



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 907 486**

⑮ Int. Cl.:
A61K 48/00
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2016 PCT/US2016/051966**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017 WO17053170**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2016 E 16849370 (8)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022 EP 3352800**

④ Título: **Métodos y composiciones para reducir metástasis**

⑩ Prioridad:
24.09.2015 US 201562232169 P

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2022

⑦ Titular/es:
**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL (100.0%)
109 Church Street
Chapel Hill, North Carolina 27516, US**

⑧ Inventor/es:
**HUANG, LEAF;
GOODWIN, TYLER;
LIU, RIHE y
MIAO, LEI**

⑨ Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 907 486 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

Métodos y composiciones para reducir metástasis

Declaración de apoyo del gobierno

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo las Concesiones Núm. CA151652, CA149387, CA157738, y DK100664 otorgadas por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Referencia a una lista de secuencias enviada como archivo de texto a través de efs-web

La lista de secuencias escrita en el archivo 482902_seqlisting.txt tiene 77.671 bytes y fue creada el 14 de septiembre de 2016.

Campo de la invención

10 El objeto de estudio descrito en el presente documento está dirigido a tratamientos que previenen o reducen la aparición de cáncer metastásico modificando factores del microentorno celular en tejidos susceptibles de metástasis.

Antecedentes

15 En el tratamiento del cáncer, el diagnóstico temprano y el tratamiento antes de la metástasis son críticos, ya que una vez que el cáncer ha hecho metástasis, las tasas de éxito de la terapia son sustancialmente más bajas. En particular, el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más frecuente diagnosticado en todo el mundo, lo que lleva a la tercera causa de muerte más citada. Solo en los Estados Unidos, se diagnostican aproximadamente 143 460 pacientes, lo que conlleva la muerte de 51 690 pacientes cada año (American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta: *American Cancer Society*; 2012. pág. 25-6). Sin embargo, la causa de la muerte rara vez se debe a la carga del cáncer de colon primario, en el que la resección local del colon donde reside el cáncer primario es bastante eficaz.

20 Desafortunadamente, la aparición de metástasis en el hígado es la principal causa de muerte en pacientes con CCR (American Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta: *American Cancer Society*; 2012. pág. 25-6).

25 En las primeras etapas de detección del cáncer colorrectal, la tasa de supervivencia a cinco años es de aproximadamente 90%. Desafortunadamente, esta tasa cae drásticamente a menos de 12% de supervivencia una vez que se ha producido la metástasis en el hígado. Los estudios también han encontrado que en el momento del diagnóstico, 20% de los pacientes ya han desarrollado metástasis en el hígado, y este número alcanza hasta 60-70% de los pacientes que han desarrollado lesiones metastásicas en el hígado en el momento de la muerte (Schima W, Kulinna C, Langenberger H, et al. Liver metastases of colorectal cancer: US, CT o MR? Cancer imaging. *International Cancer Imaging Society*. 2005; 5 (SpecNo A):S149-56).

30 Sin embargo, los tratamientos para enfermedades tales como el cáncer, cuyo objetivo terapéutico final es destruir la célula enferma o prevenir o inhibir su reproducción, incluyen la administración de fármacos citotóxicos. Los fármacos citotóxicos incluyen muchos agentes quimioterapéuticos que se utilizan en el tratamiento de cánceres, incluidos agentes alquilantes, antimetabolitos y toxinas. La mayoría de los fármacos citotóxicos no son selectivos, destruyendo tanto las células sanas como las células enfermas, lo que contribuye a efectos secundarios no deseables cuando estos agentes se suministran sistémicamente. Por lo tanto, existe la necesidad de terapias alternativas que no dependan de la administración sistémica de agentes tóxicos. El documento WO 2014/121085 divulga proteínas de fusión y usos médicos de las mismas.

35 El objeto de estudio de este documento aborda las deficiencias de las terapias conocidas mediante la modificación del microentorno de los tejidos que son susceptibles de metástasis. Al hacerlo, se previene o reduce la metástasis y se puede evitar el uso de agentes citotóxicos.

Breve compendio de la invención

40 La invención proporciona un trímero formado a partir de tres polipéptidos de fusión según la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes. La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión según la reivindicación 10 y un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico según la reivindicación 11.

45 En una realización, el objeto de estudio descrito en el presente documento se refiere a un método para modificar el microentorno de una célula diana que comprende administrar sistémicamente a un sujeto una composición que comprende un vector, en donde el vector comprende una construcción para la expresión de una trampa, en donde la trampa se expresa en la célula diana modificando así el microentorno.

50 En una realización, el objeto de estudio descrito en el presente documento se refiere a un método para reducir la metástasis de un cáncer que comprende administrar sistémicamente a un sujeto que tiene cáncer una composición que comprende un vector, en donde el vector comprende una construcción para la expresión de una trampa, en donde la trampa se expresa en tejido susceptible de metástasis, modificando así el microentorno del tejido y reduciendo la metástasis del cáncer en el tejido.

En una realización, el objeto de estudio descrito en el presente documento se refiere a un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una composición que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de unirse a CXCL12, en donde el polipéptido comprende un péptido de señalización para una localización extracelular o intracelular deseada y una región de afinidad o trampa que interacciona con CXCL12 e interrumpe su interacción con su receptor o sus receptores endógenos, y en donde dicho polipéptido se expresa transitoriamente.

5 En otra realización, el objeto de estudio descrito en el presente documento se refiere a un método que comprende adicionalmente la administración de una segunda composición que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de unirse a PD-L1, en donde el polipéptido comprende un péptido de señalización para una localización extracelular o intracelular deseada y una región de afinidad o trampa que interacciona con PD-L1 e interrumpe su interacción con su receptor o sus receptores endógenos, y en donde dicho polipéptido se expresa transitoriamente.

10 En otra realización, un método comprende adicionalmente la administración de una segunda composición que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de unirse a PD-1, en donde el polipéptido comprende un péptido de señalización para la localización extracelular o intracelular deseada y una región de afinidad o trampa que interacciona con PD-1 e interrumpe su interacción con su receptor o sus receptores endógenos, y donde dicho polipéptido se expresa transitoriamente.

15 Estas y otras realizaciones se divultan completamente en este documento.

Breve descripción de las figuras

20 La **Figura 1** representa las estructuras proteicas endógenas de la quimiocina CXCL12 utilizada para establecer una trampa contra CXCL12 de tipo salvaje con biotina C-terminal como diana para la selección positiva. (A) La Estructura del mutante CXCL12 con CXCR4 que interacciona con el motivo del extremo N-terminal eliminado para la selección negativa. (B) Las estructuras de CCL2 y CCL5 de tipo salvaje y sus mutantes que no se unen al receptor utilizados para selecciones positivas y negativas. (C) Esquemas de trampas de quimio/citocinas homodiméricas, heterodiméricas y biespecíficas que se pueden utilizar para terapias individuales o combinadas. (D) La trampa trivalente contra PD-L1, así como el proceso de autoensamblaje de la trampa trivalente. Además, se muestra la cinética de unión de la trampa trivalente contra PD-L1 utilizando PD-L1 Octet junto con el mapa de plásmido de la trampa contra PD-L1 utilizada para el suministro de genes basado en el sistema de nanopartículas.

25 La **Figura 2** representa el desarrollo y el efecto de la proteína trampa contra CXCL12 modificada genéticamente sobre la migración e invasión celular de CT-26 FL3. (A) El mapa del vector plasmídico de la secuencia de ADN de la Trampa contra pCXCL12. Las secuencias codificantes de los dominios VH y VL de unión a CXCL12 se utilizaron para el ensamblaje del gen de la trampa. La secuencia final de la trampa contra CXCL12 codifica un péptido de señalización, un dominio VH, un conector flexible, un dominio VL, una etiqueta E y una etiqueta de His(6x), respectivamente. El ADNc completo se clonó en pCDNA3.1 entre los sitios Nhe I y Xho I y la precisión se confirmó mediante la secuenciación del ADN. La afinidad de unión entre la trampa contra CXCL12 y CXCL12 mediante el uso de interferometría de biocapa. CXCL12 se inmovilizó en el biosensor AR2G y se utilizaron diferentes concentraciones de trampa contra CXCL12 para medir la cinética de unión, en donde se encontró que la trampa contra CXCL12 tenía una $K_d = 4 \text{ nM}$. (B) Se encontró que la trampa contra CXCL12 modificada genéticamente tenía una inhibición semimáxima [ND50] contra CXCL12 biológicamente activa (100 ng/ml) a una concentración de aproximadamente 120 nM. Análisis de la migración de células CT-26 FL3 estimulada con CXCL12 (100 ng/ml; 10 nM) en presencia o ausencia de trampa contra CXCL12 (2, 4, 8 o 12 $\mu\text{g/ml}$; 60, 120, 240 o 360 nM respectivamente) o Ab contra CXCL12 de control positivo (1, 2 o 4 $\mu\text{g/ml}$; 6, 12 o 24 nM respectivamente). (C) Análisis de la invasión de células CT-26 FL3 después de la estimulación con CXCL12 (100 ng/ml; 10 nM) en presencia o ausencia de trampa contra CXCL12 (4 o 12 $\mu\text{g/ml}$; 120 o 360 nM) o Ab contra CXCL12 de control positivo (4 $\mu\text{g/ml}$; 24 nM). Los datos se expresaron como media \pm dt, calculados a partir de muestras analizadas por triplicado y como porcentaje del control no tratado (sin CXCL12 ni proteína de tratamiento). *p<0,05, **p<0,01, en comparación con un control de células estimuladas (100 ng/ml, 10 nM) (sin trampa de proteínas ni tratamiento con Ab) con CXCL12. NS, no significativo.

30 La **Figura 3** representa la caracterización de nanopartículas LCP por TEM y DLS. (A) Núcleo de LCP que contiene ADNp/péptido mc-CR8C (B) Galactosa-LCP final que contiene ADNp/mc-CR8C, con tinción de acetato de uranilo negativa (C) Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) de galactosa-LCP final que contiene ADNp/mc-CR8C, que produce un diámetro de 45 nanómetros y un potencial Zeta de +10,0. La distribución de tamaño ponderado en número, volumen e intensidad ilustra la distribución de dos partículas. La población más pequeña (~45 nm) son las partículas LCP deseadas, y la población más grande (~350 nm) se debe al exceso de DOTAP y colesterol que forman liposomas después de la hidratación de película delgada que produce un promedio Z de $\sim 236 \pm 32 \text{ nm}$; n=6. (D) La estabilidad de LCP a lo largo del tiempo en una solución de suero al 10% se midió mediante DLS. Se suspendió LCP en una solución de suero al 10% y se incubó a 37°C. El promedio z se registró durante 24 horas para observar cualquier agregación de proteína/LCP indicada por el aumento del promedio z. Los datos se expresaron como media \pm dt, calculados a partir de muestras analizadas por triplicado. El promedio z (~30 nm) es uniforme durante las 24 horas, sin producir un aumento significativo en el promedio z, lo que indica una formación mínima de agregados de proteína/LCP. (E) El mapa del vector del plásmido pCXCL12 encapsulado en LCP. (F) La secuencia de ADN del gen pCXCL12.

La **Figura 4** representa el análisis farmacocinético y de biodistribución en órganos de galactosa-LCP-Trampa contra pCXCL12/mcCR8C con ^{177}Lu incorporado al núcleo de LCP. Se administraron aproximadamente 250.000 recuentos a los ratones mediante inyección en la vena de la cola. (A) Las muestras de sangre recolectadas a través del corte de la vena de la cola se recolectaron, pesaron y midieron para los recuentos radiactivos para determinar el porcentaje de dosis inyectada (% ID) que permanece en circulación. Se observa una distribución bifásica, que proporciona $T_{1/2\alpha}$ y $T_{1/2\beta}$ de 20 min y 1,054 min, respectivamente. (B) La biodistribución/acumulación en órganos de LCP se midió 16 horas después de la inyección en la vena de la cola (momento en el que los recuentos de radiación sanguínea alcanzaron la señal de fondo). Se encontró que aproximadamente 40-50% de la dosis inyectada por gramo de tejido se acumulaba en el hígado. Los datos se expresaron como media \pm dt, calculados a partir de muestras analizadas por triplicado.

La **Figura 5** representa la captura biológica de CXCL12 endógeno y su función en el reclutamiento de células inmunitarias, así como la expresión transitoria y específica en el hígado de la trampa contra pCXCL12. (A) Expresión endógena de CXCL12 en secciones incluidas en parafina de tejidos hepáticos de modelos de ratones BALB/c con cáncer colorrectal sacrificados 10 días después de la inyección del tratamiento final e hígados sanos de control [sanos (sin CCR)]. Tinción inmunofluorescente para CXCL12 (rojo), junto con tinción nuclear DAPI (azul). Se estudiaron cinco grupos, incluidos sanos (sin CCR), sin tratar (PBS), control de LCP con pGFP (10 μg en días alternos x 3), LCP pTrap (10 μg), LCP pTrap (10 μg en días alternos x 3). Todos los datos se expresaron como media \pm dt, calculados a partir de muestras analizadas por triplicado y referidos como intensidad de fluorescencia. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en los gráficos. Barra de escala: 250 μm . (B) Se tiñeron secciones adicionales para determinar el reclutamiento de células inmunitarias hacia el hígado, incluidas las MDSC antiinflamatorias inmunosupresoras [CD1b+(Verde)/GR1+(Rojo)] y T_{reg} [CD4+(Verde)/Foxp3+(Rojo)] así como la población de células T CD8+ (Verde). Se estudiaron cuatro grupos, incluidos sanos (Sin CCR), sin tratar (Tumor), sin tratar (Estroma) y LCP pTrap (10 μg en días alternos x 3). También se ha demostrado que la tinción tricrómica distingue el hígado normal del enfermo. Las flechas de color blanco indican lesiones metastásicas. Todos los datos se expresaron como media \pm dt, calculados a partir de muestras analizadas por triplicado y referidos como intensidad de fluorescencia. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en los gráficos. Barra de escala: 250 μm demuestra la expresión transitoria específica del hígado de pGFP y la trampa modificada genéticamente contra pCXCL12. (C) Análisis de microscopía de la expresión de GFP en los principales órganos que acumulan LCP. Las secciones de hígado demuestran una expresión transitoria durante al menos 4 días después de la inyección final (10 μg en días alternos x3). Barra de escala: 250 μm . Los datos se expresaron como media \pm dt, calculados a partir de al menos muestras triplicadas y referidos como una intensidad de fluorescencia cuantificada mediante el Soporte lógico Image J. NS denota no significativo, ND denota por debajo del límite de detección, los valores p representan la significación para la muestra no tratada. Barra de escala de 250 μm . Se realizaron (D) ELISA con etiqueta His(6x) y (E) análisis de transferencia Western para determinar la distribución/expresión en órganos de la trampa contra pCXCL12 en todos los principales órganos que acumulan LCP y suero. Las dosis se aumentaron a 2,0, 10,0 o 20,0 μg de ADNp administrados a través de la vena de la cola. (F) El análisis de transferencia Western de los órganos muestra la expresión de la trampa contra CXCL12 a través de uso de mAb con His(6x). La expresión es transitoria y solo dura al menos 4 días y no más de 8 días después de la inyección final (10 μg en días alternos x3). Las concentraciones de proteína total se determinaron mediante BCA y se cargaron 50 μg de proteína total por pocillo/calle. La proteína trampa se detectó a 28,6 kDa, según lo confirmado por una escala patrón de proteína, de acuerdo con el valor teórico. Se utilizó GAPDH como control de carga, excepto en las muestras de suero, donde GAPDH no está presente. Los datos se expresaron como media \pm dt, calculados a partir de muestras analizadas por triplicado y mostrados como un incremento de multiplicidad en comparación con el control no tratado. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en los gráficos.

