estructura. Por ejemplo, una fracción discontinua de una secuencia de aminoácidos puede estar compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o con mayor preferencia, no más de 4 partes de dicha secuencia de aminoácidos, en donde cada parte comprende con preferencia al menos 5 aminoácidos continuos, al menos 10 aminoácidos continuos, con preferencia al menos 20 aminoácidos continuos, con preferencia al menos 30 aminoácidos continuos de la secuencia de aminoácidos.

20 Los términos "parte" y "fragmento" se usan indistintamente en la presente y se refieren a un elemento continuo. Por ejemplo, una parte de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos o una proteína se refiere a un elemento continuo de dicha estructura. Una porción, una parte o un fragmento de una estructura comprende con preferencia una o más propiedades funcionales de dicha estructura. Por ejemplo, una porción, una parte o un fragmento de un epítipo, péptido o proteína es con preferencia inmunológicamente equivalente al epítipo, péptido o proteína de la que se deriva. En el contexto de la presente invención, una "parte" de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos con preferencia comprende, con preferencia consiste en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 92%, al menos el 94%, al menos el 96%, al menos el 98%, al menos el 99% de la estructura entera o secuencia de aminoácidos.

25 "Reducir" o "inhibir" como se usa en la presente significa la capacidad de causar una disminución general, con preferencia del 5% o más, el 10% o más, el 20% o más, con mayor preferencia, del 50% o más, y con máxima preferencia de 75% o más, en el nivel. El término "inhibir" o frases similares incluye una inhibición completa o esencialmente completa, es decir, una reducción a cero o esencialmente a cero.

30 Los términos tales como "aumentar" o "potenciar" con preferencia se refieren a un aumento o potenciación en aproximadamente al menos el 10%, con preferencia al menos el 20%, con preferencia al menos el 30%, con mayor preferencia, al menos el 40%, con mayor preferencia, al menos el 50%, incluso con mayor preferencia, al menos el 80%, y con máxima preferencia al menos el 100%, al menos el 200%, al menos el 500%, al menos el 1000%, al menos el 10000% o incluso más.

35 Los agentes, composiciones y métodos descritos en la presente se pueden usar para tratar a un sujeto con una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad caracterizada por la presencia de células enfermas que expresan un antígeno y presentan un péptido antigénico. Los ejemplos de enfermedades que se pueden tratar y/o prevenir abarcan todas las enfermedades que expresan uno de los antígenos descritos en la presente. Las enfermedades particularmente preferidas son enfermedades infecciosas tales como enfermedades virales y enfermedades de cáncer. Los agentes, composiciones y métodos descritos en la presente también se pueden usar para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en la presente.

40 De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, que incluye enfermedades infecciosas y enfermedades de cáncer, en particular aquellas formas de enfermedades infecciosas y enfermedades de cáncer descritas en la presente.

45 Una enfermedad para tratar de acuerdo con la invención es con preferencia una enfermedad que involucra un antígeno. "Enfermedad que involucra un antígeno" o expresiones similares significan de acuerdo con la invención que el antígeno se expresa en células de un tejido u órgano enfermo. La expresión en células de un tejido u órgano enfermo puede aumentar en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. En una forma de realización, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano está reprimida. De acuerdo con la invención, las enfermedades que involucran un antígeno incluyen enfermedades infecciosas y enfermedades de cáncer, en donde el antígeno asociado a la enfermedad es con preferencia un antígeno del agente infeccioso y un antígeno tumoral, respectivamente. Con preferencia, una enfermedad que involucra un antígeno es una enfermedad que involucra células que expresan un antígeno y presentan el antígeno en el contexto de las moléculas MHC, en particular con MHC de clase I.

50 Las expresiones "tejido normal" o "condiciones normales" se refieren a tejido sano o las condiciones en un sujeto sano, es decir, condiciones no patológicas, donde "sano" con preferencia significa no infectado o no canceroso.

Cáncer o enfermedad de cáncer (término médico: neoplasia maligna) es una clase de enfermedades en las que un

grupo de células muestra un crecimiento descontrolado (división más allá de los límites normales), invasión (intrusión y destrucción de tejidos adyacentes) y, algunas veces, metástasis (se disemina a otros lugares del cuerpo a través de la linfa o sangre). Estas tres propiedades malignas de los cánceres los diferencian de los tumores benignos, que son autolimitados y no invaden ni metastatizan. La mayoría de los cánceres forman un tumor, es decir, un hinchamiento o lesión formada por un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas o células tumorales), pero algunos, como la leucemia, no lo hacen. El término “cáncer” de acuerdo con la invención comprende leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer de recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer adrenal, cáncer de tiroides, cáncer sanguíneo, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer cervical, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oídos, nariz y garganta (ENT), cáncer de mama cáncer, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y sus metástasis. Sus ejemplos son carcinomas de pulmón, carcinomas de mamas, carcinomas de próstata, carcinomas de colon, carcinomas de células renales, carcinomas cervicales o metástasis de los tipos de cáncer o tumores descritos anteriormente. El término cáncer de acuerdo con la invención también comprende metástasis de cáncer.

Los ejemplos de cánceres tratables con la composición farmacéutica descrita en la presente incluyen melanoma maligno, todos los tipos de carcinoma (carcinoma de colon, células renales, vejiga, próstata, pulmón de células no pequeñas y células pequeñas, etc.), linfomas, sarcomas, blastomas, gliomas, etc.

El melanoma maligno es un tipo grave de cáncer de piel. Se debe al crecimiento descontrolado de las células pigmentarias, llamadas melanocitos.

De acuerdo con la invención, un “carcinoma” es un tumor maligno derivado de células epiteliales. Este grupo representa los cánceres más comunes, que incluyen las formas comunes de cáncer de mama, próstata, pulmón y colon.

El linfoma y la leucemia son tumores malignos derivados de células hematopoyéticas (formadoras de sangre).

Un sarcoma es un cáncer que proviene de las células transformadas en uno de los diversos tejidos que se desarrollan a partir del mesodermo embrionario. Por lo tanto, los sarcomas incluyen tumores de hueso, cartílago, grasa, músculo, vascular y tejidos hematopoyéticos.

El tumor blástico o blastoma es un tumor (usualmente maligno) que se asemeja a un tejido inmaduro o embrionario. Muchos de estos tumores son más comunes en los niños.

Un glioma es un tipo de tumor que comienza en el cerebro o columna vertebral. Se llama glioma porque proviene de las células gliales.

El sitio más común de los gliomas es el cerebro.

Por “metástasis” se entiende la diseminación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para ingresar a la cavidad y los vasos del cuerpo, y luego, después de ser transportados por la sangre, de la infiltración de los órganos blanco. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor, es decir, un tumor secundario o tumor metastásico, en el sitio blanco depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario debido a que las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar el potencial metastásico. En una forma de realización, el término “metástasis” de acuerdo con la invención se refiere a “metástasis a distancia” que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales.

Los ejemplos de enfermedades infecciosas tratables con las composiciones farmacéuticas descritas en la presente incluyen enfermedades infecciosas virales, tales como SIDA (VIH), hepatitis A, B o C, herpes, herpes zoster (viruela), sarampión alemán (virus de la rubéola), fiebre amarilla, dengue, etc. flavivirus, virus de la gripe, enfermedades infecciosas hemorrágicas (virus de Marburg o Ébola), enfermedades infecciosas bacterianas, tales como la enfermedad del legionario (*Legionella*), úlcera gástrica (*Helicobacter*), cólera (*Vibrio*), infecciones por *E. coli*, *Staphylococci*, *Salmonella* o *Streptococci* (tétanos); infecciones por patógenos protozoarios, tales como malaria, enfermedad del sueño, leishmaniasis; toxoplasmosis, es decir, infecciones por *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Toxoplasma*; o infecciones fúngicas, que son causadas por ejemplo, por *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* o *Candida albicans*).

Por “tratar” se entiende la administración de un compuesto o composición como se describe en la presente en un sujeto para prevenir o eliminar una enfermedad, que incluye la reducción del tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto; detener o retardar una enfermedad en un sujeto; inhibir o retardar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto; disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas y/o recurrencias en un sujeto que actualmente tiene actualmente o que previamente ha tenido una enfermedad; y/o prolongar, es decir, aumentar la vida del sujeto. En particular, el término “tratamiento de una enfermedad” incluye curar, acortar la duración, mejorar,

prevenir, desacelerar o inhibir la progresión o empeorar, o prevenir o retrasar la aparición de una enfermedad o sus síntomas.

5 El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento que involucra la activación de una respuesta inmune específica y/o una función efectora inmune. La inmunoterapia se puede realizar usando cualquiera de una variedad de técnicas, en las que los agentes proporcionados en la presente funcionan para eliminar las células que expresan antígenos de un paciente. Tal eliminación puede tener lugar como resultado de la mejora o inducción de una respuesta inmune y/o función efectora inmune en un paciente específico para un antígeno o una célula que expresa un antígeno.

10 En el contexto de la presente invención, los términos tales como "proteger", "prevenir", "profiláctico", "preventivo" o "protector" se refieren a la prevención o tratamiento, o ambos, de la aparición y/o propagación de una enfermedad en un sujeto y, en particular, para minimizar la posibilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad o retrasar el desarrollo de una enfermedad. Por ejemplo, una persona con riesgo de cáncer puede ser una candidata a una terapia para prevenir el cáncer.

15 Una administración profiláctica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración profiláctica de la composición de la invención, con preferencia protege al receptor del desarrollo de una enfermedad. Una administración terapéutica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración terapéutica de la composición de la invención, puede llevar a la inhibición del progreso/crecimiento de la enfermedad. Esto comprende la desaceleración del progreso/crecimiento de la enfermedad, en particular una interrupción de la progresión de la enfermedad, que con preferencia conduce a la eliminación de la enfermedad.

20 Por "estar en riesgo" se entiende un sujeto que se identifica por tener una probabilidad más alta de lo normal de desarrollar una enfermedad, en particular el cáncer, en comparación con la población general. Además, un sujeto que ha padecido o tienen actualmente una enfermedad, en particular el cáncer, es un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad, ya que tal sujeto puede continuar desarrollando una enfermedad. Los sujetos que actualmente tienen o han tenido un cáncer también tienen un mayor riesgo de metástasis del cáncer.

25 Los agentes y composiciones proporcionados en la presente se pueden usar solos o en combinación con regímenes terapéuticos convencionales, tales como cirugía, irradiación, quimioterapia y/o trasplante de médula ósea (autólogo, singénico, alogénico o no relacionado).

30 El tratamiento del cáncer representa un campo donde las estrategias de combinación son especialmente deseables, ya que con frecuencia la acción combinada de dos, tres, cuatro o incluso más fármacos/terapias de cáncer genera efectos sinérgicos que son considerablemente más fuertes que el impacto de un enfoque monoterapéutico. Por lo tanto, un tratamiento para el cáncer que utiliza mecanismos basados en inmunidad o vacunación, tales como las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, se pueden combinar efectivamente con varios otros fármacos y/o métodos dirigidos a mecanismos similares u otros específicos. Entre ellos, están por ejemplo, las combinaciones con terapias para tumores convencionales, estrategias multiepítipo, inmunoterapia adicional y enfoques de
35 tratamiento dirigidos a la angiogénesis o apoptosis (para una revisión, por ejemplo, Andersen et al. 2008: Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunology Immunotherapy, 57(11):1735-1743). La administración secuencial de diferentes agentes puede inhibir el crecimiento de células cancerosas en diferentes puntos de control, mientras que otros agentes, por ejemplo, pueden inhibir la neoangiogénesis, la supervivencia de células malignas o metástasis, lo que puede convertir al cáncer en una enfermedad crónica. La siguiente lista proporciona algunos ejemplos no limitativos de fármacos y terapias contra el cáncer que se pueden
40 usar en combinación con la presente invención:

1. Quimioterapia

La quimioterapia es el estándar de atención para múltiples tipos de cáncer. Los agentes quimioterapéuticos más
45 comunes actúan mediante la destrucción de las células que se dividen rápidamente, una de las principales propiedades de las células cancerosas. Por lo tanto, una combinación con fármacos quimioterapéuticos convencionales, tal como, por ejemplo, agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides vegetales, inhibidores de topoisomerasa y otros agentes antitumorales que afectan la división celular o la síntesis de ADN pueden mejorar significativamente los efectos terapéuticos de la presente invención mediante la eliminación de las
50 células supresoras, se reinicia el sistema inmunológico, mediante la producción de células tumorales más susceptibles a la muerte inmunomediada, o mediante la activación adicional de células del sistema inmune. Una acción anticáncer sinérgica de los fármacos quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos basados en la vacunación se ha demostrado en múltiples estudios (véase, por ejemplo, Quoix et al. 2011: Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. Lancet Oncol. 12(12):1125-33.; véase también Liseth et al. 2010: Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience. J Biomed Biotechnol. 2010:6920979; véase también Hirooka et al 2009: A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. Pancreas 38(3):e69-74). Hay cientos de fármacos quimioterapéuticos disponibles que son básicamente adecuados para terapias de combinación. Algunos ejemplos (no limitantes) de
55 fármacos quimioterapéuticos que se pueden combinar con la presente invención son carboplatino (Paraplatin),

cisplatino (Platinol, Platinol-AQ), ciclofosfamida (Cytoxan, Neosar), docetaxel (Taxotere), doxorubicina (Adriamycin), erlotinib (Tarceva), etopósido (VePesid), fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar), mesilato de imatinib (Gleevec), irinotecano (Camptosar), metotrexato (Folex, Mexate, Amethopterin), paclitaxel (Taxol, Abraxane), sorafinib (Nexavar), sunitinib (Sutent), topotecano (Hycamtin), vincristina (Oncovin, Vincasar PFS), y vinblastina (Velban).

5 2. Cirugía

La cirugía del cáncer, una operación para extirpar el tumor, aún es la base del tratamiento del cáncer. La cirugía se puede combinar con otros tratamientos de cáncer para suprimir cualquier célula tumoral restante. La combinación de métodos quirúrgicos con un tratamiento inmunoterapéutico posterior es un enfoque prometedor que se ha demostrado innumerables veces.

10 3. Radiación

La terapia de radiación aún es un componente importante del tratamiento del cáncer, ya que aproximadamente el 50% de todos los pacientes con cáncer reciben terapia de radiación durante el curso de su enfermedad. El objetivo principal de la terapia de radiación es privar a las células cancerosas de su potencial de multiplicación (división celular). Los tipos de radiación utilizados para tratar el cáncer son la radiación de fotones (rayos X y rayos gamma) y radiaciones de partículas (haces de electrones, protones y neutrones). Hay dos formas de administrar la radiación al lugar del cáncer. La radiación de haz externo se administra desde el exterior del cuerpo al dirigir los rayos de alta energía (radiación de fotones, protones o partículas) al lugar del tumor. La radiación interna o braquiterapia se administran desde el interior del cuerpo mediante fuentes radioactivas, selladas en catéteres o semillas directamente en el sitio del tumor. Las técnicas de la terapia de radiación que son aplicables en combinación con la presente invención son, por ejemplo, fraccionamiento (terapia de radiación administrada en un régimen fraccionado, por ejemplo, fracciones diarias de 1,5 a 3 Gy administradas durante varias semanas), terapia de radiación conformada 3D (3DCRT; administración de radiación al volumen del tumor macroscópico), terapia de radiación de intensidad modulada (IMRT; modulación de intensidad controlada por computadora de haces de radiación múltiples), terapia de radiación guiada por imagen (IGRT; una técnica que comprende imágenes previa a la terapia de radiación que permite la corrección), y terapia de radiación estereotáctica corporal (SRBT, administra dosis individuales muy altas de radiación solo a una pocas fracciones de tratamiento). Para una revisión de terapia de radiación, véase Baskar et al. 2012: Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J Med Sci.* 9(3):193-199.

4. Anticuerpos

Los anticuerpos (con preferencia anticuerpos monoclonales) logran su efecto terapéutico contra las células cancerosas a través de diversos mecanismos. Pueden tener efectos directos en la producción de apoptosis o muerte celular programada. Pueden bloquear componentes de las vías de transducción de señales, tales como, por ejemplo, receptores del factor de crecimiento, que detienen efectivamente la proliferación de células tumorales. En las células que expresan anticuerpos monoclonales, pueden provocar la formación de anticuerpos anti-idiotipo. Los efectos indirectos incluyen el reclutamiento de células que tienen citotoxicidad, tal como monocitos y macrófagos. Este tipo de muerte celular mediada por anticuerpos se denomina citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos también se unen al complemento, lo que lleva a una toxicidad celular directa, conocida como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La combinación de métodos quirúrgicos con fármacos o métodos inmunoterapéuticos es un enfoque exitoso, como por ejemplo, se demuestra en Gadri et al. 2009: Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. *J Immunother.* 32(4):333-40. La siguiente lista proporciona algunos ejemplos no limitantes de anticuerpos anticáncer y potenciales blancos de anticuerpos (entre paréntesis) que se pueden usar en combinación con la presente invención: Abagovomab (CA-125), Abciximab (CD41), Adecatumumab (EpCAM), Afutuzumab (CD20), Alacizumab pegol (VEGFR2), pentetato de Altumomab (CEA), Amatuximab (MORAb-009), Anatumomab mafenatox (TAG-72), Apolizumab (HLA-DR), Arcitumomab (CEA), Bavituximab (phosphatidylserine), Bectumomab (CD22), Belimumab (BAFF), Bevacizumab (VEGF-A), Bivatuzumab mertansina (CD44 v6), Blinatumomab (CD19), Brentuximab vedotin (CD30 TNFRSF8), Cantuzumab mertansina (mucina CanAg), Cantuzumab ravtansina (MUC1), Capromab pendetide (células de carcinoma prostático), Carlumab (CNT0888), Catumaxomab (EpCAM, CD3), Cetuximab (EGFR), Citatuzumab bogatox (EpCAM), Cixutumumab (receptor de IGF-1), Claudiximab (Claudin), Clivatuzumab tetraxetano (MUC1), Conatumumab (TFJAIL-R2), Dacetuzumab (CD40), Dalotuzumab (receptor del factor de crecimiento tipo insulina I), Denosumab (FtANKL), Detumomab (células de linfoma B) Drozitumab (DR5), Ecomeximab (GD3 gangliósido), Edrecolomab (EpCAM), Elotuzumab (SLAMF7), Enavatuzumab (PDL192), Ensituximab (NPC-1C), Epratuzumab (CD22), Ertumaxomab (HER2/neu, CD3), Etaracizumab (integrina avp3), Farletuzumab (receptor de folato 1), FBTA05 (CD20), Ficlatuzumab (SCH 900105), Figitumumab (IGF-1 receptor), Flanvotumab (glicoproteína 75), Fresolimumab (TGF- β), Galiximab (CD80), Ganitumab (IGF-I), Gemtuzumab ozogamicin (CD33), Gevokizumab (IL-1 β), Girentuximab (anhidrasa carbónica 9 (CA-IX)), Glebatumumab vedotin (GPNMB), Ibritumomab tiuxetan (CD20), Icrucumab (VEGFR-1), Igovoma (CA-125), Indatuximab ravtansina (SDC1), Intetumumab (CD51), Inotuzumab ozogamicina (CD22), Ipilimumab (CD152), Iratumumab (CD30), Labetuzumab (CEA), Lexatumumab (TFJAIL-R2), Libivirumab (antígeno de superficie B de hepatitis), Lintuzumab (CD33), Lrvotuzumab mertansina (CD56), Lucatumumab (CD40), Lumiliximab (CD23), Mapatumumab (TRAIL-R1), Matuzumab (EGFR), Mepolizumab (IL-5), Milatuzumab (CD74), Mitumomab (GD3 ganglioside), Mogamulizumab (CCR4), Moxetumomab pasudotox (CD22), Nacolomab tafenatox (antígeno C242), Naptumomab estafenatox (5T4),

Namatumab (RON), Necitumumab (EGFR), Nimotuzumab (EGFR), Nivolumab (IgG4), Ofatumumab (CD20), Olaratumab (PDGF-R α), Onartuzumab (receptor quinasa del factor scatter humano), Oportuzumab monatox (EpCAM), Oregovomab (CA-125), Oxelumab (OX-40), Panitumumab (EGFR), Patritumab (HER3), Pentumoma (MUC1), Pertuzuma (HER2/neu), Pintumomab (antígeno de adenocarcinoma), Pritumumab (vimentina),
 5 Racotumomab (ácido N-glicolilneuramínico), Radretumab (dominio B extra-fibronectina), Rafivirumab (glicoproteína del virus de la rabia), Ramucirumab (VEGFR2), Rilotumumab (HGF), Rituximab (CD20), Robatumumab (receptor IGF-1), Samalizumab (CD200), Sibrotuzumab (FAP), Siltuximab (IL-6), Tabalumab (BAFF), Tacatumumab tetraxetan (alfa-fetoproteína), Taplitumomab paptox (CD19), Tenatumomab (tenascina C), Teprotumumab (CD221),
 10 Ticilimumab (CTLA-4), Tigatuzumab (TRAIL-R2), TNX-650 (IL-13), Tositumomab (CD20), Trastuzumab (HER2/neu), TRBS07 (GD2), Tremelimumab (CTLA-4), Tucotuzumab celmoleuquina (EpCAM), Ublituximab (MS4A1), Urelumab (4-1BB), Volociximab (integrina $\alpha 5\beta 1$), Votumumab (antígeno tumoral CTAA16,88), Zalutumumab (EGFR), Zanolimumab (CD4).

5. Citoquinas, quimioquinas, moléculas coestimuladoras, proteínas de fusión

Otra forma de realización de la presente invención es el uso combinado de las composiciones farmacéuticas codificadoras de antígenos de la presente invención con citoquinas, quimioquinas, moléculas coestimuladoras y/o proteínas de fusión de estas para provocar una modulación inmune beneficiosa o efectos inhibidores de tumores. Con el fin de aumentar la infiltración de células inmunes en el tumor y facilitar el movimiento de las células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos que drenan el tumor, se pueden usar varias quimioquinas con estructuras de C, CC, CXC y CX3C. Algunas de las quimioquinas más prometedoras son, por ejemplo, CCR7 y sus ligandos CCL19 y CCL21, además de CCL2, CCL3, CCL5 y CCL16. Otros ejemplos son CXCR4, CXCR7 y CXCL12. Además, las moléculas coestimuladoras o reguladoras, tales como, por ejemplo, ligandos B7 (B7.1 y B7.2) son útiles. También son útiles otras citoquinas tales como por ejemplo, interleuquinas especialmente (por ejemplo, IL-1 a IL17), interferones (por ejemplo, IFNalfa1 a IFNalfa8, IFNalfa10, IFNalfa13, IFNalfa14, IFNalfa16, IFNalfa17, IFNalfa21, IFNbeta1, IFNW, IFNE1 e IFNK), IFNalfa a IFNalfa8, IFNalfa 10, IFNalfa3, IFNalfa16, IFNW, IFNW, IFNW, IFNW, IFN1, IFNlpha17). Factores hematopoyéticos, TGF (por ejemplo, TGF- α , TGF- β , y otros miembros de la familia TGF), finalmente miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral y sus ligandos, así como otras moléculas estimuladoras, que comprenden, pero sin limitación, 41BB, 41BB-L, CD137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT.beta.R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fn14, Troy/Trade, TAJ, TNFR2, HVEM, CD27, CD30, CD40,4-1 BB, OX40, GITR, GITRL, TACI, BAFF-R, BCMA, RELT, y CD95 (Fas/APO-1)), proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides, proteína mediadora de la apoptosis relacionada con el receptor TNF (TRAMP) y el receptor 6 de muerte (DR6). Especialmente CD40/CD40L y OX40/OX40L son objetivos importantes para la inmunoterapia combinada debido a su impacto directo en la supervivencia y proliferación de células T. Para una revisión ver Lechner et al. 2011: Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340.

6. Tratamientos bacterianos

Los investigadores han estado usando bacterias anaeróbicas, tales como Clostridium novyi, para consumir el interior de tumores pobres en oxígeno. Estas deben morir cuando entran en contacto con los lados oxigenados del tumor, lo que significa que serían inofensivas para el resto del cuerpo. Otra estrategia es usar bacterias anaeróbicas que se han transformado con una enzima que puede convertir un profármaco no tóxico en un fármaco tóxico. Con la proliferación de las bacterias en las áreas necróticas e hipóxicas del tumor, la enzima se expresa únicamente en el tumor. Por lo tanto, un profármaco aplicado sistémicamente se metaboliza al fármaco tóxico solo en el tumor. Se ha demostrado que esto es eficaz con el anaerobio no patógeno Clostridium sporogenes.

