

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 777**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2015 PCT/EP2015/071344**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16046060**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2015 E 15763367 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3197433**

54 Título: **Formulaciones estables de lípidos y liposomas**

30 Prioridad:
25.09.2014 WO PCT/EP2014/070503

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

73 Titular/es:
**BIONTECH SE (100.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE**

72 Inventor/es:
**HAAS, HEINRICH y
ESPARZA BORQUEZ, ISAAC HERNAN**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 989 777 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

Formulaciones estables de lípidos y liposomas

Campo técnico

5 La presente enseñanza se refiere a formulaciones acuosas de lípidos y/o liposomas con una mayor estabilidad química, a métodos para preparar tales formulaciones acuosas así como a kits que las comprenden. La presente enseñanza se refiere además a métodos para preparar composiciones farmacéuticas basadas en lípidos, a composiciones farmacéuticas preparadas mediante tales métodos y a métodos para estabilizar químicamente formulaciones acuosas de lípidos y/o liposomas.

Antecedentes

10 Los lípidos en el agua pueden existir en diferentes formas de fases laminares o no laminares (por ejemplo, cúbicas o hexagonales), que a menudo se denominan fases lipídicas liotrópicas. Por ejemplo, los liposomas consisten en bicapas lipídicas autocerradas uni o multilamelares dispersas en agua. En términos más generales, pueden considerarse como sistemas coloidales donde los lípidos están organizados en forma lamelar. Muchos de estos sistemas que comprenden fases lipídicas liotrópicas son de interés como
15 formulaciones farmacéuticas para la administración de fármacos u otras aplicaciones. Un requisito para llevar dichos productos farmacéuticos a base de lípidos a la práctica clínica es que se pueda proporcionar una vida útil suficiente después de la fabricación. En este caso, además de otros criterios, la estabilidad química de los lípidos que forman liposomas puede ser un factor limitante. Los liposomas normalmente se ensamblan a partir de fosfolípidos o compuestos relacionados. Los fosfolípidos están formados por ácidos grasos unidos a una
20 cadena principal de triglicéridos mediante enlaces éster. Estos enlaces éster son propensos a la hidrólisis química, que se acelera en condiciones ácidas o básicas (hidrólisis de éster ácida o básica). Si los liposomas u otros sistemas que están presentes como fases lipídicas liotrópicas se van a almacenar durante varios meses o años en la fase acuosa, la hidrólisis del éster puede convertirse en un factor limitante para la estabilidad de la vida útil.

25 En vista de la aceleración de la hidrólisis de ésteres en condiciones ácidas o básicas, normalmente se espera que la mejor estabilidad o la tasa de hidrólisis más baja para los lípidos esté en un rango de pH entre 6 y 7. Otras opciones para prevenir la hidrólisis son la congelación y/o liofilización de los liposomas (Chen et al., 2010; van Winden y Crommelin, 1999; Stark et al., 2010). En la literatura se informan protocolos para la congelación y liofilización de liposomas. Sin embargo, estas etapas técnicas adicionales hacen que la fabricación también
30 sea más complicada y costosa. En muchos casos, es necesario añadir crioprotectores, lo que puede no ser posible o deseable para ciertos productos. Por ejemplo, la presencia de crioprotectores y/o la propia congelación/liofilización pueden afectar las propiedades del producto de forma no deseada. Por lo tanto, la estabilización a largo plazo de preparaciones líquidas de liposomas sigue siendo una necesidad no cubierta. En este contexto, existe un interés considerable en técnicas para minimizar la hidrólisis de liposomas o, más
35 generalmente, lípidos dispersos coloidalmente en la fase líquida (acuosa). Este es particularmente el caso si los liposomas están destinados a ser utilizados como productos farmacéuticos porque en ese caso el método de estabilización debe cumplir los requisitos reglamentarios y tecnológicos para tales productos. Los productos más desafiantes en este contexto son los productos para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa), donde, entre otras cosas, deben cumplirse ciertos criterios relacionados con la esterilidad, la selección de
40 excipientes, las condiciones de iones y pH o la composición de partículas.

La presente enseñanza tiene como objetivo proporcionar métodos y medios para aumentar la estabilidad, particularmente la estabilidad química de lípidos y/o liposomas formulados en formulaciones acuosas, aumentando así la estabilidad durante la vida útil de estas formulaciones.

Resumen de la invención

45 La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. La enseñanza general y sus diversos aspectos y realizaciones en las que se basa la invención se describen a continuación:

Resumen de la Enseñanza

En un primer aspecto, la presente enseñanza se refiere a una formulación acuosa que comprende

50 - al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida, y

- al menos un agente de ajuste del pH,

en el que la formulación acuosa tiene un pH de entre 2 y 5.5.

En una realización, al menos uno de los lípidos presentes en la formulación acuosa es un lípido catiónico. En una realización, el lípido catiónico es un lípido catiónico como se define en el presente documento.

ES 2 989 777 T3

En una realización, la carga neta global de los lípidos presentes en la formulación acuosa es positiva.

En una realización, la formulación acuosa tiene un pH de entre 2 y 5, preferiblemente de entre 2.5 y 5, más preferiblemente de entre 3 y 4.5, más preferiblemente de entre 3 y 4, e incluso más preferiblemente de entre 3.5 y 4.

- 5 En una realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida comprende un glicerolípido y/o un glicerofosfolípido.

En una realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida comprende un lípido catiónico y/o un lípido no catiónico.

- 10 En una realización, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano (DOTAP), 1,2-dioleoiloxi-3-dimetilamoniopropano (DODAP) y análogos de estas moléculas que tienen una composición diferente de la fracción de cadena acilo.

En una realización, el lípido no catiónico es un lípido neutro, en el que, preferiblemente, el lípido neutro se selecciona del grupo que consiste en 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilcolina dimiristoilo (DMPC).

- 15 En una realización, el lípido no catiónico es un lípido aniónico, en el que, preferiblemente, el lípido aniónico se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilglicerol dimiristoilo (DMPG).

En una realización, la formulación acuosa comprende además al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida.

- 20 En una realización, el al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida comprende un lípido catiónico y/o un lípido no catiónico.

En una realización, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamoniopropano (DOTMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), dioctadecildimetilamonio (DODA(Br)/DDAB), cloruro de dioctadecildimetilamonio (DODAC), 1,2-dimiristoiloxipropil-1,3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), Análogos de 2,3-dioleoiloxi-N-[2-(carboxamida de espermina)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato (DOSPA) de estas moléculas que tienen una composición diferente de la fracción de cadena acilo.

- 25 En una realización, el lípido no catiónico es un lípido neutro, en el que, preferiblemente, el lípido neutro se selecciona del grupo que consiste en colesterol (Chol) y esfingomielina (SM).

- 30 En una realización, el lípido no catiónico es un lípido aniónico.

En una realización, la formulación acuosa comprende al menos un lípido catiónico y al menos un lípido no catiónico.

En una realización, la relación molar de el al menos un lípido catiónico con el al menos un lípido no catiónico es de 1:4 a 4:1, preferiblemente de 1:2 a 4:1.

- 35 En una realización, la fracción molar de al menos un lípido catiónico con respecto al lípido total es al menos el 5 %, preferiblemente al menos el 10 %, más preferiblemente al menos el 20 %.

En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH comprende un ácido y/o un tampón ácido.

En una realización, el ácido es un C₁-C₂₈ lineal, ramificado o cíclico, preferiblemente C₁-C₂₂, ácido carboxílico.

- 40 En una realización, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácidos grasos C₁₂-C₂₈ ramificados o no ramificados, saturados, monoinsaturados o poliinsaturados, preferiblemente ácidos grasos C₁₂-C₂₂ (por ejemplo, ácido oleico).

En una realización, el tampón ácido se basa en un ácido como se definió anteriormente.

En una realización, el tampón ácido se selecciona del grupo que consiste en tampón acetato, tampón citrato, tampón fosfato y tampón carbonato.

- 45 En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH comprende ácido acético y/o tampón acetato.

En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH está presente en una cantidad tal que la relación molar de lípido total a al menos un agente de ajuste del pH no excede 100:1.

ES 2 989 777 T3

En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH está presente en una cantidad tal que la relación molar de lípido total a al menos un agente de ajuste del pH es de 10:1 a 1:10, preferiblemente de 5:1 a 1:5, más preferiblemente de 2:1 a 1:2, más preferiblemente de 1.5:1 a 1:1.5, incluso más preferiblemente aproximadamente 1:1.

- 5 En una realización, la velocidad de hidrólisis de al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida se reduce en comparación con su velocidad de hidrólisis a un pH de entre 6 y 7.

En una realización, los lípidos presentes en la formulación acuosa forman liposomas.

En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH está asociado con los liposomas.

- 10 En un aspecto adicional, la presente enseñanza se refiere a un método para preparar una formulación acuosa como se definió anteriormente, el método comprende

– formar los liposomas en una solución acuosa que comprende al menos un agente de ajuste del pH y que tiene un pH de entre 2 y 5.5 o

- 15 – agregar al menos un agente de ajuste del pH a una solución acuosa que comprende liposomas para ajustar el pH de la solución acuosa a un pH de entre 2 y 5.5.

En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un kit que comprende una formulación acuosa como se definió anteriormente.

- 20 En una realización, el kit comprende además, en un recipiente separado, un compuesto farmacéuticamente activo, en el que, preferiblemente, el compuesto farmacéuticamente activo comprende un ácido nucleico, preferiblemente ADN o ARN.

En una realización, el ácido nucleico se proporciona en una solución tamponada que tiene un pH de entre 6 y 8.

En otro aspecto más, la presente enseñanza se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica, el método comprende

- 25 – proporcionar una formulación acuosa como se definió anteriormente; y
– mezclar la formulación acuosa con un compuesto farmacéuticamente activo.

En una realización, el compuesto farmacéuticamente activo comprende un ácido nucleico, preferiblemente ADN o ARN, en el que, preferiblemente, el ácido nucleico se proporciona en una solución tamponada que tiene un pH de entre 6 y 8.

- 30 En un aspecto adicional, la presente enseñanza se refiere a una composición farmacéutica preparada mediante el método definido anteriormente.

En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un método para estabilizar químicamente una formulación acuosa que comprende al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida, el método comprende

- 35 – ajustar el pH de la formulación acuosa a un pH de entre 2 y 5.5.

En una realización, la estabilización química se produce mediante la inhibición del enlace éster, el enlace tioéster y/o la hidrólisis del enlace amida.

En una realización, al menos uno de los lípidos presentes en la formulación acuosa es un lípido catiónico. En una realización, el lípido catiónico es como se definió anteriormente.

- 40 En una realización, la carga neta total de los lípidos presentes en la formulación acuosa es positiva.

En una realización, el pH se ajusta a un pH de entre 2 y 5, preferiblemente de entre 2.5 y 5, más preferiblemente de entre 3 y 4.5, más preferiblemente de entre 3 y 4, e incluso más preferiblemente de entre 3.5 y 4.

En una realización, el pH de la formulación lipídica acuosa se ajusta añadiendo al menos un agente de ajuste de pH, preferiblemente al menos un agente de ajuste de pH como se definió anteriormente.

- 45 En una realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida es como se definió anteriormente.

En una realización, los lípidos presentes en la formulación acuosa forman liposomas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra el porcentaje de DOPE recuperado de dispersiones de liposomas DOTMA/DOPE preparadas en soluciones de dispersión que tienen diferentes valores de pH. La dispersión de liposomas se almacenó a 37 °C y se tomaron muestras en diversos momentos.

5 Figura 2 muestra el porcentaje de DOPE recuperado de dispersiones de liposomas DOTMA/DOPE con diferentes valores de pH preparados en presencia de ácido acético (HAc) o varias concentraciones de tampones de ácido acético (AcB). La dispersión se almacenó durante 5 semanas a 40 °C.

Figura 3 muestra el porcentaje de DOPE recuperado de dispersiones de liposomas DOTMA/DOPE estresadas después de 5 o 6 semanas en función del valor de pH. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes.

10 Figura 4 muestra el porcentaje de recuperación de lípidos de liposomas DOTAP/DOPE después de 2 semanas a 40 °C en función del valor de pH.

Figura 5 muestra el porcentaje de recuperación de DOPE de liposomas DOTMA/DOPE en agua para inyección con o sin ácido acético (HAc) 5 mM después de almacenamiento durante 3 meses a 5 °C, 25 °C o 40 °C.

15 Figura 6 muestra las señales de bioluminiscencia en ratones inyectados con lipoplex de ARN que codifican luciferasa preparados con liposomas estabilizados con pH o liposomas no estabilizados con pH (estándar).

Figura 7 muestra la estabilidad de DOPE en liposomas DOTMA/DOPE en agua para inyección (L1) o en agua para inyección con ácido acético 5 mM (L2) a 5 °C (A), 25 °C (B) o 40 °C (C). Los liposomas se prepararon en condiciones GMP o similares a GMP.

Descripción detallada

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

30 A continuación se describirán los elementos de la presente enseñanza. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas; sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los diversos ejemplos descritos y las realizaciones preferidas no deben interpretarse como que limitan la presente enseñanza sólo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción respalda y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse divulgada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

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

40 La práctica de la presente enseñanza empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el 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).

45 A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un miembro, número entero o etapa o grupo indicado de miembros, enteros o pasos pero sin la exclusión de cualquier otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o pasos aunque en algunas realizaciones dicho otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o pasos pueden excluirse, es decir la materia consiste en la inclusión de un miembro, número entero o etapa determinado o grupo de miembros, números enteros o pasos. Los términos "un" y "una" y "el" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la enseñanza (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, o claramente contradicha por el contexto. La enumeración de rangos de valores en este documento simplemente pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se enumerara individualmente en este documento.