La **Figura 6** representa la Disminución de la incidencia de metástasis en el hígado después del tratamiento con LCP con Trampa contra pCXCL12. (A) A los ratones se les inocularon 2×10^6 células CT-26(FL3) RFP/Luc en la pared del ciego. El programa de tratamiento se muestra más arriba. El tratamiento, 10 μg (0,5 mg/kg) de ADNp, se administró a través de la vena de la cola por vía IV los días 10, 12 y 14. Los grupos incluyeron PBS (sin tratar; n=7) y LCP con pGFP (10 μg en días alternos x 3; n=6), así como LCP con Trampa contra pCXCL12 (10 μg en días alternos x 3; n=7). Se siguió la progresión de la masa tumoral global mediante la administración de 200 μl de luciferina (10 mg/ml) IP. Las imágenes bioluminiscentes de luciferasa se registraron 10 minutos después de la administración de luciferina. Se registró la carga total de tumor del ratón y del hígado. Todos los datos se expresaron como media \pm dt y se refirieron como intensidad bioluminiscente. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico. (B) Carga total de tumores de órganos de grupos no tratados (n = 3) y terapéuticos con LCP con Trampa contra pCXCL12 (n = 4). La cuantificación de la carga tumoral en los órganos se realizó con el soporte lógico IVIS/Kodak. Todos los datos se expresaron como media \pm dt y se refirieron como intensidad bioluminiscente. N.S. denota no significativo sin importancia, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico. (C) Las secciones de hígado incluidas en parafina se tiñeron con tinción tricrómica. La gran carga tumoral (indicada por flechas de color negro) y la cirrosis/fibrosis (tinción azul, colágeno) se ven claramente en los grupos de tratamiento con PBS (sin tratar) y LCP con pGFP. Los hígados tratados con LCP con Trampa contra pCXCL12 tienen una morfología de hígado

saludable normal y ninguna carga metastásica detectable. La barra de escala es de 250 μ m. Se registró la cuantificación de colágeno en la sección de hígado. Todos los datos se expresaron como media \pm d.t. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico.

5 La **Figura 7** representa la disminución de la incidencia de metástasis en el hígado y una mayor destrucción de células T después de la terapia con LCP con trampa contra pCXCL12. A los ratones se les inocularon 2×10^6 células CT-26(FL3) RFP/Luc en la pared del ciego. El tratamiento, 10 μ g (0,5 mg/kg) de ADNp, se administró a través de la vena de la cola IV los días 10, 12 y 14. Los grupos incluyeron PBS (sin tratar; n=5) y LCP con Trampa contra pCXCL12 (10 μ g en días alternos x 3; n=5) con anti-Lyt2.2 o control de IgG de isotipo administrados los días 8 y 10 IP (400 μ g, 20 mg/kg). La inoculación y el programa/dosis de tratamiento y la masa del tumor hepático el día 21 se muestran más arriba. A los ratones se les administraron 200 μ l (10 mg/ml) de luciferina IP. Después de 5 min, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los hígados, se lavaron con PBS y se colocaron en una solución de luciferina (1 mg/ml). Las imágenes bioluminiscentes se registraron utilizando cinética IVIS con cámara Kodak. La cuantificación de la carga tumoral en el hígado se realizó con el soporte lógico IVIS/Kodak. Los datos se expresaron como media transformada logarítmicamente, normalizada \pm et. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico. ROI = región de interés.

20 La **Figura 8** representa una menor incidencia de metástasis en el hígado 4T1 (Cáncer de Mama) y una mayor supervivencia después del tratamiento con LCP con Trampa contra pCXCL12. (A) La figura muestra el programa y las 25 dosis de inoculación y tratamiento, así como la detección de señales bioluminiscentes y la cuantificación de la carga tumoral 7 días después de la inoculación. Los grupos de tratamiento incluyeron PBS (sin tratar; n=5), LCP con pGFP/anti-CD8 (n=5), LCP pTrap /anti-CD8 (n=5), LCP pTrap/IgG de Isotipo (n=5). Los datos se expresaron como media transformada logarítmicamente, normalizada \pm et. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico. ROI = región de interés. (B) Análisis de citometría de flujo de la carga tumoral y cuantificación el día 10 (n = 3 por grupo). La selección consiste en células tumorales positivas para GFP (P3) frente a células no 30 positivas para GFP (P4). Los datos se expresaron como media, normalizada \pm d.t. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico. (C) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que incluye los 4 grupos de tratamiento (n=5 por grupo). La supervivencia se determinó evaluando el peso, la actividad y la calidad de vida de los ratones. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico.

35 La **Figura 9** representa una comparación de estrategias terapéuticas para reducir la incidencia de metástasis en hígado de cáncer colorrectal (HT-29). (A) La línea de tiempo en la parte superior muestra el programa de inoculación y tratamiento y la dosificación para HT-29. Los tratamientos se administraron en días alternos los días 0-16, a través de la vena de la cola IV. Los grupos de tratamiento incluyeron PBS (sin tratar; n=5), LCP con pGFP (10 μ g, 0,5 mg/kg ADNp; n=5), LCP pTrap (10 μ g, 0,5 mg/kg de ADNp; n=5), proteína trampa contra CXCL12 libre (10 μ g, 0,5 mg/kg de 40 proteína; n=5) y AMD3100 (100 μ g, 5,0 mg/kg; n=5). (B) Análisis y cuantificación de la carga tumoral el día 36 (n = 5 por grupo). La carga de metástasis en el hígado se cuantificó mediante resección y pesaje de los nódulos tumorales (en mg). Se muestra la imagen del hígado de cada grupo de tratamiento con carga metastásica, las flechas de color blanco indican lesión metastásica. La supervivencia se determinó evaluando el peso, la actividad y la calidad de vida de los ratones. Los datos se expresaron como puntos de datos individuales con media \pm d.t. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico.

45 La **Figura 10** representa la reducción de la toxicidad a través del suministro de LCP. (A) Mediciones de ALT, AST, creatinina y BUN y recuentos de leucocitos en sangre 24 horas después del tratamiento final con PBS (sin tratar), 10 μ g de LCP con pGFP en días alternos x 3, 10 μ g de LCP con Trampa contra pCXCL12 en días alternos x 3, o proteína trampa contra CXCL12 libre (20 μ g en días alternos x 3), en donde los ratones se sacrificaron los días 1, 7 y 14 después de la administración final. Todos los datos se expresaron como media \pm d.t. a partir de muestras analizadas por triplicado. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección. Los valores p de los grupos individuales en comparación con el control no tratado correspondiente se muestran en el gráfico. (B) Secciones de histología tricrómica de diferentes órganos 24 horas después del tratamiento final con PBS (sin tratar), 10 μ g de LCP con pGFP en días alternos x 3, 10 μ g de LCP con Trampa contra pCXCL12 en días alternos x 3, o proteína de trampa contra CXCL12 libre (20 μ g en días alternos x 3), en donde los ratones se sacrificaron los días 1, 7 y 14 después de la administración final. Ninguna de las secciones de histología tricrómica muestra toxicidad en ningún órgano principal, incluidos: corazón, pulmón, bazo, riñón e hígado. Barra de escala = 100 μ m.

60 La **Figura 11** representa el análisis de transferencia Western para evaluar la expresión endógena de CXCR4 en líneas celulares de cáncer humano y de ratón. Las células se cultivaron de acuerdo con las condiciones recomendadas por la ATCC, se lisaron y se normalizaron mediante BCA para una carga proteica precisa. Cada calle recibió 30 μ g de proteína total. Todas las muestras se procesaron en el mismo gel para garantizar una exposición precisa y una expresión relativa. La proteína se identificó a 42 kDa utilizando una escala patrón de proteína. Los datos se expresaron como media \pm dt, se calcularon a partir de muestras analizadas por triplicado y se refirieron como una intensidad

relativa con respecto a la muestra de mayor intensidad [CT-26 (FL3) y HT-29] y se normalizaron por la intensidad de GAPDH. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección, los valores p representan la significación de la primera línea celular en el gráfico.

5 La **Figura 12** representa la CXCL12 endógena en órganos principales de ratones (sin CCR) y en el hígado de un ratón con CCR. Expresión endógena de CXCL12 en diferentes órganos de ratones BALB/c. Las imágenes muestran tinción inmunofluorescente contra CXCL12 (rojo), junto con tinción nuclear DAPI (azul). Los datos se expresaron como media \pm dt, se calcularon a partir de al menos muestras triplicadas y se refirieron como intensidad de fluorescencia. N.S. denota no significativo, N.D. denota por debajo del límite de detección, los valores p representan la significación para la muestra de hígado. Barra de escala 250 μ m.

10 10 La **Figura 13** representa la carga tumoral total del ratón el día 24 después de la inoculación cecal. A los ratones se les inocularon 2×10^6 células CT-26 F3 RFP/Luc en la pared del ciego. El tratamiento que consistía en 10 μ g de ADNp se administró a través de la vena de la cola por vía IV los días 10, 12 y 14. Los grupos incluyeron PBS (sin tratar; n=7), LCP con ADN de pGFP (10 μ g en días alternos x 3; n=6) y LCP con trampa contra pCXCL12 (10 μ g en días alternos x 3; n=7). Se siguió la progresión de la masa tumoral mediante la administración de 200 μ l de luciferina (10 mg/ml) IP. La formación 15 de imágenes bioluminiscentes de luciferasa se realizó 10 minutos después de la administración de luciferina.

20 20 La **Figura 14** representa (A) imagen TEM de NP de LPD (vector para encapsular plásmido). (B) Biodistribución de NP de LPD marcada con Dil (24 h después de la inyección) en ratones con tumor ortotópico KPC. (C) Imágenes de fluorescencia de la distribución de Dil en el hígado y el tumor (los números de color blanco indican el % de células que absorben Dil en el órgano). Se inyectaron por vía intravenosa dos dosis diarias de NP de LPD con GFP a ratones que presentaban tumores. Se muestra la expresión de GFP en hígado y tumor (números de color verde). Actina celular marcada con faloidina. Los resultados sugieren que, aunque el hígado es el principal órgano que absorbe las NP, la expresión del plásmido se encuentra principalmente en el tumor (n = 3). (D) Expresión de GFP en diferentes poblaciones celulares dentro del tumor. Se cuantificó el % de células positivas para GFP en cada población celular (números de color blanco). Los fibroblastos positivos para α SMA y las células tumorales positivas para RFP son las principales células productoras de GFP dentro del microentorno tumoral. (E) La expresión transitoria del plásmido trampa marcado con etiqueta de His se cuantificó mediante ELISA para etiqueta de His. La expresión de la trampa fue transitoria en el plazo de una semana. Y nuevamente, el tumor es el principal órgano productor. En comparación con la proteína trampa, el suministro de plásmido prolongó la expresión de la trampa en el tumor (n = 4).

25 25

30 30 La **Figura 15** representa la inhibición del crecimiento tumoral y la supervivencia del anfitrión. (A) El programa de dosificación de diferentes tratamientos en ratones con aloinjerto de KPC se muestra en el panel superior. Las imágenes IVIS del tumor KPC después de diferentes tratamientos (n = 5~7) se muestran en el panel inferior. (B) Curva de inhibición tumoral de KPC (n = 6-10). (C) Proporciones de supervivencia de los grupos tratados. Los datos muestran la media \pm dt, n=5-8. (D y E). Peso del tumor en el punto de tiempo final de los ratones portadores de KPC con tratamiento con plásmido a dosis baja (30 μ g/ratón, 4 veces, (D) y tratamiento con plásmido a dosis alta (50 μ g/ratón, 4 veces, E). n = 4. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Los análisis estadísticos se calcularon por comparación con el grupo de control si no se menciona específicamente.

35 35 La **Figura 16** representa el estudio de metástasis a largo plazo. (A) Metástasis de células KPC en órganos principales 1 mes después de diferentes tratamientos (n = 4~5). El hígado, los pulmones y el bazo son los órganos principales para la metástasis de KPC. (B) La tinción con H&E muestra la histología de la metástasis tumoral en los órganos principales del grupo de control con PBS. La metástasis se inhibió significativamente cuando los ratones recibieron tratamiento con NP de trampa combo. Los círculos y las flechas de color azul indican el crecimiento de tumores metastásicos en pulmón, bazo e hígado. Las barras en B representan 100 μ m.

40 40 La **Figura 17** representa el ensayo ELISpot de IFN- γ de esplenocitos de ratones con cáncer de páncreas KPC ortotópico con diferentes tratamientos. (A) Los bazos se recolectaron de animales portadores de tumores. Los esplenocitos se volvieron a estimular con extractos de esplenocitos normales (control), células KPC o células KPC transducidas con marcadores RFP y Luciferasa. Las células que secretaban IFN- γ se tiñeron con anticuerpo anti-IFN- γ . Los resultados se cuantifican y se muestran en el panel derecho. ns: no significativo, ***p <0,001. n = 4. B. Se recolectaron bazos de animales portadores de tumores con diferentes tratamientos: PBS, NP con trampa contra CXCL12, NP con trampa contra PDL1 y NP con trampa Combo. Los esplenocitos se reestimularon con extractos de KPC RFP/Luc. Las células que secretaban IFN- γ se tiñeron con anticuerpo anti-IFN- γ . No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (n = 4).