7. Inhibidores de quinasa

Otro gran grupo de objetivos potenciales para la terapia complementaria del cáncer comprende inhibidores de quinasa, debido a que el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas está estrechamente interconectado con la desregulación de la actividad de quinasa. Para restaurar la actividad normal de la quinasa y, por lo tanto, reducir el crecimiento del tumor, se utiliza una amplia variedad de inhibidores. El grupo de quinasas dirigidas comprende receptores tirosina quinasas, por ejemplo, BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/ErbB2, IGF-IR, PDGFR- α , PDGFR-p, c-Kit, Flt-4, Flt3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c-Met, RON, c-Ret, ALK, tirosina quinasas citoplasmáticas, por ejemplo, c-SRC, c-YES, Abl, JAK-2, serina/treonina quinasas por ejemplo ATM, Aurora A & B, CDKs, mTOR, PKC α , PLKs, b-Raf, S6K, STK11/LKB1 y lípido quinasas, por ejemplo PI3K, SKI. Los inhibidores de quinasas de moléculas pequeñas son, por ejemplo, PHA-739358, Nilotinib, Dasatinib y PD166326, NSC 743411, Lapatinib (GW-572016), Canertinib (CI-1033), Semaxinib (SU5416), Vatalanib (PTK787/ZK222584), Sutent (SU11248), Sorafenib (BAY 43-9006) y Leflunomida (SU101). Para obtener más información, ver, por ejemplo, Zhang et al. 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer 9, 28-39.

8. Receptores tipo Toll

Los miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR) son un enlace importante entre la inmunidad innata y adaptativa y el efecto de muchos adyuvantes se basa en la activación de los TLR. Un gran número de vacunas

establecidas contra el cáncer incorporan ligandos para los TLR para reforzar las respuestas de las vacunas. Además de TLR2, TLR3, TLR4 especialmente TLR7 y TLR 8 se han examinado para la terapia del cáncer en los enfoques de inmunoterapia pasiva. El TLR7 y TLR8 estrechamente relacionado contribuyen a las respuestas antitumorales al afectar las células inmunes, células tumorales y microentorno del tumor y pueden activarse por estructuras análogas de nucleósidos. Todos los TLR se han utilizado como inmunoterapéuticos independientes o adyuvantes de vacunas de cáncer y se pueden combinar sinérgicamente con las formulaciones descritas en la presente. Para más información ver van Duin et al. 2005:Triggering TLR signaling in vaccination. Trends in Immunology, 27(1):49-55.

9. Inhibidores de angiogénesis

Además de las terapias dirigidas a los receptores inmunomoduladores afectados por los mecanismos de escape mediados por tumores y la supresión inmunitaria, existen terapias dirigidas al entorno tumoral. Los inhibidores de la angiogénesis evitan el crecimiento extenso de los vasos sanguíneos (angiogénesis) que los tumores requieren para sobrevivir. La angiogénesis promovida por las células tumorales para cumplir sus crecientes demandas de nutrientes y oxígeno, por ejemplo, se puede bloquear mediante el direccionamiento de diferentes moléculas. Los ejemplos no limitantes de moléculas mediadoras de la angiogénesis o inhibidores de angiogénesis que se pueden combinar con la presente invención son VEGF soluble (isoformas VEGF121 y VEGF165 de VEGF, receptores VEGFR1, VEGFR2 y correceptores Neuropilina-1 y Neuropilina-2) 1 y NRP-1, angiopoyetina 2, TSP-1 y TSP-2, angiostatina y moléculas relacionadas, endostatina, vasostatina, calreticulina, factor plaquetario 4, TIMP y CD41, Met-1 y Met-2, IFN- α , - β y - γ , CXCL10, IL-4, -12 y -18, protrombina (dominio kringle 2), fragmento de antitrombina III, prolactina, VEG1, SPARC, osteopontina, maspin, canstatina, proteína relacionada con proliferina, restina y fármacos como por ejemplo, bevacizumab, itraconazol, carboxiamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN- α , factor plaquetario-4, suramina, SU5416, trombospondina, antagonistas de VEGFR, esteroides angiostáticos + heparina, factor inhibitorio de angiogénesis derivado de cartílago, inhibidores de la metaloproteínasa de matriz, 2-metoxiestradiol, tecogalan, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina, inhibidores prolactina Vp3, linomida, tasquinimod. Para revisión ver Schoenfeld and Dranoff 2011:Anti-angiogenesis immunotherapy. Hum Vaccin. (9):976-81.

10. Fármacos para terapia dirigida de molécula pequeña

Los fármacos para terapia dirigida de molécula pequeña son generalmente inhibidores de los dominios enzimáticos en proteínas mutadas, sobreexpresadas o de otro modo críticas dentro de la célula cancerosa. Los ejemplos prominentes y no limitantes son los inhibidores de la tirosina quinasa imatinib (Gleevec/Glivec) y gefitinib (Iressa). El uso de moléculas pequeñas, por ejemplo, malato de sunitinib y/o tosilato de sorafenib dirigidos a algunas quinasas en combinación con vacunas para la terapia del cáncer también se describen en la solicitud de patente anterior US2009004213.

11. Vacunas a base virus

Hay varias vacunas contra el cáncer a base de virus disponibles o en desarrollo que se pueden usar en un enfoque terapéutico combinado junto con las formulaciones descritas en la presente. Una ventaja del uso de tales vectores virales es su capacidad intrínseca para iniciar respuestas inmunes, con reacciones inflamatorias que se producen como resultado de la infección viral que crea la señal de peligro necesaria para la activación inmune. Un vector viral ideal debe ser seguro y no debe introducir una respuesta inmune anti-vector para permitir el refuerzo de respuestas específicas antitumorales. Los virus recombinantes, tales como los virus vacuna, virus de herpes simple, adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus y virus avipox se han utilizado en modelos de tumores animales y, sobre la base de sus resultados alentadores, se han iniciado ensayos clínicos en seres humanos. Las vacunas a base de virus especialmente importantes son partículas tipo virus (VLP), pequeñas partículas que contienen ciertas proteínas de la capa externa de un virus. Las partículas tipo virus no contienen ningún material genético del virus y no pueden causar una infección, pero se pueden construir para presentar antígenos tumorales en su cubierta. Las VLP se pueden derivar de varios virus, tales como por ejemplo, el virus de hepatitis B u otras familias de virus, que incluyen Parvoviridae (por ejemplo, virus adenoasociados), Retroviridae (por ejemplo, VIH) y Flaviviridae (por ejemplo, virus de hepatitis C). Para una revisión general, véase Sorensen and Thompsen 2007:Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going? APMIS 115(11):1177-93; las partículas tipo virus contra el cáncer se revisan en Buonaguro et al. 2011:Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83; y en Guillen et al. 2010: Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants:application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Procedia in Vaccinology 2 (2), 128-133.

12. Estrategias multiepitopo

El uso de epítomos múltiples muestra resultados prometedores para la vacunación. Las tecnologías de secuenciación rápida combinadas con sistemas de algoritmos inteligentes permiten el aprovechamiento del mutanoma tumoral y pueden proporcionar múltiples epítomos para vacunas individualizadas que se pueden combinar con la presente invención. Para obtener más información, véase 2007: Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. J Immunother30:762-772; furthermore Castle et al. 2012:Exploiting the mutanomefor tumor vaccination. Cancer Res 72 (5):1081-91.

13. Transferencia de células T adoptiva

Por ejemplo, una combinación de una vacuna antigénica tumoral y la transferencia de células T se describe en: Rapoport et al. 2011: Rapoport et al. 2011: Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. Blood 117(3):788-97.

5 14. Terapias para blanco basado en péptidos

Los péptidos se pueden unir a los receptores de la superficie celular o a la matriz extracelular afectada que rodea el tumor. Los radionucleidos que se unen a estos péptidos (por ejemplo, RGD) finalmente destruyen la célula cancerosa si el nucleído decae en la vecindad de la célula. Especialmente los oligos o multímeros de estos motivos de unión son de gran interés, ya que esto puede llevar a una mayor especificidad y avidéz del tumor. Para ejemplos no limitantes ver Yamada 2011: Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. Nihon Rinsho 69(9):1657-61.

15. Otras terapias

Hay numerosas otras terapias de cáncer que se pueden combinar con las formulaciones de la presente invención para crear efectos sinérgicos. Los ejemplos no limitantes son los tratamientos dirigidos a la apoptosis, hipertermia, terapia hormonal, terapia de telomerasa, terapia de potenciación de insulina, terapia génica y terapia fotodinámica.

El término "inmunización" o "vacunación" describe el proceso de tratamiento de un sujeto por razones terapéuticas o profilácticas.

El término "sujeto" se refiere a los mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente invención son seres humanos, primates no humanos, animales domésticos tales como perros, gatos, ovejas, vacas, cabras, cerdos, caballos, etc., animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayos, etc., así como animales en cautiverio tales como animales de zoológico. El término "animal" como se usa en la presente también incluye a los seres humanos.

El término "autólogo" se utiliza para describir cualquier cosa que se derive del mismo sujeto. Por ejemplo, "trasplante autólogo" se refiere a un trasplante de tejido u órganos derivados del mismo sujeto. Dichos procedimientos son ventajosos porque superan la barrera inmunológica que de otro modo da como resultado el rechazo.

El término "heterólogo" se utiliza para describir algo que consiste en múltiples elementos diferentes. Como ejemplo, la transferencia de la médula ósea de un individuo a un individuo diferente constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta del sujeto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención con preferencia son estériles y contienen una cantidad efectiva de las nanopartículas descritas en la presente y, opcionalmente, de otros agentes descritos en la presente para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar junto con sustancias que aumentan la inmunidad complementarias, tal como uno o más adyuvantes, y puede comprender una o más sustancias que aumentan la inmunidad para aumentar aún más su efectividad, con preferencia para lograr un efecto sinérgico de la inmunoestimulación. El término "adyuvante" se refiere a compuestos que prolongan o potencian o aceleran una respuesta inmune. Varios mecanismos son posibles a este respecto, de acuerdo con los diversos tipos de adyuvantes. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de DC, por ejemplo, lipopolisacáridos o el ligando CD40 forman una primera clase de adyuvantes adecuados. En general, cualquier agente que influye en el sistema inmunológico del tipo de una "señal de peligro" (LPS, GP96, ARN sd etc.) o citoquinas, tal como GM-CSF, se puede usar como un adyuvante que permite intensificar y/o influenciar de manera controlada una respuesta inmune. Los oligodesoxinucleótidos CpG también se pueden usar opcionalmente en este contexto, aunque se deben considerar los efectos secundarios que se producen en ciertas circunstancias, como se explicó anteriormente. Los adyuvantes particularmente preferidos son citoquinas, tales como monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF- α , INF- γ , GM-CSF, LT- α , o factores de crecimiento, por ejemplo, hGH. Otros adyuvantes conocidos son hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund o aceite tal como Montanide®, el más preferido es Montanide® ISA51. Los lipopéptidos, tales como Pam3Cys, también son adecuados para uso como adyuvantes en la composición farmacéutica de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan usualmente en una forma de dosis uniforme y se pueden preparar de una manera conocida per se. La composición farmacéutica de la invención por ejemplo, puede estar en forma de solución o suspensión.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender sales, sustancias tamponantes, conservantes, portadores, diluyentes y/o excipientes, todos los cuales son con preferencia farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

- 5 Las sales que no son farmacéuticamente aceptables se pueden usar para preparar sales farmacéuticamente aceptables y están incluidas en la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables de este tipo comprenden de manera no limitante las preparadas a partir de los siguientes ácidos: ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden preparar como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.
- 10 Las sustancias reguladoras adecuadas para usar en la composición farmacéutica de la invención incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.
- Los conservantes adecuados para uso en la composición farmacéutica de la invención incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.
- Una formulación inyectable puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como lactato de Ringer.
- 15 El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en donde el componente activo se combina para facilitar, mejorar o permitir la aplicación. De acuerdo con la invención, el término "portador" también incluye uno o más rellenos, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para la administración a un paciente.
- Las posibles sustancias portadoras para la administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución estéril de cloruro de sodio, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de láctido biocompatibles, copolímeros de láctido/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.
- 20 El término "excipiente" cuando se usa en la presente se considera que indica todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica de la presente invención y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, portadores, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, reguladores, agentes aromatizantes o colorantes.
- 25 Los agentes y composiciones descritos en la presente se pueden administrar por cualquier vía convencional, tal como por administración parenteral, incluso mediante inyección o infusión. La administración es con preferencia parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.
- La expresión "administración parenteral" se refiere a la administración de una manera que no sea a través del tracto digestivo, como por inyección intravenosa o intramuscular. La administración sistémica es una vía de administración que es enteral, es decir, la administración que implica la absorción a través del tracto gastrointestinal o parenteral.
- 30 Las composiciones adecuadas para administración parenteral generalmente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo, que es con preferencia isotónica a la sangre del receptor. Los ejemplos de portadores y disolventes compatibles son la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, generalmente se utilizan aceites fijos estériles como medio de solución o suspensión.
- 35 Los agentes y composiciones descritos en la presente se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con otras dosis. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o una afección particular, la reacción deseada con preferencia se relaciona con la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende lentificar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser retrasar la aparición o una prevención del inicio de dicha enfermedad o dicha afección.
- 40 La cantidad efectiva de un agente o composición descrita en la presente dependerá de la afección para tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, que incluyen edad, condición fisiológica, tamaño y peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia acompañante (si está presente), la vía de administración específica y factores similares. Por consiguiente, las dosis administradas de los agentes descritos en la presente pueden depender de varios de tales parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden usar dosis más altas (o dosis efectivamente más altas logradas por una vía de administración diferente, más localizada).
- 45 La presente invención se describe en detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos, que se utilizan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Debido a la descripción y los ejemplos, las formas de realización adicionales que están incluidas igualmente en la invención son accesibles para el experto.
- 50 El tema descrito en las figuras y ejemplos que no está cubierto por las reivindicaciones se describe sólo con fines comparativos.

FIGURAS

Figura 1: Tamaño de los lipoplexos F4/ARN en diferentes relaciones de carga DOTMA/ARN (2/1, 1/1, 1/2, 1/4) en

agua (a), PBS (b) y en PBS después de la adición de CaCl_2 2,2 mM (c) y CaCl_2 (d) 22 mM.

Figura 2: Tamaños de partícula de los liposomas DOTMA/Chol (F5) y lipoplexos en diferentes relaciones de regulador y carga de DOTMA /ARN 1/1 y 2/1 (exceso positivo).

5 Figura 3: Tamaño medio de lipoplexos F5/ARN en relaciones de carga (1/1) y (1/2) después de la compactación del ARN utilizando diferentes cantidades de CaCl_2 .

Figura 4: Panorama general de los resultados seleccionados de la caracterización fisicoquímica de lipoplexos de ARN con liposomas DOTMA/DOPE. El eje x proporciona la relación de carga entre DOTMA y ARN. Parte superior:tamaño de partícula a partir de mediciones, PCS, medio:índice de polidispersión, parte inferior:potenciales zeta de las mismas formulaciones. Las líneas se han introducido para guiar el ojo.

10 Figura 5: (a) Tamaño medio de los lipoplexos F4/Luc-ARN en la relación de carga (1/2) en agua y después de la adición de regulador concentrado a PBS (1x), cloruro de sodio (150 mM), glucosa (5%) o glucosa regulador de fosfato. En contraste con la relación 1/1, que conduce a la agregación en todas las condiciones del regulador (no se muestra en la presente), los tamaños de partícula de los lipoplexos en la relación 1/2 fueron de aproximadamente 220 nm. (b) La polidispersión de tamaño varió de 0,23 a 0,34, lo que indica estabilidad coloidal.

15 Figura 6: (a) Tamaño medio de los lipoplexos F4 /ARN en relaciones de carga DOTMA/ARN seleccionadas. Los tamaños de partícula de lipoplexos con relaciones de carga entre 1:1,8 y 1:1,4 fueron de aproximadamente 160 nm. Con un exceso negativo decreciente (relación de carga 1:1,2), el tamaño de partícula se determinó a 183 nm. (b) Todas las relaciones de carga analizadas llevan a lipoplexos con índices de polidispersidad pequeños menores a 0,2.

20 Figura 7: a) Tamaño medio de los liposomas DOTMA/DOPE (1:2) en agua sin extrusión (F4-bruto), después de la extrusión usando una membrana de policarbonato con un diámetro de poro de 400 nm (F4-400), 200 nm (F4-200), 100 nm (F4-100) o 50 nm (F4-50). Los lipoplexos correspondientes con una relación de carga DOTMA/ARN de 1/2 en agua (2:) y en regulador PBS (3:). (b) La polidispersidad del tamaño de los lipoplexos con liposomas extrudidos varió de 0,10 a 0,28. Sin embargo, los lipoplexos formados por liposomas no extrudidos también mostraron una distribución de tamaño suficientemente estrecha.

25

Figura 8: El tamaño medio (a) y el índice de polidispersidad (b) de los liposomas DOTMA/DOPE (F4) se determinaron antes de la liofilización y después de la liofilización y reconstitución con agua.

Figura 9: Tamaño de partícula de liposomas con diferentes relaciones DOTMA/DOPE. Para los liposomas con una fracción alta de DOPE (90%), las partículas son inestables en PBS y en agregados.

30 Figura 10: Tamaño de partícula de lipoplexos con liposomas que comprenden diferentes relaciones de DOTMA/DOPE. Con la relación DOTMA/DOPE de 9/1 a 4/6, los lipoplexos tienen tamaños de partícula definidos (<300 nm) con valores de PI bajos (<0,2). Con una fracción de DOPE más alta, se obtienen tamaños de partículas más grandes con valores de PI altos.

35 Figura 11: Actividades de luciferasa in vivo y ex vivo después de la inyección en ratones BALB/c de luciferasa-ARN (20 μg , g) complejo con diferentes cantidades de liposomas F4 para producir relaciones F4:ARN de 4,8:1,2,4:1, 1,2:1, 1,2:2, 1,2:4.

Figura 12: Distribución de la señal de luciferasa total entre los órganos derivados del experimento descrito en la Figura 11.

40 Figura 13: Actividades de luciferasa in vivo y ex vivo después de la inyección en ratones BALB/c de luciferasa-ARN (20 μg , g) complejo con liposomas F11 o F12.

Figura 14: Actividades de luciferasa in vivo y ex vivo después de la inyección en ratones BALB/c de luciferasa-ARN (20 μg , g) complejo con liposomas F2 o F5.

45 Figura 15: Cuantificación de las actividades de luciferasa en los bazo de ratones después de la inyección de luciferasa-ARN (20 μg , g) diluido en 1X PBS (A) o no diluido en agua (B y C) complejo con liposomas F4 diluido en 1X PBS (B) o no diluido en agua (A y C) con una relación F4:ARN de 1,2:2. Las concentraciones de PBS finales de todos los complejos se ajustaron a 1X PBS.

Figura 16: Cuantificación de las actividades de luciferasa en los bazo de ratones después de la inyección de luciferasa-ARN (20 μg , g) precomplejado con 0,125 o CaCl_2 1 mM o sin precomplejación con liposomas F4 con una relación de F4:ARN de 1,2:2.

50 Figura 17: Cuantificación de las actividades de luciferasa en los bazo de ratones después de la inyección de luciferasa-ARN (20 μg , g) o liposomas F4 diluidos en 1X PBS o NaCl 154 mM y mezclado con una relación de F4:ARN de 1,2:2.

- Figura 18: Cuantificación de las actividades de luciferasa en los bazos de ratones después de la inyección de luciferasa-ARN (20 µg, g) precomplejado con 1-4 mM CaCl₂ y mezclado con liposomas F4 con una relación de F4:ARN de 1,2:2 usando NaCl 154 mM en vez de 1X PBS como regulador de dilución.
- 5 Figura 19:(A) La luciferasa-ARN (5 µg) se incubó en 25 o 50% de suero de ratón durante 30 minutos y luego se sometió a electroporación en DC inmaduras derivadas de monocitos humanos. La actividad de la luciferasa se evaluó 18 h más tarde a través del ensayo de luciferasa in vitro estándar. (B) Luciferasa-ARN (20 µg) se complejó mediante un protocolo estándar con liposomas F4 con una relación F4:ARN de 1,2:2 y luego se incubó en presencia o ausencia de suero de ratón 50% durante 30 min. Se inyectaron ratones BALB/c por vía intravenosa con estas formulaciones y las actividades de luciferasa in vivo se cuantificaron a partir de bazos de ratones.
- 10 Figura 20: Evaluación de la captación de Cy5-ARN o F4-rho por las poblaciones celulares en el bazo después de la inyección en ratones BALB/c de Cy5-ARN (40 µg) complejados con liposomas F4 marcados con rodamina (F4-rho) (1,2:2; Liposoma:ARN).
- Figura 21: Evaluación del estado de maduración (A) de las células dendríticas (revelado por regulación por aumento de CD86 y CD40) y (B) concentraciones en suero de IFNα y TNFα después de la inyección en ratones C57BL/6 de HA-ARN (40 µg) complejados con F4 (1,2:2; Liposoma:ARN), F4 solo o PBS (como control).
- 15 Figura 22: Evaluación de las frecuencias (A) de las células T CD8+ específicas de antígeno y (B) las respuestas de recuperación de la memoria después de la inmunización de ratones C57BL/6 con SIINFEKL-ARN (20 o 40 µg) complejados con liposomas F4 en diferentes relaciones liposoma:ARN.
- Figura 23: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones C57BL/6 que recibieron tres inmunizaciones intravenosas de SIIN-FEKL-ARN (40 µg) complejadas con liposomas F4 con una relación de F4:ARN de 1,2:2 o se dejaron sin tratar y se inyectaron 2x10⁵ células tumorales B 16-OVA sc en los flancos.
- 20 Figura 24: Crecimiento tumoral individual después de la inoculación s.c. de 2x10⁵ células tumorales B16-OVA en los flancos de ratones C57/B16 que recibieron siete inmunizaciones intravenosas de SIINFEKL-ARN (40 µg) complejadas con liposomas F4 o F12 con una relación de F4:ARN de 1,2:2. Se utilizaron liposomas solos sin SIINFEKL-ARN como tratamiento de control.
- 25 Figura 25: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier después de inoculación s.c. de 2x10⁵ células tumorales B16-OVA en los flancos de ratones C57/B16 que recibieron siete inmunizaciones intravenosas de SIINFEKL-ARN (40 µg) complejadas con liposomas F4 o F12 con una relación de F4:ARN de 1,2:2. Se utilizaron liposomas solos sin SIINFEKL-ARN como tratamiento de control.
- 30 Figura 26: Actividades de luciferasa in vivo y ex vivo después de la inyección en ratones BALB/c de luciferasa-ARN (20 µg) complejadas con diferentes cantidades de liposomas F5 para producir relaciones F5:ARN de 4,8:1,2,4:1, 1,2:1, 1,2:2, 1,2:4.
- Figura 27: Distribución de la señal de luciferasa total entre los órganos derivados del experimento descrito en la Figura 26.
- 35 Figura 28: Preformulación de ARN y reconstitución de la solución ARN-lipoplexo.
- Figura 29: Resultados de las mediciones de DLS de lipoplexos de ARN reconstituidas de acuerdo con el protocolo de formulación clínica. La diseminada limitada de los tamaños de partícula de lipoplexos recibidos demuestra la robustez del procedimiento de mezcla.
- 40 Figura 30: Tamaño de partícula e índice de polidispersidad de lipoplexos 1:2 de precursores liposomales extrudidos y no extrudidos.
- Figura 31: Actividades de luciferasa in vivo después de la inyección en ratones BALB/c de luciferasa-ARN (20 µg) complejados con liposomas pequeños o grandes en PBS para lograr lipoplexos de tamaño diferente.
- Figura 32: Cuantificación de las actividades de luciferasa en bazos de ratones después de la inyección de lipoplexos de luciferasa-ARN de diferente tamaño. Los lipoplexos de Lager, ensamblados a partir de liposomas más grandes, tienen una mayor actividad, independientemente de la composición lipídica de los liposomas.
- 45 Figura 33: Los lipoplexos formadas mediante el uso de NaCl y regulador PBS en forma concentrada normal y 10X. En este último caso, se añadió un volumen 10 veces menor para obtener la misma concentración final. Todos los lipoplexos tienen aproximadamente el mismo tamaño, pero las de soluciones concentradas son un poco más pequeñas.
- 50 Figura 34: Actividad (expresión de luc) de los lipoplexos medida en la Figura 33. Como tendencia, los lipoplexos de los reguladores no concentrados tienen mayor actividad. El tratamiento con solución salina normal produce la mayor actividad.