50

55

55 Los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y

cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "como"), proporcionados en este documento tiene como objetivo simplemente ilustrar mejor la enseñanza y no plantea una limitación en el alcance de la enseñanza reivindicada. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la enseñanza.

- 5 La presente enseñanza proporciona una formulación acuosa que comprende
- al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida, preferiblemente enlaces éster, y
 - al menos un agente de ajuste del pH,
- en el que la formulación acuosa tiene un pH de entre 2 y 5.5.
- 10 La formulación acuosa de acuerdo con la presente enseñanza (que también puede denominarse dispersión lipídica acuosa) se caracteriza por una estabilidad química aumentada, más particularmente por una estabilidad química aumentada del al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados entre los grupo formado por enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida, preferentemente enlaces éster. En una realización, la velocidad de hidrólisis de al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste
- 15 en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida, preferiblemente enlaces éster, se reduce en comparación con su velocidad de hidrólisis a un pH de entre 6 y 7. En una realización, la velocidad de hidrólisis se reduce en al menos un factor 1.5, preferiblemente en al menos un factor 2, más preferiblemente en al menos un factor 3, incluso más preferiblemente en al menos un factor 4.
- En una realización, la formulación acuosa tiene un pH de entre 2 y 5, preferiblemente de entre 2.5 y 5, más
- 20 preferiblemente de entre 3 y 4.5, más preferiblemente de entre 3 y 4, e incluso más preferiblemente de entre 3.5 y 4. En otra realización preferida, la formulación acuosa tiene un pH de entre 3.1 y 3.9.
- El término "lípido", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula anfífilica que comprende una fracción hidrófila (por ejemplo, un grupo de cabeza polar) y una fracción lipófila o hidrófoba. La fracción lipófila o hidrófoba puede comprender al menos una fracción de ácido graso saturado o insaturado,
- 25 ramificado o lineal, o un derivado o análogo del mismo (por ejemplo, un fluorocarbono). Una fracción de ácido graso consiste esencialmente en una fracción/cadena de hidrocarburo, particularmente una cadena de acilo. Preferiblemente, la fracción de ácido graso o su derivado o análogo tiene una longitud de 10 a 30, más preferiblemente de 12 a 25, incluso más preferiblemente de 14 a 22 átomos de carbono. En caso de que el lípido comprenda más de uno, por ejemplo, dos o tres, fracciones de ácidos grasos o derivados o análogos de
- 30 los mismos, estas fracciones de ácidos grasos o derivados o análogos de los mismos pueden ser iguales o diferentes. El término "lípido" comprende lípidos catiónicos y lípidos no catiónicos, es decir, lípidos neutros o aniónicos. Los lípidos pueden incluir fosfolípidos o derivados de los mismos, glicerolípidos o derivados de los mismos, esfingolípidos (por ejemplo, esfingomielina) o derivados de los mismos, o lípidos esteroides (por ejemplo, colesterol) o derivados de los mismos. Los glicerolípidos están compuestos de glicerol que están
- 35 mono, di o trisustituídos con fracciones de ácidos grasos. Los fosfolípidos, cuya fracción hidrófila comprende un grupo fosfato, pueden ser glicerofosfolípidos. Preferiblemente, los lípidos usados de acuerdo con la presente enseñanza son lípidos formadores de bicapas. Los lípidos también pueden funcionalizarse/modificarse, por ejemplo, con (oligo)péptidos, polímeros (por ejemplo, PEG) u otros grupos funcionales. En un medio acuoso, los lípidos pueden además organizarse supramolecularmente, por ejemplo, en forma de partículas basadas en
- 40 lípidos o fases liotrópicas, tales como liposomas, fases laminares, fases hexagonales y hexagonales inversas, fases cúbicas, micelas y micelas inversas compuestas de monocapas. El efecto de estabilización de acuerdo con la presente enseñanza se aplica a todos los tipos de organización lipídica supramolecular. Preferiblemente, los lípidos usados de acuerdo con la presente enseñanza son farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, adecuados como excipientes, como componentes para formulaciones de administración de fármacos y/o para
- 45 uso en la transfección de ácidos nucleicos en células.
- Si la presente divulgación se refiere a una carga tal como una carga positiva, una carga negativa o una carga neutra o a un compuesto catiónico, un compuesto negativo o un compuesto neutro, esto generalmente significa que la carga mencionada está presente a un pH seleccionado, tal como un pH fisiológico. Por ejemplo, el
- 50 término "lípido catiónico" se refiere a un lípido que tiene una carga neta positiva a un pH seleccionado, tal como un pH fisiológico. El término "lípido neutro" se refiere a un lípido que no tiene carga neta positiva o negativa, que puede estar presente en forma de una molécula sin carga o una molécula anfótera (o zwitteriónica) neutra a un pH seleccionado, tal como un pH fisiológico. Por "pH fisiológico" en el presente documento se entiende un pH de entre 6 y 8, preferiblemente de entre 6.5 y 8, más preferiblemente de aproximadamente 7.5.
- Un lípido catiónico comprende preferiblemente un grupo de cabeza catiónico. El grupo polar de la cabeza de
- 55 los lípidos catiónicos preferiblemente comprende derivados de amina tales como aminas primarias, secundarias y/o terciarias, amonio cuaternario, varias combinaciones de aminas, sales de amidinio, o grupos de guanidina y/o imidazol, así como grupos de cabeza de piridinio, piperizina y aminoácidos como lisina, arginina, ornitina y/o triptófano. Más preferiblemente, el grupo de cabeza polar del lípido catiónico comprende derivados de

amina. Más preferiblemente, el grupo de cabeza polar del lípido catiónico comprende un amonio cuaternario. El grupo de cabeza del lípido catiónico puede comprender una única carga catiónica o múltiples cargas catiónicas.

5 Un lípido aniónico comprende preferiblemente un grupo de cabeza aniónico, tal como un grupo fosfato. El grupo de cabeza del lípido aniónico puede comprender una única carga aniónica o múltiples cargas aniónicas.

En una realización, al menos uno de los lípidos presentes en la formulación acuosa es un lípido catiónico, preferiblemente un lípido catiónico como se define en el presente documento.

En una realización, la carga neta global de los lípidos presentes en la formulación acuosa es positiva.

10 El término "carga neta global", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la suma de las cargas netas de todos los lípidos presentes en la formulación acuosa.

En una realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida comprende un glicerolípido y/o un glicerofosfolípido.

15 En una realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida es un glicerolípido. En otra realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida es un glicerofosfolípido. En otra realización más, la formulación acuosa comprende al menos dos lípidos que tienen uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida, en el que los al menos dos lípidos comprenden un glicerolípido y un glicerofosfolípido.

20 En una realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida comprende un lípido catiónico y/o un lípido no catiónico.

25 En una realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida es un lípido catiónico. En otra realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida es un lípido no catiónico. En otra realización más, la formulación acuosa comprende al menos dos lípidos que tienen uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida, en el que los al menos dos lípidos comprenden un lípido catiónico y un lípido no catiónico.

30 En una realización, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano (DOTAP), 1,2-dioleoiloxi-3-dimetilamoniopropano (DODAP) y análogos de estas moléculas que tienen una composición diferente de la fracción de la cadena acilo.

En una realización, el lípido no catiónico es un lípido neutro, en el que, preferiblemente, el lípido neutro se selecciona del grupo que consiste en 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilcolina dimiristoilo (DMPC).

35 En una realización, el lípido no catiónico es un lípido aniónico, en el que, preferiblemente, el lípido aniónico se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilglicerol dimiristoilo (DMPG).

En una realización, la formulación acuosa comprende además al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida. En una realización, la formulación acuosa comprende además al menos un lípido que no tiene ningún enlace éster.

40 En una realización, el al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida comprende un glicerolípido y/o un glicerofosfolípido.

45 En una realización, el al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida es un glicerolípido. En otra realización, el al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida es un glicerofosfolípido. En otra realización más, la formulación acuosa comprende al menos dos lípidos que no tienen enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida, en el que los al menos dos lípidos comprenden un glicerolípido y un glicerofosfolípido.

En una realización, el al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida comprende un lípido catiónico y/o un lípido no catiónico.

50 En una realización, el al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida es un lípido catiónico. En otra realización, el al menos un lípido que no tiene enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida es un lípido no catiónico. En otra realización más, la formulación acuosa comprende al menos dos lípidos que no tienen enlaces éster, enlaces tioéster o enlaces amida, en el que los al menos dos lípidos comprenden un lípido catiónico y un lípido no catiónico.

- 5 En una realización, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamoniopropano (DOTMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), dioctadecildimetilamonio (DODA(Br)/DDAB), cloruro de dioctadecildimetilamonio (DODAC), 1,2-dimiristoiloxipropil-1,3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), análogos de 2,3-dioleiloxi-N-[2-(carboxamida de espermina)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato (DOSPA) de estas moléculas que tienen una composición diferente de la parte de la cadena acilo.
- En una realización, el lípido no catiónico es un lípido neutro, en el que, preferiblemente, el lípido neutro se selecciona del grupo que consiste en colesterol (Chol) y esfingomielina (SM).
- En una realización, el lípido no catiónico es un lípido aniónico.
- 10 En una realización, la formulación acuosa comprende al menos un lípido catiónico y al menos un lípido no catiónico, preferiblemente al menos un lípido catiónico y al menos un lípido neutro.
- En una realización, la formulación acuosa comprende DOTMA y DOPE. En otra realización, la formulación acuosa comprende DOTAP y DOPE.
- 15 En una realización, el lípido no catiónico, es decir, neutro o aniónico, preferiblemente neutro, funciona como un "lípido auxiliar". El término "lípido auxiliar" se refiere a un lípido capaz de aumentar la eficacia del suministro de partículas basadas en lípidos (por ejemplo, liposomas) a un objetivo, preferiblemente a una célula.
- En una realización, la relación molar de el al menos un lípido catiónico con el al menos un lípido no catiónico es de 4:1 a 1:4, preferiblemente de 1:2 a 4:1.
- 20 En una realización, la fracción molar del al menos un lípido catiónico con respecto al lípido total es al menos 5 %, preferiblemente al menos 10 %, más preferiblemente al menos 20 %.
- El término "agente de ajuste del pH", como se usa en el presente documento, pretende referirse a cualquier agente activo del pH que pueda usarse para modificar el valor del pH de una solución (acuosa) e incluye agentes acidificantes y alcalinizantes. Los agentes acidificantes se utilizan para reducir el pH, mientras que los agentes alcalinizantes se utilizan para aumentar el pH. Preferiblemente, el agente de ajuste del pH de acuerdo con la presente enseñanza es un agente acidificante.
- 25 En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH comprende un ácido y/o un tampón ácido.
- En una realización, el ácido es un ácido carboxílico lineal, ramificado o cíclico de C₁-C₂₈, preferiblemente de C₁-C₂₂.
- 30 En una realización, el ácido es seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácidos grasos C₁₂-C₂₈ ramificados o no ramificados, saturados, monoinsaturados o poliinsaturados, preferiblemente ácidos grasos C₁₂-C₂₂ (por ejemplo, ácido oleico).
- En una realización, el tampón ácido se basa en un ácido como se definió anteriormente.
- En una realización, el tampón ácido se selecciona del grupo que consiste en tampón acetato, tampón citrato, tampón fosfato y tampón carbonato.
- 35 En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH comprende ácido acético y/o tampón acetato.
- En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH está presente en una cantidad tal que la relación molar de lípido total con el al menos un agente de ajuste del pH no excede 100:1.
- 40 En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH está presente en una cantidad tal que la relación molar de lípido total al al menos un agente de ajuste del pH es de 10:1 a 1:10, preferiblemente de 5:1 a 1:5, más preferiblemente de 2:1 a 1:2, más preferiblemente de 1.5:1 a 1:1.5, incluso más preferiblemente aproximadamente 1:1.
- En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH está presente en una concentración de 1 mM a 10 mM.
- 45 En una realización, los lípidos presentes en la formulación acuosa forman partículas basadas en lípidos, tales como liposomas. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la formulación acuosa es una dispersión de liposomas acuosa. En una realización, la carga neta global de los lípidos que forman los liposomas es positiva. En una realización, los liposomas son liposomas catiónicos.
- 50 El término "liposoma", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una vesícula lipídica microscópica que a menudo tiene una o más bicapas de un lípido formador de vesículas, tal como un fosfolípido, y que es capaz de encapsular un fármaco. Se pueden emplear diferentes tipos de liposomas en el contexto de