45 45 La **Figura 18** representa NP con trampa combo que facilita la infiltración de células T al microentorno tumoral. (A) Las secciones de tejido de aloinjertos de KPC con diferentes tratamientos se tiñeron para CD3 (verde), p53 (rojo) y DAPI (azul) y a continuación se analizaron mediante microscopía IF. Las tinciones H&E adyacentes muestran la arquitectura 50 50 del estroma de las regiones. Las líneas punteadas de color amarillo demuestran el borde de la invasión de las células tumorales en el páncreas normal. Las zonas del rectángulo de color naranja se amplían para una mejor visualización. Las regiones tumorales también se presentan con menor aumento. Las barras de escala indican 400 μ m. (B) El porcentaje de células CD3+ dentro de las regiones tumorales se cuantificó con Image J de 5 imágenes representativas de cada tratamiento. (C) Las suspensiones de células individuales de tumores de aloinjerto de KPC (dentro de las regiones tumorales) después de diferentes tratamientos (n = 5) se tiñeron con anticuerpos contra CD3 y CD8. El

porcentaje de células CD3⁺ CD8 se cuantifica mediante citometría de flujo. **p* < 0,05. ***p* < 0,01. D y E. Se pretrataron ratones con tumores KPC98027 con 3 inyecciones diarias de mAb contra CD8 (300 µg/ratón) para agotar las células T CD8+ en los ratones. Se utilizaron mAb de isotipo como control. La eficacia de NP con trampa combo en ratones con o sin agotamiento de CD8 se comparó mediante imágenes (D) y se cuantificó (E).

- 5 La **Figura 19** representa los cambios de las células inmunitarias que se infiltran en el tumor en el microentorno tumoral. Los ratones portadores de tumores murinos KPC se dividieron en cuatro grupos y se trataron con PBS, NP con trampa contra CXCL12/Ctrl, NP con trampa contra PDL1/Ctrl o NP con trampa Combo. Al final del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se recolectaron tejidos tumorales para (A) evaluación por inmunotinción y (B) ensayo de citometría de flujo: el primer panel muestra las MDSC (amarillo); el segundo panel muestra las células Treg (amarillo) y el tercer panel muestra los macrófagos (rojo). Los números que se muestran en color blanco indican el % promedio de cada tipo de célula en el tumor. Las barras en A representan 200 µm. **p* < 0,05; ***p* < 0,01. Los análisis estadísticos se calcularon por comparación con el grupo no tratado si no se menciona específicamente.
- 10 15 La **Figura 20** representa el cambio de cobertura de CXCL12 y PD-L1 después del tratamiento con plásmido trampa. Se presentan tanto la imagen de fluorescencia (A) como la cuantificación (B) (n = 5). Las barras en A representan 200 µm. Los análisis estadísticos se calcularon por comparación con el grupo de control si no se menciona específicamente. Todos los datos muestran la media ± ETM (n = 4), **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.

20 La **Figura 21** representa los cambios de las citocinas en el microentorno tumoral. El nivel de citocinas se detectó mediante RT-PCR cuantitativa. Los análisis estadísticos se calcularon por comparación con el grupo de control si no se menciona específicamente. Todos los datos muestran la media ± ETM (n = 4), **p* < 0,05; ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.

- 25 30 La **Figura 22** representa los cambios en el microentorno tumoral después de varios tratamientos. (A) Los ratones portadores de KPC se dividieron en 4 grupos y se trataron con PBS, NP con trampa contra CXCL12/Ctrl, NP con trampa contra PDL1/Ctrl o NP con trampa Combo. Al final del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se recolectaron los tejidos tumorales para la tinción de doble fluorescencia de CD31 (que se muestra en color verde) y αSMA (tinción de fibroblastos, que se muestra en color rojo). Las ubicaciones representativas (cuadrado punteado de color amarillo) se amplían (cuadrado de color amarillo). Los vasos sanguíneos se descomprimieron y normalizaron después del tratamiento con la trampa contra CXCL12 o la trampa Combo. La flecha de color amarillo indica los vasos sanguíneos normalizados. Las imágenes del panel inferior se amplían a partir de las zonas encuadradas en las imágenes del panel superior correspondientes. Las barras en los paneles superior e inferior representan 500 y 100 µm, respectivamente. (B) El % de cobertura de αSMA, la densidad de CD31 y los vasos sanguíneos normalizados se cuantificaron utilizando Image J de 5 imágenes representativas de cada grupo. Los análisis estadísticos se calcularon por comparación con el grupo de control si no se menciona específicamente. Todos los datos muestran la media ± dt (n = 5), ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.

35 La **Figura 23** representa la acumulación (A) y la distribución (B) de NP de LPD marcadas con Dil en diferentes órganos y tumores respectivamente, de ratones portadores de aloinjertos de KPC tratados con PBS o NP de trampa combo.

40 La **Figura 24** representa la cobertura de colágeno dentro de los tumores de ratones tratados con PBS, NP con trampa contra CXCL12/Ctrl, NP con trampa contra PDL1/Ctrl y NP con trampa Combo, respectivamente.

45 La **Figura 25** representa la morfología H&E de los ratones portadores de KPC que se dividieron en 5 grupos y se trataron con 4 dosis de PBS, NP Ctrl, NP con trampa contra CXCL12/Ctrl, NP con trampa contra PD-L1/Ctrl y NP con trampa Combo cada dos días. Al final de los tratamientos, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los órganos principales para la tinción de patología H&E. El rectángulo de color azul resalta el hígado y el riñón de los grupos con PBS y NP Ctrl, lo que indica toxicidades hepáticas y renales graves. En estos órganos se observó vacuolización celular, células descamativas-degenerativas y necrosis focal (flechas de color amarillo).

Descripción detallada

Como se divulga en el presente documento, la mejora de la tasa de supervivencia y el tratamiento de los pacientes con cáncer se basa en la prevención o disminución de la aparición de metástasis. En particular, los pacientes con cáncer colorrectal (CCR) tienden a desarrollar metástasis en el hígado. Los estudios han demostrado que la relación entre el receptor de quimiocinas (CXCR4) expresado en las células de cáncer de colon y el ligando de quimiocinas (CXCL12) secretado por las células estrelladas hepáticas (HSC) juega un papel importante en la metástasis en el hígado de CCR (Zeelenberg I, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The Chemokine Receptor CXCR4 is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases. *Cancer Res.*, 63: 3833-3839, 2003). Estas células estrelladas hepáticas son células perisinusoidales residentes que han demostrado producir altos niveles de CXCL12 endógeno para el reclutamiento de linfocitos en zonas de inflamación. Los estudios de migración e invasión han demostrado que, en presencia de altos niveles de CXCL12, las células de cáncer colorrectal (CXCR4 positivas) migran e invaden a través del gradiente de concentración de CXCL12. Otros estudios de muestras de cáncer colorrectal humano también han encontrado que un mal pronóstico y una mayor tasa de metástasis en el hígado se correlacionan con altos niveles de expresión de CXCR4 en las células cancerosas (Zeelenberg I, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The Chemokine Receptor CXCR4 is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases. *Cancer Res.*, 63: 3833-3839, 2003). Como se describe en el presente documento, un método para interrumpir este gradiente de CXCL12 (profilácticamente) en el sitio futuro de la metástasis (hígado) puede disminuir la aparición de metástasis colorrectal en el hígado.

Como se describe en el presente documento, los presentes métodos evitan los problemas de las terapias conocidas. El tratamiento de animales con AMD3100, un antagonista de CXCR4 de molécula pequeña, ha demostrado que la alteración del eje CXCL12/CXRC4 puede disminuir la aparición de metástasis colorrectal en el hígado (Matsusue R, Kubo H, Hisamori S, Okoshi K, Takagi H, Hida K, Nakano K, Itami A, Kawada K, Nagayama S, Sakai Y. Hepatic 5 stellate cells promote liver metastases of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. *Ann Surg Oncol.* 16(9):2645-53, 2009). Posteriormente, se han desarrollado muchos antagonistas de CXCR4. Sin embargo, el papel endógeno de CXCL12 y CXCR4 en el sistema inmunológico es vital para la homeostasis normal. Por lo tanto, estos tratamientos tradicionales que incluyen terapias de proteínas y moléculas pequeñas vienen con problemas de toxicidad sistémica inespecífica. Además, hasta donde conocen los autores del presente documento, no se han desarrollado ni 10 se ha informado sobre terapias dirigidas a CXCL12 para reducir la aparición de lesiones metastásicas.

Como se divulga en el presente documento, se puede lograr una estrategia anticancerosa única, en la que el suministro de genes (que codifican la trampa contra CXCL12) al hígado puede alterar el microentorno hepático, por ejemplo, los niveles de factor proteico en el mismo. Los métodos descritos en el presente documento dan como resultado una modificación local y transitoria del microentorno, evitando así que otras células sufran una toxicidad indeseable. El 15 suministro de tales genes puede lograr menores concentraciones de factores tales como CXCL12, preparando al hígado para resistir la migración/invasión de las células de cáncer colorrectal. La asociación entre CXCL12 y CXCR4 juega un papel crucial en la metástasis en el hígado, en la que la expresión en exceso de CXCR4 es característica de las lesiones por metástasis colorrectal en el hígado humano altamente metastásico, así como los altos niveles de CXCL12 expresados en el hígado (Shan-shan Zhang, Zhi-peng Han, Ying-ying Jing, et al., CD133+CXCR4+ colon 20 cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. *BMC Med.* 10: 85, 2012).

El objeto de estudio descrito en el presente documento no se limita a ningún tejido o célula diana en particular. Como se divulga en el presente documento, la elección como diana del microentorno es un paradigma anticanceroso único, en el que las lesiones metastásicas no son una diana específica, sino que en lugar de eso, el entorno se prepara para que no sea adecuado para que se forme o progrese la metástasis, lo que finalmente permite una disminución del crecimiento y aparición de metástasis. A través de la incorporación de un radical de direccionamiento, por ejemplo, el radical de direccionamiento de galactosa para la expresión hepática local de la proteína terapéutica, es posible dirigirse al tejido deseado sin que se encuentre expresión en órganos o suero distintos de la diana. Dado que este enfoque se puede utilizar en muchos tejidos además del hígado y con otras trampas además de CXCL12, se pueden elegir como diana otros tejidos metastásicos, tales como mama, pulmón, ganglios linfáticos, próstata, cerebro, páncreas y hueso.

30 Otros factores del microentorno pueden desempeñar un papel en la migración, la invasión y la proliferación de metástasis del cáncer. Estos factores se vuelven más pronunciados en el órgano de interés cuando se induce la inflamación. Esta inflamación puede estar asociada con muchos factores ambientales diferentes que varían desde las 35 proteínas secretadas por el cáncer primario hasta la dieta del paciente. Por lo tanto, también se contempla el direccionamiento de estos factores en la materia descrita en el presente documento. En consecuencia, el direccionamiento de los factores en tejido altamente metastásico o tejido que es susceptible de metástasis es una terapia prometedora para reducir la aparición/progresión de metástasis en muchos órganos.

La especificidad insuficiente por la diana de la mayoría de los enfoques en el tratamiento de enfermedades ha limitado las aplicaciones para el tratamiento satisfactorio de estas enfermedades en medicina clínica. Además, las deficiencias de la terapia génica, debido a las numerosas barreras extracelulares e intracelulares, han dificultado verdaderamente 40 los tratamientos clínicos de muchas enfermedades. Por lo tanto, para superar estas barreras, los autores del presente documento han desarrollado un vector para aplicaciones clínicas con alta especificidad, acumulación y suministro al núcleo de la célula diana. El objeto de estudio descrito en el presente documento supera los problemas de las terapias anteriores y no solo puede tratar la metástasis en el hígado y los cánceres primarios, sino muchas otras enfermedades 45 hepáticas tales como el VHB, el hígado graso, la cirrosis hepática y muchas otras. Por otra parte, además de las enfermedades hepáticas, a través de la incorporación de diferentes radicales de direccionamiento, tales como análogos de adenosina, que se dirigen a los receptores de adenosina A2B altamente expresados en las células epiteliales pulmonares, se prepara el vector para acumular y suministrar trampas, tales como trampas de ADNp contra CXCL12 u otros factores del microentorno, que juegan un papel en otros tejidos susceptibles de metástasis. En 50 consecuencia, los métodos y composiciones descritas en el presente documento se pueden utilizar para preparar los factores del microentorno de numerosos tejidos que se sabe que tienen altas tasas de metástasis, tales como pulmón, ganglios linfáticos, mama, hueso y otros.

Otro tipo de cáncer recalcitrante es el tumor pancreático, que se sabe que es resistente a la inmunoterapia debido a su fuerte microentorno tumoral (TME) inmunosupresor. CXCL12 y PD-L1 son dos moléculas que controlan el TME 55 supresor. Se fabricaron proteínas de fusión, también denominadas en el presente documento como un tipo de trampa, que se unen a una de estas dos moléculas con alta afinidad ($K_d = 4 \text{ nM}$ y 16 pM , respectivamente) y sometieron a prueba para determinar la unión específica con la diana. La ADN plasmídico que codificaba cada trampa se formuló en nanopartículas de LPD y se inyectó I.V. a ratones con cáncer de páncreas ortotópico KPC. La expresión de las trampas fue principalmente en el tumor y secundariamente en el hígado. La terapia de trampa combinada redujo el tumor y prolongó significativamente la supervivencia del anfitrión en 57%. Cualquiera de las trampas sola solo produjo 60 un efecto terapéutico parcial. Los autores del presente documento también encontraron que la trampa contra CXCL12 permitió la penetración de células T en el tumor y la trampa contra PD-L1 permitió que las células T infiltradas destruyeran las células tumorales. La terapia de trampa combinada también redujo significativamente la metástasis

de las células tumorales a otros órganos. No se encontró toxicidad en ninguno de los órganos principales, incluidos el hígado y el riñón. En consecuencia, la terapia de trampa combinada modificó significativamente la TME supresora para permitir que el sistema inmunitario del anfitrión destruyera las células tumorales.

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en este campo.

I. Definiciones

El término "microentorno" se refiere a la célula diana y su entorno adyacente.

10 El término "construcción" se refiere a un segmento de material genético construido artificialmente, tal como una secuencia de ácido nucleico, que se va a expresar en un tejido o célula diana. Puede contener el inserto genético y también estará presente en el vector cualquier promotor necesario, etc.

15 El término "susceptible" se refiere a un tejido o célula que, debido a su microentorno, tienen tendencia a que ciertos tipos de cánceres crezcan o hagan metástasis en el tejido o la célula. A modo de ejemplo no limitante, los cánceres colorrectales tienden a hacer metástasis y crecer en el hígado como resultado del microentorno de las células hepáticas. Se sabe que otros cánceres hacen metástasis en tejidos y células particulares del organismo. En otro ejemplo no limitante, el cáncer de mama tiende a hacer metástasis en el hígado, el cerebro y los ganglios linfáticos regionales y en el hueso. Por lo tanto, estos tejidos y células son susceptibles como se emplea en el presente documento.

20 Como se emplea en el presente documento, "reducción de la metástasis" se refiere a la inhibición o disminución de la metástasis en tejidos y células susceptibles. Se pueden utilizar numerosas formas de determinar una reducción en la metástasis. A modo de ejemplo no limitante, los sujetos con un tipo de cáncer que típicamente se sabe que metastatiza y que se esperaría que metastatizaran que muestran poca o ninguna metástasis después del tratamiento habrán mostrado una reducción en la metástasis. En particular, el objeto de estudio descrito en el presente documento proporciona la reducción de la metástasis de cualquier cáncer en el hígado.