Figura 35: Los lipoplexos se formaron después de la adición del NaCl al ARN en diferentes concentraciones. La concentración final de NaCl fue la misma en todos los casos, ya que de las soluciones concentradas se añadieron volúmenes más bajos. Como tendencia, el tamaño del lipoplexos aumenta al disminuir la concentración de la solución de NaCl agregada. Como los lipoplexos más grandes tienen mayor actividad que los más pequeños, se considera que el uso de NaCl 0,9% (150 mM) produce la mejor actividad.

Figura 36: Tamaño (Zave) e índice de polidispersidad (PI), para lipoplexos con diferentes relaciones de mezcla (relaciones DOTMA/nucleótido), directamente después de la reconstitución, y después de 2 h y 24 h.

Figura 37: Resultados de las mediciones de DLS de lipoplexos de ARN con diferentes relaciones de carga probadas in vivo.

Figura 38: Cuantificación de las actividades de luciferasa en bazos de ratones después de la inyección de lipoplexos de ARN de luciferasa de tamaño diferente.

EJEMPLOS

Las técnicas y los métodos utilizados en la presente se describen en la presente o se llevan a cabo de manera conocida per se y como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Todos los métodos, que incluyen el uso de kits y reactivos, se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante, a menos que se indique específicamente.

Ejemplo de referencia 1: Materiales y métodos de preparación de liposomas

La fabricación de liposomas se realizó mediante diferentes protocolos. El "método de la película" o la "inyección de etanol" se usó para la preparación de liposomas. Para el método de la película, los lípidos se disolvieron en cloroformo y se colocaron cantidades apropiadas en un balón. El disolvente orgánico se evaporó en un evaporador rotatorio y la película seca se reconstituyó con agua o solución reguladora/excipientes mediante la agitación suave del matraz. Típicamente, se seleccionó una concentración total de lípidos de 5 mM. Para la inyección de etanol, los lípidos se disolvieron en relaciones molares adecuadas en etanol hasta una concentración total en el rango de 100-400 mM. La solución de etanol se inyectó bajo agitación en agua o la solución acuosa de regulador/excipientes. El tamaño de los liposomas se ajustó mediante extrusión a través de membranas de polycarbonato de diferente tamaño de poro (50-400 nm), y/o se filtraron a través de filtros estériles disponibles comercialmente de 220-450 nm de tamaño de poro, o se usaron filtros para uso clínico con otros tamaños de poro (1 μ m-5 μ m) (Sartorius, Gotinga, Alemania, Millipore, Schwalbach, Alemania).

La concentración final de lípidos en la fase acuosa estaba entre 5 mM y 25 mM. La composición lipídica se controló mediante análisis HPLC. El tamaño de partícula y el potencial zeta se determinaron por dispersión dinámica de la luz.

Formación de lipoplexos

La formación de lipoplexos se realizó mediante diferentes protocolos. El procedimiento detallado se da con los experimentos individuales. Para varios experimentos, se realizó la incubación directa de soluciones de ARN con soluciones de liposomas en agua o en presencia de regulador o excipientes. Los lipoplexos también se pueden formar mediante la mezcla de soluciones lipídicas en etanol con soluciones de ARN en agua o soluciones acuosas de regulador/excipientes. El protocolo de preparación seleccionado dependía de las características de partícula y la aplicación biológica deseadas y se describe con más detalle con los experimentos respectivos.

Mediciones de PCS

Las mediciones del tamaño de partícula y potencial zeta se realizaron en un analizador de potencial zeta de partículas IZ submicrónicas 380 ZLS (PSS Nicomp, Santa Bárbara, CA). El tamaño se determinó mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS) a un ángulo de dispersión de 90° con un tiempo de equilibrio de 2 minutos y tiempos de corrida de 15 minutos. La autocorrelación se realizó mediante el análisis gaussiano de intensidad ponderada, que proporciona información sobre el diámetro medio de la población en masa y el índice de polidispersidad (PI).

Potencial zeta

El potencial zeta se midió en agua usando una intensidad de campo eléctrico de 5 V/cm y una separación de electrodos de 0,4 cm. La movilidad electrostática se convirtió al potencial zeta mediante la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski. Todas las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura de 23 °C.

Fraccionamiento de campo-flujo

Se realizó un FFF de flujo simétrico (AF4) utilizando el sistema Eclipse 3+ equipado con un canal largo (275 mm de longitud) y el detector de dispersión de luz MALS de ángulo triple *miniDA WN TREOS* (Wyatt Technologie, Dernbach, Alemania) usando el siguiente hardware/parámetros:

Membrana: celulosa regenerada 10 kD (*Microdyn Nadir*, Wiesbaden, Alemania)

Espaciador: espaciador de 250 μ m (ancho 21,5 mm)

Disolvente: 10 mM de NaNO₃

Flujo del detector: 1,0 mL/min

5 Flujo del foco: 1,5 mL/min

Flujo de inyección: 0,2 mL/min

Gradiente de flujo cruzado: 4 mL/min (fijado durante 15 min, luego 4 mL/min a 0,1 mL/min en 20 min)

Animales

10 Ratones C57BL/6 y BALB/c eran de Jackson Laboratories. Se utilizaron animales apareados por edad (8-10 semanas) y sexo (hembra) a lo largo de los experimentos.

Células y líneas celulares

B16-OVA es una línea celular de melanoma B16-F10 que expresa el gen de la ovoalbúmina de pollo (OVA). Las DC inmaduras derivadas de monocitos humanos (iDC) se diferenciaron de monocitos CD14⁺ purificados en presencia de IL-4 (1000 U/ml) y GM-CSF (1000 U/ml) durante 5 días.

15 Constructos de ARN y transcripción in vitro

20 Todos los plásmidos para la transcripción in vitro de ARN codificador de antígeno desnudo se basaron en el esqueleto pST1-2hBgUTR-A120 que presenta una UTR de β -globina humana 3' (hBgUTR) y una cola poli(A) de 120 nucleótidos y permite la generación de ARN transcrito in vitro farmacológicamente mejorado. El constructo SIINFEKL contiene un 257-264 de OVA de pollo. El constructo HA fue una secuencia parcial optimizada por codón de HA de gripe (aa 60-285 fusionada a 517-527; cepa de gripe A/PR/8/34) diseñada para combinar epítopos de MHC inmunodominantes principales. pST1-Luciferasa-A120 (Luc) contiene el gen de luciferasa de luciérnaga (15). El ARN se generó por transcripción in vitro. La marcación de ARN con Cy5-UTP (Cy5-ARN) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, RU) usando el constructo HA como molde.

25 Preparación e inyección de lipoplexos

30 A menos que se indique lo contrario, como protocolo estándar, los ARN y los liposomas se prediluyeron en solución salina reguladora con fosfato libre de ARNasa IX (PBS) (Ambion) hasta un volumen final de 100 μ l antes de la mezcla. 10 minutos después de mezclar el ARN diluido y el liposoma, se inyectaron 200 μ l de una solución de lipoplexo por ratón por vía intravenosa. Para algunos experimentos, PBS se reemplazó con NaCl libre de ARNasa 154 mM (Ambion)

Análisis citométrico de flujo

35 Los anticuerpos monoclonales para citometría de flujo fueron de BD Pharmingen. Las muestras de sangre hipotéticamente lisadas se incubaron a 4 °C con mAB específicos. Las células del bazo se obtuvieron mediante digestión con colagenasa (1 mg/ml; Roche). La cuantificación de células CD8⁺ específicas de SIINFEKL con tetrámero H-2 Kb/SIINFEKL (Beckman-Coulter) se describió previamente. Los datos de citometría de flujo se adquirieron en un citómetro de flujo analítico FACS-Canto II y se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star)

Electroporación

50 μ l de solución de ARN se sometieron a electroporación en iDC con parámetros de electroporación de 270V y 150 μ F utilizando un electroporador BioRad.

40 Examen de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* (BLI)

45 La captación y la traducción de Luc-ARN se evaluaron mediante imágenes de bioluminiscencia in vivo utilizando el sistema de imágenes IVIS Lumina (Caliper Life Sciences). Brevemente, se inyectó una solución acuosa de D-luciferina (150 mg/kg de peso corporal) (BD Bio-sciences) i.p. 6 h después de la administración de lipoplexos de ARN. Después de 5 minutos, se cuantificaron los fotones emitidos (tiempo de integración de 1 minuto). La bioluminiscencia in vivo en regiones de interés (ROI) se cuantificó como radiancia promedio (fotones/s/cm²/sr) utilizando el software IVIS Living Image 4.0. La intensidad de la luz transmitida que se origina en las células que expresan luciferasa dentro del animal se representó como una imagen en escala de grises, donde negro es la señal de bioluminiscencia menos intensa y blanco la más intensa. Las imágenes de referencia en escala de grises de los ratones se obtuvieron bajo iluminación de luz LED baja. Las imágenes se superpusieron usando el software Living Image 4.0.

ELISA

Se detectó IFN- α (PBL) de ratón y TNF α (eBioscience) en sueros de ratón utilizando el ensayo ELISA estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Experimentos de tumor

5 Para determinar la inmunidad protectora, los ratones recibieron tres inmunizaciones. Posteriormente, se inocularon 2×10^5 células tumorales B16-OVA s.c. en los flancos de los ratones C57BL/6. Para la evaluación de la inmunidad terapéutica, primero se inocularon los mismos números de células tumorales. Las inmunizaciones se iniciaron después de que los tumores alcanzaron un diámetro de 2 a 3 mm. Los tamaños de los tumores se midieron cada tres días. Los animales se sacrificaron cuando el diámetro del tumor superó los 15 mm.

10 Ejemplo 2: Efecto de los reguladores/iones sobre los tamaños de partícula y PI de los lipoplexos de ARN

Se prepararon lipoplexos de liposomas y ARN en diferentes relaciones de carga +/- entre el DOTMA lipídico catiónico (con carga positiva) y el ARN con carga negativa. Las características fisicoquímicas de los liposomas se investigaron mediante la dispersión dinámica de luz (PCS) y las mediciones del potencial zeta.

15 El uso de un regulador que a menudo es necesario para aplicaciones farmacéuticas e iones puede llevar a la agregación de lipoplexos que los hace inadecuados para la aplicación parenteral a los pacientes. Con el fin de evaluar estos efectos sobre el diámetro promedio de los lipoplexos, las características de las partículas de los lipoplexos de los liposomas DOTMA/DOPE (F4) [DOT-MA/DOPE (1:1 mol:mol)] y el ARN en diferentes relaciones de carga se determinaron bajo cuatro condiciones tamponantes, a saber, agua, regulador PBS, PBS más CaCl₂ 2,2 mM y PBS más CaCl₂ 22 mM. Para las mediciones, en resumen, se formaron lipoplexos mediante la adición de ARN a liposomas preformados, posteriormente se añadieron los reguladores. La concentración final de ARN se seleccionó a aproximadamente 100 μ g/ml. Todas las demás concentraciones se ajustaron en consecuencia o se seleccionaron como se indica en las figuras. Los tamaños de partícula se muestran en la Figura 1. La relación de carga DOTMA/ARN se da en el eje x de cada gráfico.

25 En el agua, se obtuvieron lipoplexos de tamaños de partícula definidos (tamaño medio menor de 300 nm), con bajos índices de polidispersidad (<0,3). Los tamaños de partícula medidos solo fueron ligeramente afectados por la relación de carga. Sin embargo, las partículas cargadas negativamente son más pequeñas (tamaño promedio de 100 a 200 nm) y más estables (PI <0,15) que las partículas no cargadas (tamaño promedio de 200 a 250 nm, PI <0,2).

30 En el regulador PBS, el mismo efecto es más prominente. Los lipoplexos comparativos con una relación de carga positiva o neutra forman partículas más grandes (parcialmente estabilizadas por las cargas positivas). Los lipoplexos comparativos con una relación de carga neutra son agregados inestables en construcción. En contraste, los lipoplexos cargados negativamente son estables (como lo indica un PI bajo <0,2) y compactos con tamaños de partícula promedio de 250 nm y menos.

35 (a) Después de la adición de CaCl₂, se observa un aumento en el tamaño de las partículas. Sin embargo, en concentraciones fisiológicas de Ca⁺⁺ (mostradas: 2,2 mM; en algunos tipos de células, la concentración fisiológica puede ser de hasta 5 mM, rara vez de hasta 10 mM), las partículas con carga negativa aún tienen tamaños definidos por debajo de 500 nm con un índice de polidispersidad que no excede 0,6. Para la muestra comparativa con exceso de carga positiva, el tamaño aumentó casi a 1000 nm.

40 (b) La adición de CaCl₂ 22 mM a las muestras b) (PBS) indujo la agregación/floculación en todas las condiciones, supuestamente debido a la formación de partículas de fosfato de calcio.

45 Estos resultados demuestran que en soluciones reguladoras tal como, por ejemplo, en regulador PBS y/o en presencia de CaCl₂, las relaciones de carga positiva o neutra son poco adecuadas para la producción de formulaciones liposómicas estables. La estabilidad de los lipoplexos depende en gran medida de la relación de carga +/- entre el lípido DOTMA catiónico y el ARN cargado. Además, tanto la fuerza iónica del regulador de formulación como la presencia de cationes bivalentes tienen una fuerte influencia en el tamaño de las partículas. En condiciones fisiológicas (es decir, pH 7,4; Ca⁺⁺ 2,2 mM), una relación de carga negativa parece ser imperativa debido a la inestabilidad de los lipoplexos neutros o cargados positivamente comparativos. Para lipoplexos con exceso de carga negativa se observó la tendencia más baja para la agregación.

Referencia

50 Ejemplo 3: Efecto de la carga positiva sobre la estabilidad de los lipoplexos de ARN

Para una evaluación adicional de un posible efecto beneficioso/perjudicial de las cargas positivas en la estabilidad de los lipoplexos (véase, por ejemplo, Figura 1 b y c), los tamaños de partícula de los lipoplexos de los liposomas DOTMA/Chol (F5) [DOTMA/Chol (1:1 mol:mol)] y el ARN con relaciones de carga DOTMA/ARN de 1/1 y 2/1 se midieron en diferentes reguladores (ver Figura 2). Para comparación, también se midió el tamaño de los liposomas

puros.

5 En el cloruro de sodio 150 mM, así como en el regulador PBS, una relación de carga DOTMA/ARN positiva de 2/1 conduce a tamaños de partículas mayormente aumentados/agregados con un índice de polidispersidad mayor que 0,4. Este resultado indica que las cargas positivas no son adecuadas para estabilizar los lipoplexos y que se debe esperar una agregación para los lipoplexos con carga positiva también en condiciones fisiológicas.

Ejemplo 4: Influencia de la precompactación del ARN mediado por cationes bivalentes sobre el tamaño de partícula de los lipoplexos de ARN

10 Para analizar la influencia de la precompactación de ARN usando cationes divalentes antes de la complejación, se determinó el tamaño de partícula de los lipoplexos F5/ARN en relaciones de carga (1/1 comparativa) y (1/2) se determinaron después de la compactación del ARN con diferentes cantidades de CaCl_2 . Contrariamente a los Ejemplos 2 y 3 aquí, los iones se añadieron al ARN antes de la formación del lipoplexo. La concentración final de liposomas fue en todos los casos 100 μM , y la concentración de ARN se ajustó en consecuencia. Debido a que para la F5/ARN 1/2 se duplicó la concentración de ARN, aquí también se duplicó la concentración de CaCl_2 .

15 Después del pretratamiento de los lipoplexos sin carga de ARN/F5 (1:1 comparativo) con concentraciones fisiológicas de CaCl_2 (es decir, 2,2 mM), el tamaño promedio de la partícula del lipoplexo resultante se infla (es decir, a 1,2 μm); véase Figura 3. Debido a este gran tamaño, tales partículas no son idealmente adecuadas para composiciones farmacéuticas y/o la administración de ARN a las células. Por el contrario, ambos experimentos de precompactación con lipoplexos con carga negativa y concentraciones bajas/altas (baja: 0,3 mM; alto: 4,4 mM) de CaCl_2 produjeron partículas de tamaño pequeño de aproximadamente 200 (350) nm.

20 Estos resultados indican que el ARN se puede precondensar con iones bivalentes. Debido a esta etapa de precondensación, los lipoplexos con tamaños de partículas definidos y compactos se pueden formar en relaciones de carga negativas; se puede prevenir la agregación o aumento sustancial del tamaño de partícula.

Ejemplo 5: Caracterización fisicoquímica de los lipoplexos de ARN

25 En la Figura 4, se proporcionan los resultados de la caracterización físico-química de los lipoplexos de ARN con F4 (DOTMA/DOPE) a diferentes relaciones de carga +/- entre DOTMA y ARN. Como se puede observar para los lipoplexos cargados negativamente, en relaciones de +/- de 1/1 (comparativas) y superiores, el tamaño de partícula es constante a aproximadamente 200 nm. El potencial zeta disminuye monótonamente de +/- 2/1 a 1 // 1 (ambos comparativos), y permanece constante a un mayor exceso de carga negativa. Estos resultados sugieren que las características importantes de las partículas, a saber, tamaño de las partículas y potencial zeta, son invariantes con el exceso de ARN, a partir de la relación 1/1 (comparativa). En este rango, se pueden fabricar partículas estables coloidales de tamaño bien definido. Se pueden obtener resultados similares en presencia de iones y reguladores (PBS).

Ejemplo 6: Efecto de la composición de regulador sobre la estabilidad/tamaño partícula de lipoplexos de ARN cargados negativamente

35 La estabilidad de los lipoplexos en diferentes reguladores se investigó más detalladamente. Para probar si un exceso de carga negativa produce lipoplexos estables coloidales en potenciales sistemas reguladores relevantes, se determinaron los tamaños de partícula de lipoplexos F4/Luc-ARN en la relación de carga (1/2) en agua y después de la adición del regulador concentrado a PBS (1x), cloruro de sodio (150 mM), glucosa (5%) o glucosa regulada con fosfato (ver Figura 5).

40 En todas las condiciones probadas, los tamaños de partículas no superan los 300 nm con valores de PI claramente menores que 0,4. Estos resultados sugieren que, si se fabrican como se describe en la presente, los lipoplexos de ARN con una relación de carga de 1/2 (exceso de ARN cargado negativamente) son coloidalmente estables en diferentes condiciones tamponantes.

Ejemplo 7: Correlación de la relación de carga negativa y el tamaño de partícula/estabilidad

45 La estabilidad coloidal de los lipoplexos en la relación entre (1/1, comparativa) y (1/2) se investigó adicionalmente. Los tamaños de partícula de los lipoplexos F4/ARN con relaciones de carga entre 1:1,8 y 1:1,2 (comparativos) se midieron en agua; véase Figura 6.

50 Estos resultados sugieren que en el rango de las relaciones de carga probadas, el tamaño de partícula de los lipoplexos es invariante a cambios menores en el exceso de ARN. En relación con las relaciones de carga probadas (negativas) de 1:1,2 (comparativas) a 1:1,8, los tamaños de las partículas están generalmente en el rango de 100 a 200 nm con valores de PI menores de 0,2.

Ejemplo 8: Efecto de la extrusión del tamaño de partícula y los valores de PI de los lipoplexos de ARN

En este experimento se muestra que se pueden producir lipoplexos de diferente tamaño. Con el fin de determinar el efecto de una etapa de extrusión adicional sobre el tamaño de partícula medio y los valores de PI de liposomas o

lipoplexos de ARN, se realizaron experimentos de extrusión (utilizando una membrana de policarbonato con diferentes diámetros de poros). Los resultados del tamaño de partícula de lipoplexos de ARN con F4 sin extrudir (DOTMA/DOPE) y con F4 extrudido en agua o PBS se muestran en la Figura 7.

5 Los experimentos demuestran que, además del rango de tamaño ya descrito de 200-300 nm, también se pueden producir partículas más grandes y más pequeñas. Aquí, como ejemplo, se obtuvieron partículas con un tamaño en el rango de 400-500 nm y <100 nm.

10 Mientras que los lipoplexos de ARN no extrudido muestran tamaños de partícula promedio entre 400 y 500 nm, la extrusión de lipoplexos de ARN generalmente lleva a partículas significativamente más pequeñas con tamaños menores de 200 nm. En contraste, el efecto de la extrusión sobre la polidispersidad es marginal; tanto los liposomas extrudidos como los no extrudidos llevan a partículas discretas y bien definidas (con valores de PI entre 0,1 y 0,3), si se complejan con ARN.

Ejemplo 9: Efecto de la liofilización sobre las características de la partícula

15 Los lipoplexos no son estables en suspensión líquida para el almacenamiento a largo plazo y el agregado. La liofilización es una técnica para enfrentar este desafío. Se investigó el efecto de la liofilización sobre las características de las partículas. Los tamaños de partícula de los liposomas DOTMA/DOPE (F4) se determinaron antes de la liofilización y después de la liofilización y la reconstitución con agua (ver Figura 8, donde los complejos con una relación de carga de 1,8:2 y 2:2 son comparativos).

Estos resultados sugieren que los lipoplexos se pueden liofilizar sin afectar las características de las partículas.

Ejemplo 10: Efecto de la relación de DOTMA/DOPE sobre las características de las partículas

20 Se fabricaron liposomas y lipoplexos con diferentes relaciones de DOTMA/DOPE. Los liposomas con una fracción DOPE muy alta (90% en moles, comparativa) fueron inestables en PBS (Figura 9). Para los lipoplexos, ya en una fracción DOPE de 70% en moles, el tamaño de partícula aumentó significativamente (Figura 10). Todas las demás composiciones fueron estables.

Ejemplo 11: Administración in vivo de lipoplexos de ARN

25 A los ratones BALB/c (n = 3) se les inyectó por vía intravenosa luciferasa-ARN (20 µg) complejo con diferentes cantidades de liposomas F4 para obtener relaciones de F4:ARN de 4,8:1 (comparativa), 2,4:1 (comparativa), 1,2:1 (comparativo), 1,1,2:2, 1,2:4 (comparativo). Las actividades de luciferasa in vivo y ex vivo se evaluaron a través del examen de imágenes in vivo 6 horas después de la inyección del lipoplexo y en la Figura 11 se muestran los conjuntos de órganos y ratones representativos. La Figura 12 muestra la distribución de la señal de luciferasa total
30 entre los órganos derivados del experimento descrito en la Figura 11.

F4 (DOTMA:DOPE) va más a los pulmones (un poco de bazo) en la relación de F4:ARN de 4,8:1 (comparativo), a ambos pulmones y al bazo en la relación de F4:ARN de 2,4:1 (comparativo) y exclusivamente para el bazo en relaciones de F4:ARN de 1,2:1 (comparativo), 1,2:2, 1,2:4 (comparativo). Por lo tanto, los lipoplexos neutros y aniónicos se dirigen específicamente al bazo, mientras que los lipoplexos catiónicos se dirigen principalmente al pulmón (expresión de wrt a proteína). No se detectó expresión en el hígado.
35

A los ratones BALB/c (n = 5) se les inyectó por vía intravenosa luciferasa-ARN (20 µg) complejo con liposomas F11 o F12 con una relación Fx:ARN de 1,2:2 [F11:DOTMA/DOPE (1:2 mol:mol); F12:DOTMA/DOPE (mol:mol 2:1)]. Las actividades de luciferasa in vivo y ex vivo se evaluaron mediante imágenes in vivo 6 horas después de la inyección del lipoplexo y se muestran los ratones y conjuntos de órganos representativos en la Figura 13. Los derivados de F4 F11 y F12 también se dirigen al bazo en una relación liposoma:ARN de 1,2:2.
40

A los ratones BALB/c (n = 5) se les inyectó por vía intravenosa luciferasa-ARN (20 µg) complejo con liposomas F2 o F5 con una relación Fx:ARN de 1:1 (comparativa) [F2:DOTAP/DOPE (1:1 mol:mol); F5:DOTMA/Chol (1:1 mol:mol)]. Las actividades de luciferasa in vivo y ex vivo se evaluaron a través de imágenes in vivo 6 horas después de la inyección del lipoplexo y se muestran los ratones y conjuntos de órganos representativos en la Figura 14. En la relación liposoma:ARN de 1:1 (comparativa), mientras que F2 se dirige al bazo, F5 se dirige tanto al bazo como a los pulmones.
45

Luciferasa-ARN (20 µg) diluido en 1X PBS (A) o sin diluir en agua (B y C) se complejó con liposomas F4 diluido en 1X PBS (B) o sin diluir en agua (A y C) con una relación de F4:ARN de 1,2:2. Las concentraciones finales de PBS de todos los complejos se ajustaron a 1X PBS. A los ratones BALB/c (n = 5) luego se les inyectó por vía intravenosa A, B o C, y las actividades de luciferasa en los bazos de ratones se cuantificaron a través de imágenes in vivo (Media + SD); véase Figura 15.
50

Como un protocolo de mezcla estándar, tanto los liposomas como el ARN se diluyen en PBS (conc final de 1X PBS) y luego se mezclan en volúmenes iguales. La predilución del ARN solo es tan buena como el protocolo estándar. Todos los demás protocolos que carecen de predilución de ARN en PBS dieron resultados peores. Se prefiere la

presencia de iones en la solución de ARN antes de la complejación para lograr buenos resultados.