- la presente enseñanza, incluyendo, sin limitarse a ellos, vesículas multilaminares (MLV), pequeñas vesículas unilaminares (SUV), grandes vesículas unilaminares (LUV), liposomas estéricamente estabilizados (SSL), liposomas multivesiculares, vesículas (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.
- 5 En una realización, los liposomas tienen un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 1000 nm, preferiblemente de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 800 nm, preferiblemente de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 600 nm, tal como de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm.
- 10 Los liposomas se pueden formar usando métodos estándar, 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. Preferiblemente, los liposomas se forman usando el método de inyección de etanol.
- El término “método de inyección de etanol” se refiere a un proceso en el que una solución de etanol que comprende lípidos se vierte rápidamente en una solución acuosa a través de una aguja. Esta acción dispersa los lípidos por toda la solución y promueve la formación de partículas lipídicas, como la formación de liposomas.
- 15 En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH está asociado con las partículas basadas en lípidos, preferiblemente liposomas. De acuerdo con la presente enseñanza, el término “asociado con” significa que el agente de ajuste del pH está unido o forma parte de las partículas basadas en lípidos, preferiblemente liposomas, por ejemplo, incorporándolos/insertándolos en la membrana bicapa lipídica. En una realización, el agente de ajuste del pH asociado con los liposomas es un ácido carboxílico, preferiblemente un ácido
- 20 carboxílico como se definió anteriormente. En una realización, el ácido carboxílico es un ácido carboxílico C₁₂-C₂₈ ramificado o no ramificado, preferiblemente C₁₂-C₂₂. En una realización, el ácido carboxílico es un ácido graso C₁₂-C₂₈ ramificado o no ramificado, saturado, monoinsaturado o poliinsaturado, preferiblemente un ácido graso C₁₂-C₂₂ (por ejemplo, ácido oleico). En una realización, las partículas basadas en lípidos, preferiblemente liposomas, comprenden entre 1 y 10 % del agente de ajuste del pH.
- 25 En una realización, las partículas basadas en lípidos, preferiblemente liposomas, comprenden (por ejemplo, encapsulan) un compuesto farmacéuticamente activo, en el que, preferiblemente, el compuesto farmacéuticamente activo comprende un ácido nucleico, preferiblemente ADN o ARN.
- La presente enseñanza también proporciona un método para preparar una formulación acuosa como se definió anteriormente, el método comprende
- 30 – formar los liposomas en una solución acuosa que comprende al menos un agente de ajuste del pH y que tiene un pH de entre 2 y 5.5 o
- agregar al menos un agente de ajuste del pH a una solución acuosa que comprende liposomas para ajustar el pH de la solución acuosa a un pH de entre 2 y 5.5.
- 35 La presente enseñanza también proporciona un kit que comprende una formulación acuosa como se definió anteriormente.
- En una realización, el kit comprende además, en un recipiente separado, un compuesto farmacéuticamente activo, en el que, preferiblemente, el compuesto farmacéuticamente activo comprende un ácido nucleico, preferiblemente ADN o ARN.
- 40 En una realización, el ácido nucleico se proporciona en una solución tamponada que tiene un pH de entre 6 y 8. Las sustancias tampón adecuadas para su uso en dichas soluciones tamponadas incluyen Tris, HEPES, MOPS y MES.
- Tal como se utiliza en este documento, el término “kit” se refiere a un artículo de fabricación que comprende uno o más contenedores y, opcionalmente, un soporte de datos. Dichos uno o más recipientes pueden llenarse
- 45 con uno o más de los medios o reactivos mencionados anteriormente. Se pueden incluir contenedores adicionales en el kit que contengan, por ejemplo, diluyentes, tampones y reactivos adicionales. Dicho soporte de datos puede ser un soporte de datos no electrónico, por ejemplo, un soporte de datos gráficos tal como un folleto informativo, una hoja informativa, un código de barras o un código de acceso, o un soporte de datos electrónico tal como un disquete, un disco compacto (CD), un disco versátil digital (DVD), un microchip u otro soporte de datos electrónico basado en semiconductores. El código de acceso puede permitir el acceso a una
- 50 base de datos, por ejemplo, una base de datos de Internet, una base de datos centralizada o descentralizada. Dicho soporte de datos puede comprender instrucciones para el uso del kit en los métodos de la enseñanza. Además, el soporte de datos puede comprender información o instrucciones sobre cómo llevar a cabo los métodos de la presente enseñanza.
- 55 El término “compuesto farmacéuticamente activo” (o “agente terapéutico”), como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que tenga un efecto positivo o ventajoso sobre la afección o estado patológico de un sujeto cuando se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferiblemente, un compuesto farmacéuticamente activo posee propiedades curativas o paliativas y puede

ser administrado para mejorar, aliviar, mitigar, revertir, retrasar el inicio o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Un compuesto farmacéuticamente activo puede tener propiedades profilácticas y puede usarse para retrasar la aparición de una enfermedad o para disminuir la gravedad de dicha enfermedad o afección patológica.

- 5 Los compuestos farmacéuticamente activos incluyen péptidos o proteínas farmacéuticamente activos, ácidos nucleicos farmacéuticamente activos, por ejemplo, ADN o ARN, y otras moléculas orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente activas, por ejemplo, compuestos de moléculas pequeñas (es decir, compuestos orgánicos bioactivos con un peso molecular inferior a 900 Daltons).

10 El término "péptido", como se usa en el presente documento, comprende oligopéptidos y polipéptidos que se producen de forma natural o no natural 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 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 más, preferiblemente 21 o más y hasta preferiblemente 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos (por ejemplo, de 10 a 100, de 10 a 50, 10 a 40, 20 a 100, 20 a 50 o 20 a 40 aminoácidos) unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere preferentemente a péptidos grandes, preferentemente a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptido" y "proteína" son sinónimos y se usan indistintamente en el presente documento.

20 El término "péptido o proteína farmacéuticamente activo" incluye proteínas o polipéptidos completos, y también puede referirse a fragmentos farmacéuticamente activos de los mismos. También puede incluir análogos farmacéuticamente activos de un péptido o proteína. El término "péptido o proteína farmacéuticamente activo" incluye además péptidos y proteínas que son antígenos, es decir, la administración del péptido o proteína a un sujeto provoca una respuesta inmunitaria en un sujeto que puede ser terapéutica o protectora parcial o total.

25 Los ejemplos de proteínas farmacéuticamente activas incluyen, pero no se limitan a, citocinas y proteínas del sistema inmunitario tales como compuestos inmunológicamente activos (por ejemplo, interleucinas, factor estimulante de colonias (CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, factor de necrosis tumoral (TNF), interferones, integrinas, adhesinas, seletinas, receptores homing, receptores de células T, inmunoglobulinas, antígenos solubles del complejo mayor de histocompatibilidad, antígenos inmunológicamente activos tales como antígenos bacterianos, parasitarios o virales, alérgenos, autoantígenos, anticuerpos), hormonas (insulina, hormona tiroidea, catecolaminas, gonadotropinas, hormonas tróficas, prolactina, oxitocina, dopamina, somatotropina bovina, leptinas y similares), hormonas de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento humana), factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento similar a la insulina y similares), receptores de factores de crecimiento, enzimas (activador tisular del plasminógeno, estreptoquinasa, biosintética o degradativa del colesterol, enzimas estereodogénicas, quinasas, fosfodiesterasas, metilasas, desmetilasas, deshidrogenasas, celulasas, proteasas, lipasas, fosfolipasas, aromatasas, citocromos, adenilato o guanilato ciclasas, neuramidasa y similares), receptores (receptores de hormonas esteroides, receptores de péptidos), proteínas de unión (proteínas de unión a la hormona del crecimiento o al factor de crecimiento y similares), factores de transcripción y traducción, proteínas supresoras del crecimiento tumoral (por ejemplo, proteínas que inhiben la angiogénesis), proteínas estructurales (tales como colágeno, fibroína, fibrinógeno, elastina, tubulina, actina y miosina), proteínas sanguíneas (trombina, albúmina sérica, factor VII, factor VIII, insulina, factor IX, factor X, activador tisular del plasminógeno, proteína C, factor de von Willebrand, antitrombina III, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de granulocitos eritropoyetina (G-CSF) o factor VIII modificado, anticoagulantes y similares.

45 En una realización, la proteína farmacéuticamente activa de acuerdo con la enseñanza es una citocina que participa en la regulación de la homeostasis linfoide, preferiblemente una citoquina que participa y preferiblemente induce o mejora el desarrollo, preparación, expansión, diferenciación y/o supervivencia de células T. En una realización, la citocina es una interleucina. En una realización, la proteína farmacéuticamente activa de acuerdo con la enseñanza es una interleucina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-21.

55 El término "compuesto inmunológicamente activo" se refiere a cualquier compuesto que altere una respuesta inmunitaria, preferiblemente induciendo y/o suprimiendo la maduración de células inmunes, induciendo y/o suprimiendo la biosíntesis de citocinas y/o alterando la inmunidad humoral estimulando la producción de anticuerpos por las células B. Los compuestos inmunológicamente activos poseen una potente actividad inmunoestimulante que incluye, entre otras, actividad antiviral y antitumoral, y también pueden regular negativamente otros aspectos de la respuesta inmune, por ejemplo, desplazando la respuesta inmune alejándola de una respuesta inmune TH2, lo cual es útil para tratar una amplia gama de enfermedades mediadas por TH2. Los compuestos inmunológicamente activos pueden ser útiles como adyuvantes de vacunas.

Un ácido nucleico es de acuerdo con la enseñanza preferiblemente ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), más preferiblemente ARN, lo más preferiblemente in vitro ARN transcrito (ARN IVT) o ARN sintético. Los ácidos nucleicos incluyen, de acuerdo con las enseñanzas, ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas de forma recombinante y sintetizadas químicamente. De acuerdo con la enseñanza, un ácido nucleico puede estar en forma de una molécula que es monocatenaria o bicatenaria y lineal o cerrada covalentemente para formar un círculo.

Los ácidos nucleicos también pueden estar incluidos en un vector. El término "vector" como se usa en el presente documento incluye cualquier vector conocido por el experto, incluidos vectores plásmidos, vectores cósmidos, vectores fagos tales como fago lambda, vectores virales tales como vectores adenovirales o baculovirales, o vectores cromosómicos artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) o cromosomas artificiales P1 (PAC). Dichos vectores incluyen vectores de expresión así como de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos así como vectores virales y en general 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 in vitro sistemas de expresión. Los vectores de clonación se utilizan en general para diseñar y amplificar un determinado fragmento de ADN deseado y pueden carecer de las secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "ADN" se refiere a una molécula que comprende residuos de desoxirribonucleótidos y preferiblemente está compuesta total o sustancialmente por residuos de desoxirribonucleótidos. "Desoxirribonucleótido" se refiere a un nucleótido que carece de un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosilo. El término "ADN" comprende ADN aislado tal como ADN purificado parcial o completamente, ADN esencialmente puro, ADN sintético y ADN generado recombinantemente e incluye ADN modificado que difiere del ADN natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como en el(los) extremo(s) de un ADN o internamente, por ejemplo en uno o más nucleótidos del ADN. Los nucleótidos en las moléculas de ADN también pueden comprender nucleótidos no estándar, como nucleótidos que no se encuentran en la naturaleza o nucleótidos sintetizados químicamente. Estos ADN alterados pueden denominarse análogos o análogos del ADN natural.

En el contexto de la presente enseñanza, 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 "ARN" comprende ARN aislado tal como ARN parcial o completamente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético y ARN generado recombinantemente e incluye ARN modificado que difiere del ARN que se produce de forma 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 en el(los) extremo(s) de un ARN o internamente, por ejemplo en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en 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 del ARN natural.

La expresión "ácido nucleico farmacéuticamente activo" pretende referirse a ácidos nucleicos que tienen actividades biológicas, tales como expresión de proteínas, interferencia con la expresión génica o inmunoestimulación. Por lo tanto, dichos ácidos nucleicos son útiles para interferir con la expresión génica (por ejemplo, ARN antisentido o ARNip), modificar las actividades de las proteínas (por ejemplo, aptámeros de ADN o aptámeros de ARN) o activar la inmunidad (por ejemplo, vacunas de isARN o ADN o vacunas de ARNm). Un "ácido nucleico farmacéuticamente activo" también puede ser un ácido nucleico que codifica un péptido o proteína farmacéuticamente activo o que es farmacéuticamente activo por sí solo, por ejemplo, tiene una o más actividades farmacéuticas tales como las descritas para las proteínas farmacéuticamente activas.

De acuerdo con la enseñanza, el término "ácido nucleico que codifica un péptido o proteína" significa que el ácido nucleico, si está presente en el entorno apropiado, preferiblemente dentro de una célula, puede dirigir el ensamblaje de aminoácidos para producir el péptido o proteína durante el proceso de traducción. Preferiblemente, los ácidos nucleicos de acuerdo con la enseñanza son capaces de interactuar con la maquinaria de traducción celular permitiendo la traducción del péptido o proteína.

En una realización, el ácido nucleico es ARN.

De acuerdo con la enseñanza, "ARN" se refiere tanto al ARN de cadena simple como al ARN de doble cadena e incluye ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN pequeño inhibidor (ARNip), ARN pequeño en horquilla (ARNph), microARN (miARN), ARN antisentido, ARN inmunoestimulante (ARNie) y aptámeros de ARN. En una realización preferida, el ARN seleccionado proviene del grupo que consiste en ARNm, ARNip, ARNph, miARN, ARN antisentido, ARNie y aptámeros de ARN.

El ARN puede contener secuencias autocomplementarias que permiten que partes del ARN se doblen y se emparejen consigo mismas para formar dobles hélices. De acuerdo con las enseñanzas se prefieren como ARN oligonucleótidos sintéticos de 6 a 100, preferiblemente de 10 a 50, en particular de 15 a 30 o de 15 a 20 nucleótidos o ARN mensajero (ARNm) de más de 50 nucleótidos, preferiblemente de 50 a 10.000, preferiblemente 100 a 5000, en particular de 200 a 3000 nucleótidos.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "ARN mensajero (ARNm)" se refiere a una "transcripción" que puede generarse usando un molde de ADN y puede codificar un péptido o proteína. Normalmente, un ARNm comprende una región 5' no traducida, una región codificante de proteína y una región 3' no traducida. En el contexto de la presente enseñanza, el ARNm puede generarse mediante transcripción in vitro a partir de una plantilla de ADN. La metodología de transcripción in vitro es conocida por el experto. Por ejemplo, existe una variedad de in vitro kits de transcripción disponibles comercialmente.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "ARN inhibidor pequeño (ARNip)" se refiere a oligonucleótidos cortos bicatenarios (típicamente de 19 a 23, preferiblemente 21 nucleótidos de longitud) que pueden usarse para inducir la destrucción de un ARNm diana mediante el reconocimiento del objetivo por una hebra del ARNip, un mecanismo conocido como ARN de interferencia (ARNi).