25 Como se emplea en el presente documento, el término "trampa" se refiere a un producto de expresión que se une, inhibe o reduce la actividad biológica de la molécula diana en el microentorno. La trampa es suministrada mediante vectores, que pueden ser virales, no virales, sintéticos, tales como nanopartículas y similares, cada uno de los cuales comprende los materiales necesarios para la subclonación y expresión de la trampa. La trampa también se puede suministrar mediante liposomas o células vivas, incluidos monocitos y células madre. La inhibición se puede medir por medio de K_D , por ejemplo, o mostrando una reducción en la actividad de la diana, de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% o más. La trampa está diseñada para trabajar en una molécula diana deseada, que en muchos casos es una proteína atrapable como se conoce en la técnica en vista del objeto de estudio descrito en el presente documento.

30 El término "transitorio" se refiere a un efecto que no es permanente.

35 El término "sujeto" se refiere a animales tales como mamíferos, incluidos, pero sin limitarse a, primates (p. ej., seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado una enfermedad tal como cáncer o una enfermedad del hígado.

40 Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o la propagación del cáncer. Para los fines de esta divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitarse a, el alivio de los síntomas, la disminución del grado de enfermedad, el estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, el retraso o la desaceleración de la progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección o el trastorno, así como aquellos propensos a tener la afección o el trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la afección o el trastorno.

45 La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de la trampa que (i) trata o previene la enfermedad, afección o trastorno en particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno en particular, o (iii) previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno en particular descrito en el presente documento. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, retardar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas a los órganos periféricos; inhibir (es decir, retardar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

50 55 El término "cáncer" se refiere a, o describe, la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" indica sales que no son indeseables biológicamente o de otro modo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición tanto de ácido como de base. La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser compatible química y/o toxicológicamente con los otros ingredientes que componen una formulación y/o el mamífero que se trata con ellos.

5 Como se emplea en el presente documento, el término "suministro" se refiere a la transferencia de una sustancia o molécula (p. ej., un polinucleótido) a un sitio fisiológico, tejido o célula. Esto abarca el suministro a la porción intracelular de una célula o al espacio extracelular. El suministro de un polinucleótido a la porción intracelular de una célula también se denomina a menudo "transfección".

10 Como se emplea en el presente documento, el término "intracelular" o "intracelularmente" tiene su significado habitual como se entiende en la técnica. En general, el espacio interior de una célula, que está rodeado por una membrana, se define como espacio "intracelular". De manera similar, como se emplea en el presente documento, el término "extracelular" o "extracelularmente" tiene su significado habitual como se entiende en la técnica. En general, el espacio fuera de la membrana celular se define como espacio "extracelular".

15 Un fibroblasto es una célula que sintetiza matriz extracelular y colágeno, el marco estructural (estroma) de los tejidos animales. La función principal de los fibroblastos es mantener la integridad estructural de los tejidos conectivos secretando continuamente precursores de la matriz extracelular. En realizaciones, los fibroblastos son una diana del estroma para los vectores descritos en el presente documento.

En el presente documento se pueden utilizar las siguientes abreviaturas. Se definen algunas abreviaturas que aparecen en el texto de este documento.

20	ALT	Alanina Aminotransferasa
	AST	Aspartato Aminotransferasa
	BLI	Interferometría de BioCapa
	BUN	Nitrógeno Ureico en Sangre
	CMV	Citomegalovirus
25	CCR	Cáncer Colorrectal
	DLS	Dispersión Dinámica de la Luz
	DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
	DOPA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato
	DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano
30	DSPE	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
	ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
	GFP	Proteína Fluorescente Verde
	LCP	Fosfato de Calcio Lipídico
	mc	Monocíclico
35	NHS	N-Hidroxisuccinimida
	PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
	PEG	PolietilenGlicol
	PK	Farmacocinética
	pTrap	Galactosa-PEG-LCP con trampa contra pCXCL12/mc-CR8C
40	TEM	Microscopio de Electrónico de Transmisión

Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina (también denominada en el presente documento "dominio variable de cadena ligera" ("dominio VL") o "dominio variable de cadena pesada" ("dominio VH"), respectivamente) consiste en una región "marco" interrumpida por tres "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones marco sirven para alinear las CDR para la unión específica a un epítopo de un antígeno. Las CDR incluyen los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son los principales responsables de la unión al antígeno. Del extremo amino al extremo carboxilo, los dominios VL y VH comprenden las siguientes regiones marco (FR) y CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VL también se denominan en el presente documento, respectivamente, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3; las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VH también se denominan en el presente documento, respectivamente, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3.

La asignación de aminoácidos a cada dominio VL y VH está de acuerdo con cualquier definición convencional de CDR. Las definiciones convencionales incluyen, la definición de Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), la definición de Chothia (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342:878-883, 1989); una combinación de CDR de Chothia Kabat en la que CDR-H1 es una combinación de las CDR de Chothia y Kabat; la definición de AbM utilizada por el soporte lógico de modelado de anticuerpos de Oxford Molecular; y la definición de contacto de Martin et al. (bioinfo.org.uk/abs) (véase la Tabla 1). Kabat proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración de Kabat) en la que a los restos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número. Cuando se dice que un anticuerpo comprende CDR según una determinada definición de CDR (p. ej., Kabat), esa definición especifica el número mínimo de restos de la CDR presentes en el anticuerpo (es decir, las CDR de Kabat). No excluye que también estén presentes otros restos que caen dentro de otra definición convencional de CDR pero fuera de la definición especificada. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende CDR definidas por Kabat incluye, entre otras posibilidades, un anticuerpo en el que las CDR contienen restos de CDR de Kabat y ningún otro restos de CDR, y un anticuerpo en el que CDR H1 es una combinación de CDR H1 de Chothia-Kabat y otras CDR contienen resto de CDR de Kabat y ningún resto de CDR adicional basado en otras definiciones.

Tabla 1

Definiciones convencionales de CDR utilizando la numeración de Kabat					
Bucle	Kabat	Chotia	Combinación de Chothia y Kabat	AbM	Contacto
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26-H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

*CDR-H1 de Chothia puede terminar en H32, H33 o H34 (según la longitud del bucle). Esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat ubica las inserciones de restos adicionales en 35A y 35B, mientras que la numeración de Chothia los ubica en 31A y 31B. Si no están presentes H35A ni H35B (numeración de Kabat), el bucle CDR-H1 de Chothia termina en H32. Si solo está presente H35A, termina en H33. Si tanto H35A como H35B están presentes, termina en H34.

El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítopo se puede formar a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítulos formados a partir de aminoácidos contiguos (también conocidos como epítulos lineales) típicamente se conservan con la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítulos formados por plegamiento terciario (también conocidos como epítulos conformacionales) típicamente se pierden con el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítulos incluyen, por ejemplo, cristalográfia de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p. ej. Epitope Mapping Protocols, en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Glenn E. Morris, ed. (1996). El epítopo puede ser lineal. El epítopo también puede ser un epítopo conformacional. Cabe señalar que el término "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un lípido catiónico" representa uno o más lípidos catiónicos. Como tales, los términos "un", "uno o más" y "al menos uno" se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" se utilizan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera lo contrario.

Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor, abarque variaciones de, en algunas realizaciones \pm 50%, en algunas realizaciones \pm 20%, en algunas realizaciones \pm 10%, en algunas realizaciones \pm 5%, en algunas realizaciones \pm 1%, en algunas realizaciones \pm 0,5% y en algunas realizaciones \pm 0,1% de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados o emplear las composiciones divulgadas.

A continuación se establecen definiciones adicionales.

II. Métodos

En una realización, el presente objeto de estudio se refiere a un método para modificar el microentorno de una célula diana que comprende administrar sistémicamente a un sujeto una composición que comprende un vector, en donde

el vector comprende una construcción para la expresión de una trampa en la células diana, en donde la trampa se expresa en la célula diana, en donde se modifica el microentorno de la célula diana.

Como se describe en el presente documento, la expresión de la trampa da como resultado la presencia de una cantidad eficaz de la trampa expresada para modificar el microentorno de la célula diana.

- 5 La modificación del microentorno de una célula diana comprende la reducción de la cantidad de una molécula diana que normalmente está presente en el microentorno. Como se emplea en el presente documento, la reducción de la cantidad se refiere a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% o más de reducción de la cantidad de la molécula diana en comparación con la cantidad en ausencia de la trampa .
- 10 Las moléculas diana útiles incluyen proteínas, tales como enzimas, quimiocinas, citocinas, factores proteicos y combinaciones de los mismos. Las dianas adecuadas incluyen las de la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

CXC (quimiocinas alfa)		
CXCL1	GRO- α /SCYB-1/MGSA/GRO-1/NAP-3 (MIP-2 α /KC)	CXCR1, CXCR2
CXCL2	GRO- β / SCYB-2/GRO-2/MIP-2 α (MIP-2 β /KC)	CXCR2
CXCL3	GRO- γ /SCYB-3/GRO-3/MIP-2 β (KC)	CXCR2
CXCL4	PF-4/SCYB-4	Desconocido
CXCL5	ENA-78/SCYB-5 (LIX)	CXCR2
CXCL6	GCP-2/SCYB-6	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2/(SCYB-7/PBP/CTAP-III/ β -TG	CXCR1, CXCR2
CXCL8	SCYB-8/GCP-1/NAP-1/MDNCF	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG/SCYB-9	CXCR3
CXCL10	IP-10/SCYB-10	CXCR3, KSHV-
GPCR		
CXCL11	I-TAC/ SCYB-11/ β -R1/H174/IP-9	CXCR3
CXCL12	SDF-1/SCYB-12/PBSF	CXCR4
CXCL13	BCA-1/SCYB-13	CXCR5
CXCL14	BRAK/ SCYB-14/Bolecina	Desconocido
CXCL16	Pequeña citocina inducible B6	CXCR6
C (quimiocinas gamma)		
XCL1	Linfotactina/SCYC1/SCM-1 α /Linfotactina α	XCR1
XCL2	SCM-1b/SCYC2/Linfotactina β	XCR1
CX ₃ C (quimiocinas delta)		
CX ₃ CL1	Fractalcina/SCYD1	CX3CR1
CCL1	I-309/SCYA1 (TCA-3)	CCR8
CCL2	MCP-1/SCYA2/MCAF/HC11 (JE)	CCR2, CCR5, CCR10
CCL3	MIP-1 α /SCYA 3/LD78 α /SIS- α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β /SCYA4/ACT-2/G-26/HC21/LAG-1/SIS- γ	CCR5, CCR10
CCL5	RANTES/SCYA5/SIS- δ	CCR1, CCR3, CCR5,
CCR10		
CCL7	MCP-3/SCYA7	CCR1, CCR2, CCR3
CCR5,		
CCL8	MCP-2/SCYA8/HC14 (MARC)	CCR2, CCR3, CCR5

CCR1,		
CCL11	Eotaxina/SCYA11	CCR3
CCL13	MCP-4/SCYA13/Ck β 10/NCC-1	CCR1, CCR2, CCR3,
CCR5		
CCL14	HCC-1/SCYA14/ Ck β 1/MCIF/NCC-2/CC-1	CCR1
CCL15	MIP-1 δ /SCYA15/Lkn-1/HCC-2/MIP-5/NCC-3/CC-2	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4/SCYA16/Ck β 12/LEC/LCC-1/NCC-4/ILINCK/LMC/Mtn-1	CCR1
CCL17	TARC/ SCYA17 (ABCD-2)	CCR4
CCL18	P ARC/SCY A18/Ck β 7/DC-CK1/AMAC-1/MIP-4/DCtactina	Desconocido
CCL19	MIP-3 β / SCYA19/ Ck β 11/ELC/Éxodo-3	CCR7
CCL20	MIP-3 α / SCYA20/LARC/Éxodo-1	CCR6
CCL21	6Cquina/SCYA21/ Ck β 9/SLC/Éxodo-2	CCR7
CCL22	MDC/SCYA22 (ABCD-1)	CCR4
CCL23	MPIF/SCYA23/ Ck β 8/ Ck β 8-1/MIP-3/MPIP-1	CCR1
CCL24	Eotaxina-2/SCYA24/ Ck β 6/MPIF-2	CCR3
CCL25	TECK/SCYA25/ Ck β 15	CCR9
CCL26	Eotaxina-3/SCYA26/MIP-4a/TSC-1/IMA	CCR3
CCL27	CTACK/SCYA27/ESkine/Skinkine	CCR3, CCR2, CCR10
CCL28	CCL28/SCYA28/MEC	CCR10, CCR3

Una molécula diana particularmente útil es CXCL12. Otros Factores Proteicos incluyen: EGF, neurregulina, FGF, HGF, VEGF, VEGFR y NRP-1, Ang1 y Ang2, PDGF (homodímero BB) y PDGFR, TGF- β , endogolina y receptores de TGF- β , MCP-1, histamina, integrinas α 2 β 1, α V β 3, α V β 5, α V β 6, α 6 β 4 y α 5 β 1, VE-cadherina y CD31, efrina, activadores del plasminógeno, inhibidor-1 del activador del plasminógeno, eNOS y COX-2, AC133, ID1/ID3, LOX y HIF.

5 Trampas Inhibidoras y de Bloqueo y sus Dianas: Las trampas inhibidoras para dianas de macromoléculas incluyen trampas que pueden ser moléculas de proteínas que se unen específicamente e inhiben o bloquean adicionalmente las funciones biológicas de una diana de interés. Las dianas de las trampas inhibidoras o de bloqueo pueden ser cito/quimiocinas y sus correspondientes receptores, incluidos, pero sin limitarse a, IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-21 (y receptores de IL), TNF-alfa (y receptor de TNF-alfa), TGF-beta (y receptor de TGF-beta), CSF-1 (y receptor de CSF-1), CXCR1 y sus ligandos (CXCL5, CXCL6, CXCL8), CXCR2 y sus ligandos (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 y CXCL8), CXCR3 y sus ligandos (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11), CXCR4 y su ligando (CXCL12), CXCR5 y su ligando (CXCL13), CX3CR1 y su ligando (CX3CL1), CCR1 y sus ligandos (CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16), CCR3 y sus ligandos (CCL4, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28), CCR4 y sus ligandos (CCL17, CCL22), CCR5 y sus ligandos (CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15, CCL16, CCL20), CCR6 y su ligando (CCL20), CCR7 y sus ligandos (CCL19, CCL21), CCR9 y su ligando (CCL25), CCR10 y sus ligandos (CCL27 y CCL28), ACKR3 y sus ligandos (CCL11, CCL12), ACKR6 y su ligando (CCL18).

10 15 20 Las dianas de las trampas inhibidoras pueden ser proteínas relacionadas con el punto de control inmunitario, incluidas, pero sin limitarse a, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (CD270 o TNFRSF14), BTLA (CD272), TIM-3, GAL9, TIGIT, A2aR, LAG-3, KIR y MHC clase I o II.