5 Luciferasa-ARN (20 µg) precomplejada con CaCl₂ 0,125 o 1 mM o sin precomplejación se mezcló mediante un protocolo estándar con liposomas F4 con una relación de F4:ARN de 1,2:2. A los ratones BALB/c (n = 5) se les inyectaron por vía intravenosa estas formulaciones y las actividades de luciferasa in vivo se cuantificaron a partir de bazos de ratones (Mean + SD); véase Figura 16.

La precondensación de ARN con CaCl₂ 1 mM cuando se usa PBS como regulador aumenta la señal de luciferasa 3 veces (concentraciones más altas de CaCl₂ en presencia de PBS lleva a grandes agregados de partículas). La precondensación de ARN con Ca²⁺ ayuda a aumentar la señal de luciferasa.

10 Luciferasa-ARN (20 µg) o liposomas F4 diluidos en PBS 1X o NaCl 154 mM se mezclaron con una relación de F4:ARN de 1,2:2. A los ratones BALB/c (n = 5) se les inyectaron por vía intravenosa estas formulaciones y las actividades de luciferasa in vivo se cuantificaron a partir de bazos de ratones (Media + SD); véase Figura 17.

Usando el protocolo de mezcla estándar, el reemplazo de PBS con NaCl isosmolar actuó tan bien como PBS.

15 Luciferasa-ARN (20 µg) precomplejado con CaCl₂ 1-4 mM se mezcló usando un protocolo estándar con liposomas F4 con una relación de F4:ARN de 1,2:2 usando NaCl 154 mM en lugar de PBS 1X como regulador de dilución. A los ratones BALB/c (n = 5) se les inyectaron por vía intravenosa estas formulaciones y las actividades de luciferasa in vivo se cuantificaron a partir de bazos de ratones (Media + SD); véase Figura 18.

Quando PBS se reemplaza con NaCl, se puede usar CaCl₂ 2 mM, lo que lleva a un aumento de 4,5 veces (las concentraciones más altas de CaCl₂ no aumentan más la señal).

20 Luciferasa-ARN (5 µg) se incubó en 25 o 50% de suero de ratón durante 30 min. y luego se sometió a electroporación en DC inmaduras derivadas de monocitos humanos. La actividad de la luciferasa se evaluó 18 h más tarde a través del ensayo de luciferasa in vitro estándar (Media + SD); véase Figura 19A. Luciferasa-ARN (20 µg) se complejó mediante un protocolo estándar con liposomas F4 con una relación de F4:ARN de 1,2:2 y luego se incubó en presencia o ausencia de suero de ratón 50% durante 30 min. A los ratones BALB/c (n = 5) se les inyectaron por vía intravenosa estas formulaciones y las actividades de luciferasa in vivo se cuantificaron a partir de bazos de ratones (Media + SD); véase Figura 19B.

El ARN desnudo se degrada en presencia de suero. La complejación del ARN con liposomas F4 lo protege de la degradación mediada por ARNasa en suero.

30 A los ratones BALB/c (n = 3) se les inyectaron por vía intravenosa Cy5-ARN (40 µg) complejado con liposomas F4 marcados con rodamina (F4-rho) (1,2:2; Liposoma:ARN). La captación de Cy5-ARN o F4-rho por las poblaciones de células en el bazo se evaluó mediante citometría de flujo 1 hora después de la inyección del lipoplex, véase Figura 20.

35 Como las células presentadoras de antígenos profesionales (APC), las DC esplénicas y los macrófagos internalizaron eficientemente el ARN encapsulado en liposomas y el propio liposoma mientras que las células B y T casi no internalizaron ni el ARN encapsulado en liposomas ni el propio liposoma. De este modo, los lipoplexos de ARN se internalizan selectivamente mediante APC esplénicas.

40 A los ratones C57BL/6 (n = 3) se les inyectó HA-ARN (40 µg) complejado con F4 (1,2:2; Liposoma:ARN), F4 solo o PBS (como control); véase Figura 21. (A) El estado de maduración de las células dendríticas (revelado por la regulación por aumento de CD86 y CD40) en el bazo se determinó mediante citometría de flujo 24 horas después de los tratamientos (Media + SD). (B) Las concentraciones séricas de IFNα y TNFα se evaluaron mediante ELISA 6 y 24 horas después de los tratamientos (Media + SD).

45 Como se reveló mediante la regulación por aumento de los marcadores de activación (CD86, CD40) en las DC, los lipoplexos ARN-F4 activaron las DC esplénicas, mientras que el liposoma solo no lo hizo. Curiosamente, aunque los lipoplexos de ARN-F4 se detectaron en 5-10% de las DC esplénicas en un experimento anterior, todas las DC se activaron en el bazo, lo que implica la existencia de un medio inflamatorio en el bazo después de la administración. En todos los animales inyectados con ARN-lipoplexos, se pudo detectar una gran cantidad de IFNα en sangre 6 h (también después de 24 h, aunque en cantidades mucho menores). También se pudo detectar TNFα pero a niveles muy moderados en todos los animales a los que se inyectó ARN-lipoplexos (solo después de las 6 h). La secreción de citoquinas es específica de ARN-lipoplexos ya que ni el PBS ni el liposoma solo no produjeron una secreción de citoquinas significativa (estado inicial). En consecuencia, los lipoplexos de ARN activan las DC esplénicas que llevan a la inflamación sistémica.

55 Los ratones C57BL/6 (n = 5) se inmunizaron por vía intravenosa con SIINFEKL-ARN (20 o 40 µg) complejados con liposomas F4 en diferentes relaciones liposoma:ARN en los días 0, 3, 8 y 15; véase la Figura 22. (A) Las frecuencias de las células T CD8+ específicas de antígeno se determinaron mediante tinción con tetrámero SIINFEKL-MHC 5 días después de la última inmunización (Día 20) (Media + SD). (B) Las respuestas de recuperación de la memoria se evaluaron mediante la tinción con tetrámero SIINFEKL-MHC en el Día 62 después de otra inyección de lipoplexos

F4-ARN en el Día 57 (Media + SD).

5 Se puede generar un alto orden de inmunidad de células T específica de antígeno después de la inmunización repetitiva con lipoplexos F4 (A). 6 semanas después de la última inmunización (d57), una inyección de lipoplexos de refuerzo pudo expandir la memoria de las células T CD8 que se formó en las inyecciones anteriores (B). Los complejos F4 (1,2:1 comparativos) formaron agregados, mientras que los complejos F4 (1,2:2) fueron transparentes. Se prefiere F4 (1,2:2) con 40 µg de ARN. Por lo tanto, se pueden generar respuestas efectoras y de memoria de células T fuertes con ARN-lipoplexos

10 En los días 0, 3 y 8, los ratones C57BL/6 (n = 3) recibieron tres inmunizaciones intravenosas de SIINFEKL-ARN (40 µg) complejo con liposomas F4 con una relación de F4:ARN de 1,2:2 o se dejaron sin tratar. El día 14, se inyectaron 2x10⁵ células tumorales B16-OVA s.c. en los flancos. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se muestran en la Figura 23.

Se logró una protección completa con la administración del lipoplexos de ARN en el modelo profiláctico B16-OVA.

15 Se inocularon 2x10⁵ células tumorales B 16-OVA s.c. en los flancos de ratones C57/B16 (n = 10, d0). En el día 10 (diámetro del tumor 2-3 mm), los ratones recibieron siete inmunizaciones intravenosas de SIINFEKL-ARN (40 µg) complejo con liposomas F4 o F12 con una relación de F4:ARN de 1,2:2 (en los días 10, 13, 17, 24, 31, 38, 45). Se utilizaron liposomas solos sin SIINFEKL-ARN como tratamiento de control. El crecimiento del tumor individual y las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se muestran en las Figuras 24 y 25, respectivamente.

20 En un modelo terapéutico, se detectó un retraso significativo en el crecimiento del tumor para los grupos F4+ARN o F12+ARN. Se observó la contracción de los tumores después de tres inmunizaciones para ambos grupos. A los ratones BALB/c (n = 3) se les inyectó por vía intravenosa Luciferasa-ARN (20 µg) complejo con diferentes cantidades de liposomas F5 para obtener relaciones F5:ARN de 4,8:1 (comparativa), 2,4:1 (comparativa), 1,2:1 (comparativa), 1,2:2, 1,2:4 (comparativo). Las actividades de luciferasa in vivo y ex vivo se evaluaron mediante imágenes in vivo 6 horas después de la inyección del lipoplexos y en la Figura 26 se muestran los conjuntos de órganos y órganos representativos. La Figura 27 muestra la distribución de la señal de luciferasa total entre los órganos derivados del experimento descrito en la Figura 26.

30 F5 (DOTMA:Chol) va a los pulmones en la relación de F5:ARN de 4,8:1 (comparativa), principalmente a los pulmones pero también al bazo en la relación de F5:ARN (2,4:1 comparativa), principalmente a bazo, pero también a los pulmones en la relación de F5:ARN (1,2:1 comparativa) y exclusivamente a bazo en las relaciones de F5:ARN (1,2:2, 1,2:4 comparativa). Los lipoplexos neutros y aniónicos se dirigen más específicamente al bazo, mientras que los lipoplexos catiónicos se dirigen principalmente al pulmón (expresión de wrt a proteína). No se detectó expresión en el hígado.

Ejemplo 12: Formulación clínica de lipoplexos

35 La formulación que sigue el protocolo previamente establecido consiste en dos etapas, a saber, la preformulación de un ARN dado usando una solución isotónica de cloruro de sodio como diluyente y la formación de lipoplexos mediante la adición de una cantidad definida de liposomas. Para la preformulación, los primeros 4 ml de solución de cloruro de sodio (0,9% p/p en agua) se sacarán del vial de NaCl con una jeringa y se añadirán al ARN. Luego, se extraerán 400 µl de liposomas (2,8 mg/ml de lípido total en agua) del vial del liposoma y se inyectarán usando una cánula (diámetro interno de 0,9 mm) en la solución de ARN y cloruro de sodio. La formulación de lipoplexos de ARN obtenida (5,5 ml) se puede administrar mediante inyección parenteral directa de la dosis deseada y después de la preparación de una infusión intravenosa. Para este fin, de la formulación de ARN lipoplexos, se tomarán 5,0 ml y se diluirán en una bolsa de infusión que contiene 50 ml de solución isotónica de cloruro de sodio. Por este protocolo, las formulaciones de lipoplexos con tamaños de partícula de aproximadamente 300 a 500 nm se obtienen de manera robusta y reproducible; véase Figura 28.

Los materiales y componentes que se pueden usar son los siguientes:

45 Componentes:

- ARN: 0,5 mg/ml en HEPES 10 mM y EDTA 0,1 mM
- Diluyente: NaCl 0,9%
- Liposomas: DOTMA 2,68 mM, DOPE 1,34 mM, tamaño de partícula (Z_{ave}), jeringas de 300-500 nm:

Jeringas

- 50
- Jeringas de 5 mL: (por ejemplo, Omnifix, 5 mL, Luer Lock, B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Alemania)
 - Jeringa 1 mL: Injekt-F Tuberculina, 1 mL, Luer Lock, B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Alemania)

Agujas:

- 0,9 x 44 mm, 20 G 1 1/2", BD Microlance 3, Becton Dickinson S.A. (Fraga, España)

Los tamaños de las partículas de lipoplexo de ARN producidos de acuerdo con el procedimiento anterior varían de 300 nm a 500; véase Figura 29.

Ejemplo 13: Efecto del tamaño de partícula

- 5 Se demuestra, que la actividad de los lipoplexos aumenta con el aumento de tamaño. El tamaño de los liposomas utilizados para la formación de lipoplexos afecta también el tamaño de los lipoplexos. Los liposomas más grandes llevan también a lipoplexos más grandes.

10 Se investigaron las características de las partículas de ARN lipoplexos reconstituidos usando F4 (DOTMA/DOPE 50:50 mol/mol) y F12 (DOTMA/DOPE 66,7:33,3 mol/mol) usando diferentes tamaños de precursor. Para ello, se realizó el ajuste de tamaño de las partículas de lipoplexos con liposomas extrudidos y liposomas no extrudidos, filtrados a 0,45 µm.

Tabla 1: Tamaños de liposomas usados para la formación del lipoplexo

Formulación	Tamaño extrudido	Tamaño no extrudido
F4	164 nm	582 nm
F12	163 nm	637 nm

- 15 Los resultados para los lipoplexos se muestran en la Figura 30. Se demuestra que los lipoplexos de diferentes tamaños se pueden producir usando precursores de diferentes tamaños.

Los resultados de las Figuras 31 y 32 indican que cuanto más grandes sean los liposomas más grandes son los lipoplexos formados en estos experimentos, y mayor es la señal de luciferasa observada.

Ejemplo 14: Regulador de cloruro de sodio

- 20 Varios experimentos han demostrado que la adición de regulador PBS al ARN antes de la adición de liposomas, lleva a un aumento de la actividad de los lipoplexos. Aquí se demuestra que, en lugar de PBS, se puede usar una solución salina normal (0,9%, por ejemplo, NaCl 150 mM) para la condensación de ARN. Dicha solución de NaCl está disponible como producto farmacológico aprobado, lo que facilita la logística y la manipulación del lipoplexo-IMP. Además se demuestra que también se pueden usar soluciones concentradas de NaCl y PBS para la condensación de ARN, lo que da como resultado una actividad equivalente de los lipoplexos formados posteriormente. Además, se muestran mediciones de tamaño detalladas, donde se añadieron soluciones de NaCl concentradas de manera diferente a ARN antes de la formación del lipoplexo. En general, el tamaño de lipoplexo aumenta al disminuir la concentración de la solución de NaCl añadida; véase Figura 35. Como el aumento de tamaño se correlaciona con el aumento de la actividad (ver Ejemplo 13), se considera que la adición de la solución salina normal, y no la solución salina concentrada, produce una mayor actividad.

Para analizar la influencia de la preformulación de ARN utilizando reguladores comunes antes del ensamblaje, se determinó el tamaño de partícula de los lipoplexos a una relación de carga 1:2 después del tratamiento del ARN con diferentes reguladores de PBS concentrados o soluciones de cloruro de sodio; véase las Figuras 33 y 34.

- 35 El protocolo de mezcla anterior, donde los liposomas y el ARN se tratan en PBS (1x conc final de PBS) y luego se mezclan en volúmenes iguales, se puede reemplazar por una mezcla más simple con una solución normal de cloruro de sodio (0,9%), que está disponible en el comercio como un medicamento aprobado. Como protocolo de mezcla para el lipoplexo-IMP, el ARN se preformula con solución salina isotónica y luego se mezcla con los liposomas en agua.

- 40 Los resultados sugieren que el ion monovalente se puede añadir a diferentes concentraciones para obtener la misma fuerza iónica final en la formulación del lipoplexo sin afectar significativamente las propiedades del lipoplexo.

Ejemplo 15: Relación de carga del liposoma/ARN

La relación de carga (relación de lípido catiónico a nucleótido) de 1,3 a 2 es adecuada en relación con las características fisicoquímicas y la actividad biológica. En esta relación, se supone que una fracción más alta de ARN se incluirá en los lipoplexos en cuanto a la relación 1:2.

- 45 La estabilidad coloidal, las características de las partículas y la actividad de luciferasa de los lipoplexos de liposomas no extrudidos se investigaron adicionalmente. Los lipoplexos se ensamblaron en solución salina isotónica con

5 relaciones de carga de liposomas/ARN entre 1:2 y 1,9:2 (comparativa), véase las Figuras 36 y 37. Para lipoplexos, con una relación de carga de 1,7:2 (comparativa) los tamaños de partícula aumentaron significativamente a través del tiempo. De acuerdo con los lipoplexos de liposomas extrudidos, los lipoplexos con una relación de carga entre 1:2 y 1,6:2 son invariantes a cambios menores en el exceso de ARN y muestran tamaños de partículas en el rango de 350 a 480 nm con valores de PI menores de 0,3.

Como se demuestra en la Figura 38, las relaciones de carga liposoma/ARN entre 1,1:2 y 1,6:2 dan como resultado una buena actividad en el bazo.

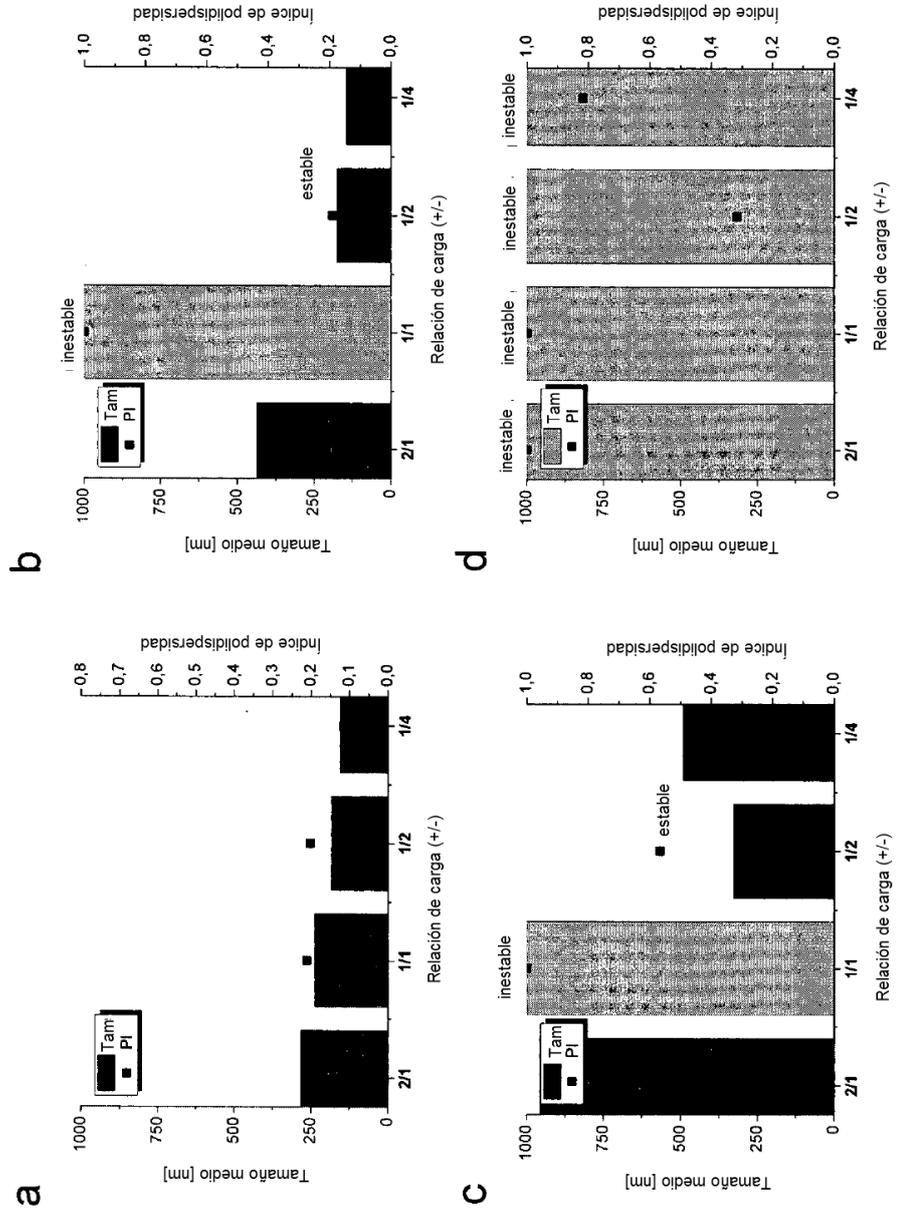
Todas las relaciones administran ARN exclusivamente al bazo sin cambios significativos en el rendimiento entre las diferentes relaciones de lípido/ARN.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que comprenden al menos un lípido catiónico, al menos un lípido auxiliar neutro y ARN que codifica al menos un antígeno para usar en un método para administrar el al menos un antígeno a células presentadoras de antígenos profesionales en el bazo de un sujeto, donde dicho método comprende la administración sistémica de la composición farmacéutica al sujeto,
- en donde el antígeno es un antígeno asociado a la enfermedad o provoca una respuesta inmune contra un antígeno asociado a la enfermedad o células que expresan un antígeno asociado a la enfermedad, y
- en donde las nanopartículas son lipoplexos que comprenden
- 10 (i) DOTMA y DOPE en una relación molar de 8:2 a 3:7, preferiblemente de 7:3 a 5:5, en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTMA a las cargas negativas en el ARN es de 1,6:2 a 1:2, preferiblemente 1,4:2 a 1,1:2; o
- (ii) DOTMA y colesterol en una relación molar de 8:2 a 3:7, preferiblemente de 7:3 a 5:5, en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTMA a las cargas negativas en el ARN es de 1,6:2 a 1:2, preferiblemente 1,4:2 a 1,1:2; o
- 15 (iii) DOTAP y DOPE en una relación molar de 8:2 a 3:7, preferiblemente de 7:3 a 5:5, en donde la relación de carga de las cargas positivas en DOTAP a las cargas negativas en el ARN es de 1,6:2 a 1:2, preferiblemente 1,4:2 a 1,1:2.
2. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en donde las nanopartículas tienen un diámetro promedio en el intervalo de 50 nm a 1000 nm, preferiblemente de 100 nm a 800 nm, preferiblemente de 200 nm a 600 nm, tal como de 300 nm a 500 nm, según lo determinado por dispersión dinámica de la luz.
- 20 3. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde las células presentadoras de antígeno son células dendríticas y/o macrófagos.