El término "ARN en horquilla pequeña (ARNph)" se relaciona con una secuencia de ARN que realiza un giro cerrado en horquilla y puede usarse para silenciar la expresión del gen diana a través de ARNi.

Los términos "microARN" o "miARN" se relacionan con una pequeña molécula de ARN no codificante (típicamente de 19 a 25 nucleótidos de longitud), que funciona en la regulación transcripcional y postranscripcional de la expresión génica.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "ARN antisentido" se refiere a un ARN monocatenario, normalmente un oligonucleótido sintético que está diseñado para aparearse con un ARNm celular objetivo, inhibiendo así físicamente el proceso de traducción y eventualmente induciendo la destrucción del ARNm objetivo.

De acuerdo con la presente enseñanza, "ARN inmunoestimulante (ARNis)" se refiere a ARN que puede activar receptores inmunes innatos, tales como, por ejemplo, los TLR-3, 7 y 8 endoplásmicos o la proteína citosólica RIG-1. En una realización, el isRNA comprende uno o más nucleótidos de uridina (U).

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "aptámero de ARN" se refiere a ARN que a través de su estructura tridimensional precisa se puede usar como un anticuerpo, es decir, hacer que se una específicamente a estructuras determinadas y de ese modo activar o bloquear mecanismos biológicos.

De acuerdo con la enseñanza, el ARN puede modificarse. Por ejemplo, el ARN puede estabilizarse mediante una o más modificaciones que tengan efectos estabilizadores sobre el ARN.

El término "modificación" en el contexto del ARN tal como se utiliza de acuerdo con la presente enseñanza incluye cualquier modificación del ARN que no esté presente de forma natural en dicho ARN.

En una realización de la enseñanza, el ARN usado de acuerdo con la enseñanza no tiene 5'-trifosfatos sin tapar. La eliminación de dichos 5'-trifosfatos sin tapar se puede lograr tratando el ARN con una fosfatasa.

El ARN de acuerdo con la enseñanza puede tener ribonucleótidos modificados, naturales o no naturales (sintéticos), con el fin de aumentar su estabilidad y/o disminuir su citotoxicidad y/o modular su potencial inmunoestimulante. Por ejemplo, en una realización, en el ARN utilizado de acuerdo con las enseñanzas, la uridina está sustituida parcial o completamente, preferiblemente completamente, por pseudouridina.

En una realización, el término "modificación" se refiere a proporcionar un ARN con una tapa 5' o un análogo de tapa 5'. El término "tapa 5'" se refiere a una estructura de tapa que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm mediante un enlace trifosfato inusual de 5' a 5'. En una realización, esta guanosina está metilada en la posición 7. El término "tapa 5' convencional" se refiere a un tapa 5' de ARN de origen natural, preferiblemente al tapa de 7-metilguanosina (m⁷G). En el contexto de la presente enseñanza, el término "tapa 5'" incluye un análogo de tapa 5' que se asemeja a la estructura de tapa del ARN y está modificado para poseer la capacidad de estabilizar el ARN si se une al mismo, preferiblemente in vivo y/o en una celda. Proporcionar un ARN con una tapa 5' o un análogo de tapa 5' puede lograrse mediante transcripción in vitro de una plantilla de ADN en presencia de dicha tapa 5' o análogo de tapa 5', en el que dicha tapa 5' se incorpora cotranscripcionalmente en la cadena de ARN generada, o el ARN puede generarse, por ejemplo, mediante transcripción in vitro, y la tapa 5' puede generarse postranscripcionalmente usando enzimas de protección, por ejemplo, enzimas de protección del virus vaccinia.

El ARN puede contener modificaciones adicionales. Por ejemplo, una modificación del ARNm utilizada en la presente enseñanza puede ser una extensión o truncamiento de la cola poli(A) de origen natural.

El término “estabilidad” del ARN se relaciona con la “vida media” del ARN. La “vida media” se refiere al período de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, cantidad o número de moléculas. En el contexto de la presente enseñanza, la vida media de un ARN es indicativa de la estabilidad de dicho ARN.

5 Si, de acuerdo con la presente enseñanza, se desea disminuir la estabilidad del ARN, también es posible modificar el ARN para interferir con la función de los elementos como se describió anteriormente aumentando la estabilidad del ARN.

De acuerdo con la presente enseñanza, el ARN puede obtenerse mediante síntesis química o mediante transcripción in vitro de una plantilla de ADN apropiada. En el contexto de la presente enseñanza, el término “transcripción” se refiere a un proceso en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en
 10 ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. De acuerdo con la presente enseñanza, el término “transcripción” comprende “transcripción in vitro”, en el que el término “transcripción in vitro” se refiere a un proceso en el que el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza in vitro en un sistema libre de células, preferiblemente usando extractos celulares apropiados. Preferiblemente, se aplican vectores de clonación para la generación de transcritos. Estos vectores de clonación se designan generalmente como vectores de
 15 transcripción y, de acuerdo con la presente enseñanza, están comprendidos en el término “vector”. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor de cualquier ARN polimerasa. Ejemplos particulares de ARN polimerasas son las ARN polimerasas T7, T3 y SP6. Una plantilla de ADN para transcripción in vitro se puede obtener clonando un ácido nucleico, en particular ADNc, e introduciéndolo en un vector apropiado para transcripción in vitro. El ADNc puede obtenerse mediante transcripción inversa del
 20 ARN. Preferiblemente, se usan vectores de clonación para producir transcritos que generalmente se denominan vectores de transcripción.

El término “traducción” de acuerdo con la enseñanza se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una hebra de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para formar un péptido o proteína.

25 El término “inhibición de la expresión génica” se refiere a un proceso, en el que se pueden usar oligonucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNip monocatenario antisentido o bicatenario) para unir secuencias de ARNm específicas que inducen ya sea la degradación del ARNm diana y/o el bloqueo de traducción.

En una realización, el compuesto farmacéuticamente activo es un antígeno o un ácido nucleico que codifica un antígeno o un fragmento del mismo, por ejemplo, un antígeno asociado a una enfermedad.

30 El término “enfermedad” se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad a menudo se interpreta como una afección médica asociada con síntomas y signos específicos. Una enfermedad puede ser causada por factores originalmente de una fuente externa, como una enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, como enfermedades autoinmunitarias.

De acuerdo con la enseñanza, el término “enfermedad” también se refiere a enfermedades cancerosas. Los
 35 términos “enfermedad cancerosa” o “cáncer” (término médico: neoplasia maligna) se refieren a una clase de enfermedades en las que un grupo de células muestran un crecimiento descontrolado (división más allá de los límites normales), invasión (intrusión y destrucción de tejidos adyacentes) y, a veces, metástasis (diseminación a otras partes del cuerpo a través de la linfa o la 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
 40 cánceres forman un tumor, es decir, una hinchazón o lesión formada por un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas o células tumorales), pero algunos, como la leucemia, no lo hacen. Ejemplos de cánceres incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, glioma y leucemia. Más particularmente, ejemplos de tales cánceres incluyen cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de región anal, cáncer de estómago,
 45 cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula paratiroides, cáncer de glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma hipofisario. El término “cáncer” de acuerdo con la enseñanza también comprende metástasis de cáncer.

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

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

El linfoma y la leucemia son neoplasias malignas derivadas de células hematopoyéticas (formadoras de sangre).

5 Un sarcoma es un cáncer que surge de células transformadas en uno de varios tejidos que se desarrollan a partir del mesodermo embrionario. Por tanto, los sarcomas incluyen tumores de tejido óseo, cartilaginoso, adiposo, muscular, vascular y hematopoyético.

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

Un glioma es un tipo de tumor que comienza en el cerebro o la columna vertebral. Se llama glioma porque surge de las células gliales. El sitio más común de los gliomas es el cerebro.

10 Por "metástasis" se entiende la diseminación de 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 corporal y los vasos, y luego, después de ser transportada por la sangre, infiltración de órganos diana. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor, es decir, un tumor secundario o un
15 tumor metastásico, en el sitio diana depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la enseñanza 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.

20 El término "enfermedad infecciosa" se refiere a cualquier enfermedad que puede transmitirse de un individuo a otro o de un organismo a otro y es causada por un agente microbiano (por ejemplo, el resfriado común). Ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen enfermedades infecciosas virales, como el SIDA (VIH), hepatitis A, B o C, herpes, herpes zóster (varicela), sarampión alemán (virus de la rubéola), fiebre amarilla, dengue, etc., flavivirus, virus de la influenza, enfermedades infecciosas hemorrágicas (virus de Marburg o
25 Ébola) y síndrome respiratorio agudo severo (SARS), enfermedades infecciosas bacterianas, como la enfermedad del legionario, (Legionela), enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), úlcera gástrica (Helicobacter), cólera (Vibrio), tuberculosis, difteria, infecciones por E. coli, estafilococos, salmonella o Estreptococos (tétanos); infecciones por protozoos patógenos como malaria, enfermedad del sueño, leishmaniasis; toxoplasmosis, es decir infecciones por Plasmodium, Trypanosoma, Leishmania y Toxoplasma; o infecciones por hongos, que son causadas, por ejemplo, por Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis o Candida albicans.

35 El término "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a cualquier enfermedad en la que el cuerpo produce una respuesta inmunogénica (es decir, sistema inmunitario) a algún constituyente de su propio tejido. En otras palabras, el sistema inmunitario pierde su capacidad de reconocer algún tejido o sistema dentro del cuerpo como propio y lo ataca como si fuera extraño. Las enfermedades autoinmunitarias se pueden clasificar en aquellas en las que predominantemente un órgano está afectado (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis antiinmunitaria) y aquellas en las que el proceso de la enfermedad autoinmunitaria se difunde a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple es causada por células T que atacan las vainas que rodean las fibras nerviosas del cerebro y la médula espinal.
40 Esto produce pérdida de coordinación, debilidad y visión borrosa. Las enfermedades autoinmunitarias son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumática, anemia hemolítica, tiroiditis antiinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis, diabetes, esclerodermia, psoriasis y similares.

45 El término "antígeno" se refiere a un agente que comprende un epítipo contra el cual se va a generar una respuesta inmunitaria. El término "antígeno" incluye en particular proteínas, péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, especialmente ARN y ADN, y nucleótidos. El término "antígeno" también incluye agentes que se vuelven antigénicos -y sensibilizantes- sólo a través de una transformación (por ejemplo, de manera intermedia en la molécula o al completarse con una proteína corporal). Un antígeno es preferiblemente presentable por células del sistema inmunitario tales como células presentadoras de antígeno como células dendríticas o
50 macrófagos. Además, un antígeno o un producto de procesamiento del mismo es preferiblemente reconocible por un receptor de células T o B, o por una molécula de inmunoglobulina tal como un anticuerpo. En una realización preferida, el antígeno es un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral o un antígeno bacteriano.

55 El término "antígeno asociado a una enfermedad" se utiliza en su sentido más amplio para referirse a cualquier antígeno asociado a una enfermedad. Un antígeno asociado a una enfermedad es una molécula que contiene epítopos que estimularán el sistema inmunitario del huésped para generar una respuesta inmunitaria específica del antígeno celular y/o una respuesta de anticuerpos humorales contra la enfermedad. Por tanto, el antígeno asociado a la enfermedad puede utilizarse con fines terapéuticos. Los antígenos asociados a enfermedades

están preferiblemente asociados con infección por microbios, típicamente antígenos microbianos, o asociados con cáncer, típicamente tumores.

El término "enfermedad que implica un antígeno" se refiere a cualquier enfermedad que implica un antígeno, por ejemplo, una enfermedad que se caracteriza por la presencia de un antígeno. La enfermedad que involucra un antígeno puede ser una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad cancerosa o simplemente cáncer. Como se mencionó anteriormente, el antígeno puede ser un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral o un antígeno bacteriano.

En una realización, un antígeno asociado a una enfermedad es un antígeno asociado a un tumor. Preferiblemente, el órgano o tejido enfermo se caracteriza por células enfermas tales como células cancerosas que expresan un antígeno asociado a una enfermedad y/o se caracterizan por la asociación de un antígeno asociado a una enfermedad con su superficie. La inmunización con antígenos asociados a tumores intactos o sustancialmente intactos o fragmentos de los mismos tales como péptidos o ácidos nucleicos del MHC de clase I y clase II, en particular ARNm, que codifican dicho antígeno o fragmento hace posible provocar un tipo de respuesta MHC de clase I y/o de clase II y, por lo tanto, estimulan las células T tales como los linfocitos T citotóxicos CD8+ que son capaces de lisar células cancerosas y/o células T CD4+. Dicha inmunización también puede provocar una respuesta inmunitaria humoral (respuesta de células B) que resulta en la producción de anticuerpos contra el antígeno asociado al tumor. Además, las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas (DC), pueden cargarse con péptidos presentados por MHC de clase I mediante transfección con ácidos nucleicos que codifican antígenos tumorales in vitro y administrado a un paciente. En una realización, el término "antígeno asociado a tumor" se refiere a un constituyente de células cancerosas que puede derivar del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular. En particular se refiere a aquellos antígenos que se producen, preferiblemente en grandes cantidades, intracelularmente o como antígenos de superficie en células tumorales. Los ejemplos de antígenos tumorales incluyen HER2, EGFR, VEGF, antígeno CAMPATH1, CD22, CA-125, HLA-DR, linfoma de Hodgkin o mucina-1, pero no se limitan a ellos.