25 Las dianas también incluyen aquellas cuya regulación por incremento o por disminución por captura inhibidora suprimirá la expresión o reducirá la actividad biológica de IDO, TDO, arginasa-1/2, receptores de adenosina, CD39, CD73, COX2, receptores EP e iNOS que están involucrados en catabolismo (por IDO, TDO, ARG1/2) de aminoácidos (es decir, triptófano, arginina, cisteína, glutamina y fenilalanina), generación de adenosina (por CD39, CD73 y mediada por receptores de adenosina), prostaglandina E2 (por COX2), especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (por iNOS), dando todas como resultado la inmunosupresión de TME.

30 Trampas inhibidoras para metabolitos de moléculas pequeñas: las dianas de las trampas inhibidoras también pueden ser moléculas pequeñas, incluidas, pero sin limitarse a, metabolitos de triptófano (es decir, quinurenina que es producida por IDO o TDO y señales a través del receptor arilhidrocarbonado), AMPc y adenosina, que juegan un papel crítico en la inhibición de las células T, el reclutamiento y/o la expansión de las células inmunosupresoras y, en consecuencia, el microentorno tumoral inmunosupresor.

Trampas Estimuladoras y sus Dianas: las trampas también pueden ser simuladas, incluidas aquellas que actúan de manera agonística sobre las dianas del punto de control inmunitario CD28, ICOS (CD278), 4-1BB (CD137 o TNFRSF9), OX40 (CD134 o TNFRSF4), GITR (CD357 o TNFRSF18), CD27 (TNFRSF7) y CD40 (TNFRSF5). Las trampas estimuladoras también pueden ser aquellas que poseen o imitan los efectos agonísticos de los ligandos de los receptores anteriores, incluidos, pero sin limitarse a, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), B7-H5 (VISTA o Gi24), ICOSL (B7H2 o CD275), 4-1BBL (CD137L), OX40L (CD252), GITRL, CD27L (CD70) y CD40L (CD154). Las dianas de las trampas agonísticas también incluyen algunos receptores tipo toll, incluidos, pero sin limitarse a, TLR4, TLR7, TLR8 y TLR9 que desempeñan funciones críticas en la activación de las células T. Las trampas pueden basarse en dominios o fragmentos similares a anticuerpos. Se ha encontrado que la expresión local y transitoria de las trampas de quimio/citocina da como resultado la actividad biológica deseada y baja toxicidad. La mayoría de los productos biológicos que se unen a la diana se basan en un anticuerpo monoclonal de longitud completa que tiene una vida media prolongada. De hecho, la administración sistémica y prolongada de una trampa contra CXCL12 puede provocar daño hepático transitorio y reducción del recuento de glóbulos blancos, como se demuestra en los datos *in vivo* de los autores de la presente invención. Además, debido al gran tamaño, la estructura compleja y las modificaciones postraduccionales sofisticadas, los anticuerpos de longitud completa tienen varias desventajas intrínsecas al servir como trampas de quimio/citocinas, incluida ineeficiencia en la penetración del tejido para acceder a TME, dificultad para diseñar y optimizar las propiedades de captura de las dianas, tales como la interrupción de la unión del receptor, alta estabilidad, biespecificidad (si fuera necesario) y efectos secundarios inducidos por Fc. La estrategia de los autores de la presente invención para abordar el desafío es desarrollar nuevas moléculas de captura con las características deseadas a partir de bibliotecas de proteínas basadas en pequeños dominios de proteínas, incluidos, pero sin limitarse a, el dominio VH de inmunoglobulina, el dominio VL de inmunoglobulina, una proteína de fusión VH y VL, scF_v, un péptido o proteína obtenidos a partir de una región de unión y/o marco de un anticuerpo, un dominio de unión a la diana que no sea de inmunoglobulina, tal como un mimético de anticuerpo de un solo dominio basado en un armazón que no sea de inmunoglobulina (tal como un monocuerpo basado en el dominio FN, anticuerpo basado en el dominio Z, DARPin), individualmente y en cualquier combinación.

Algunos anticuerpos de unión a la diana conocidos pueden alterarse y diseñarse para que sirvan como trampa para el enfoque de suministro de genes transitorio y local descrito en este trabajo. Para competir eficazmente con los receptores naturales, una trampa debe poseer una especificidad de unión y una afinidad inusualmente altas contra el sitio de unión del receptor, una propiedad que es más probable que se logre a través de la selección dirigida de proteínas de una biblioteca de fragmentos de proteínas o anticuerpos con una alta diversidad en los bucles o restos de la superficie que podrían utilizarse en la interacción con una diana de interés, utilizando tecnologías de presentación y selección de proteínas/péptidos tales como la presentación en fagos, la presentación en la superficie celular, la presentación de ARNm, la presentación de ADN, la presentación en ribosomas que se utilizan ampliamente en las selecciones de proteínas *in vitro*.

Como se describe en el presente documento, el bloqueo local y transitorio de las vías de señalización mediado por ciertas quimio/citocinas clave, p. ej., CXCL12, una quimiocina que se ha implicado en el desempeño de un papel fundamental en la migración/invasión de células de cáncer colorrectal positivas para CXCR4 al hígado, puede prevenir significativamente la metástasis de CCR. En primer lugar, los autores de la presente invención diseñaron un gen trampa contra CXCL12 basado en secuencias de anticuerpos anti-CXCL12, fusionando un dominio VH y un VL a través de un conector flexible resistente a proteasa. Para lograr una secreción eficiente desde los hepatocitos del hígado después de la expresión, se incorporó un péptido señal fuerte en el extremo N-terminal, mientras que se introdujeron etiquetas de afinidad en el extremo C-terminal para facilitar la purificación y detección de proteínas. La secuencia codificante de la trampa contra CXCL12 resultante se clonó en un vector de expresión pCDNA3.1 dirigido por un promotor CMV. Se encontró que la trampa contra CXCL12 resultante expresada y purificada a partir de células 293T tenía una K_D de 4 nM con CXCL12 (**Fig. 2A**), mientras que su unión con CXCL1, CXCL8 y CXCL10 no fue detectable. Esta trampa contra CXCL12 suprimió en gran medida la migración y la invasión de células CT-26-FL3 estimuladas con CXCL12 (**Fig. 2B-C**). La expresión local y transitoria de esta trampa contra CXCL12 se probó utilizando el sistema de suministro de genes basado en la nanopartículas de fosfato de calcio y lípidos (LCP) (**Fig. 5**). Como se detalla a continuación, tres tratamientos con el ADNp de la trampa contra pCXCL12 formulado en LCP resolvieron casi por completo cualquier aparición de metástasis colorrectal en el hígado CT26-FL3 sin signos de propagación del cáncer a otros órganos. (**Fig. 6**).

Para generar una trampa contra CXCL12 que tenga una potencia mucho mayor, los autores de la presente invención desarrollaron una trampa contra CXCL12 basada en la biblioteca de dominios VH. Para facilitar la selección de proteínas *in vitro*, los autores de la presente invención expresaron y purificaron CXCL12 recombinante de tipo salvaje que contenía una etiqueta de biotina C-terminal (wtCXCL12-biotina, **Fig. 1A**), así como CXCL12 mutante (Δ CXCL12, **Fig. 1A**) en el que los 8 restos N-terminales (resaltados en color cian en **Fig. 1A**) que están implicados en la unión a CXCR4 fueron eliminados. Se utilizó wtCXCL12-biotina como diana para la selección positiva, mientras que se utilizó Δ CXCL12 para eliminar secuencias que se unían a sitios no deseados mediante lavado competitivo. Se utilizaron estrategias similares para desarrollar trampas de un solo dominio contra otras quimiocinas, como se ilustra en la **Fig. 1B** para CCL2 y CCL5.

En resumen, la biblioteca de dominios VH presentada aclarada previamente con una columna de estreptavidina-agarosa se incubó con una cantidad apropiada de wtCXCL12 biotinilado en un tampón de unión que facilitaba la formación de un enlace disulfuro. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, seguido de la adición de

cuentas de agarosa con estreptavidina prelavadas para capturar las secuencias de V_H . Las cuentas resultantes se lavaron primero con un tampón de unión para eliminar las secuencias unidas de forma no específica, seguido de un lavado competitivo con un gran exceso de Δ CXCL12 para eliminar las secuencias de V_H que se unieron a CXCL12 en sitios alejados del extremo N-terminal de unión a CXCR4. El grupo enriquecido se regeneró para una nueva ronda de selección. Se realizó un lavado competitivo extenso para facilitar el enriquecimiento de las secuencias que se unían al CXCL12 N-terminal con una tasa de separación muy lenta. Después de cinco rondas de selección, los autores de la presente invención identificaron con éxito 6 secuencias de V_H que se unían fuerte y específicamente a wtCXCL12, pero no a Δ CXCL12. Como se muestra en **Fig. 1A**, estas secuencias tienen velocidades de reacción muy lentas, con una afinidad de unión a wtCXCL12 en el intervalo de nanomolar baja a picomolar.

10 **Trampas bivalentes con efectos sinérgicos de captura de quimio/citocinas**

Las quimiocinas existen como monómeros y dímeros en condiciones fisiológicas, y la evidencia convincente sugiere que ambas formas regulan la función *in vivo*. Se planteó la hipótesis de que la dimerización de quimiocinas perturba la distribución de los subestados conformacionales, lo que a su vez afecta de manera diferencial a la activación de las diversas vías de señalización aguas abajo. Se ha informado de que CXCL1, CXCL12, CCR2, CCR5 e IL-6 adoptan todos estructuras diméricas u oligoméricas para interactuar con sus receptores de emparejamiento.

En general, las quimiocinas CXC se dimerizan utilizando la primera hebra β y la hélice α formando una estructura globular, con la interfaz del dímero ubicada lejos de las regiones N-terminal y de bucle N de unión al receptor. Las quimiocinas CC se dimerizan utilizando sus restos de bucle N y forman una estructura extendida, por lo que sus dominios de dimerización y de unión al receptor se solapan. CXCL12, por ejemplo, forma en condiciones fisiológicas tanto monómeros como dímeros, que tienen distintos efectos sobre la función y la señalización celulares (Ray P 2012 PMID22142194). Mientras que CXCL12 monomérico activa preferentemente la señalización de CXCR4 a través de Gai y Akt, la forma dimérica promueve de manera más eficaz el reclutamiento de β -arrestina 2 a CXCR4 y la quimiotaxis de células cancerosas que expresan CXCR4. Significativamente, CXCL12 dimérico se une preferentemente a CXCR4 sobre CXCR7. Estos hallazgos indican que la captura de CXCL12 dimérico podría bloquear de manera más efectiva las vías de señalización mediadas por CXCR4. Las trampas homodiméricas o heterodiméricas se pueden generar fácilmente a través de la fusión genética (**Fig. 1C**). Para generar trampas de quimio/citocinas homodiméricas, cada trampa de dominio individual puede fusionarse genéticamente consigo misma a través de un conector flexible como una proteína de fusión recombinante. De manera similar, las trampas heterodiméricas que se unen a una quimiocina de interés en dos sitios únicos se pueden generar utilizando dos trampas que se unen a sitios no solapantes con afinidades similares.

Trampas biespecíficas que bloquean señalizaciones mediadas por dos quimio/citocinas diferentes.

La redundancia de la red de quimiocinas implicada en la metástasis tumoral y la inmunosupresión de TME indica que una terapia de captura que actúa sobre más de una vía de señalización debería ser más eficaz. Se pueden generar trampas biespecíficas que pueden bloquear simultáneamente las vías de señalización mediadas por dos quimio/citocinas diferentes al vincular genéticamente dos trampas con especificidad única a través de un conector flexible de longitud ajustable (**Fig. 1C**).

Trampas trivalentes contra PD-L1 con una eficacia de captura de dianas muy potente

Una de las formas más efectivas de desarrollar un ligando de alta calidad que se une a un diana de interés es convertir el dominio de unión a la diana a su forma multivalente, como se observa en casi todos los tipos de anticuerpos y numerosas proteínas interactivas multiméricas. Para minimizar la posible inmunogenicidad, se pueden utilizar dominios de trimerización altamente estables de proteínas extracelulares abundantes en ratones, seres humanos u otros organismos o dominios de trimerización basados en tales proteínas para la generación de trampas trivalentes para el propósito de suministro local y transitorio de genes. Los autores de la presente invención eligieron utilizar un dominio de trimerización de CMP-1 humano. Las fuertes interacciones hidrófobas e iónicas dentro del extremo C-termina de CMP-1 de ratón o humano dan como resultado una estructura trimérica paralela, unida por disulfuro y en forma de bastón con alta estabilidad. Los autores de la presente invención desarrollaron una plataforma tecnológica robusta que permite la conversión fácil de un dominio de unión a la diana de proteínas endógenas (tales como PD-L1, PD-1) o un dominio de afinidad de la selección de proteínas en su forma trivalente mediante la fusión genética con el dominio de trimerización, dando como resultado trampas trivalentes con alta estabilidad y avidez significativamente mejorada. Típicamente, las trampas trivalentes que se unen a una diana de interés con afinidades de unión de nanomolares bajas a picomolares se pueden generar fácilmente a partir de dominios monoméricos que son 1000 veces más débiles. La secuencia de ratón de este dominio de trimerización es altamente homóloga a la de CMP-1 humana, lo que facilita el cambio a la versión humana si se desea una aplicación traduccional. Dado que la trampa trimérica se forma a través del autoensamblaje de tres monómeros idénticos, solo requiere un ADNc que codifique el monómero, lo que hace que el suministro del gen sea mucho más corto y fácil. Utilizando esta estrategia, los autores de la presente invención desarrollaron una potente trampa contra PD-L1 al fusionar genéticamente el dominio extracelular humano o de ratón de PD-1 que se une a PD-L1 con un dominio de trimerización estable que es muy abundante en los cartílagos humanos y de ratón (**Fig. 1D**). La proteína trivalente resultante se unió a PD-L1 con una Kd de aproximadamente 16 picomolar, que es 10.000 veces mayor que la existente entre PD-1 y PD-L1 endógenos (**Fig. 1D**). Además, en un modelo KPC inmunocompetente de cáncer de páncreas, el ADN plasmídico que codifica

esta trampa trimérica (**Fig. 15**) indujo eficientemente la reducción del tumor después de la administración IV de NP, cuando se utilizó junto con una trampa contra CXCL12.

En otra realización, un trímero formado a partir de tres polipéptidos de fusión, en donde cada polipéptido de fusión comprende un dominio extracelular de PD-1, un conector flexible y un dominio de trimerización, dicho trímero capaz de unirse a PD-L1, en donde el polipéptido de fusión está codificado por un secuencia de ácido nucleico con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25.