Figura 1



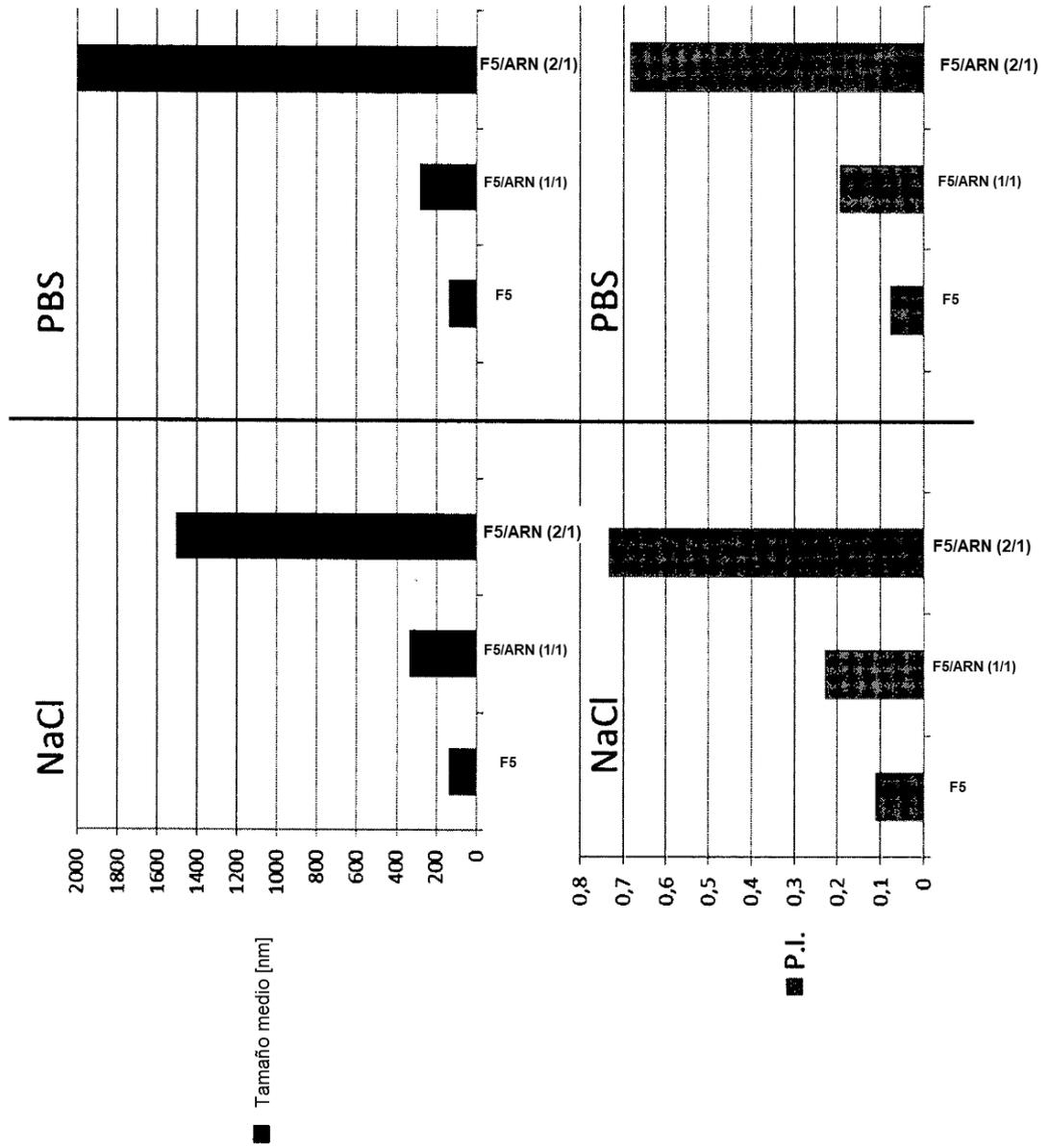


Figura 2

Figura 3

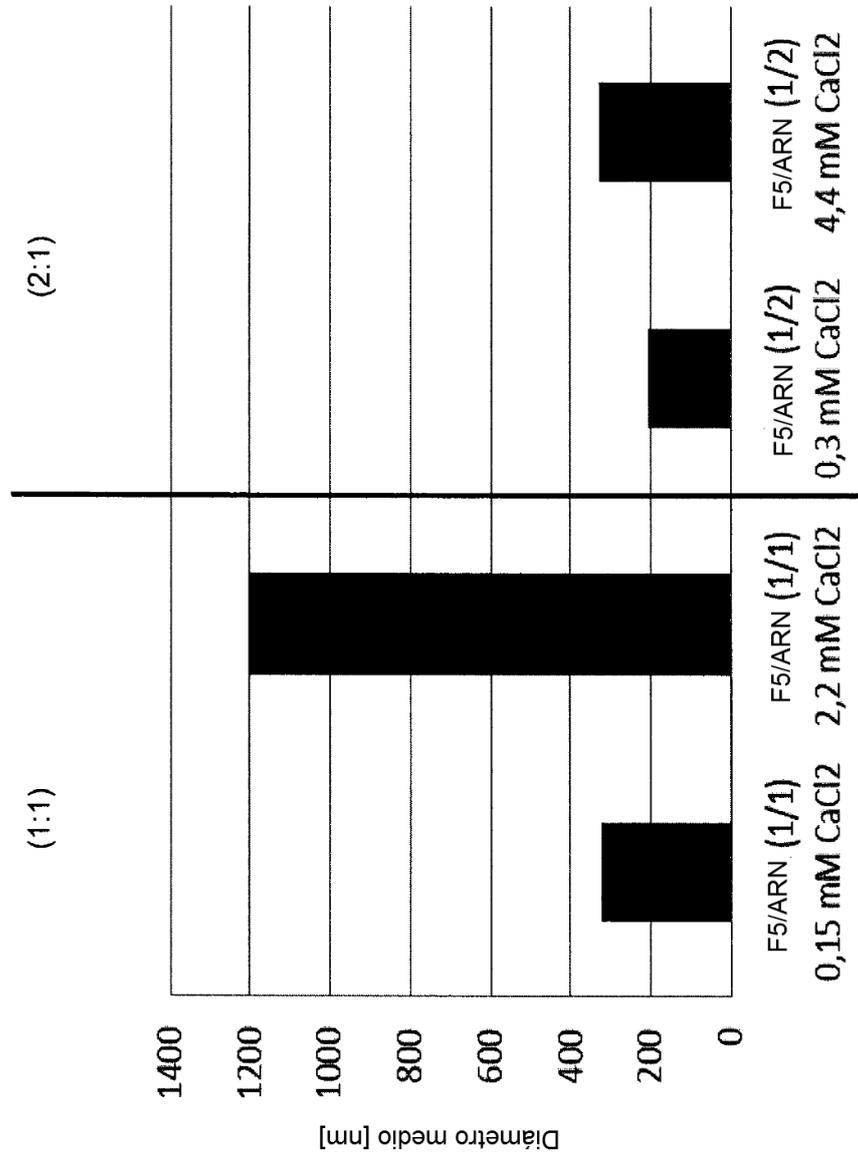
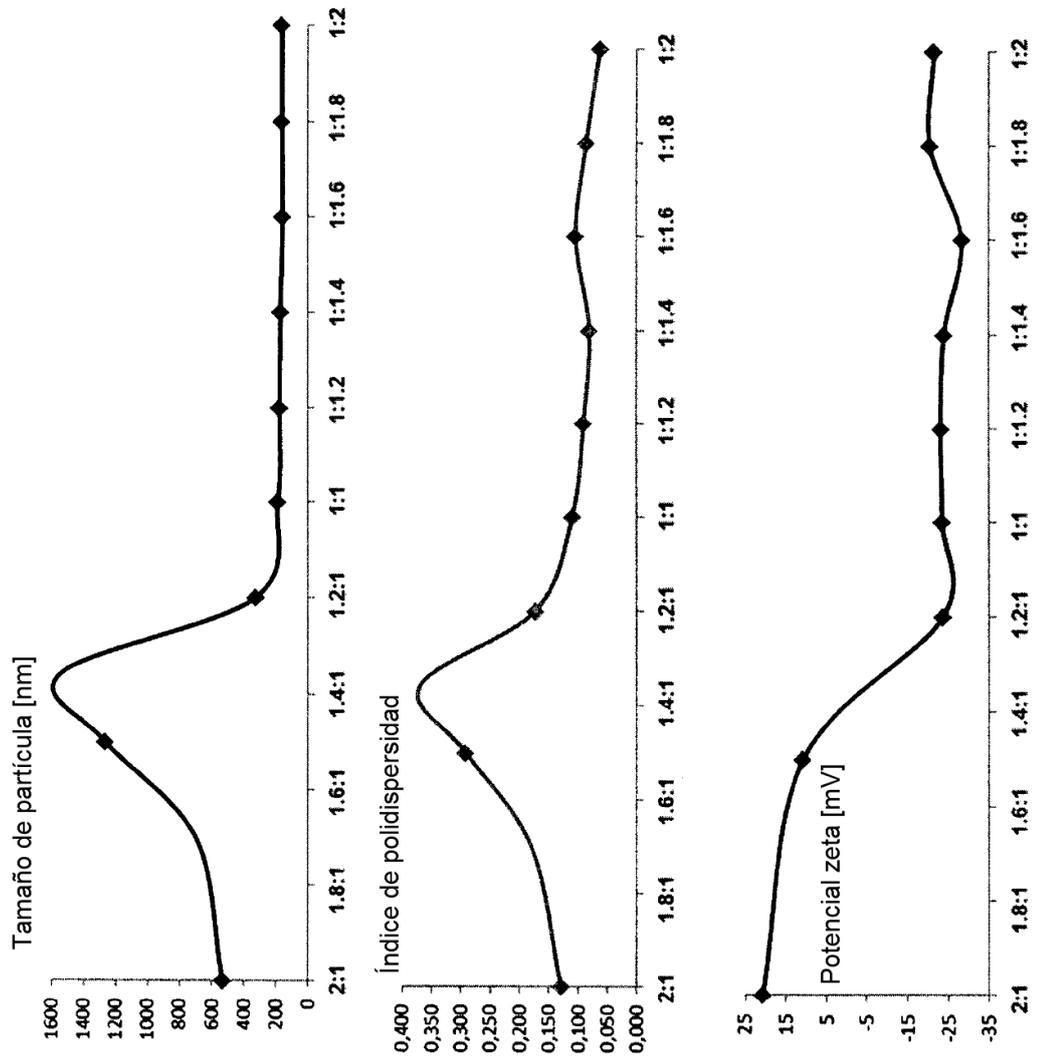


Figura 4



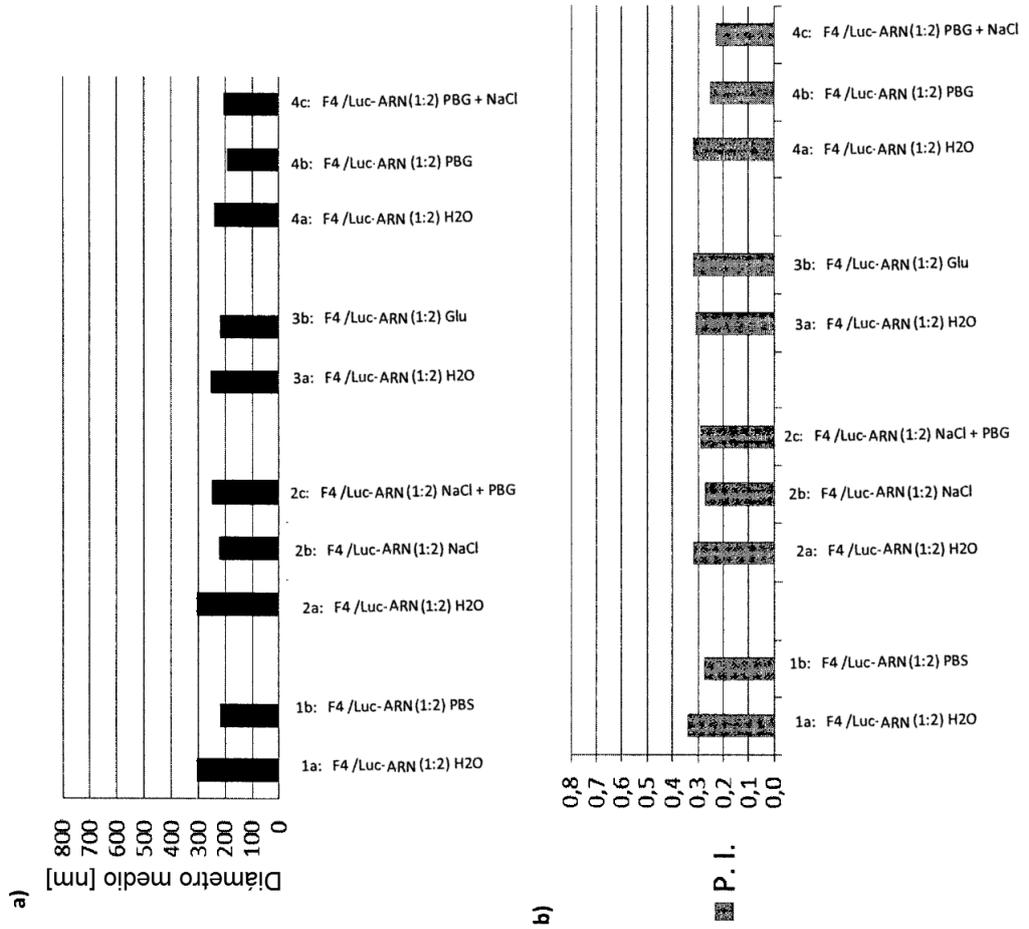


Figura 5

Figura 6

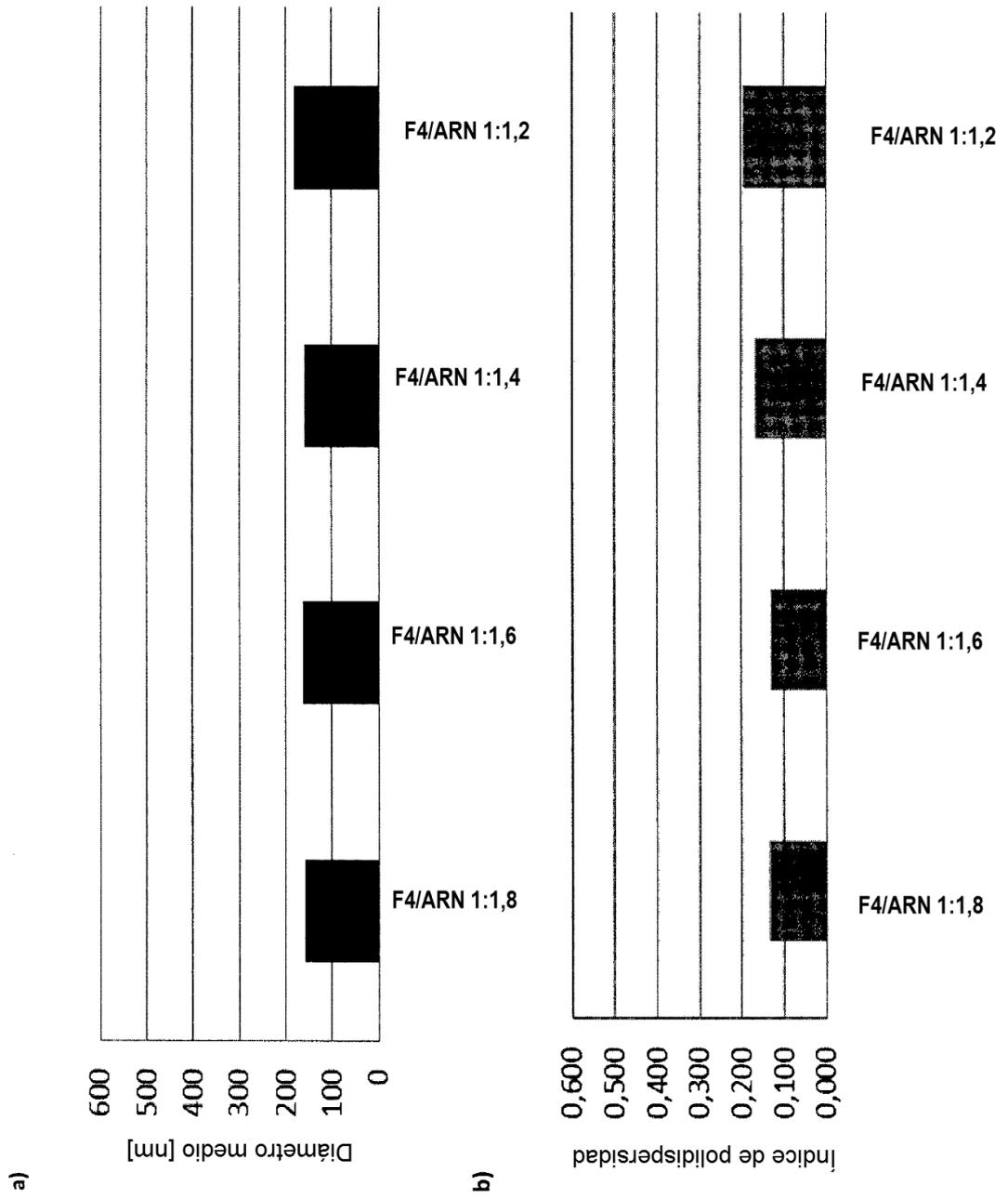
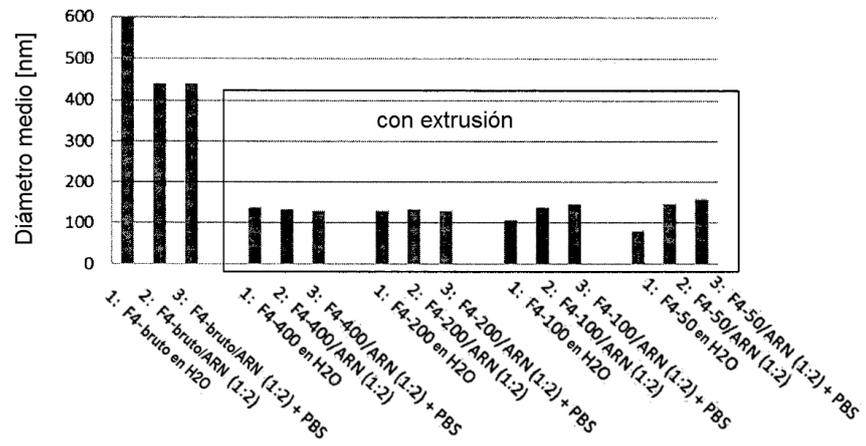
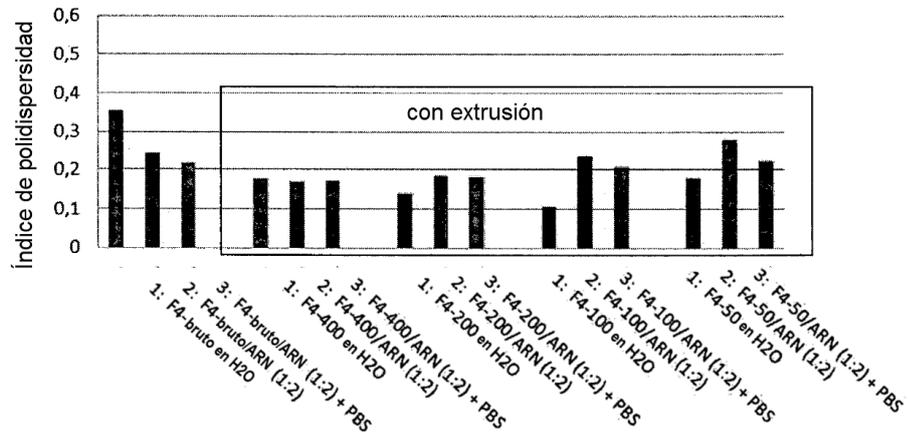


Figura 7

a)



b)