De acuerdo con la presente enseñanza, un antígeno asociado a tumor comprende preferiblemente cualquier antígeno que sea característico de tumores o cánceres así como de células tumorales o cancerosas con respecto al tipo y/o nivel de expresión. En una realización, el término "antígeno asociado a tumor" se refiere a proteínas que en condiciones normales, es decir, en un sujeto sano, se expresan específicamente en un número limitado de órganos y/o tejidos o en etapas de desarrollo específicas, por ejemplo, el antígeno asociado al tumor puede estar expresado específicamente en tejido estomacal bajo condiciones normales, expresarse específicamente en el tejido del estómago, preferiblemente en la mucosa gástrica, en los órganos reproductivos, por ejemplo, en los testículos, en el tejido trofoblástico, por ejemplo, en la placenta o en las células de la estirpe germinal, y se expresan o se expresan de 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 asociados a tumores en el contexto de la presente enseñanza incluyen, por ejemplo, antígenos de diferenciación, preferiblemente antígenos de diferenciación específicos de tipo celular, es decir, proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en un determinado tipo de célula en una determinada etapa de diferenciación, cáncer/antígenos testiculares, es decir, proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en los testículos y, a veces, en la placenta, y antígenos específicos de la estirpe germinal. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno asociado a tumores preferentemente no se expresa o sólo raramente se expresa en tejidos normales o se muta en células tumorales. Preferiblemente, el antígeno asociado a tumor o la expresión aberrante del antígeno asociado a tumor identifica células cancerosas. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno asociado a tumor que es expresado por una célula cancerosa en un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad cancerosa, es preferiblemente una autoproteína en dicho sujeto. En realizaciones preferidas, el antígeno asociado a tumores en el contexto de la presente enseñanza se expresa en condiciones normales específicamente en un tejido u órgano que no es esencial, es decir, tejidos u órganos que cuando son dañados por el sistema inmunitario no provocan la muerte del sujeto, o en órganos o estructuras del cuerpo a los que el sistema inmunitario no puede acceder o es difícilmente accesible. Preferiblemente, un antígeno asociado a tumor se presenta en el contexto de moléculas de MHC mediante una célula cancerosa en la que se expresa.

Ejemplos de antígenos de diferenciación que idealmente cumplen los criterios para antígenos asociados a tumores contemplados en la presente enseñanza como estructuras diana en inmunoterapia tumoral, en particular, en vacunación tumoral, son las proteínas de superficie celular de la familia Claudin, tales como CLDN6 y CLDN18.2. Estos antígenos de diferenciación se expresan en tumores de diversos orígenes y son particularmente adecuados como estructuras diana en relación con la inmunoterapia contra el cáncer mediada por anticuerpos debido a su expresión selectiva (sin expresión en un tejido normal relevante para la toxicidad) y localización en la membrana plasmática.

Otros ejemplos de antígenos que pueden ser útiles en la presente enseñanza son p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abl CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, 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.
- 5 El término “antígeno viral” se refiere a cualquier componente viral que tenga propiedades antigénicas, es decir, que pueda provocar una respuesta inmunitaria en un individuo. El antígeno viral puede ser una ribonucleoproteína viral o una proteína de la envoltura.
- 10 El término “antígeno bacteriano” se refiere a cualquier componente bacteriano que tenga propiedades antigénicas, es decir, que pueda provocar una respuesta inmunitaria en un individuo. El antígeno bacteriano puede derivar de la pared celular o de la membrana citoplasmática de la bacteria.
- 15 El término “respuesta inmunitaria”, como se usa en el presente documento, se refiere a una reacción del sistema inmunitario tal como ante organismos inmunogénicos, tales como bacterias o virus, células o sustancias. El término “respuesta inmunitaria” incluye la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria está relacionada con una activación de células inmunes, una inducción de la biosíntesis de citocinas y/o la producción de anticuerpos.
- De acuerdo con la presente enseñanza, el término “tratamiento de una enfermedad” incluye curar, acortar la duración, mejorar, ralentizar o inhibir la progresión o el empeoramiento de una enfermedad o los síntomas de la misma.
- 20 El término “inmunoterapia” se refiere a un tratamiento que implica preferiblemente una reacción inmune específica y/o función(es) efectora(s) inmune(s).
- El término “inmunización” o “vacunación” describe el proceso de tratar a un sujeto por razones terapéuticas o profilácticas.
- 25 El término “sujeto”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere preferentemente a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente enseñanza son humanos, primates no humanos, animales domésticos tales como perros, gatos, ovejas, vacas, cabras, cerdos, caballos, etc., animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, guineas, cerdos, etc. así como animales en cautiverio, como animales de zoológicos. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.
- 30 La presente enseñanza también proporciona un método para preparar una composición farmacéutica, el método comprende
- proporcionar una formulación acuosa como se definió anteriormente; y
 - mezclar la formulación acuosa con un compuesto farmacéuticamente activo.
- En una realización, el compuesto farmacéuticamente activo comprende un ácido nucleico, en el que, preferiblemente, el ácido nucleico se proporciona en una solución tamponada que tiene un pH de entre 6 y 8.
- 35 La presente enseñanza también proporciona una composición farmacéutica preparada mediante el método definido anteriormente.
- En una realización, la composición farmacéutica comprende liposomas cargados con el compuesto farmacéuticamente activo.
- En una realización, la composición farmacéutica comprende lipoplex de ácidos nucleicos.
- 40 Los términos “lipoplex de ácido nucleico” o “lipoplex”, tal como se utilizan en este documento, se refieren a un complejo de lípidos y ácidos nucleicos, como ADN o ARN, preferiblemente ARN. Los lipoplex se forman espontáneamente cuando lípidos catiónicos (por ejemplo, en forma de liposomas catiónicos, que a menudo también incluyen lípidos auxiliares neutros), polímeros catiónicos y otras sustancias con cargas positivas se mezclan con ácidos nucleicos, y se ha demostrado que liberan ácidos nucleicos en las células. En una
- 45 realización, los lipoplex tienen un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 1000 nm, preferiblemente de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 800 nm, preferiblemente de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 600 nm, tal como de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm.
- 50 El “diámetro” o “tamaño” promedio de las partículas basadas en lípidos (por ejemplo, liposomas o lipoplex) descritas en este documento es generalmente el “tamaño de diseño” o el tamaño previsto de las partículas basadas en lípidos preparadas de acuerdo con un proceso establecido. El tamaño puede ser una dimensión medida directamente, tal como el diámetro promedio o máximo, o puede determinarse mediante un ensayo indirecto tal como un ensayo de detección de filtración. La medición directa del tamaño de las partículas suele

realizarse mediante dispersión dinámica de la luz. Con frecuencia, los resultados de las mediciones dinámicas de dispersión de la luz 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). Como surgen variaciones menores en el tamaño durante el proceso de fabricación, una variación de hasta el 40 % de la medida indicada es aceptable y se considera dentro del tamaño indicado. Alternativamente, el tamaño puede determinarse mediante ensayos de detección de filtración. Por ejemplo, una preparación de partículas es menor que un tamaño establecido, si al menos el 97 % de las partículas pasan a través de un filtro "tipo pantalla" del tamaño establecido.

En una realización, el al menos un agente de ajuste del pH está asociado con los liposomas y/o lipoplex.

Las composiciones farmacéuticas de la enseñanza son preferentemente estériles y contienen una cantidad eficaz de lípidos o partículas basadas en lípidos (por ejemplo, liposomas o lipoplex). Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes adicionales como se analiza en el presente documento, tales como un agente terapéutico o antígeno adicional. Las composiciones farmacéuticas de la enseñanza pueden comprender además uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de la enseñanza puede comprender además al menos un adyuvante.

Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado sola o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una condición particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende frenar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o invertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser un retraso de la aparición o una prevención de la aparición de dicha enfermedad o dicha afección. Una cantidad eficaz dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, la condición fisiológica, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento y el tipo de terapia complementaria (si está presente), la vía de administración específica y factores similares. De acuerdo con lo anterior, las dosis administradas pueden depender de varios de dichos 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 mediante una vía de administración diferente y más localizada).

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse mediante cualquier vía convencional. En una realización, la composición farmacéutica se formula para administración sistémica. De acuerdo con la presente enseñanza, la administración sistémica es preferiblemente mediante administración parenteral incluyendo inyección o infusión, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, en el ganglio linfático, intradérmica o intramuscular.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral normalmente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo, que es preferiblemente isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de vehículos y diluyentes/disolventes compatibles son agua estéril (por ejemplo, agua para inyección), solución Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, como medio de solución o suspensión se utilizan aceites fijos, normalmente estériles.

El término "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la no toxicidad de un material que, preferiblemente, no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

El término "excipiente" cuando se usa en el presente documento pretende indicar todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica de la presente enseñanza y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, vehículos, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, tampones, agentes aromatizantes o colorantes.

El término "adyuvante" se refiere a compuestos que prolongan, mejoran o aceleran una respuesta inmunitaria. A este respecto son posibles diferentes mecanismos dependiendo de los diferentes tipos de adyuvantes. Por ejemplo, compuestos que permiten la maduración de las DC, por ejemplo, Los lipopolisacáridos o ligando CD40 forman una primera clase de adyuvantes adecuados. En general, cualquier agente que influya en el sistema inmunitario del tipo "señal de peligro" (LPS, GP96, dsRNA, etc.) o citocinas, como GM-CSF, se puede utilizar como adyuvante que permite intensificar una respuesta inmunitaria y/o influenciados de manera controlada. Opcionalmente también se pueden utilizar en este contexto oligodesoxinucleótidos CpG, aunque hay que tener en cuenta sus efectos secundarios, que se producen en determinadas circunstancias, como se ha explicado anteriormente. Los adyuvantes particularmente preferidos son citocinas, tales como monocinas, lincocinas, interleucinas o quimiocinas, 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 como Montanide[®], más preferido Montanide[®] ISA51. Los lipopéptidos, tales como Pam3Cys, también son adecuados para su uso como adyuvantes en las composiciones farmacéuticas de la presente enseñanza.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente enseñanza también se pueden usar junto con otro agente terapéutico que se puede administrar antes, simultáneamente con o después de la administración de las composiciones farmacéuticas de la presente enseñanza. Dichos agentes terapéuticos incluyen agentes inmunomoduladores, que pueden ser inmunoestimulantes o inmunosupresores, fármacos quimioterapéuticos para pacientes con cáncer, por ejemplo, gemcitabina, etopofos, cisplatino, carboplatino, agentes antivirales, agentes antiparasitarios o agentes antibacterianos y, si se administran simultáneamente, pueden estar presentes en una composición farmacéutica de la presente enseñanza.

10 La composición farmacéutica de la enseñanza se puede usar para inducir una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta inmunitaria contra un antígeno asociado a una enfermedad o células que expresan un antígeno asociado a una enfermedad, tal como una respuesta inmunitaria contra el cáncer. De acuerdo con lo anterior, la composición farmacéutica puede usarse para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que involucra un antígeno asociado a la enfermedad o células que expresan un antígeno asociado a la enfermedad, tal como el cáncer. Preferiblemente dicha respuesta inmunitaria es una respuesta de células T. En una realización, el antígeno asociado a la enfermedad es un antígeno tumoral.

15 La presente enseñanza también proporciona una composición farmacéutica o un kit como se define en este documento para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o para su uso en un método de inmunoestimulación.

20 La presente enseñanza también se refiere al uso de una composición o kit farmacéutico como se define en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o para su uso en un método de inmunoestimulación.

La presente enseñanza proporciona además un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o un método de inmunoestimulación, los métodos comprenden la etapa de administrar una composición farmacéutica como se define en el presente documento a un sujeto que lo necesita.

25 Finalmente, la presente enseñanza proporciona un método para estabilizar químicamente una formulación acuosa que comprende al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida, preferiblemente enlaces éster, el método comprende

– ajustar el pH de la formulación acuosa a un pH de entre 2 y 5.5.

En una realización, la estabilización química se produce mediante la inhibición del enlace éster, el enlace tioéster y/o la hidrólisis del enlace amida, preferiblemente la hidrólisis del enlace éster.

30 En una realización, al menos uno de los lípidos presentes en la formulación acuosa es un lípido catiónico, preferiblemente un lípido catiónico como se define en el presente documento.

En una realización, la carga neta global de los lípidos presentes en la formulación acuosa es positiva.

35 En una realización, el pH se ajusta a un pH de entre 2 y 5, preferiblemente de entre 2.5 y 5, más preferiblemente de entre 3 y 4.5, más preferiblemente de entre 3 y 4, e incluso más preferiblemente de entre 3.5 y 4. En otra realización preferida, la formulación acuosa tiene un pH de entre 3.1 y 3.9.

En una realización, el pH de la formulación lipídica acuosa se ajusta añadiendo al menos un agente de ajuste del pH, preferiblemente al menos un agente de ajuste del pH como se definió anteriormente.

En una realización, el al menos un lípido que tiene uno o más enlaces seleccionados del grupo que consiste en enlaces éster, enlaces tioéster y enlaces amida es como se definió anteriormente.