En realizaciones, las trampas útiles incluyen receptores. Los receptores de citocinas existen en familias estructuralmente relacionadas y comprenden complejos de señalización molecular de alta afinidad que facilitan la comunicación mediada por citocinas. Los receptores de citocinas de tipo I tienen ciertos motivos conservados en su dominio de aminoácidos extracelulares y carecen de actividad intrínseca de proteína tirosina cinasa. Esta familia incluye receptores para IL2 (subunidad beta), IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL9, IL11, IL12, GM-CSF, G-CSF, Epo, LIF, CNTF, y también los receptores para Trombopoyetina (TPO), Prolactina y Hormona del crecimiento. La familia de receptores de citocinas tipo I se subdivide en tres subconjuntos en función de la capacidad de los miembros de la familia para formar complejos con uno de los tres tipos diferentes de componentes de señalización del receptor (gp130, beta común y gamma común - la cadena gamma del receptor de IL2).

Los receptores de citocinas de tipo II son receptores multiméricos compuestos por subunidades heterólogas y son receptores principalmente para interferones. Esta familia incluye receptores para IFNalpha, IFN-beta, IFN-gamma, IL10, IL22 y factor tisular. Los dominios extracelulares de los receptores de citocinas de tipo II comparten similitudes estructurales en su dominio de unión a ligandos. Se han descrito varios motivos de secuencia intracelular conservados, que probablemente funcionan como sitios de unión para las proteínas efectoras intracelulares JAK y STAT.

Los receptores de quimiocinas son receptores acoplados a proteínas G con 7 estructuras transmembrana y se acoplan a proteínas G para la transducción de señales. Los receptores de quimiocinas se dividen en diferentes familias: receptores de quimiocinas CC, receptores de quimiocinas CXC, receptores de quimiocinas CX3C y receptores de quimiocinas XC (XCR1).

Los miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) comparten un dominio rico en cisteína (CRD) formado por tres enlaces disulfuro que rodean un motivo central de CXXCXXC creando una molécula alargada. TNFR se asocia con procaspasas a través de proteínas adaptadoras (FADD, TRADD, etc.) que pueden escindir otras procaspasas inactivas y desencadenar la cascada de caspasas, lo que destina irreversiblemente la célula a la apoptosis.

Los receptores de TGF-beta son receptores de serina/treonina quinasa de un solo paso. Los receptores de TGF-beta incluyen TGFBR1, TGFBR2 y TGFBR3, que pueden distinguirse por sus propiedades estructurales y funcionales.

Aunque los métodos incluyen la administración sistémica, los métodos actúan localmente, en el sentido de que el efecto sobre el microentorno generalmente se aísla en o alrededor de las células diana. Esto se puede lograr mediante la incorporación al vector de un ligando de direccionamiento como se describe en otra parte del presente documento.

Los métodos también son transitorios. Es decir, el efecto del método dura aproximadamente tres (3) días o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 20 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 16 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 12 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 10 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 8 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 6 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 4 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 3 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 3 horas o menos. En realizaciones, el efecto dura aproximadamente 1 hora o menos.

En otra realización, el presente objeto de estudio se refiere a un método para reducir la metástasis de un cáncer que comprende administrar sistémicamente a un sujeto que padece el cáncer una composición que comprende un vector, en donde el vector comprende una trampa, en donde la trampa se suministra a, y a continuación se expresa en, y se libera del tejido susceptible de metástasis, en donde se reduce la metástasis del cáncer en el tejido.

En esta realización, los métodos incluyen todas las variables descritas anteriormente.

Además, los métodos son particularmente útiles en cánceres como se describe en otra parte del presente documento.

La reducción de la metástasis puede ser desde una inhibición total, es decir, indetectable, hasta un nivel de metástasis inferior al esperado dado el tipo y agresividad del cáncer y/o tumor. Tales tipos y tumores son conocidos por los expertos en la técnica. Los datos que muestran una metástasis inferior a la de un control o comparador también evidencian los métodos descritos en el presente documento. La reducción puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% o más.

En otra realización, el presente objeto de estudio se refiere a un método para tratar el cáncer que comprende administrar sistémicamente a un sujeto que padece cáncer una composición que comprende un vector, en donde el vector comprende una trampa.

- En otra realización, el presente objeto de estudio se refiere a un método para tratar el cáncer que comprende, administrar sistémicamente a un sujeto que padece cáncer, una combinación, en donde la combinación comprende al menos dos vectores, en donde uno de los vectores comprende una trampa para una citocina/quimiocina, y otro vector comprende una trampa para una diana asociada con el cáncer. En un aspecto particular, la combinación comprende una trampa para una quimiocina CXCL12 y una trampa para PD-L1, y el cáncer es cáncer pancreático, tal como adenocarcinoma ductal pancreático. En otro aspecto, la combinación comprende una trampa para una quimiocina CXCL12 y una trampa para PD-1, y el cáncer es cáncer pancreático, tal como adenocarcinoma ductal pancreático. En otra realización, las combinaciones incluyen trampa contra CXCL12 con trampa contra PD-1, trampa contra CXCL12 con trampa contra PD-L1, trampa contra CXCL12 con trampa contra PD-L2, trampa contra CXCL12 con trampa contra PD-1, trampa contra CXCL12 con trampa contra CD27 agonística, trampa contra CXCL12 con trampa contra CD28 agonística, trampa contra CXCL12 con trampa contra ICOS agonística, trampa contra CXCL12 con trampa contra CD40 agonística, trampa contra CXCL12 con trampa contra OX40 agonística, trampa contra CXCL12 con trampa contra CD137 agonística, trampa contra CXCL12 con trampa contra IDO, trampa contra CXCL12 con trampa contra TDO, trampa contra CXCL12 con trampa contra ARG1, trampa contra CXCL12 con trampa contra NOS, trampa contra CXCL12 con trampa contra TGF-beta, trampa contra CXCL12 con trampa contra B7-H3, trampa contra CXCL12 con trampa contra B7-H4, trampa contra CXCL12 con trampa contra CTLA4, trampa contra CXCL12 con trampa contra HVEM, trampa contra CXCL12 con trampa contra BTLA, trampa contra CXCL12 con trampa contra LAG3, trampa contra CXCL12 con trampa contra KIR, trampa contra CXCL12 con trampa contra TIM3, trampa contra CXCL12 con trampa contra GAL9, trampa contra CXCL12 con trampa contra A2aR, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CXCR1, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CXCR2, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CXCR4, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CXCR5, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CXCR7, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCR2, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCR4, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCR5, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCR7, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCR9, trampa contra PD-1 o trampa PD-L1 con trampa contra CXCL1, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CXCL8, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CXCL10, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCL2, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCL5, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCL22, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra IL-6, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra IL-10, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra TGF-beta, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CSF1, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra B7-H3, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra B7-H4, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CTLA4, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra HVEM, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra BTLA, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra LAG3, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra KIR, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra TIM3, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra GAL9, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra A2aR, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CCR4, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra IDO-1, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra TDO, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra ARG1, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra NOS, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra PI3K, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CD27 agonística, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CD28 agonística, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra ICOS agonística, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CD40 agonística, trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra OX40 agonística, y trampa contra PD-1 o PD-L1 con trampa contra CD137 agonística.
- En otra realización, la trampa contra CXCL12 comprende una región VH de un anticuerpo anti-CXCL12 humano. En otra realización, la trampa contra CXCL12 comprende una región VL de un anticuerpo anti-CXCL12 humano. En otra realización, la trampa contra CXCL12 comprende una proteína de fusión que comprende una región VH y VL de un anticuerpo anti-CXCL12 humano. En otra realización, la trampa contra CXCL12 comprende un dominio que no es de inmunoglobulina que imita a los anticuerpos, incluidos, pero sin limitarse a, monocuerpo basado en el dominio FN, anticuerpo basado en el dominio Z y DARPin.
- En otra realización, el CXCL12 humano se establece en el número de acceso de GenBank AAH39893 (SEQ ID NO: 64) o el número de acceso de GenBank AAV49999 (SEQ ID NO: 65). En otra realización, la secuencia de ácido nucleico de CXCL12 humano se establece en el número de acceso de GenBank AY802782 (SEQ ID NO: 66).
- En otra realización, la trampa contra CXCL12 comprende una región VH, en donde dicha región VH tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 7, 12 y 17.
- En otra realización, la trampa contra CXCL12 comprende una región VH, en donde dicha región VH tiene al menos al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 17 y una región VL, en donde dicha región VL tiene al menos al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 18.
- En otra realización, la trampa contra CXCL12 consiste esencialmente en una región VH, en donde la región VH tiene al menos 90% de identidad con una región VH correspondiente de SEQ ID NO: 17. En otra realización, la trampa contra CXCL12 consiste esencialmente en una región VL, en donde la región VL tiene al menos 90% de identidad con una región VL correspondiente de SEQ ID NO: 18.
- En otra realización, la trampa contra CXCL12 comprende una región VH que tiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) en donde las tres CDR son (a) SEQ ID NOS: 3-5, respectivamente; (b) las tres CDR son SEQ ID NOS: 8-10, respectivamente; (c) las tres CDR son SEQ ID NOS: 13-15, respectivamente; o (d) las tres CDR

son SEQ ID NOS: 19-21, respectivamente y una región VL que tiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), en donde las CDR son SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente.

En otra realización, un polipéptido capaz de unirse a CXCL12 codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEC ID NO: 63.

- 5 El adenocarcinoma ductal pancreático es una enfermedad mortal que mata a 330.000 personas en todo el mundo cada año (American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2012*. Atlanta: American Cancer Society; 2012. pág. 25-6). La tasa de supervivencia a cinco años es solo de aproximadamente 12%. Se sabe que la enfermedad es resistente a la quimioterapia y a la radioterapia. También es resistente a los inhibidores del punto de control. Más de 90% de PDAC está mutado en KRas y la mayoría también contiene mutaciones adicionales en el gen p53. Se ha
10 desarrollado un modelo de ratón genéticamente modificado que contiene las mutaciones KRas y p53, es decir, los ratones KPC, desarrollan espontáneamente PDAC que imita de cerca la enfermedad clínica. Los autores de la presente invención han utilizado una línea celular obtenida a partir de tumor KPC, denominada KPC98027, que se inoculó ortotópicamente en las colas del páncreas en los ratones singénicos C57BL6. La línea de células tumorales se transdujo de manera estable con luciferasa y proteína de fluorescencia roja utilizando un vector de lentivirus.
15 Dado que el tumor es resistente a la inmunoterapia, incluidos los inhibidores de puntos de control, los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que el TME inmunosupresor puede modificarse mediante la expresión local de proteínas trampa que se dirigen a moléculas clave en el tumor. A partir del trabajo de Feig et al., CXCL12 parece ser una quimiocina clave que no permite que las células T se infiltren en el tumor (Feig et al., *Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer*, *PNAS*, 10 de diciembre de 2013; 110(50):20212-7). Una trampa contra CXCL12 expresada localmente en el tumor debería aliviar el problema. El tumor KPC expresa en exceso PD-L1, que es un punto de control en el sistema inmunitario. La expresión en exceso de PD-L1 en las células tumorales dará como resultado la destrucción de las células T a través de la interacción del eje PD-1/PD-L1. Por lo tanto, los autores de la presente invención decidieron suministrar ambas trampas al tumor mediante terapia génica. La nanopartícula (NP) de lípido-protamina-ADN (LPD)
20 bien establecida se utilizó para suministrar al tumor el ADN plasmídico que codificaba la trampa.
25

La combinación puede ser sinérgica. El término "sinérgico" como se emplea en el presente documento se refiere a una combinación terapéutica que es más eficaz que los efectos aditivos de los dos o más agentes terapéuticos individuales. Una determinación de una interacción sinérgica entre, p. ej., una trampa contra citocinas y una trampa contra PD-L1, se puede basar en los resultados obtenidos de los ensayos descritos en el presente documento. Por ejemplo, los métodos *in vivo* o *in vitro* se divulan en el presente documento. Los resultados de estos ensayos se pueden analizar utilizando el método de combinación de Chou y Talalay y el análisis de dosis-efecto con el soporte lógico CalcuSyn para obtener un Índice de Combinación (Chou y Talalay, 1984, *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55). Las combinaciones proporcionadas pueden evaluarse en uno o más sistemas de ensayo, y los datos pueden analizarse utilizando un programa convencional para cuantificar el sinergismo, el aditivismo y el antagonismo entre los agentes anticancerosos. Un ejemplo de programa es el descrito por Chou y Talalay, en *New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy*, Academic Press, 1987, Capítulo 2. Los valores del Índice de Combinación inferiores a 0,8 indican sinergia, los valores superiores a 1,2 indican antagonismo y los valores entre 0,8 y 1,2 indican efectos aditivos. La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y resultar "sinérgica", es decir, el efecto logrado cuando los agentes activos se utilizan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los agentes activos son: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministran en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, p. ej., mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, se administra secuencialmente, es decir, en serie, una dosificación efectiva de cada agente activo, mientras que en la terapia de combinación, se administran juntas dosificaciones efectivas de dos o más agentes activos. Los efectos combinados se pueden evaluar utilizando tanto el modelo de independencia de BLISS como el modelo de agente único más alto (HSA) (Lehar et al., *Molecular Systems Biology*, 3:80 (2007)). Las puntuaciones de BLISS cuantifican el grado de potenciación de los agentes individuales y una puntuación de BLISS positiva (superior a 0) sugiere una aditividad superior a la simple. Una puntuación de BLISS positiva acumulada superior a 250 se considera una fuerte sinergia observada dentro de los intervalos de concentración probados. Una puntuación HSA (superior a 0) sugiere un efecto combinado mayor que el máximo de las respuestas al agente único a las concentraciones correspondientes.

55 Los presentes métodos superan la especificidad insuficiente hacia la diana de la mayoría de los enfoques en el tratamiento de enfermedades. Además, las deficiencias de la terapia génica, debidas a las numerosas barreras extracelulares e intracelulares, han dificultado verdaderamente los tratamientos clínicos de muchas enfermedades. Por lo tanto, con el fin de superar estas barreras, se divulga en el presente documento un vector que puede encontrar uso en aplicaciones clínicas con alta especificidad, acumulación y suministro para las células diana, tales como el núcleo de los hepatocitos del hígado. En una realización, este vector produce un vector no viral altamente reproducible capaz de suministrar ADNp al núcleo. El vector LCP descrito en el presente documento proporciona la capacidad de incorporar fácilmente un promotor de CMV, un péptido de señalización extracelular, una proteína trampa, radicales de direcciónamiento y péptidos de penetración nuclear.