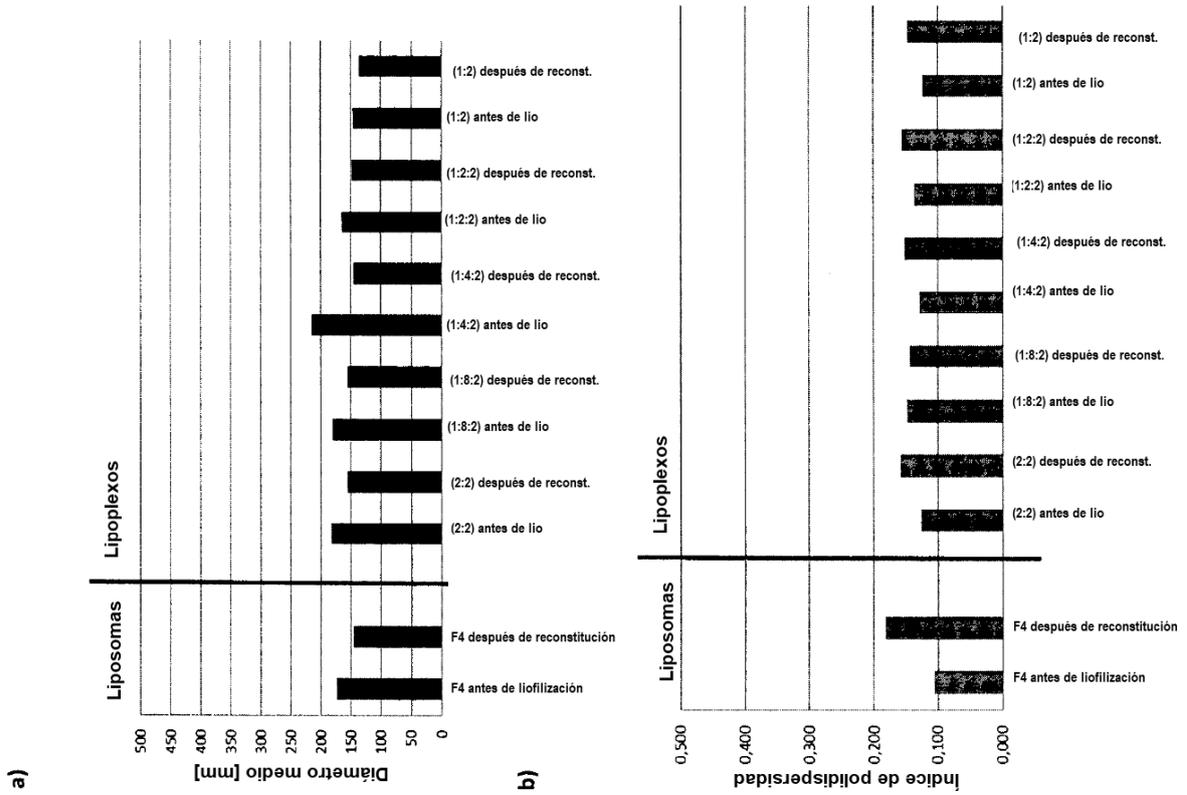


Figura 8

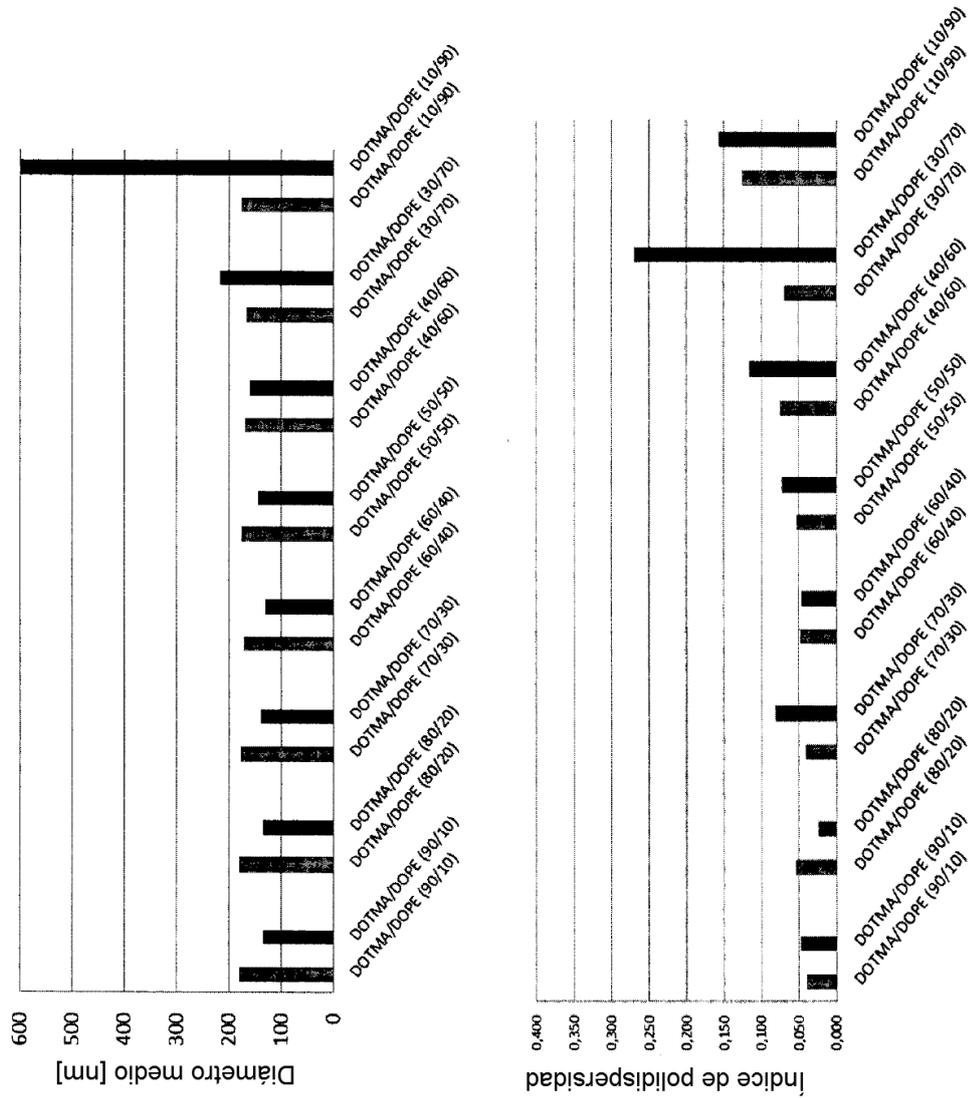


Figura 9

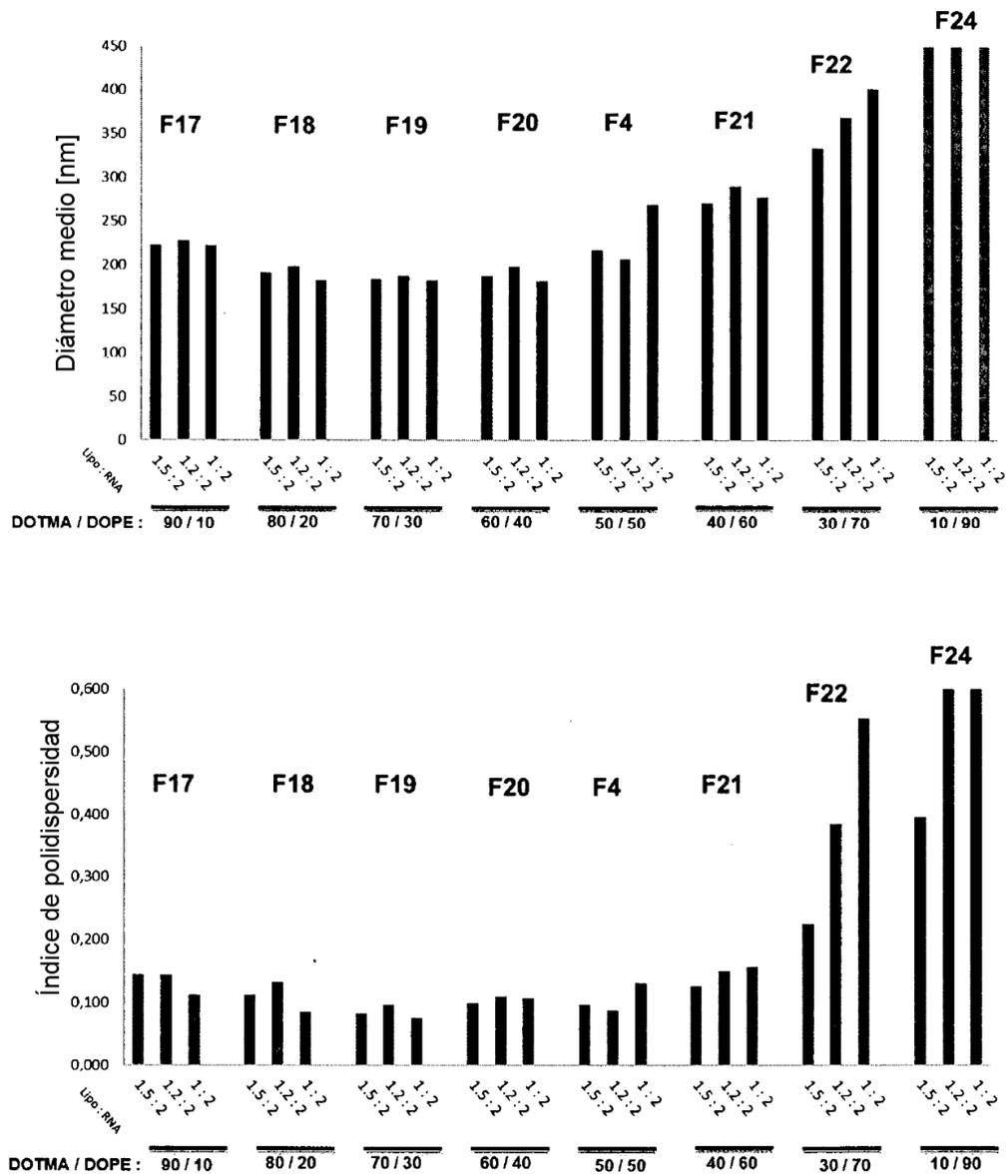
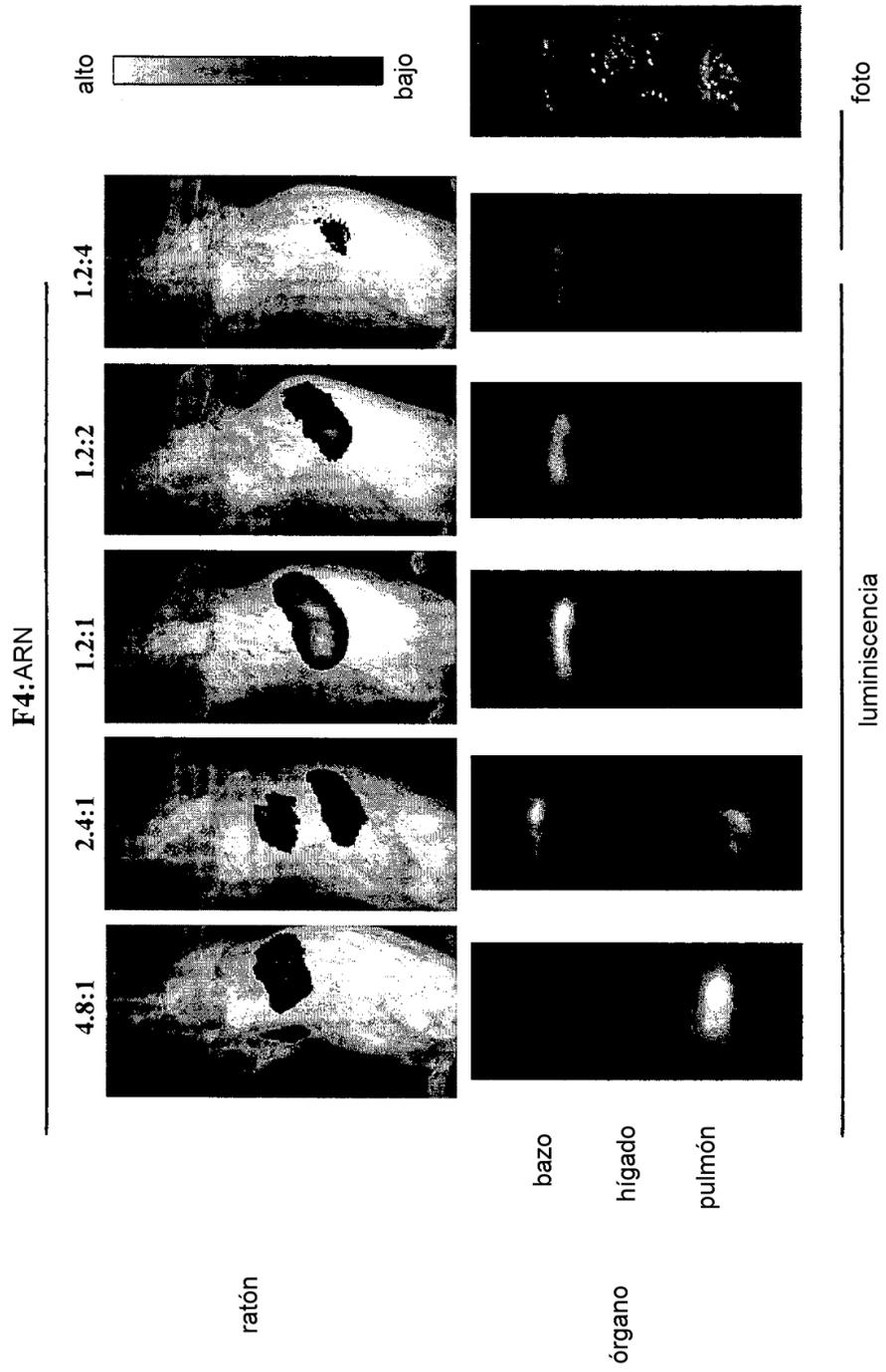


Figura 10

Figura 11



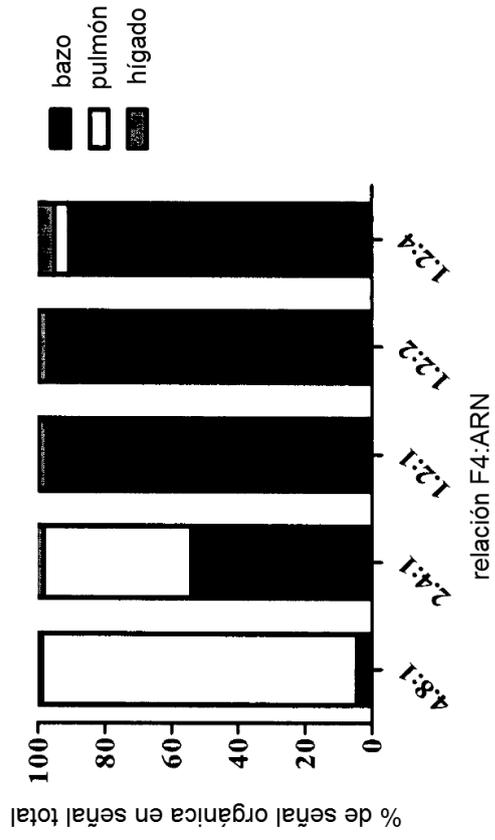


Figura 12

Figura 13

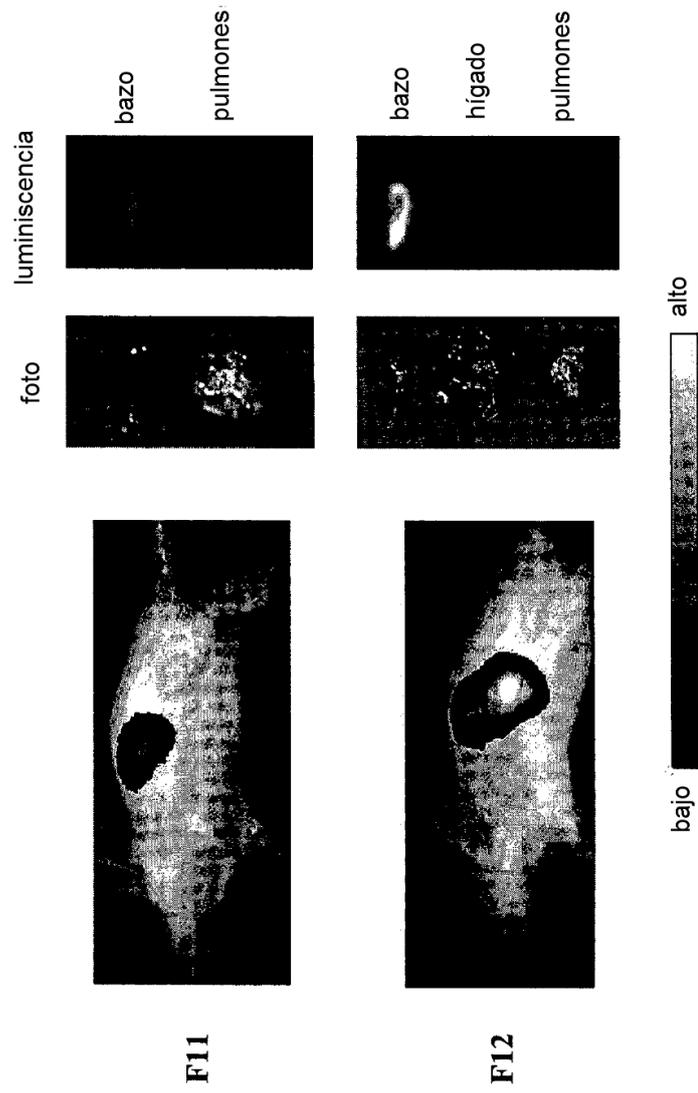
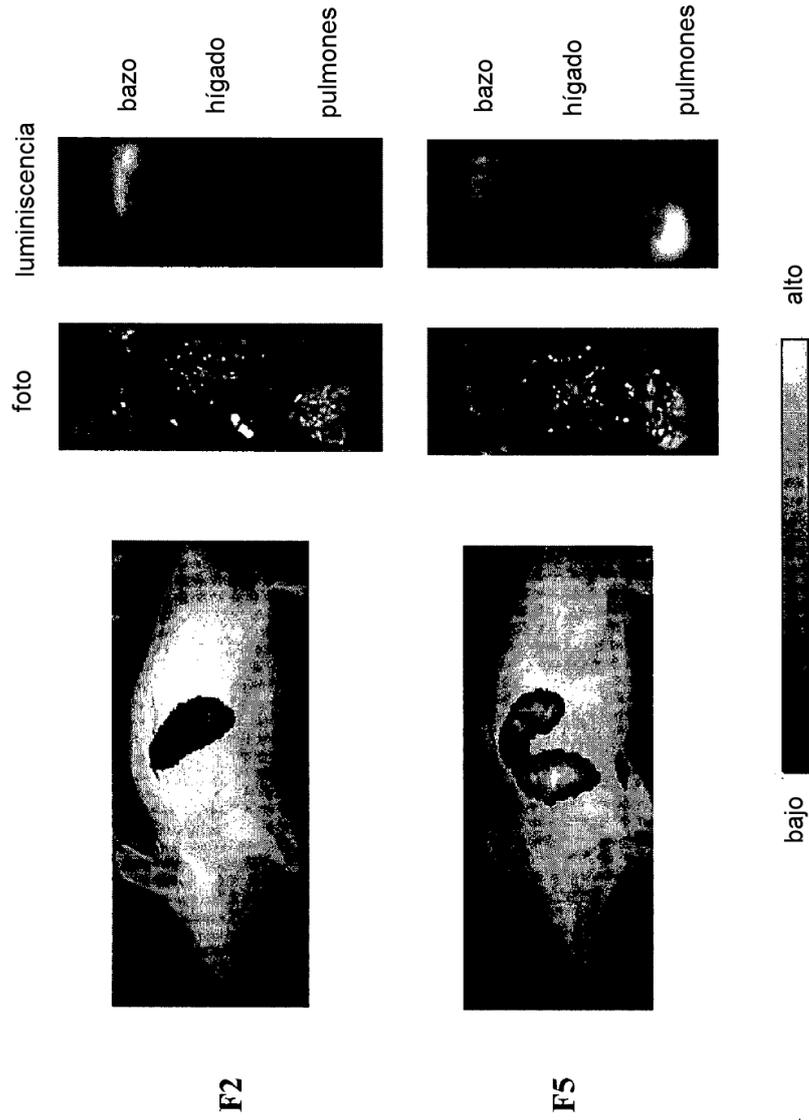


Figura 14

Lipo:ARN 1:1



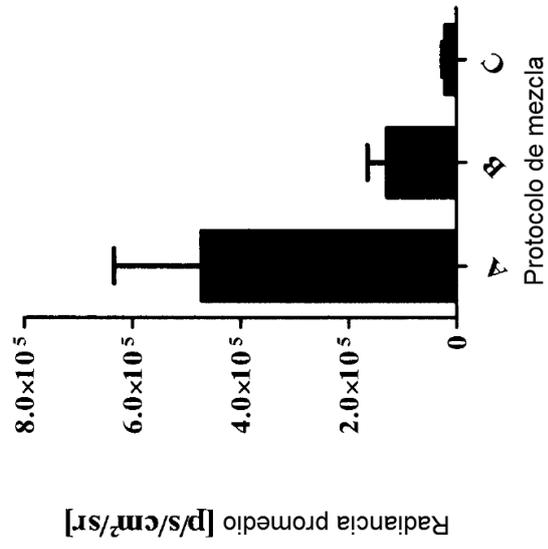


Figura 15

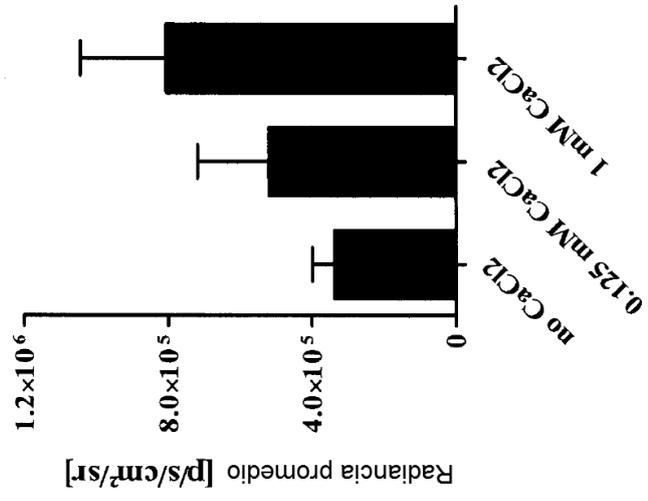


Figura 16

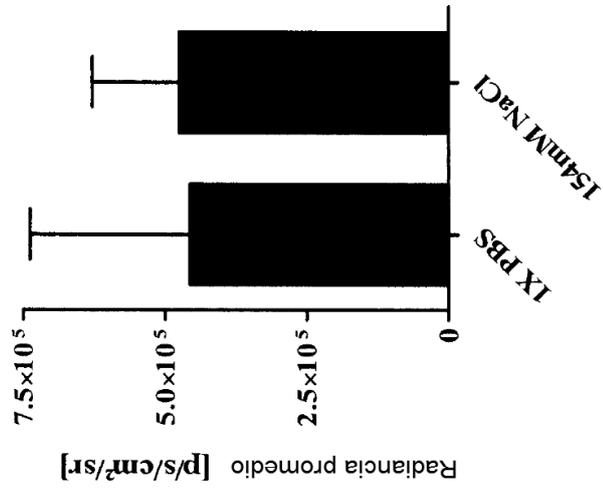


Figura 17

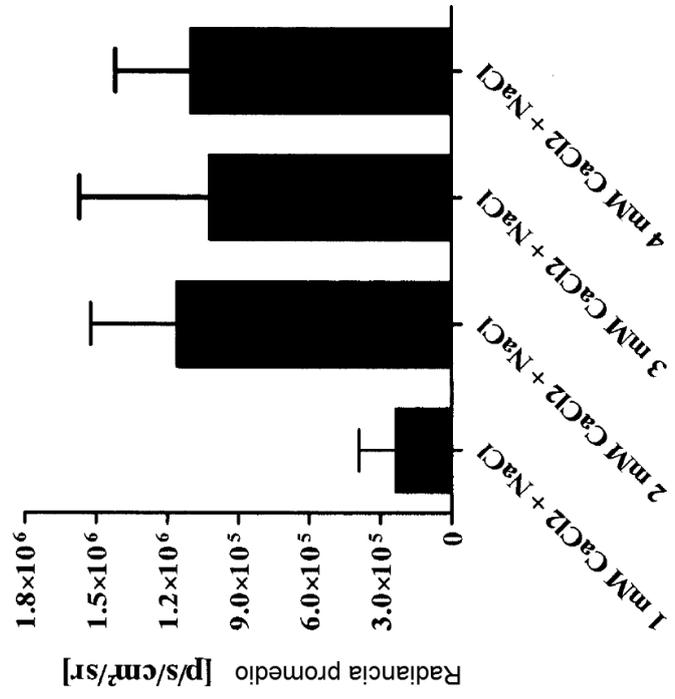
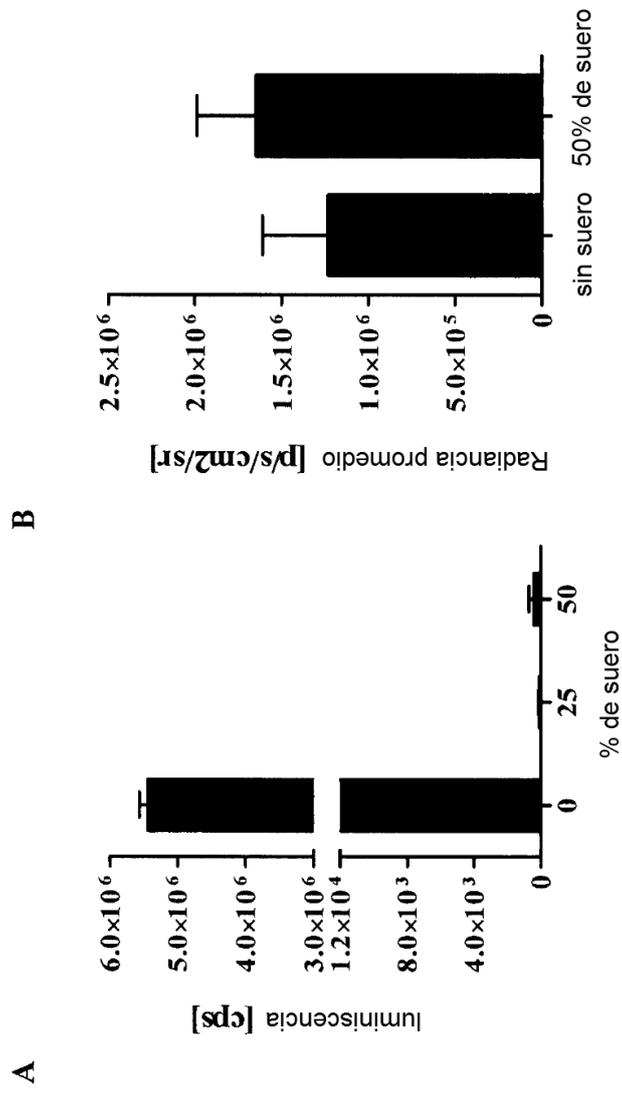