40 En una realización, los lípidos presentes en la formulación acuosa forman liposomas.

En una realización, al menos un agente de ajuste del pH está asociado con los liposomas.

La presente enseñanza se ilustra mejor con los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos del alcance de la enseñanza.

Ejemplos

45 Materiales

Cloruro de (R)-N,N,N-trimetil-2,3-dioleiloxi-1-1propanaminio (R-DOTMA), Merck & Cie.

1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), Corden Pharma

Etanol 99.5 % Ph. Eur., Carl Roth

Ácido acético Farmacopea de los Estados Unidos (USP), AppliChem

Acetato de sodio USP, AppliChem

Tampón HEPES, Life Technologies

Agua para inyección, Baxter

Jeringa de 1 ml para inyección-F, B. Braun

5 Aguja 0.9x40 mM Microlance 3, BD

Viales de vidrio R6 tipo I, Wheaton

Sellos de aluminio de 20 mM, Wheaton

Tapones de butilo de 20 mM, Wheaton

Ejemplo 1: Preparación de liposomas

10 Todos los materiales en contacto con las soluciones y preparaciones de liposomas fueron estériles y desechables. Los liposomas se formaron con la llamada técnica de inyección de etanol (Batzri y Korn, 1973), donde los lípidos disueltos en etanol se inyectan en una fase acuosa con agitación.

15 Las proporciones de lípidos y las concentraciones de lípidos en etanol variaron dependiendo de la formulación deseada y el tamaño de partícula. Para los liposomas DOTMA/DOPE, la solución de etanol contenía DOTMA y DOPE en una proporción molar de 2:1 a una concentración total de lípidos de aproximadamente 330 mM. Para los liposomas DOTAP/DOPE, la solución de etanol contenía DOTAP y DOPE en una proporción molar de 2:1 a una concentración total de lípidos de aproximadamente 330 mM. Las soluciones se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de tamaño de poro de 0.2 µm (Millipore Millex MP).

20 Luego se inyectaron las soluciones lipídicas estériles en etanol en un matraz giratorio desechable que contenía una fase acuosa y se agitaron a una velocidad de 150 rpm durante al menos una hora. La fase acuosa era agua para inyección (wfi) o agua filtrada con Milli-Q con una conductividad de 1.3 µS/cm a 25 °C, o era una solución tampón compuesta de sales tampón y ácidos como se indica. Todos los materiales eran de calidad farmacéutica. La inyección se realizó hasta una concentración final de lípidos de 5-10 mM, de acuerdo con el experimento. La mayoría de los experimentos se realizaron a una concentración final de lípidos totales de 25 6.6 mM en la fase acuosa.

30 Las preparaciones de liposomas resultantes se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm. Luego, la preparación del filtrado se diluyó con una solución de dispersión hasta la concentración deseada y se almacenó en bolsas de bioproceso. Para experimentos estándar, se seleccionó 4 mM como concentración final. La temperatura de almacenamiento antes de los experimentos de estabilidad del pH era de 2-5 °C.

Ejemplo 2: Estabilidad de los liposomas DOTMA/DOPE en función del valor del pH

35 La estabilidad de DOPE en liposomas DOTMA/DOPE se investigó después de ajustar el pH a diferentes valores entre pH 7 y pH 4. Para pH 7, se utilizó tampón HEPES 10 mM. Para todos los valores de pH más bajos, se utilizaron tampones de ácido acético (todos de 10 mM) (ver Tabla 1). Se llenaron viales de vidrio R6 tipo I con 2 ml de la dispersión de liposomas y se almacenaron en una cámara de estabilidad a 37 °C. Los valores de pH se midieron mediante potenciometría utilizando un pHmetro WTW inoLab pH 7310, Weilheim, Alemania.

Tabla 1: Soluciones de dispersión

Solución	Concentración	pH
Tampón de acetato USP	10 mM	4
Tampón de acetato USP	10 mM	5
Tampón de acetato USP	10 mM	6
HEPES	10 mM	7

40 La estabilidad de los lípidos se probó en diferentes puntos de tiempo hasta 6 semanas después de la preparación de los liposomas midiendo la concentración de lípidos en la preparación de liposomas utilizando un sistema HPLC (Agilent Technologies 1200 equipado con detectores DAD y ELSD, Santa Clara, CA, EE. UU.).

Los resultados se dan en la Figura 1. Se representa la recuperación normalizada de DOPE (en porcentaje) de los liposomas DOTMA/DOPE. Sólo se muestra DOPE, ya que para DOTMA, en todas las condiciones, no se encontró ninguna indicación de degradación, lo que se debe al hecho de que DOTMA comprende enlaces éter en lugar de enlaces éster. Los liposomas en la fase acuosa con el pH más bajo, pH 4, mostraron la mejor estabilidad sin degradación significativa después de 6 semanas. Por el contrario, a pH 5 se observó una degradación ya significativa con una recuperación de sólo el 80 % del valor inicial. La estabilidad disminuyó al aumentar el pH, y la degradación más alta se encontró para pH 6 y pH 7 (el rango donde se esperaría la mejor estabilidad).

Ejemplo 3: Influencia de la concentración del tampón en la estabilidad de los liposomas.

Se investigó más a fondo la estabilidad de DOPE en liposomas DOTMA/DOPE (DOTMA:DOPE en una relación molar de 2:1) en el rango de pH bajo. En este experimento se probaron valores de pH incluso más bajos añadiendo ácido acético puro (10 mM). Los tampones de ácido acético se añadieron en tres concentraciones diferentes, a saber, 1 mM, 5 mM y 10 mM. Las muestras se estresaron a 40 °C durante 5 semanas.

En la Figura 2, se da la recuperación de DOPE para las diversas condiciones. En confirmación de los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 2 (Figura 1), la estabilidad se mejoró continuamente reduciendo el pH. El ácido acético puro (10 mM; pH 3.2) pareció ser al menos tan bueno o mejor que el tampón acetato (AcB) de pH 3.5 a la misma concentración. El efecto estabilizador de los tampones ácidos dependía de la concentración, como se puede ver más claramente a pH 5 y 6. Como tendencia, concentraciones más altas de tampón dieron como resultado una mejor protección contra la hidrólisis. A valores de pH muy bajos este efecto fue menos pronunciado. Se puede concluir que la adición de ácido acético puro a una concentración adecuada puede ser una forma simple y directa de obtener la estabilización del DOPE con respecto a la hidrólisis del éster.

Ejemplo 4: Comparación de los resultados de diferentes estudios de estrés.

En la Figura 3 se resume el resultado de varios estudios de estrés independientes. En cada caso, los liposomas DOTMA/DOPE se estresaron en ácido acético y soluciones tampón de ácido acético (todas 10 mM) a diferentes valores de pH a 40 °C. Se muestran los resultados después de 5 o 6 semanas (cuadrados con diferentes rellenos). La línea continua se trazó para visualizar la tendencia general.

Se puede reconocer fácilmente una correlación entre la estabilidad de los lípidos y el valor del pH. La máxima estabilidad se obtiene en el rango de pH inferior a 4, donde el efecto protector parece alcanzar una meseta. Valores de pH más bajos o concentraciones más altas de tampón/ácido pueden conducir a una protección aún mejor contra la hidrólisis. Sin embargo, en el presente contexto, no son deseables concentraciones de tampón extremadamente altas o valores de pH extremadamente bajos, porque tales condiciones duras no pueden usarse en formulaciones para administración a pacientes.

Ejemplo 5: Estabilidad de los liposomas DOTAP/DOPE en función del valor del pH

En este estudio se investigó la estabilidad de los liposomas con DOTAP en lugar de DOTMA. DOTAP es un lípido catiónico con una estructura similar a la de DOTMA, pero comprende enlaces éster en lugar de enlaces éter. Por lo tanto, DOTAP debería ser propenso a la hidrólisis de ésteres de manera similar a DOPE. Además del cambio de DOTMA a DOTAP, todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios.

En la Figura 4, se muestran los resultados de las mediciones de recuperación de lípidos después de dos semanas a 40 °C para diferentes condiciones de pH en la fase acuosa. Se muestran los resultados tanto para DOTAP como para DOPE. Para ambos lípidos tuvo lugar la hidrólisis, donde el comportamiento general fue equivalente y similar al hallazgo para DOPE en liposomas DOTMA/DOPE. Por tanto, la hidrólisis de DOTAP podría evitarse del mismo modo que la de DOPE mediante la adición de tampones ácidos o ácidos, como el ácido acético.

Ejemplo 6: Comparación de la degradación de DOPE en liposomas DOTMA/DOPE en agua para inyección con o sin ácido acético 5 mM

Se probó la adición de ácido acético para la estabilización de liposomas para uso farmacéutico, que habían sido fabricados previamente en agua pura para inyección (wfi). En la Figura 5 se muestran los resultados de los estudios de estrés con y sin ácido acético. Para los liposomas estabilizados, se añadió ácido acético 5 mM a la fase acuosa antes de la formación de liposomas. Se muestran los resultados de las mediciones de recuperación de DOPE después de 3 meses de almacenamiento a tres temperaturas diferentes, 5 °C, 25 °C y 40 °C. En los tres casos, la recuperación fue mayor con el ácido acético presente en la fase acuosa. El efecto se volvió más pronunciado a temperaturas más altas (condiciones de estrés) y fue más claramente visible a 40 °C, en el que la recuperación podría mejorarse de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 90 %.

Al comparar la estabilidad a diferentes temperaturas, la adición de 5 mM de ácido acético tuvo un efecto similar al de reducir la temperatura de almacenamiento entre 15 y 35 °C. Teniendo en cuenta la regla general de que reducir la temperatura en 10 °C conduce a una disminución de la velocidad de hidrólisis en un factor de dos,

esto correspondería a un aumento de la estabilidad (o disminución de la velocidad de hidrólisis) a una temperatura dada en un factor de aproximadamente 4 (tomando como base un efecto equivalente a una disminución de la temperatura de 20 °C).

Ejemplo 7: Formación de lipoplex

5 Se usaron liposomas DOTMA/DOPE con pH estabilizado para formar formulaciones de lipoplex de ARN para inyección intravenosa con calidad equivalente o mejor con respecto a las características fisicoquímicas en comparación con los lipoplex elaborados a partir de liposomas que no estaban estabilizados con pH.

Los lipoplex de ARN se prepararon según el siguiente protocolo:

1. Adición de 4 ml de solución de NaCl al 0.9 % a 1.1 ml de ARN;
- 10 2. Adición de 0.4 ml de liposomas a la mezcla de ARN/NaCl; y
3. Equilibrio durante 3 minutos a temperatura ambiente.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica de liposomas y lipoplex. El diámetro del liposoma se midió mediante dispersión de luz dinámica utilizando un PSS-Nicomp 380 ZLS, Santa Bárbara, CA, EE. UU. Mientras que el tamaño y el índice de polidispersidad (PDI) de los liposomas con ácido acético eran algo menores que los de aquellos sin ácido acético, el tamaño de partícula de los lipoplex era algo mayor con que sin ácido acético, mientras que el índice de polidispersidad era menor. El tamaño mayor se considera favorable en términos de actividad biológica, mientras que el índice de polidispersidad más pequeño es favorable con respecto a los requisitos de calidad. El número de partículas subvisibles, que no deben estar presentes en los productos inyectables por encima de ciertos umbrales, fue significativamente menor cuando se utilizaron liposomas estabilizados para la preparación de lipoplex. El valor de pH de la formulación final fue superior a 6 y, por lo tanto, era adecuada para inyección. La osmolaridad era equivalente a las condiciones fisiológicas.

Tabla 2: Caracterización fisicoquímica de liposomas y lipoplex de ARN

Fase acuosa en liposomas	Liposomas		Lipoplex de ARN					
	Tamaño de partícula		Tamaño de partícula		SVP- USP 778		pH	Osmolaridad mOsmol/kg
	Nm	PDI	nm	PDI	>10 µm	>25 µm		
wfi	410	0.26	468	0.256	1150	45	6.9	301
HAc de 5 mM en wfi	329	0.239	553	0.226	517	12	6.1	304

25 **Ejemplo 8: Evaluación biológica de lipoplex**

La actividad biológica de los lipoplex formados a partir de liposomas estabilizados con el pH (adición de ácido acético) se investigó mediante mediciones de bioluminiscencia. La absorción y traducción del ARN codificante de luciferasa de luciérnaga formulado (luc RNA lipoplex) se evaluaron mediante imágenes de bioluminiscencia in vivo utilizando el sistema de imágenes Xenogen IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences). Brevemente, se inyectó i.p. una solución acuosa de D-luciferina (75 mg/kg de peso corporal) (Caliper Life Sciences) se inyectó en ratones por vía intraperitoneal (i.p.) 6 horas después de la administración de 20 µg de lipoplex de ARN de luc. Los fotones emitidos por animales vivos o tejidos extraídos fueron cuantificados 10 minutos más tarde con un tiempo de exposición de 1 minuto. Se dibujaron regiones de interés (ROI) de las imágenes mostradas y se cuantificó la bioluminiscencia como radiancia promedio (fotones/seg/cm2/sr, representada por barras de colores) utilizando el software IVIS Living Image 4.0.

Como se muestra en la Figura 6, las señales obtenidas con lipoplex formados a partir de liposomas estabilizados con pH (ver Tabla 3) fueron sólo ligeramente inferiores que aquellas con lipoplex formados a partir de liposomas no estabilizados con pH. La muy pequeña disminución del número absoluto fue inferior al margen de error de las mediciones y, por tanto, no fue significativa.