El vector puede ser un liposoma. Los liposomas son vesículas sustancialmente esféricas que se autoensamblan que comprenden una bicapa lipídica que rodea un núcleo, que puede ser acuoso, en donde la bicapa lipídica comprende lípidos anfipáticos que tienen cabezas hidrófilas y colas hidrófobas, en los que las cabezas hidrófilas de las moléculas lipídicas anfipáticas están orientadas hacia el núcleo o solución circundante, mientras que las colas hidrófobas se orientan hacia el interior de la bicapa. La estructura de bicapa lipídica comprende por lo tanto dos monocapas opuestas que se denominan "folíolo interno" y "folíolo externo", en donde las colas hidrófobas están protegidas del contacto con el medio circundante. El "folíolo interno" es la monocapa en donde los grupos de cabeza hidrófila están orientados hacia el núcleo del liposoma. El "folíolo externo" es la monocapa que comprende lípidos anfipáticos, en donde los grupos de cabeza hidrófila están orientados hacia la superficie externa del liposoma. Los liposomas típicamente tienen un diámetro que oscila entre aproximadamente 25 nm y aproximadamente 1 μ m. (véanse, p. ej., Shah (ed.) (1998) Miceles, Microemulsions, and Monolayers: Science and Technology, Marcel Dekker; Janoff (ed.) (1998) *Liposomes: Rational Design*, Marcel Dekker). El término "liposoma" abarca tanto los liposomas multilamelares que comprenden desde dos hasta cientos de bicapas lipídicas concéntricas que alternan con capas de una fase acuosa y vesículas unilamelares que comprenden una única bicapa lipídica.

Los métodos para fabricar liposomas (tipos LCP y LDP) son bien conocidos en la técnica, p. ej., documento PCT/US2010/044209. Se puede encontrar una revisión de las metodologías de preparación de liposomas en *Liposome Techonology* (CFC Press NY 1984); *Liposomes* de Ostro (Marcel Dekker, 1987); Lichtenberg y Barenholz (1988) *Methods Biochem Anal.* 33:337-462 y Patente de Estados Unidos Núm. 5.283.185. Por ejemplo, los lípidos catiónicos y, opcionalmente, los colípidos se pueden emulsionar mediante el uso de un homogeneizador, liofilizar y fundir para obtener liposomas multilamelares. Alternativamente, los liposomas unilamelares se pueden producir mediante el método de evaporación de fase inversa (Szoka y Papahadjopoulos (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198). En algunas realizaciones, los liposomas se producen utilizando hidratación de película delgada (Bangham et al. (1965) *J. Mol. Biol.* 13:238-252). En ciertas realizaciones, la formulación de liposomas se puede someter a sonicación brevemente e incubar a 50°C durante un período corto de tiempo (p. ej., aproximadamente 10 minutos) antes del dimensionamiento (véase Templeton et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15:647-652).

En algunas realizaciones, se elabora un liposoma dirigido o un liposoma PEGilado como se describe en otra parte del presente documento, en donde los métodos comprenden adicionalmente una etapa posterior a la inserción que sigue a la preparación del liposoma o a la producción del liposoma, en donde un producto conjugado de lípido-ligando de direccionamiento o un lípido PEGilado se insertan posteriormente en el liposoma. Los liposomas que comprenden un producto conjugado de lípido-ligando de direccionamiento o un producto conjugado de lípido-PEG se pueden preparar siguiendo mecanismos conocidos en la técnica, incluidos, pero sin limitarse a, los presentados en el presente documento (véase la sección Experimental; Ishida et al. (1999) *FEBS Lett.* 460:129-133; Perouzel et al. (2003) *Bioconjug. Chem.* 14:884-898). La etapa posterior a la inserción puede comprender mezclar los liposomas con el producto conjugado de lípido-ligando de direccionamiento a o el producto conjugado de lípido-PEG e incubar las partículas entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 60°C durante un breve período de tiempo (p. ej., aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos). En algunas realizaciones, los liposomas se incuban con un producto conjugado de lípido-PEG o un producto conjugado de lípido-PEG-ligando de direccionamiento a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 20% en moles, que incluye, pero sin limitarse a, aproximadamente 5% en moles, aproximadamente 6% en moles, aproximadamente 7% en moles, aproximadamente 8% en moles, aproximadamente 9% en moles, aproximadamente 10% en moles, aproximadamente 11% en moles, aproximadamente 12% en moles, aproximadamente 13% en moles, aproximadamente 14% en moles, aproximadamente 15% en moles, aproximadamente 16% en moles, aproximadamente 17% en moles, aproximadamente 18% en moles, aproximadamente 19% en moles y aproximadamente 20% en moles, para formar un sistema de suministro sigiloso. En algunas de estas realizaciones, la concentración del producto conjugado de lípido-PEG es de aproximadamente 10% en moles. El radical de polietilenglicol del producto conjugado de lípido-PEG puede tener un peso molecular que oscila entre aproximadamente 100 y aproximadamente 20.000 g/mol, incluidos, pero sin limitarse a, aproximadamente 100 g/mol, aproximadamente 200 g/mol, aproximadamente 300 g/mol, aproximadamente 400 g/mol, aproximadamente 500 g/mol, aproximadamente 600 g/mol, aproximadamente 700 g/mol, aproximadamente 800 g/mol, aproximadamente 900 g/mol, aproximadamente 1000 g/mol, aproximadamente 5000 g/mol, aproximadamente 10.000 g /mol, aproximadamente 15.000 g/mol y aproximadamente 20.000 g/mol. En ciertas realizaciones, el producto conjugado de lípido-PEG comprende una molécula de PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 2000 g/mol. En algunas realizaciones, el producto conjugado de lípido-PEG comprende DSPE-PEG₂₀₀₀. Los productos conjugados lípido-PEG-ligando de direccionamiento también se pueden insertar con posterioridad en liposomas utilizando los métodos de post-inserción descritos anteriormente.

En una realización, el liposoma contiene un vector que codifica una proteína de fusión de trampa contra CXCL12 y trampa contra PD-1 unida a través de un péptido 2A escindible, lo que permite administrar solo una composición en lugar de dos para la terapia de trampa combinada contra CXCL12/PD-L1.

La incorporación del radical de galactosa de direccionamiento a través de la conjugación con DSPE-PEG permite la captación activa en los hepatocitos a través del receptor de asialoglicoproteína que se expresa en gran medida en los hepatocitos del hígado. El uso de DOTAP y el núcleo de fosfato de calcio sensible al ácido permite el escape endosomal de la estructura ADNp/mc-CR8C condensada, que se libera al citoplasma. Además, la condensación del ADNp con el péptido mc-CR8C catiónico que penetra la membrana permite una mejor captación y liberación nuclear. La incorporación del promotor de CMV dentro del ADNp permite una alta expresión en el hígado.

A través de la incorporación de estas partes como se describe en el presente documento, se proporciona un vector diseñado inteligentemente que produce altos niveles terapéuticos de expresión en los tipos de células diana deseados. Este vector LCP con pTrap proporciona una disminución significativa de la aparición de metástasis colorrectal en el hígado (80%), así como una disminución significativa de la carga tumoral que se encuentra en el hígado (10 veces).

5 Se encontraron niveles elevados de la trampa contra CXCL12, así como niveles reducidos de la proteína CXCL12 libre en el hígado de manera dependiente de la dosis, así como una reducción en el reclutamiento de células inmunitarias (CD8+), lo que demuestra un efecto biológico específico del tratamiento con LCP con pTrap.

Por lo tanto, en el presente documento se muestra que el suministro de ADNp en un vector de galactosa-LCP no muestra signos de efectos inespecíficos, con una respuesta inmunitaria mínima o nula después de tres inyecciones 10 QOD. En estos estudios, la etiqueta de His incorporada en el extremo C-terminal de la trampa contra pCXCL12 fue necesaria para determinar los niveles de expresión a través de ensayos de transferencia Western y ELISA. Sin embargo, para otras aplicaciones clínicas, es posible que no se necesite la etiqueta de His. Esto ayudaría a eludir cualquier respuesta inmunitaria, tal como la inducción de anticuerpos neutralizantes.

15 Además, la capacidad para tener una expresión transitoria de esta pequeña trampa contra CXCL12 (~28 kD) que no dura más de 8 días, permite a los médicos la capacidad de controlar/supervisar estrechamente el nivel y el tiempo de expresión para limitar la respuesta inmunitaria sin dejar de lograr eficacia terapéutica.

En el presente documento se divulga la afinidad y la producción de la trampa (proteína) contra CXCL12 diseñada mediante Interferometría de BioCapa (BLI), así como supresión de la migración y la invasión *in vitro* (Fig. 2). Se encontró que la trampa contra CXCL12 diseñada tenía una $K_d = 4$ nM a través del análisis BLI (Fig. 2A). Además, 20 produce la mitad de la inhibición máxima [ND50] contra CXCL12 biológicamente activa (100 ng/ml) *in vitro* a una concentración de aproximadamente 120 nM (Fig. 2B). También se ha informado de que el tratamiento de células CT-26 con la quimiocina CXCL12 endógena produce una regulación por incremento de las vías de migración/invasión/proliferación. Por lo tanto, los autores de la presente invención investigaron la capacidad de su 25 trampa contra CXCL12 y un anticuerpo (Ab) contra CXCL12 disponible comercialmente para suprimir la migración y la invasión de células CT-26 FL3 estimuladas con CXCL12 endógena (Fig. 2B y 2C). Estos experimentos *in vitro* demuestran la capacidad de la trampa contra CXCL12 para disminuir la migración y la invasión de células CT-26 FL3 estimuladas con CXCL12 (100,0 ng/ml), lo que produce una supresión completa a 8,0 μ g/ml y 12,0 μ g/ml, respectivamente (Fig. 2B y 2C). También se utilizó como control un anticuerpo disponible comercialmente (ND50 de 2-4 μ g/ml; 12-24 nM).

30 Una dosis de ADNp *in vivo* útil (0,5 mg/kg por inyección única) es sustancialmente más baja que las dosis que se demostró anteriormente que tenían expresión *in vivo*. Además, este es el primer caso en el que una cantidad terapéutica de ADNp se ha suministrado con éxito al hígado a través de vectores no virales que no sean mediante el uso de una inyección hidrodinámica invasiva que da como resultado una lesión hepática y no es clínicamente aplicable. Tal suministro es atribuible al uso del vector LCP diseñado inteligentemente.

35 En 2013, Hu et al. informaron por primera vez del uso de este vector para obtener altos niveles de expresión de luciferasa en el hígado (Hu, Y., et al., A Highly Efficient Synthetic Vector: Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo. ACS Nano, 2013. 7(6): pág. 5376-5384). Sin embargo, este nivel de expresión es el más alto obtenido a través de vectores no virales, solo por detrás de las técnicas de inyección hidrodinámica. Hu et al. encontraron que el suministro de ADNp marcado con Cy-3 a través de este vector Gal-LCP se acumula 40 preferentemente en los núcleos de los hepatocitos 6 h después de la inyección intravenosa en la vena de la cola (Hu, Y., et al., A Highly Efficient Synthetic Vector: Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo. ACS Nano, 2013. 7(6): pág. 5376-5384). La distribución en órganos del vector Gal-LCP-ADNp/mcCR8C radiomarcado demostró una captación prominente en el hígado de ratón. Además, mediante el suministro de una trampa contra CXCL12 en el hígado, los autores de la presente invención demostraron claramente que el efecto terapéutico se 45 produjo mediante la disminución de CXCL12 libre que se encuentra en el microentorno hepático (Fig. 5A). Esta terapia produjo una disminución en la carga tumoral del hígado, lo que posteriormente disminuyó la inflamación del hígado en comparación con el hígado enfermo no tratado.

50 Los grupos no tratados produjeron niveles más altos de CXCL12 y contribuyeron aún más a la acumulación de metástasis en el hígado. Por lo tanto, el tratamiento profiláctico de pacientes colorrectales con este vector Gal-LCP-ADNp/mcCR8C puede ayudar a disminuir la inflamación en el hígado, que desempeña un papel fundamental en la expresión hepática de CXCL12 y la progresión de la metástasis en el hígado.

55 Mediante el uso de este vector, se pueden poner en práctica una serie de aplicaciones y terapias, tales como el tratamiento de enfermedades hepáticas. En el presente documento se muestra que este vector tiene la capacidad de suministrar altos niveles de ADNp terapéutico a los hepatocitos del hígado. Por lo tanto, en el presente documento se proporciona la capacidad no sólo de tratar la metástasis en el hígado y los cánceres primarios, sino también muchas otras enfermedades hepáticas tales como el VHB, el hígado graso, la cirrosis hepática y muchas otras. Además de las enfermedades hepáticas, la incorporación de diferentes fracciones de direccionamiento, tales como los análogos de adenosina, que se dirigen a los receptores de adenosina A2B altamente expresados en las células epiteliales pulmonares, preparará este vector para acumular y suministrar trampas de ADNp contra CXCL12 u otros factores del 60 microentorno que se sabe que desempeñan un papel en otros tejidos altamente metastásicos. Tal estrategia puede

modificar los factores del microentorno de numerosos tejidos que se sabe que tienen altas tasas de metástasis, tales como pulmón, ganglio linfático, mama y hueso.

III. Composiciones

Se proporcionan composiciones que son adecuadas para la administración sistémica.

- 5 Las composiciones descritas en el presente documento comprenden vectores. Como se emplea en el presente documento, un vector incluye vectores virales, vectores no virales, vectores sintéticos y similares. Se hace referencia a las Solicitudes de Publicaciones de los Estados Unidos Núm. 2012-0201872; 2011-0117026; y 2011-0117141. Los vectores también incluyen vectores de liposomas o vectores de células vivas tales como monocitos o células madre.

Vectores de suministro

- 10 Los métodos adecuados para suministrar la trampa de la invención incluyen vectores virales y vectores no virales, tales como vectores de plásmidos, vectores de liposomas o vectores de células vivas, tales como monocitos o células madre.

El término "vector", como se emplea en el presente documento, se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes células anfitrionas. Un "vector de expresión" o "vector de terapia génica" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogos en una célula foránea. Un vector de clonación o expresión puede comprender elementos adicionales, por ejemplo, el vector de expresión puede contener un promotor específico de órgano para la expresión del gen de la trampa y contener secuencias de señalización para la localización extracelular o intracelular deseada. El vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, lo que permite que se mantenga en dos organismos, por ejemplo, en células humanas para la expresión y en un anfitrión procariótico para la clonación y amplificación. El término vector también puede utilizarse para describir un virus recombinante, p. ej., un virus modificado para contener la secuencia codificante de un compuesto o factor terapéutico. Como se emplea en el presente documento, un vector puede ser de origen viral o no viral o liposomas o células tales como monocitos o células madre.

25 Los términos "virus", "partícula viral", "partícula de vector", "partícula de vector viral" y "virión" se utilizan indistintamente y deben entenderse en sentido amplio como partículas virales infecciosas que se forman cuando, p. ej., un vector viral de la invención se transduce a una célula o línea celular apropiadas. Las partículas virales de acuerdo con la invención se pueden utilizar con el fin de transferir ADN a las células *in vitro* o *in vivo*. Los términos "vector", "vector de polinucleótido", "construcción de vector de polinucleótido", "construcción de vector de ácido nucleico" y "construcción de vector" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier construcción de ácido nucleico para la transferencia génica, como entiende un experto en la técnica.