Figura 18

Figura 19



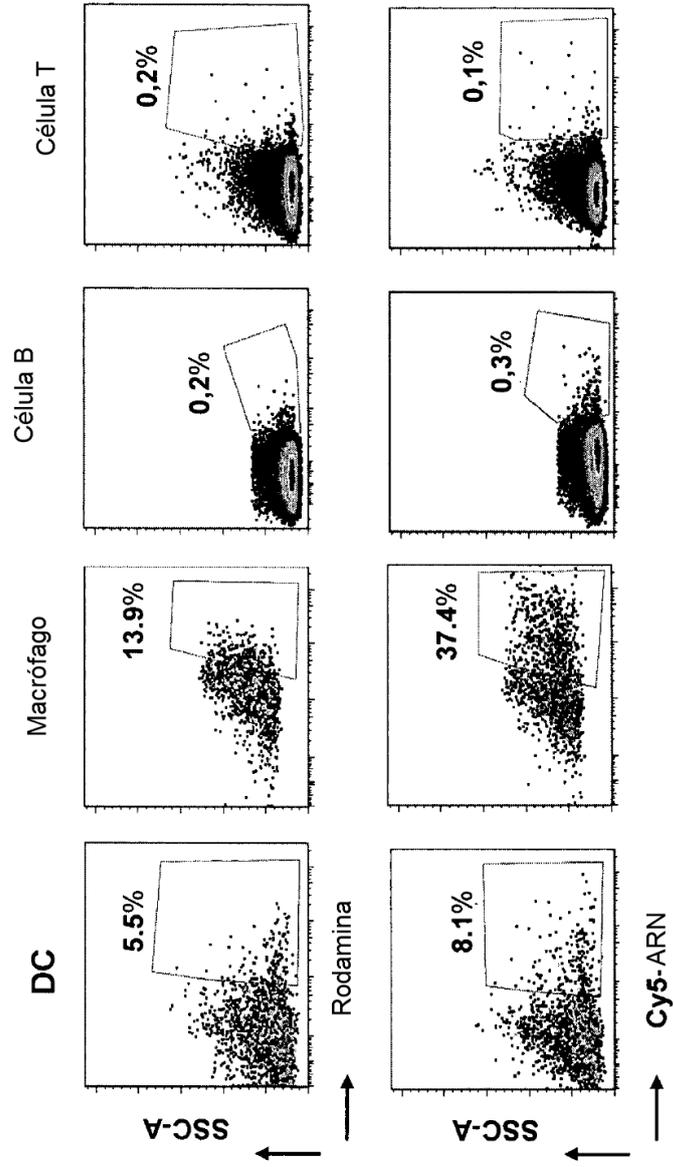


Figura 20

Figura 21

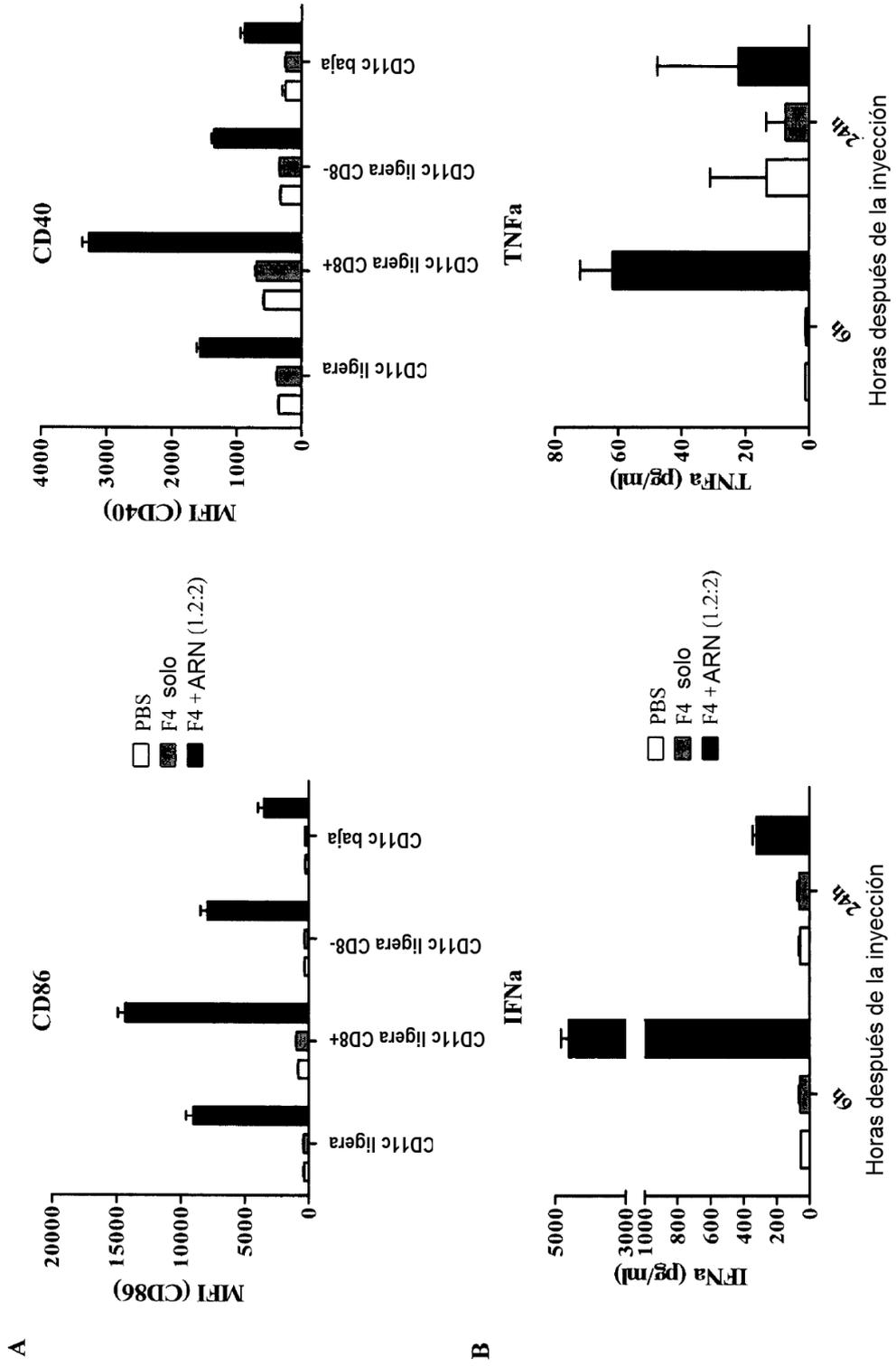


Figura 22

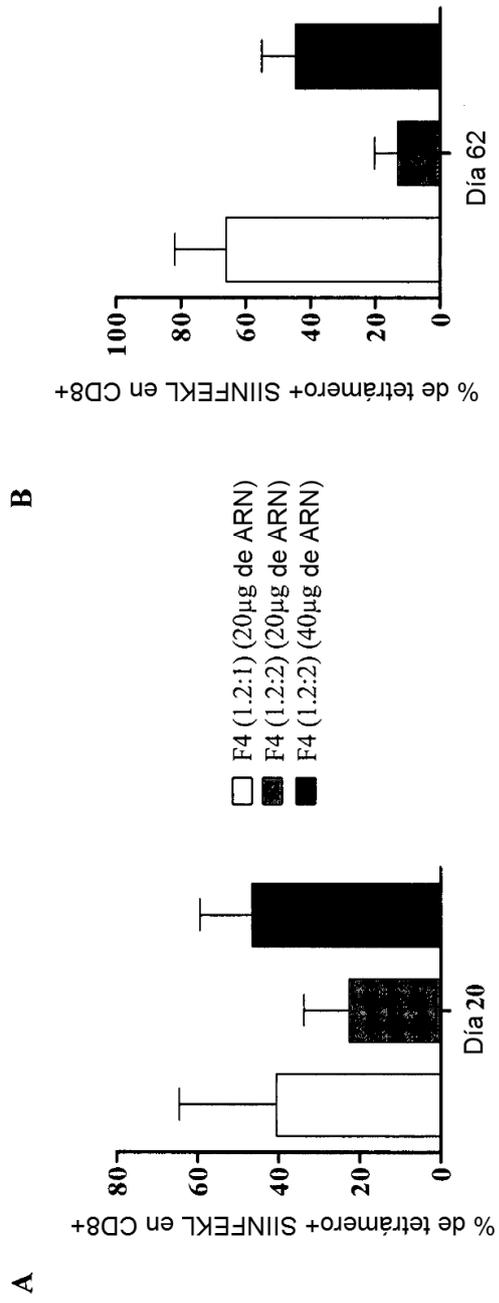


Figura 23

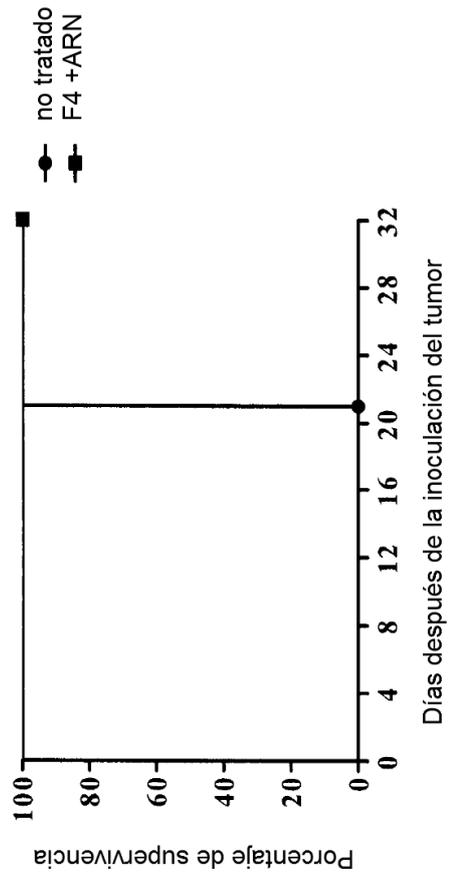


Figura 24

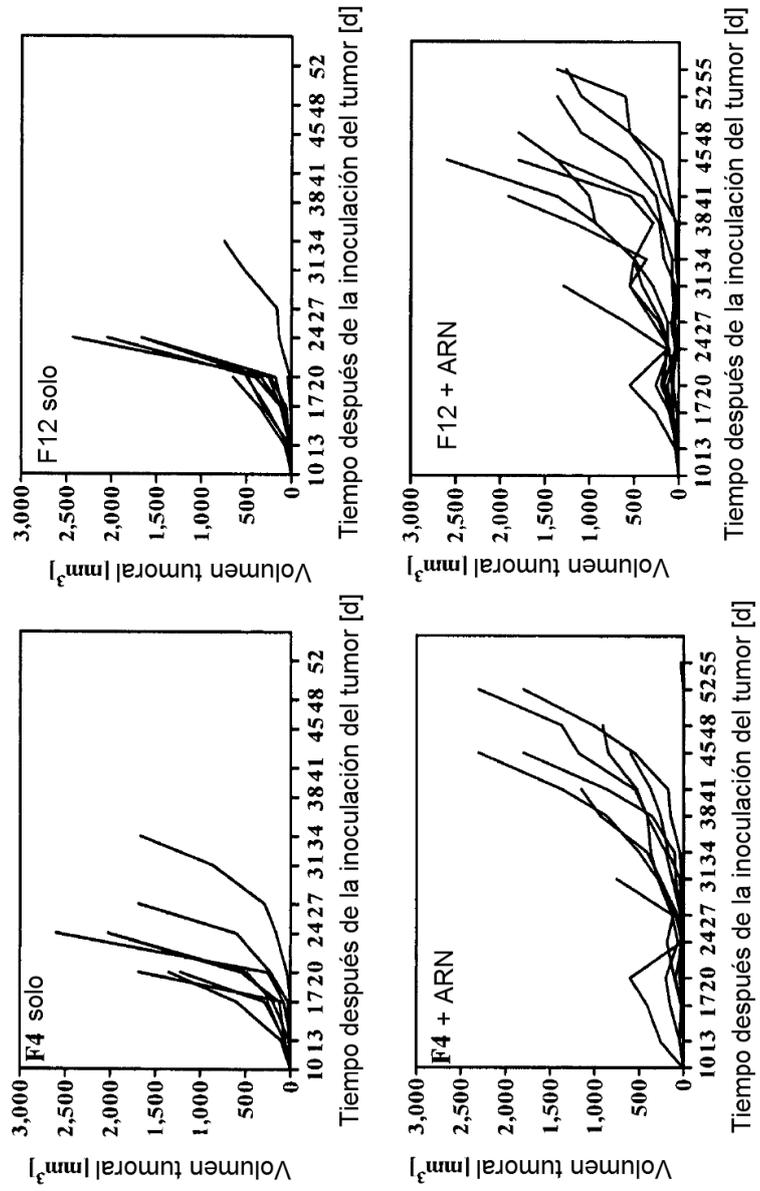


Figura 25

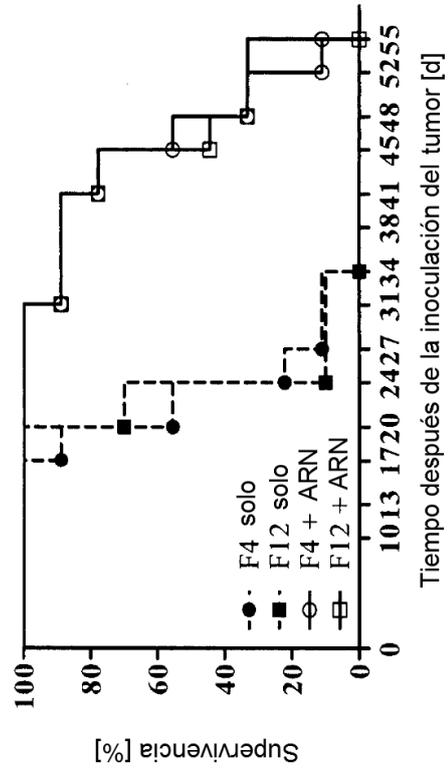
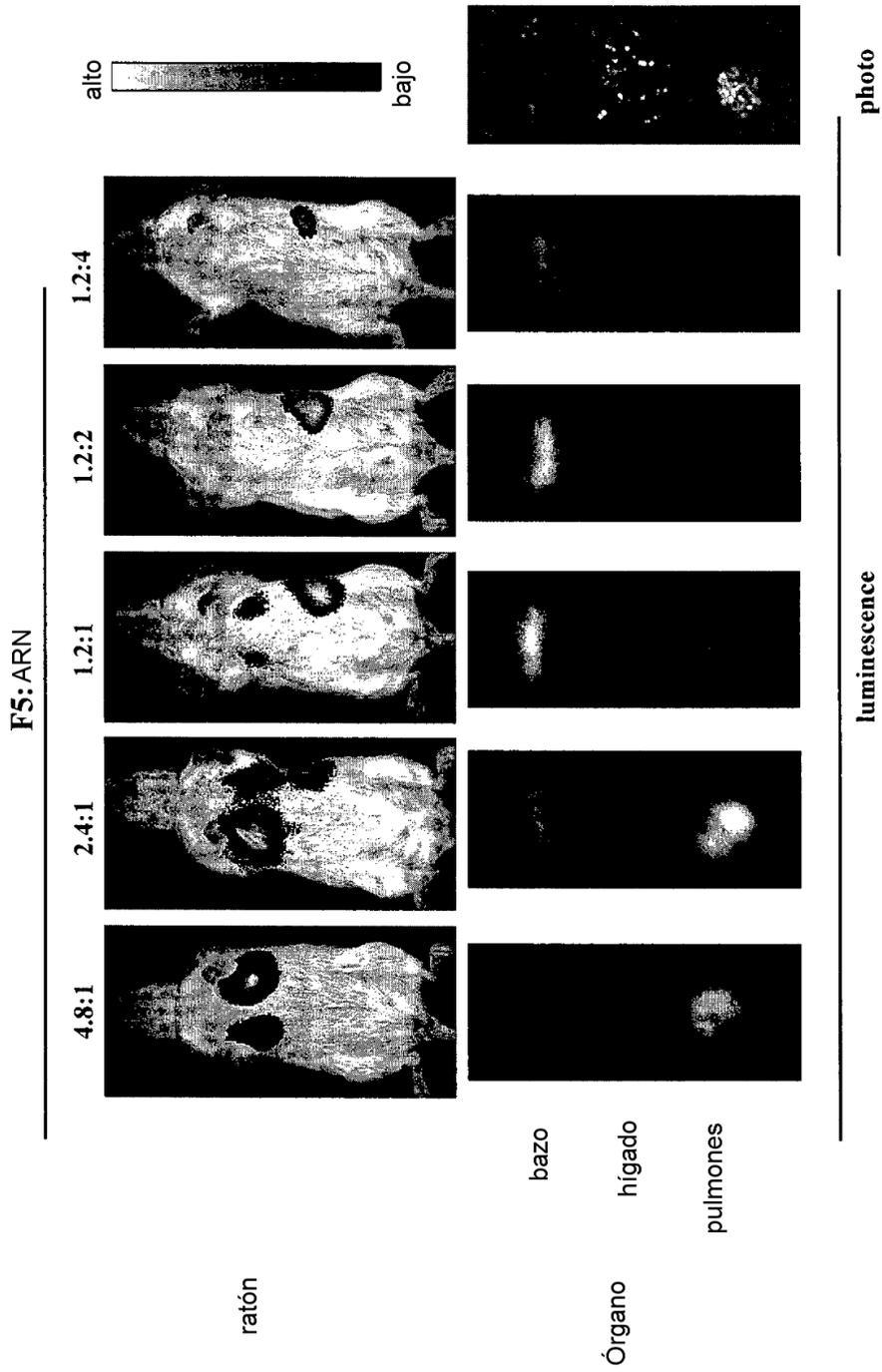


Figura 26



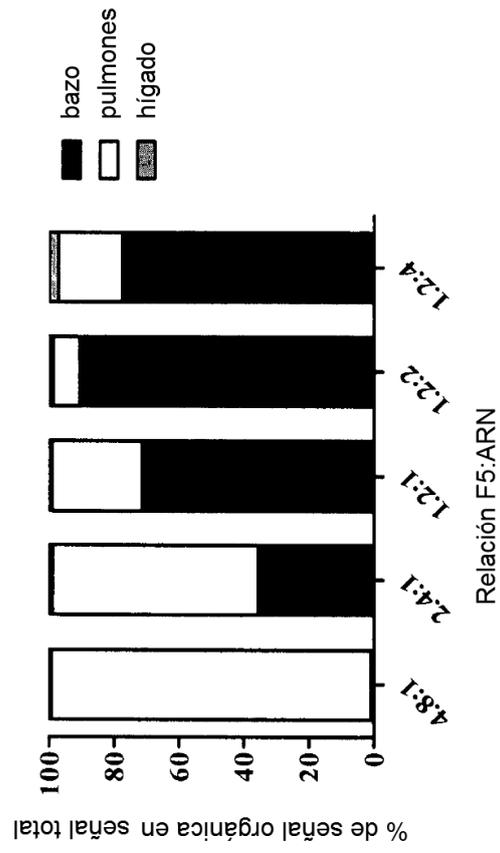


Figura 27

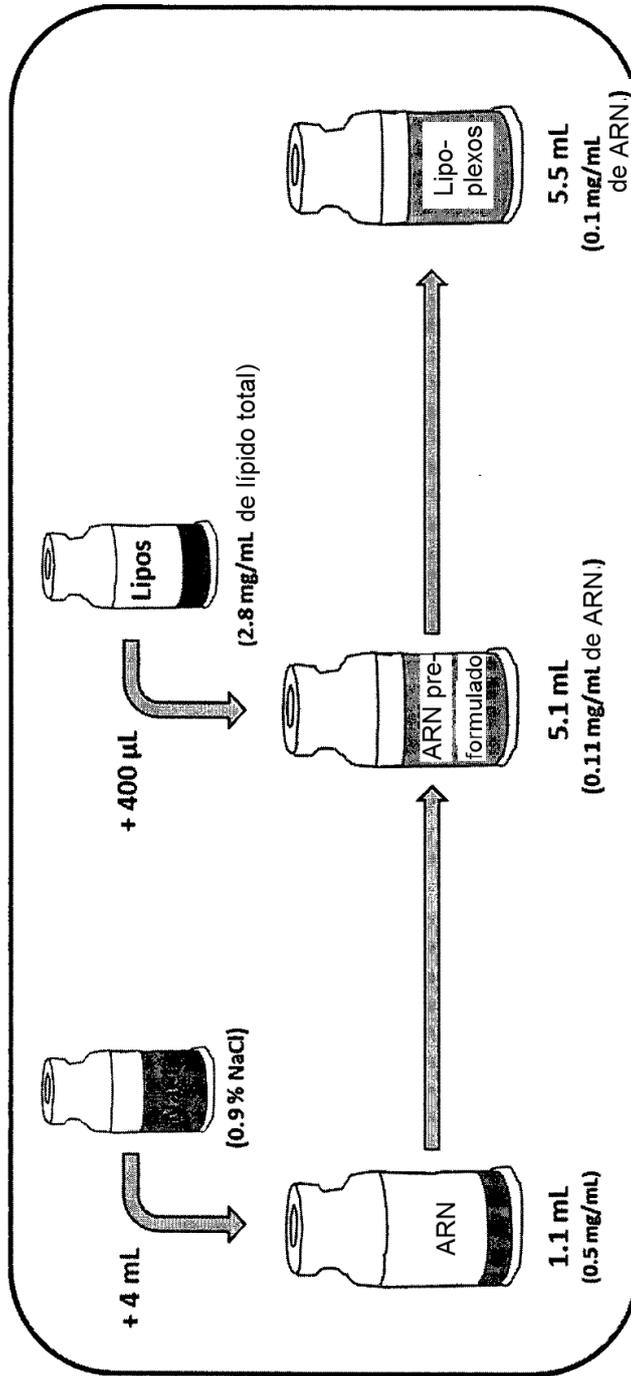


Figura 28

Figura 29

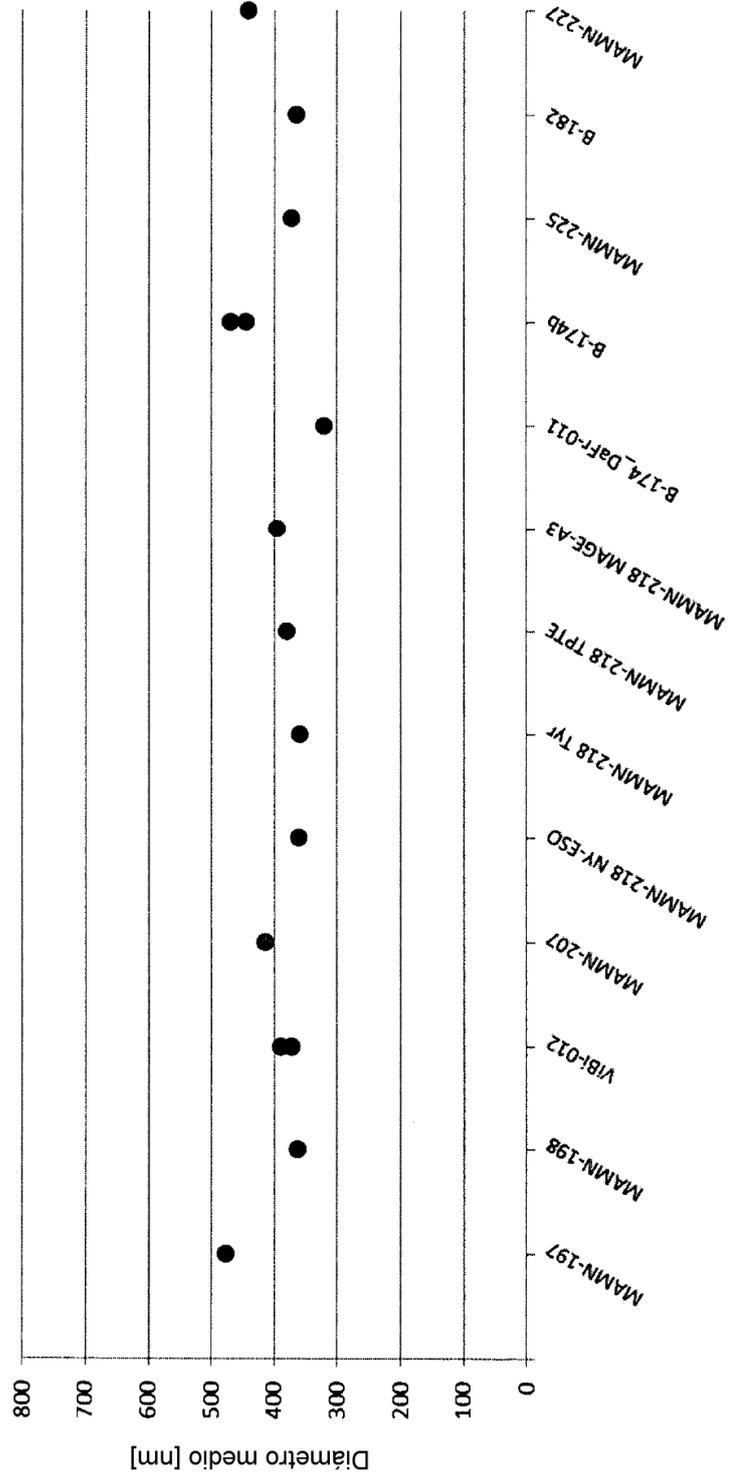
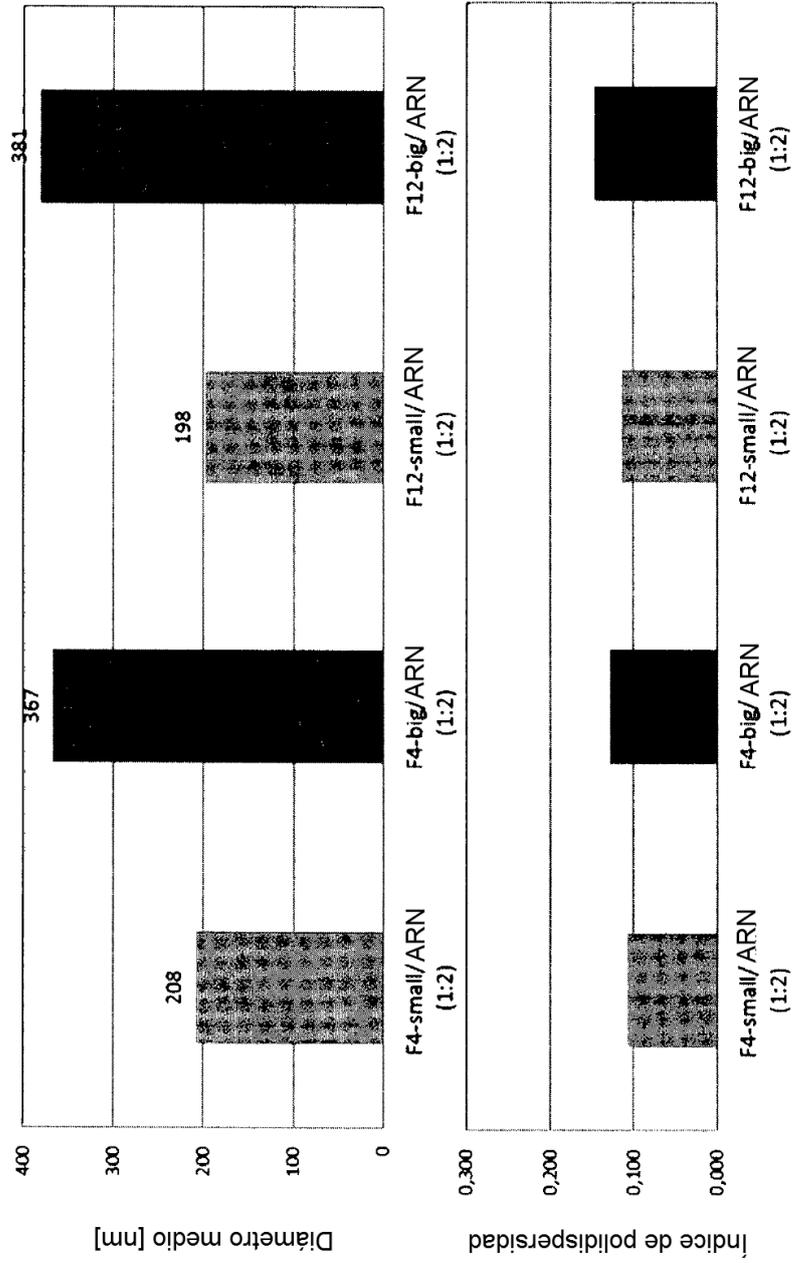