40 Tabla 3: Valores de pH de muestras de lipoplex

Muestra	pH

ES 2 989 777 T3

Liposomas de referencia	6.9
Liposomas de ácido acético 10 mM	5.0
Liposomas de ácido acético 5 mM	6.0
Liposomas de ácido acético 2 mM	6.7

Ejemplo 9: Estabilidad de DOPE en liposomas DOTMA/DOPE preparados en condiciones GMP o similares a GMP en agua para inyección o agua para inyección que comprende ácido acético 5 mM

5 Se fabricaron liposomas que consistían en DOTMA/DOPE en una proporción molar de 2/1 mediante la técnica de inyección de etanol hasta una concentración de aproximadamente 4 mM (lípidos totales). Como fase acuosa, se usó agua para inyección (wfi) o wfi que comprendía ácido acético 5 mM. Los liposomas en wfi se denominaron liposomas L1, los liposomas en wfi que comprenden ácido acético 5 mM (lo que da como resultado un valor de pH entre 3 y 4) se denominaron liposomas L2. Aparte de la presencia o ausencia de ácido acético, todas las demás condiciones de fabricación fueron idénticas. Se utilizaron lípidos de calidad GMP y la fabricación se realizó en condiciones GMP o similares a GMP. Se fabricaron varios lotes de liposomas L1 y L2 y, después de llenarlos en viales de vidrio, se probó la estabilidad a las siguientes temperaturas:

1. 5 °C (2-8 °C);
2. 25 °C (22-28 °C) = condiciones aceleradas;
3. 40 °C (38-42 °C) = condiciones de estrés.

15 Los datos de estabilidad para los liposomas L1 y L2 se recopilaron durante un período de hasta 25 meses (L1) y hasta 9 meses (L2), respectivamente. Los estudios de estabilidad aún están en curso. En las Figuras 7 A a C, se muestran datos de estabilidad para diferentes lotes de liposomas L1 y L2 a diferentes temperaturas. En todas las condiciones de temperatura y para todos los lotes fabricados, la estabilidad del DOPE en los liposomas L2 fue sustancialmente mejor que la de los liposomas L1.

20 Esto indica que el ajuste del pH a condiciones ácidas mediante la adición de ácido acético 5 mM a la fase acuosa mejora significativamente la estabilidad del DOPE en los liposomas. La vida útil de los liposomas se puede incrementar en un factor aproximado de 4.

Referencias

25 Batzri, S. and E. D. Korn (1973). "Single bilayer liposomes prepared without sonication." *Biochim Biophys Acta* 298(4): 1015-1019.

Chen, C. J., D. D. Han, C. F. Cai and X. Tang (2010). "An overview of liposome lyophilization and its future potential." *Journal of Controlled Release* 142(3): 299-311.

30 Stark, B., G. Pabst and R. Prassl (2010). "Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41(3-4): 546-555.

van Winden, E. C. and D. J. Crommelin (1999). "Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes." *J Control Release* 58(1): 69-86.

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende
 - (i) una dispersión acuosa de liposomas que comprende
 - liposomas que comprenden 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y al menos un lípido catiónico seleccionado del grupo que consiste en 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamoniopropano (DOTMA) y 1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano (DOTAP), siendo dichos liposomas catiónicos a pH fisiológico, en el que el pH fisiológico tiene un pH de entre 6 y 8, y
 - al menos un agente regulador del pH,
 en el que la dispersión acuosa de liposomas tiene un pH de entre 2 y 4.5, y
 - (ii) en un recipiente separado, un ácido nucleico farmacéuticamente activo, en el que el ácido nucleico farmacéuticamente activo se proporciona en una solución tamponada que tiene un pH de entre 6 y 8.
2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación molar del al menos un lípido catiónico a DOPE es de 1:4 a 4:1, más preferiblemente de 1:2 a 4:1.
3. El kit de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que al menos un agente de ajuste del pH comprende un ácido y/o un tampón ácido.
4. El kit de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el ácido es ácido acético.
5. El kit de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el tampón ácido es tampón acetato.
6. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las tasas de hidrólisis de DOPE y/o DOTAP se reducen en comparación con sus tasas de hidrólisis a un pH de entre 6 y 7.
7. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que al menos un agente de ajuste del pH está asociado con los liposomas.
8. Un método para preparar una composición farmacéutica, el método comprende
 - proporcionar una dispersión acuosa de liposomas como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
- mezclar la dispersión acuosa de liposomas con un ácido nucleico farmacéuticamente activo, en el que el ácido nucleico farmacéuticamente activo se proporciona en una solución tamponada que tiene un pH de entre 6 y 8.
9. Un método para estabilizar químicamente una dispersión acuosa de liposomas que comprende liposomas que comprenden 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y al menos un lípido catiónico seleccionado del grupo que consiste en 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamoniopropano (DOTMA) y 1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano (DOTAP), estando dichos liposomas catiónicos a pH fisiológico, comprendiendo el método
 - ajustar el pH de la dispersión acuosa de liposomas a un pH de entre 2 y 4.5, en el que, preferiblemente, la estabilización química se produce mediante la inhibición de la hidrólisis del enlace éster.

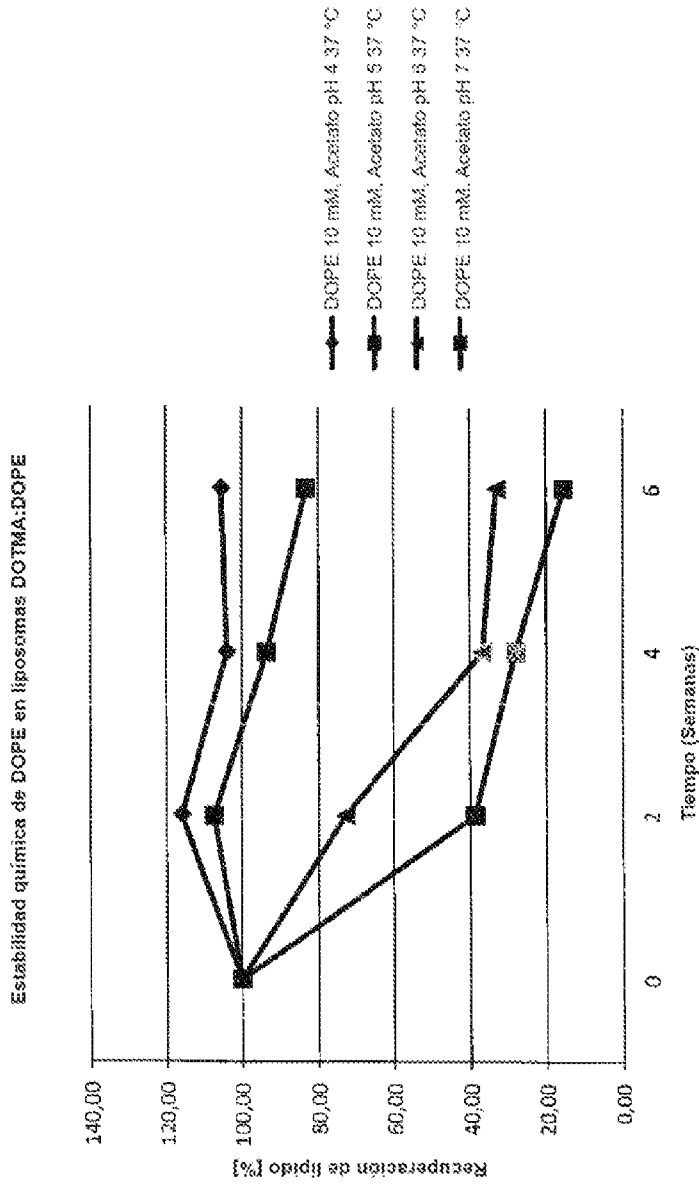


Figura 1

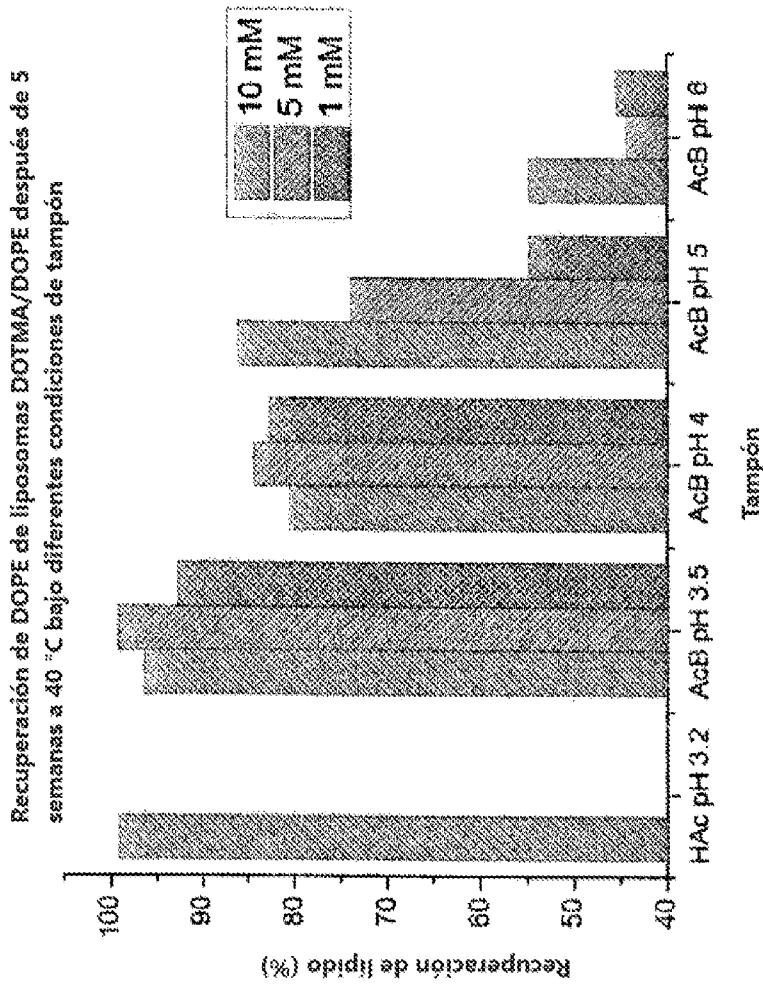


Figura 2

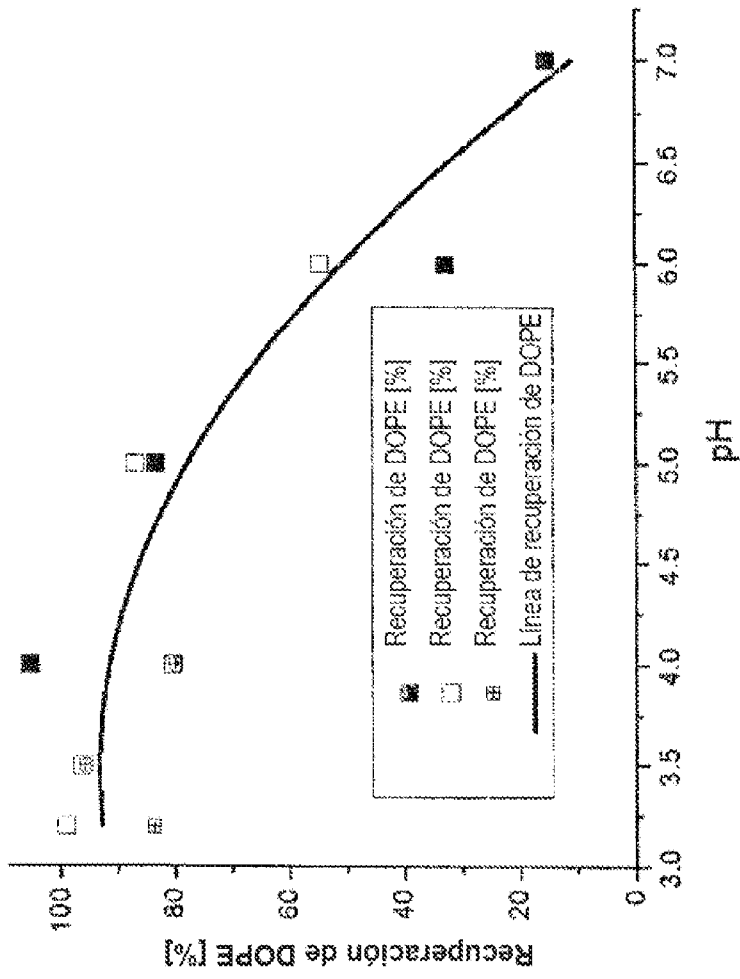


Figura 3

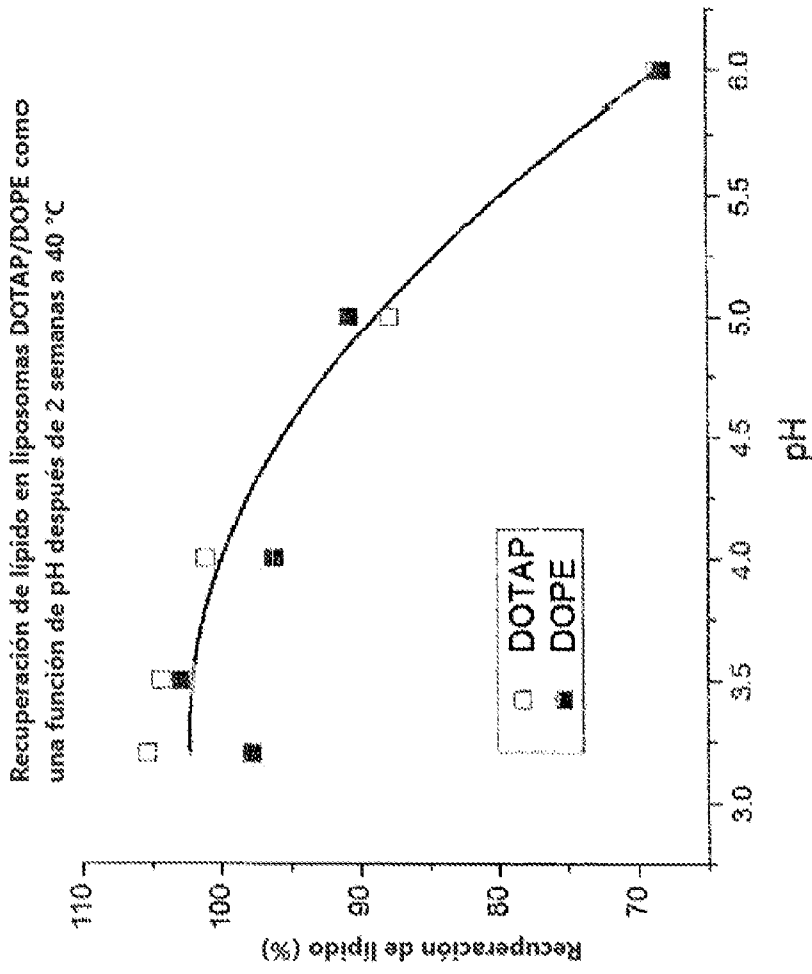


Figura 4

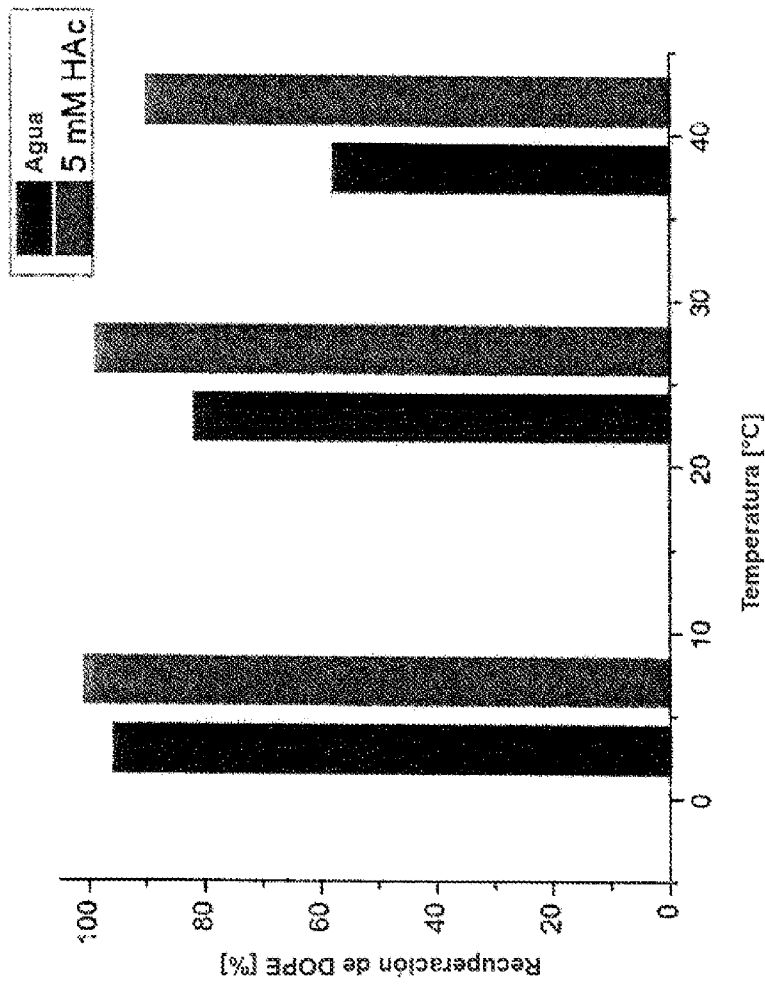


Figura 5

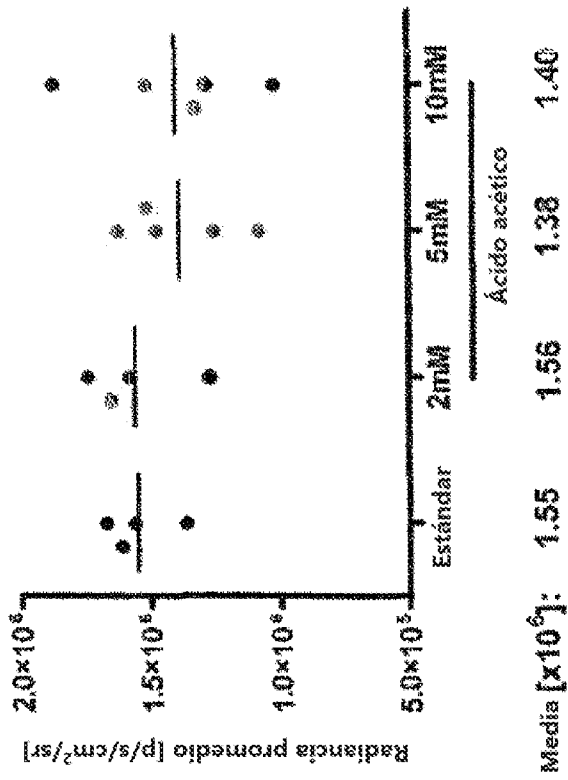


Figura 6

A

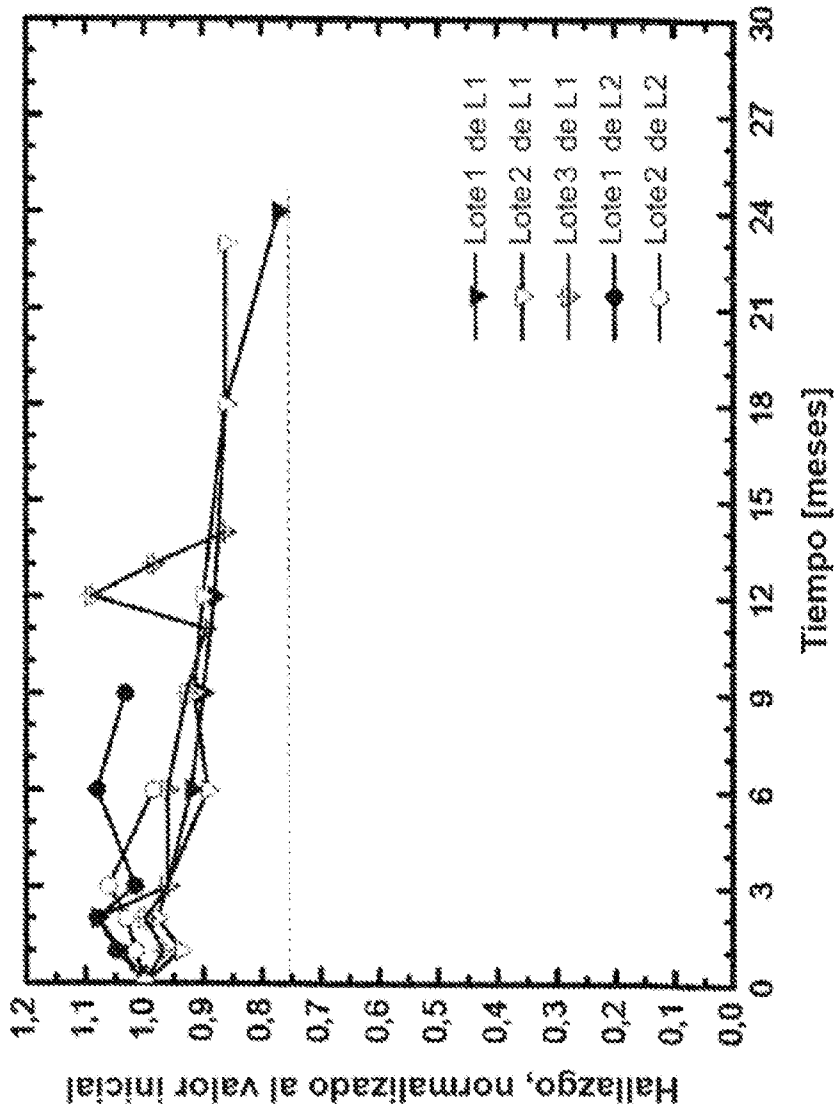


Figura 7

B

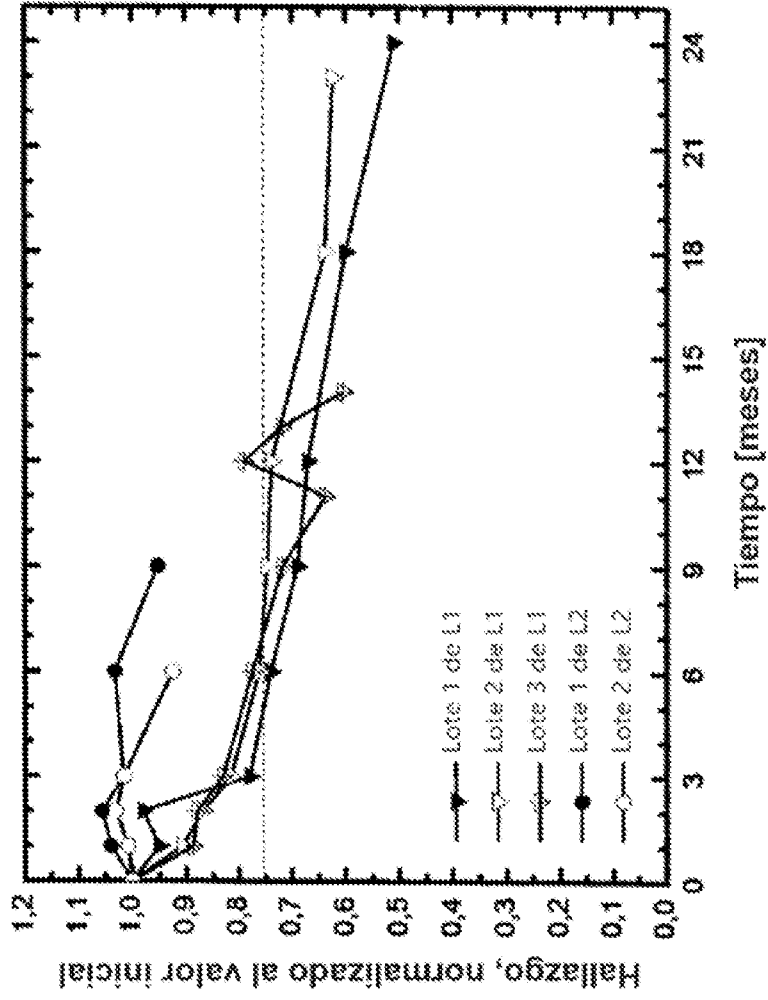


Figura 7 (cont.)

C

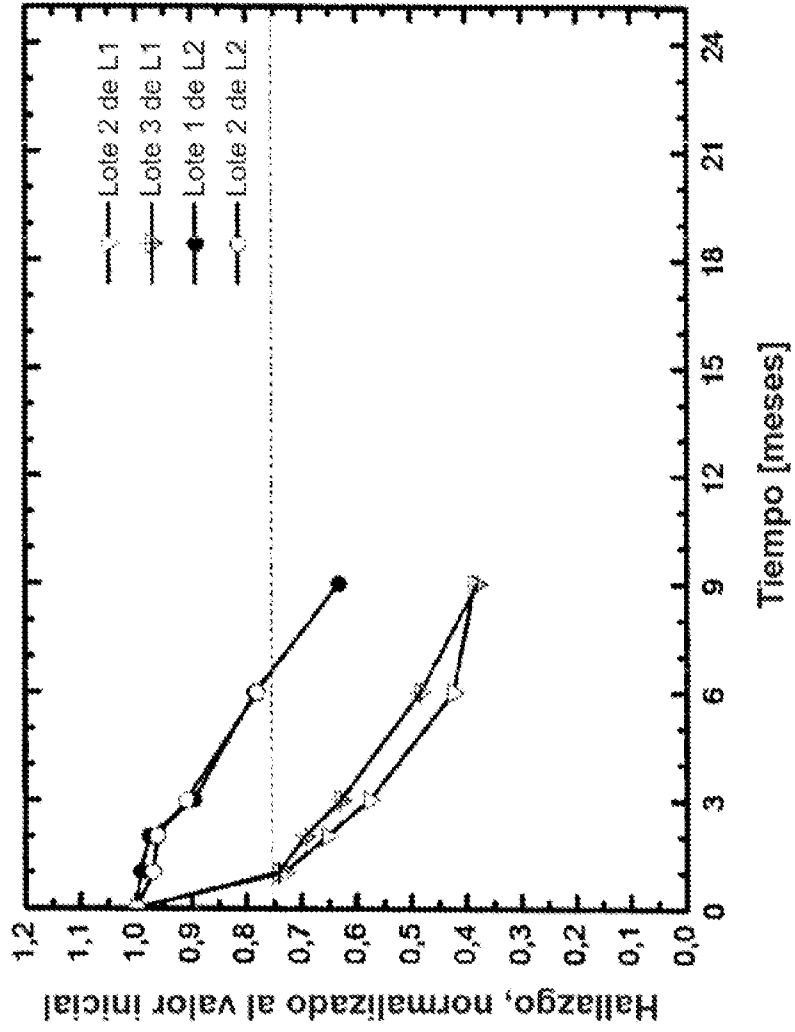


Figura 7 (cont.)