Figura 30



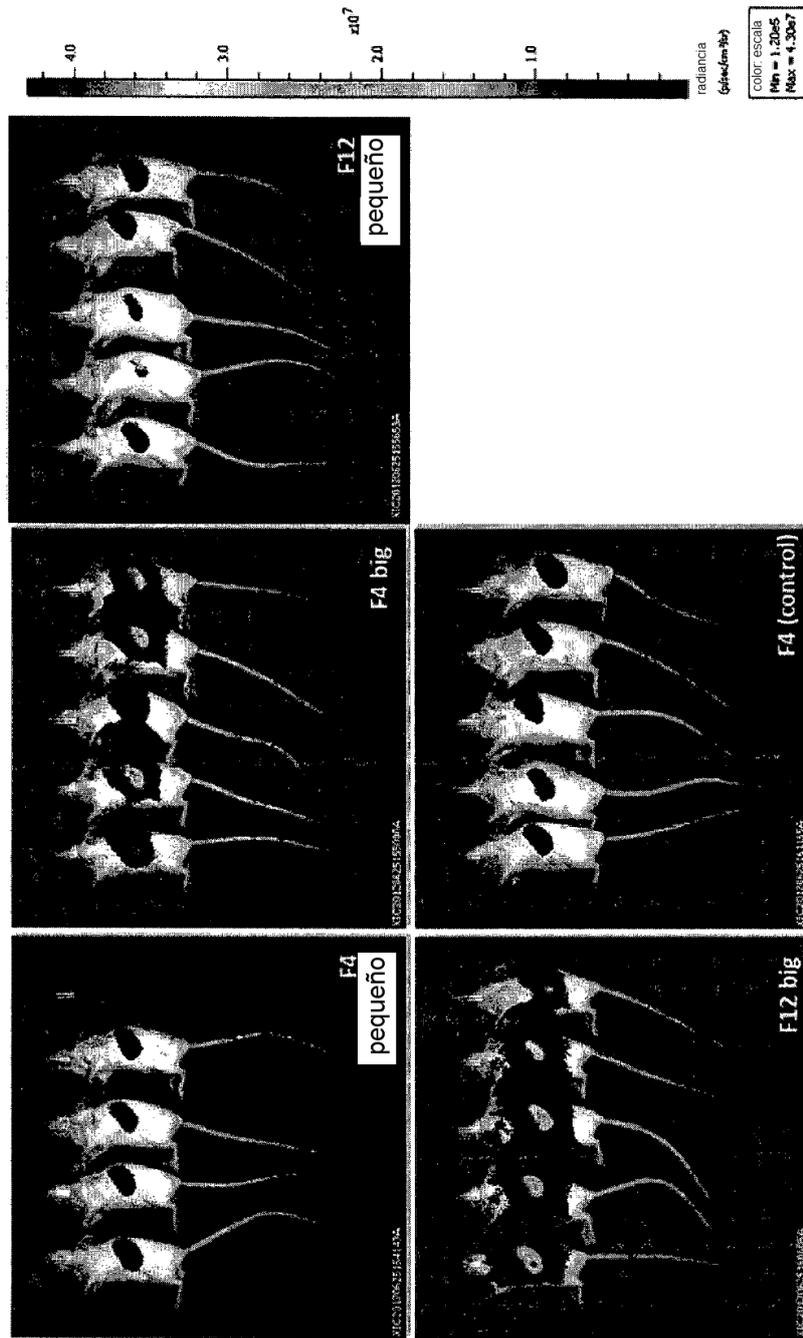
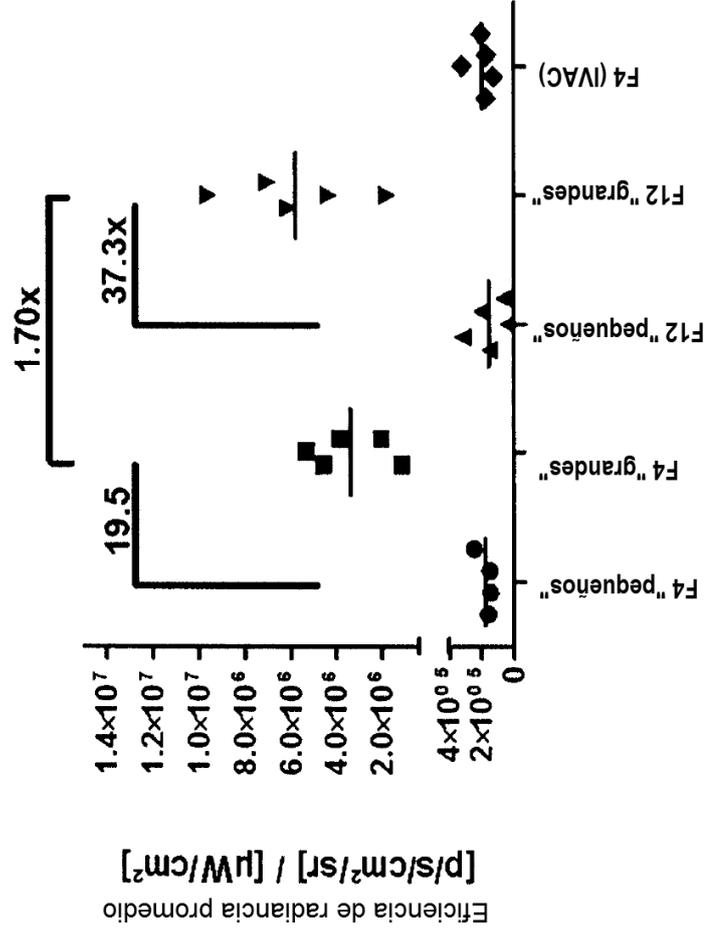


Figura 31

Figura 32



F4 cambio en veces pequeño vs. grande: 19,5

F12 cambio en veces pequeño vs. grande: 37,3

Cambio en veces F4 grande vs. F12 grande: 1,70

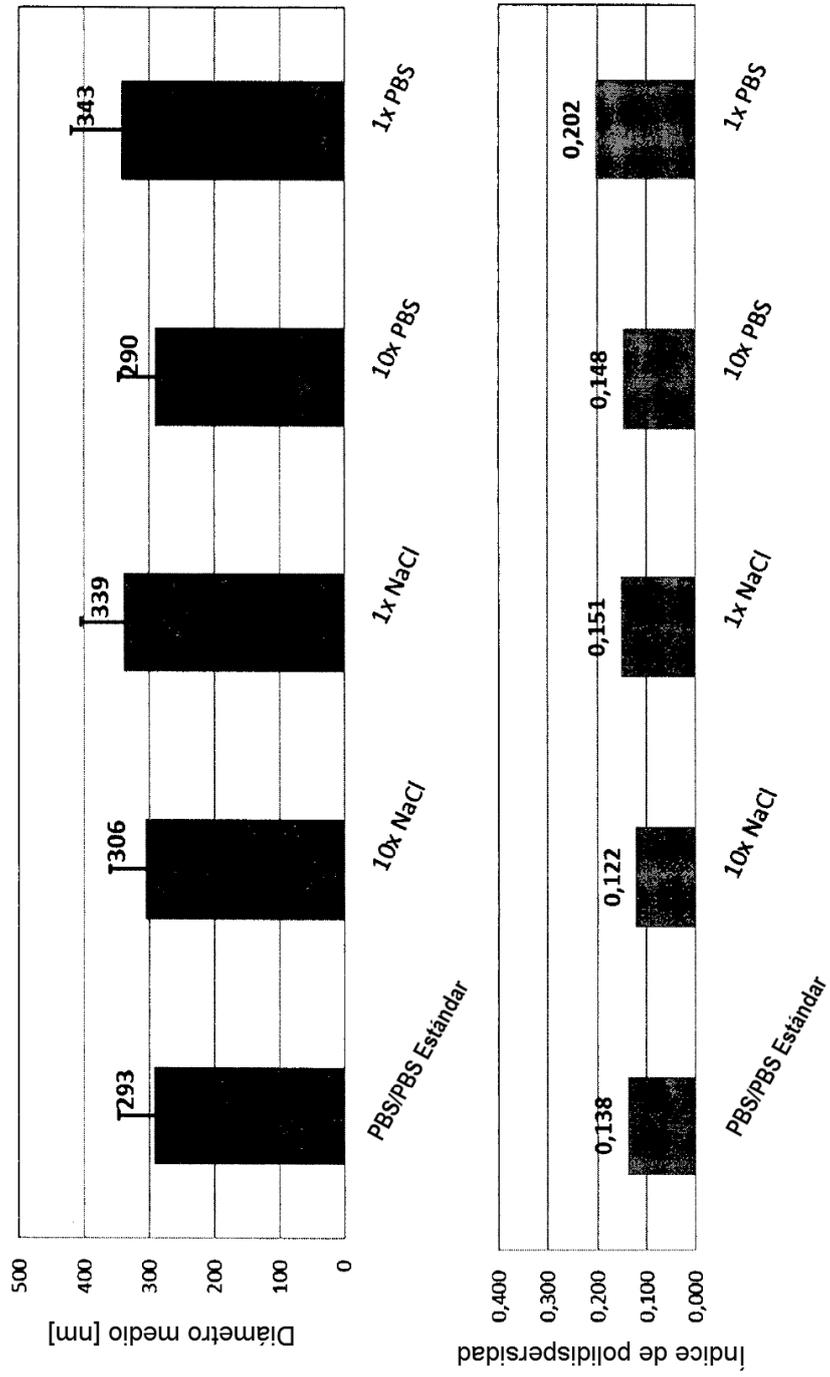


Figura 33

Figura 34

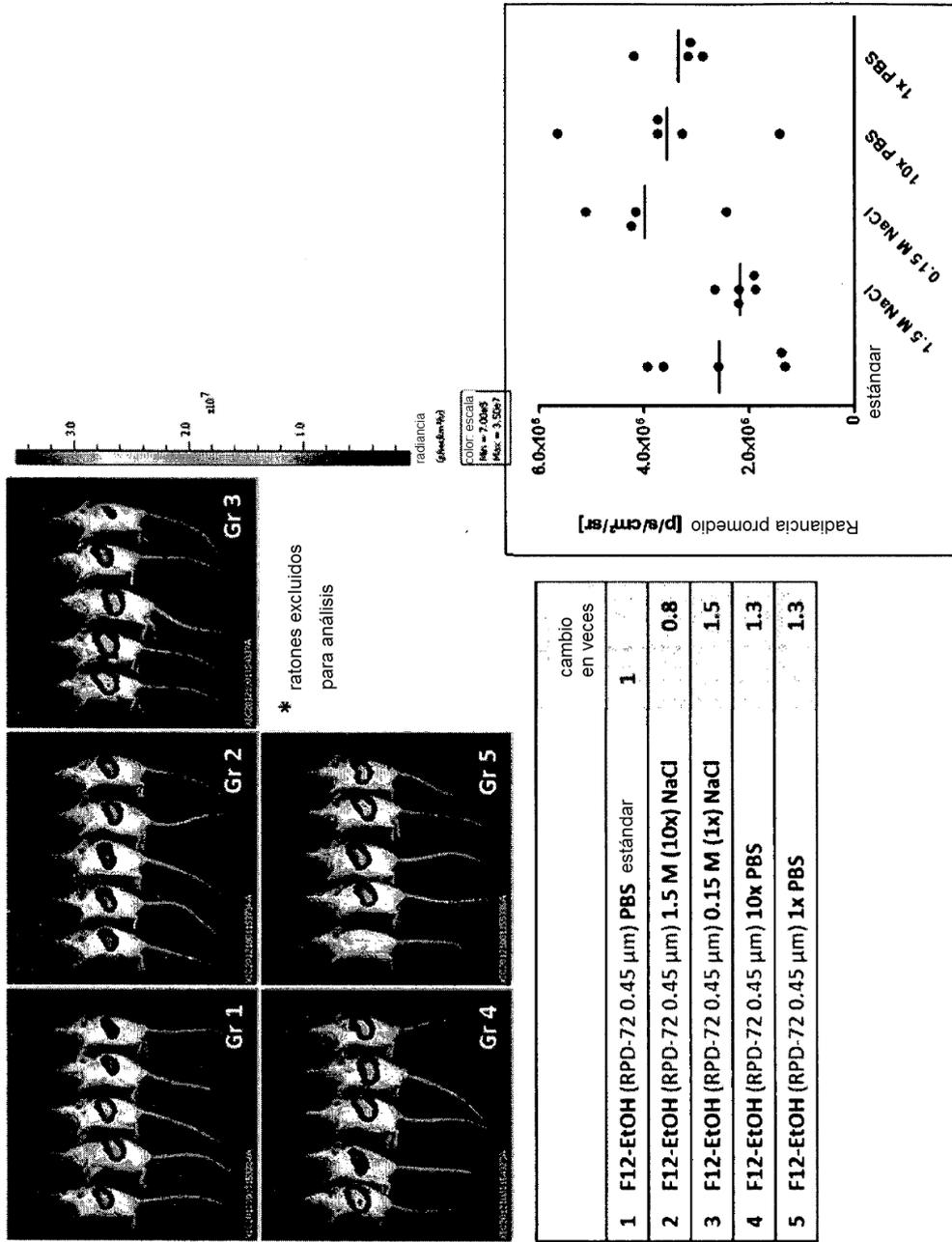


Figura 35

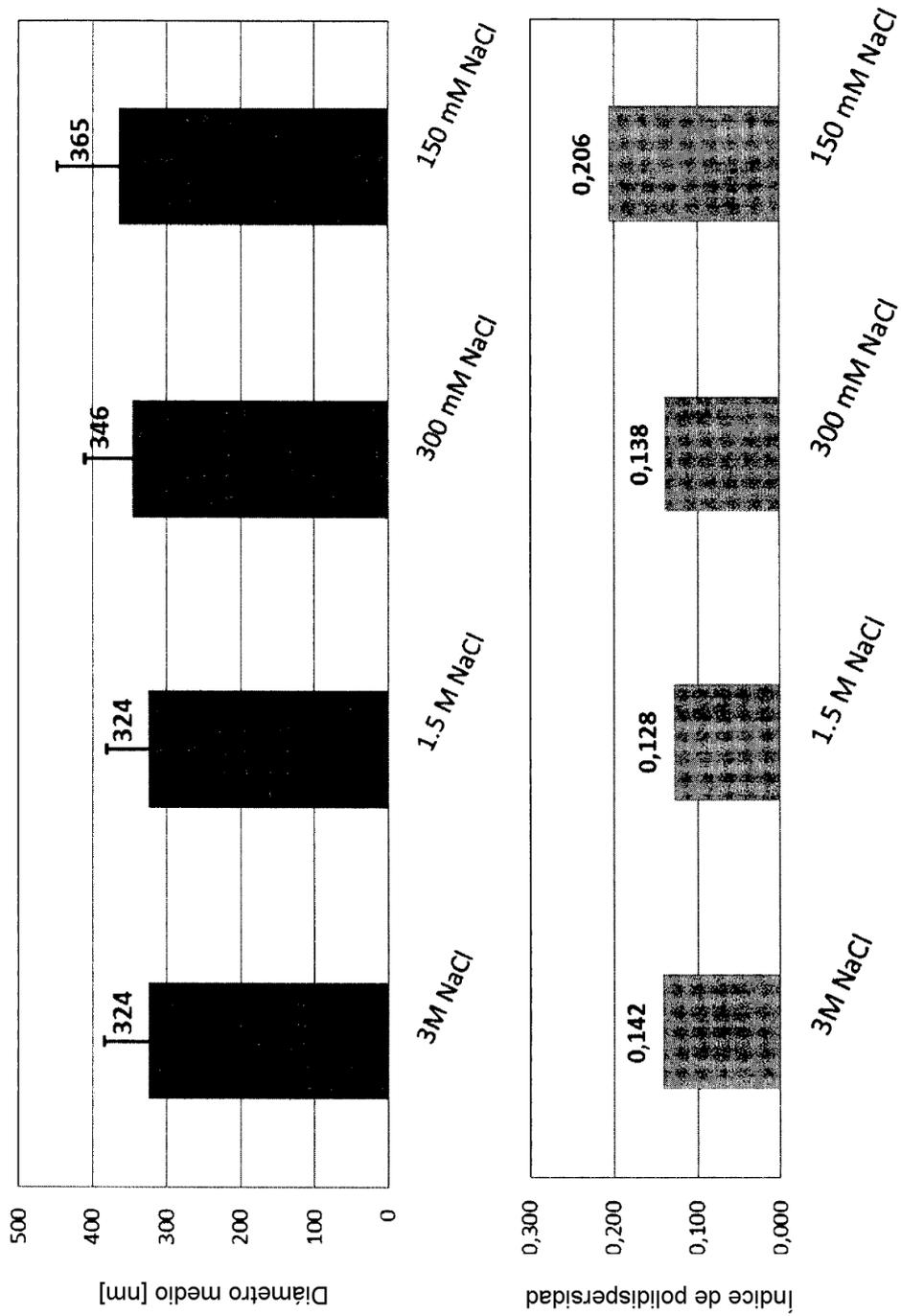
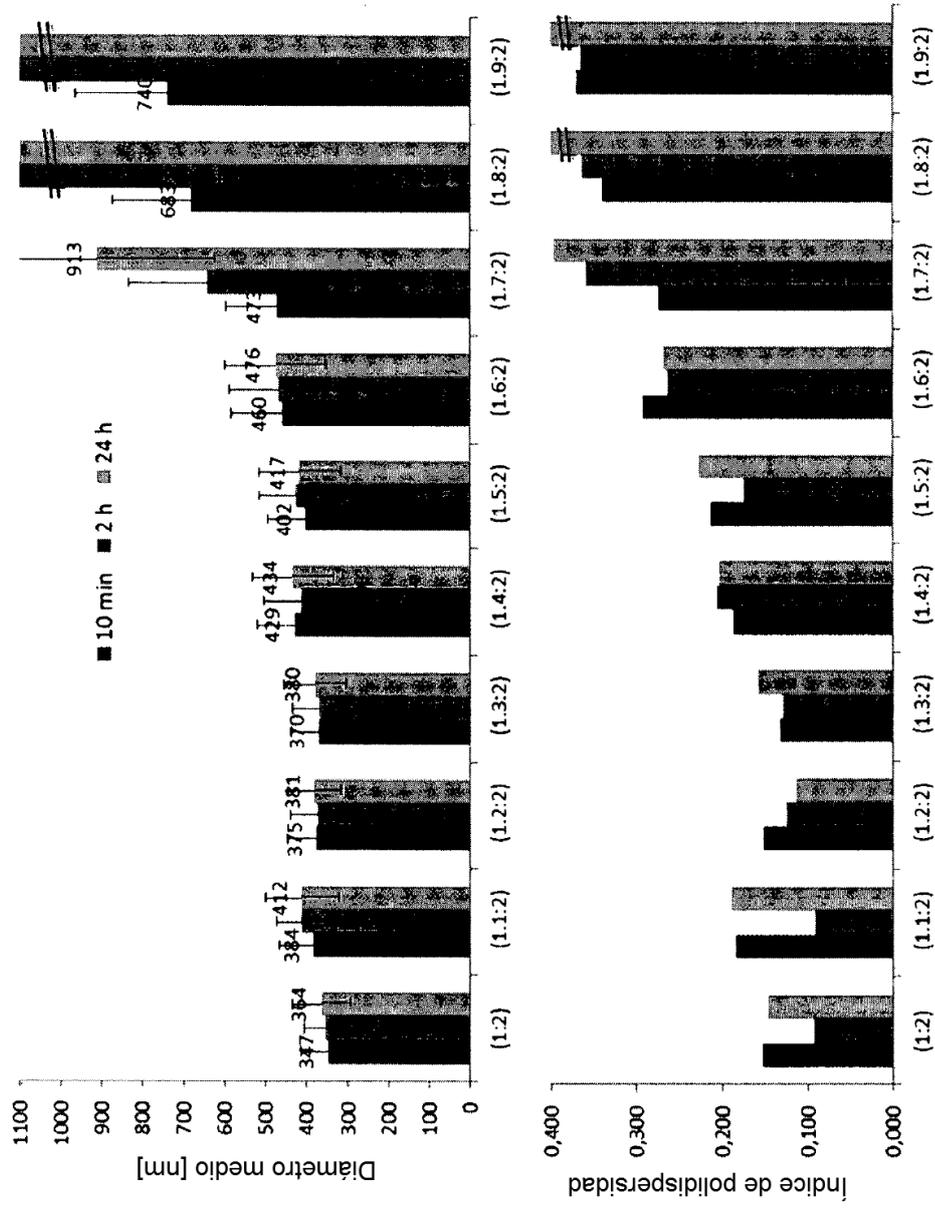


Figura 36



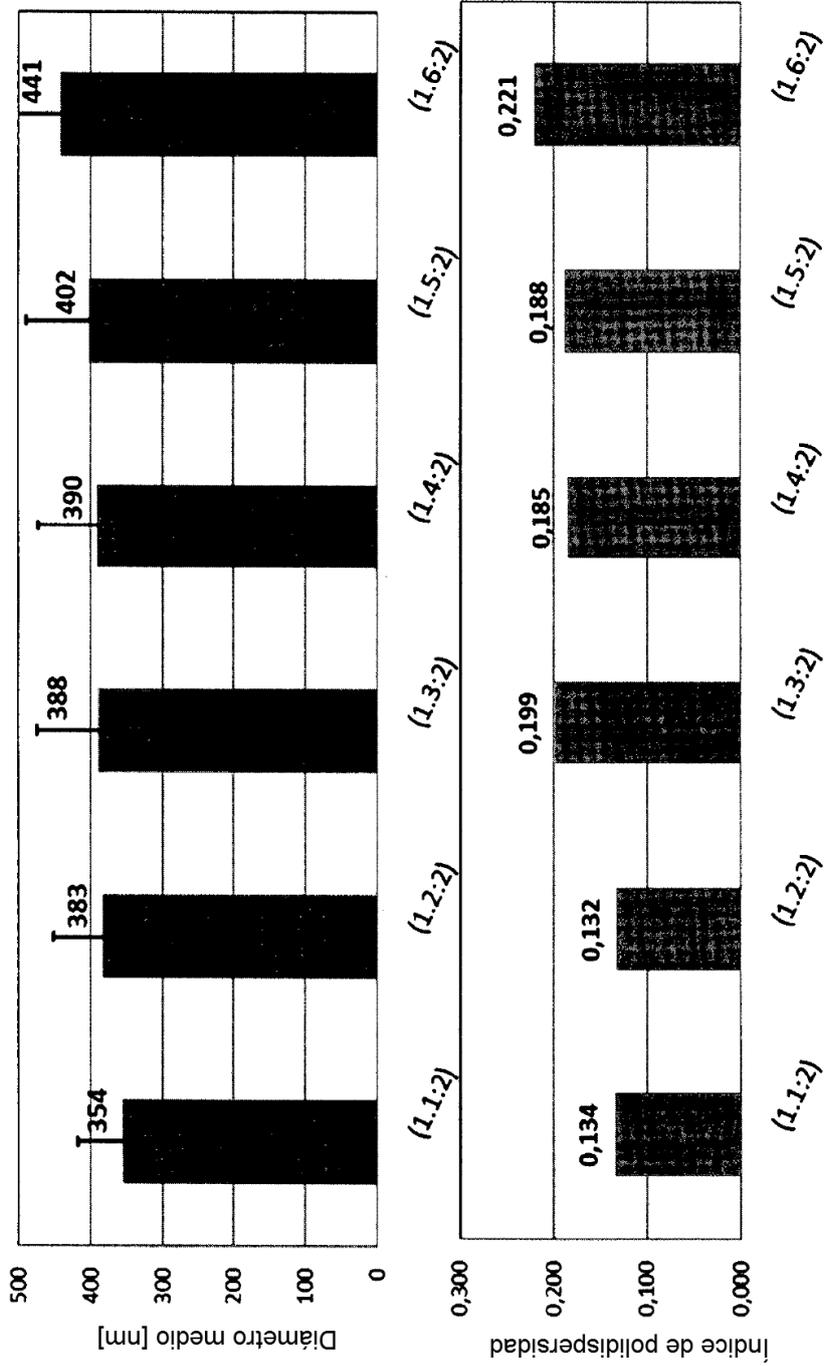


Figura 37

Figura 38