30 Como se emplea en el presente documento, el término "vector viral" se utiliza de acuerdo con su significado reconocido en la técnica. Se refiere a una construcción de vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen viral y se puede empaquetar en una partícula de vector viral. El vector y/o la partícula se pueden utilizar con el propósito de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos a las células *in vitro* o *in vivo*. Se conocen en la técnica numerosas formas de vectores virales, cuyas fuentes incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, retrovirus y virus adenoasociados (AAV).

35 La presente invención contempla el uso de cualquier vector para la introducción de la trampa de interés en células de mamífero. Los vectores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, vectores virales y no virales, tales como retrovirus (incluyendo lentivirus), vectores de adenovirus (Ad) que incluyen formas de replicación competente, de replicación deficiente y vacías de los mismos, vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de virus de simio 40 (SV-40), vectores del virus del papiloma bovino, vectores del virus de Epstein-Barr, vectores del virus del herpes, vectores del virus vaccinia, vectores del virus de la leucemia murina de Moloney, vectores del virus del sarcoma murino de Harvey, vectores del virus del tumor mamario murino, vectores del virus del sarcoma de Rous y vectores de plásmidos no virales. En una realización, el vector es un vector viral. Los virus pueden transducir células de manera eficiente e introducir su propio ADN en una célula anfitriona. Al generar vectores virales recombinantes, los genes no esenciales se reemplazan por un gen o secuencia codificante para una proteína heteróloga (o no nativa).

45 En la construcción de vectores virales, los genes no esenciales se reemplazan por uno o más genes que codifican uno o más compuestos o factores terapéuticos. Típicamente, el vector comprende un origen de replicación y el vector puede comprender o no también una función de "marcador" o "marcador seleccionable" mediante la cual se puede identificar y seleccionar el vector. Si bien se puede utilizar cualquier marcador seleccionable, los marcadores seleccionables para su uso en tales vectores de expresión son generalmente conocidos en la técnica y la elección del marcador seleccionable adecuado dependerá de la célula anfitriona. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables que codifican proteínas que confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas incluyen ampicilina, metotrexato, tetraciclina, neomicina (Southern et al., J., J Mol Appl Genet. 1982;1(4):327-41 (1982)), ácido micoferónico (Mulligan et al., Science 209:1422-7 (1980)), puromicina, zeomicina, higromicina (Sugden et al., Mol Cell Biol. 5(2):410-3 (1985)) o G418.

55 La referencia a un vector u otras secuencias de ADN como "recombinantes" simplemente reconoce la conexión operable de las secuencias de ADN que típicamente no están conectadas operablemente cuando están aisladas o se encuentran en la naturaleza. Las secuencias reguladoras (expresión/control) se conectan operablemente a una secuencia codificante de ácido nucleico cuando las secuencias de expresión/control regulan la transcripción y, según

corresponda, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por lo tanto, las secuencias de expresión/control pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) delante de la secuencia codificante, señal de corte y empalme para intrones y codones de parada.

5 Se sabe que los vectores de terapia génica de adenovirus exhiben una fuerte expresión in vitro, un título excelente y la capacidad de transducir células en división y que no se dividen in vivo (Hitt et al., *Adv in Virus Res* 55:479-505 (2000)). Cuando se utilizan in vivo, estos vectores conducen a una expresión génica fuerte pero transitoria debido a las respuestas inmunitarias provocadas frente al esqueleto del vector. Los vectores Ad recombinantes para su uso en el presente documento invención comprenden: (1) un sitio de empaquetamiento que permite que el vector se incorpore a viriones Ad de replicación defectuosa; y (2) un polinucleótido de interés, tal como un polinucleótido que codifica la trampa de interés. Otros elementos necesarios o útiles para la incorporación a viriones infecciosos incluyen las ITR de Ad 5' y 3', los genes E2 y E3, etc.

10 Los viriones Ad de replicación defectuosa que encapsulan los vectores Ad recombinantes de la presente invención se fabrican mediante mecanismos convencionales conocidos en la técnica utilizando células de empaquetamiento y tecnología de empaquetamiento de Ad. Se pueden encontrar ejemplos de estos métodos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.872.005. Un polinucleótido de interés se inserta comúnmente en el adenovirus en la región 15 E1A, E1B o E3 eliminada del genoma del virus. Los vectores adenovirales preferidos para su uso en la práctica de la invención no expresan uno o más productos del gen Ad de tipo salvaje, p. ej., E1a, E1b, E2, E3, E4. Las realizaciones preferidas son viriones que se utilizan típicamente junto con líneas celulares de empaquetamiento que complementan las funciones de E1, E2A, E4 y, opcionalmente, las regiones del gen E3. Véanse, p. ej. las Patentes de Estados Unidos 20 Núm. 5.872.005, 5.994.106, 6.133.028 y 6.127.175. Los vectores de adenovirus se purifican y formulan utilizando técnicas mecanismos convencionales conocidos en la técnica.

20 Los vectores de AAV recombinantes se caracterizan porque son capaces de dirigir la expresión y la producción de los productos transgénicos seleccionados en células diana. Así, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de AAV esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección de células diana.

25 Los viriones de AAV recombinantes (rAAV) para su uso en la práctica de la presente invención se pueden producir utilizando metodología convencional, conocida por los expertos en la técnica y se construyen de tal manera que incluyen, como componentes conectados operablemente en la dirección de la transcripción, secuencias de control que incluyen secuencias de inicio y terminación transcripcionales, y la secuencia codificante para una trampa de interés. Estos componentes están limitados en el extremo 5' y 3' por secuencias ITR de AAV funcionales. Por "secuencias ITR de AAV 30 funcionales" se entiende que las secuencias ITR funcionan según lo previsto para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de AAV. Por lo tanto, no se necesita que las ITR de AAV para su uso en los vectores de la invención tengan una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje y se pueden alterar mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos o las ITR de AAV se pueden obtener a partir de cualquiera de varios serotipos de AAV. Un vector de AAV es un vector obtenido a partir de un serotipo de virus adenoasociado, que incluye, pero sin limitarse a, 35 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, etc. Los vectores de AAV preferidos tienen los genes REP y CAP de tipo salvaje suprimidos en su totalidad o en parte, pero conservan las secuencias ITR flanqueantes funcionales.

40 Típicamente, un vector de expresión de AAV se introduce en una célula productora, seguido de la introducción de una construcción auxiliar de AAV, donde la construcción auxiliar incluye regiones codificantes de AAV capaces de expresarse en la célula productora y que complementan las funciones auxiliares de AAV ausentes en el vector de AAV. La construcción auxiliar se puede diseñar para regular por disminución la expresión de las proteínas REP grandes (Rep78 y Rep68), típicamente mediante la mutación del codón de inicio que sigue a p5 de ATG a ACG, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.548.286. A esto le sigue la introducción de virus auxiliares y/o vectores adicionales en la célula productora, en donde el virus auxiliar y/o los vectores adicionales proporcionan funciones accesoriales capaces de soportar la producción eficiente de virus rAAV. A continuación, las células 45 productoras se cultivan para producir rAAV. Estas etapas se llevan a cabo utilizando la metodología convencional. Los viriones de AAV de replicación defectuosa que encapsulan los vectores de AAV recombinantes de la presente invención se fabrican mediante mecanismos convencionales conocidos en la técnica utilizando células de empaquetamiento y tecnología de empaquetamiento de AAV. Se pueden encontrar ejemplos de estos métodos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.436.146; 5.753.500, 6.040.183, 6.093.570 y 6.548.286. Otras 50 composiciones y métodos para el empaquetamiento son descritos por Wang et al. (documento US 2002/0168342) e incluyen aquellos mecanismos dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

55 Actualmente se conocen aproximadamente 40 serotipos de AAV, sin embargo, hoy en día todavía se están identificando nuevos serotipos y variantes de serotipos existentes y se consideran dentro del alcance de la presente invención. Véanse Gao et al (2002), *PNAS* 99(18):11854-6; Gao et al. (2003), *PNAS* 100(10):6081-6; Bossis y Chiorini (2003), *J. Virol.* 77(12):6799-810. Se utilizan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células diana concretas o para dirigirse a tipos de células específicos dentro de un tejido diana particular. El uso de diferentes serotipos de AAV puede facilitar la elección como diana del tejido maligno. Se ha demostrado que los serotipos de AAV que incluyen 1, 2, 4, 5 y 6 transducen a tejido cerebral. Véanse, p. ej., Davidson et al., (2000), *PNAS* 97(7):3428-32; Passini et al (2003), *J. Virol.* 77(12):7034-40. Los serotipos de AAV particulares pueden dirigirse y/o replicarse más eficientemente en el tejido o las células diana. Se puede utilizar un solo vector AAV autocomplementario en la práctica 60 de la invención para aumentar la eficiencia de la transducción y dar como resultado un inicio más rápido de la expresión

transgénica (McCarty et al., Gene Ther. agosto 2001; 8(16):1248-54).

Los vectores retrovirales son una herramienta común para el suministro de genes (Miller, 1992, Nature 357: 455-460). Los vectores retrovirales y más particularmente los vectores lentivirales se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. Los vectores retrovirales se han probado y se ha encontrado que son vehículos de suministro adecuados

5 para la introducción estable de una variedad de genes de interés en el ADN genómico de una amplia gama de células diana. La capacidad de los vectores retrovirales para suministrar transgenes de una sola copia sin reordenar a las células hace que los vectores retrovirales sean muy adecuados para transferir genes a las células. Adicionalmente, los retrovirus entran en las células anfitrionas mediante la unión de glicoproteínas de la envoltura retroviral a receptores de superficie celular específicos en las células anfitrionas. En consecuencia, los vectores retrovirales seudotipificados en los que la proteína de la envoltura nativa codificada se reemplaza por una proteína de la envoltura heteróloga que tiene una especificidad celular diferente a la de la proteína de la envoltura nativa (p. ej., se une a un receptor de superficie celular diferente en comparación con la proteína de la envoltura nativa) pueden también encontrar utilidad en la práctica de la presente invención. La capacidad de dirigir el suministro de vectores retrovirales que codifican un transgén a un tipo específico de células diana es muy deseable para aplicaciones de terapia génica.

10 15 La presente invención proporciona vectores retrovirales que incluyen, p. ej., vectores de transferencia retrovirales que comprenden uno o más polinucleótidos de interés y vectores de empaquetamiento retrovirales que comprenden uno o más elementos de empaquetamiento. En particular, la presente invención proporciona vectores retrovirales seudotipificados que codifican una proteína de la envoltura heteróloga o funcionalmente modificada para producir retrovirus seudotipificados.

20 25 30 La secuencia central de los vectores retrovirales de la presente invención se puede obtener fácilmente a partir de una amplia variedad de retrovirus, incluidos, por ejemplo, retrovirus de tipo B, C y D, así como espumavirus y lentivirus (véase RNA Tumor Viruses, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Un ejemplo de un retrovirus adecuado para su uso en las composiciones y métodos de la presente invención incluye, pero no se limita a, lentivirus. Otros retrovirus adecuados para su uso en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, el Virus de la Leucosis Aviar, el Virus de la Leucemia Bovina, el Virus de la Leucemia Murina, el Virus Inductor de Foco en Células de Visón, el Virus del Sarcoma Murino, el Virus de la Reticuloendoteliosis y el Virus del Sarcoma de Rous. Los virus de la leucemia murina particularmente preferidos incluyen 4070A y 1504A (Hartley y Rowe, J. Virol. 19:19-25, 1976), Abelson (ATCC Núm. VR-999), Friend (ATCC Núm. VR-245), Graffi, Gross (ATCC Núm. VR-590), Kirsten, Virus del Sarcoma Harvey and Rauscher (ATCC Núm. VR-998), y el Virus de la Leucemia Murina de Moloney (ATCC Núm. VR-190). Tales retrovirus se pueden obtener fácilmente de depósitos o colecciones tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC"; Rockville, MD), o aislar de fuentes conocidas utilizando técnicas comúnmente disponibles.

35 Preferiblemente, una secuencia de vector retroviral de la presente invención se obtiene a partir de un lentivirus. Un lentivirus preferido es un virus de la inmunodeficiencia humana, p. ej., tipo 1 o 2 (es decir, VIH-1 o VIH-2, en donde el VIH-1 se denominaba anteriormente virus 3 asociado a la linfadenopatía (HTLV-IE) y virus relacionado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (ARV)), u otro virus relacionado con el VIH-1 o el VIH-2 que se haya identificado y asociado con el SIDA o una enfermedad similar al SIDA. Otros vectores de lentivirus incluyen un virus Visna/maedi de oveja, un virus de inmunodeficiencia felina (FIV), un lentivirus bovino, un virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), un virus de anemia infecciosa equina (EIAV) y un virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV).

40 45 50 Los diversos géneros y cepas de retrovirus adecuados para su uso en las composiciones y métodos son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Fields Virology, tercera edición, editado por B. N. Fields et al., Lippincott-Raven Publishers (1996), véase, p. ej., Capítulo 58, Retroviridae: The Viruses and Their Replication, clasificación, páginas 1768-1771, incluida la Tabla 1).

La invención es aplicable a una variedad de sistemas retrovirales, y los expertos en la técnica apreciarán los elementos comunes compartidos entre diferentes grupos de retrovirus. Todos los retrovirus comparten las características de los viriones envueltos con proyecciones superficiales y que contienen una molécula de ARN de hebra sencilla lineal de sentido positivo, un genoma que consiste en un dímero y las proteínas comunes gag, pol y env.

55 Los lentivirus comparten varias proteínas estructurales del virión, incluidas las glicoproteínas de la envoltura SU (gp120) y TM (gp41), que están codificadas por el gen env; CA (p24), MA (p117) y NC (p7-11), que están codificadas por el gen gag; y RT, PR e IN codificadas por el gen pol. El VIH-1 y el VIH-2 contienen proteínas accesorias y otras que participan en la regulación de la síntesis y el procesamiento del ARN del virus y otras funciones de replicación. Las proteínas accesorias, codificadas por los genes vif, vpr, vpu/vpx y nef, se pueden omitir (o inactivar) del sistema recombinante. Además, tat y rev se pueden omitir o inactivar, p. ej., mediante mutación o delección.

Los sistemas de empaquetamiento de vectores lenti-virales de primera generación proporcionan construcciones de empaquetamiento separadas para gag/pol y env, y típicamente emplean una proteína de la envoltura heteróloga o funcionalmente modificada por razones de seguridad. En sistemas de vectores lenti-virales de segunda generación, los genes accesorios, vif, vpr, vpu y nef, se suprimen o inactivan. Los sistemas de vectores lenti-virales de tercera generación son aquellos en los que el gen tat se ha suprimir o inactivar de otro modo (p. ej., mediante mutación).

La compensación para la regulación de la transcripción proporcionada normalmente por tat se puede proporcionar mediante el uso de un promotor constitutivo fuerte, tal como el potenciador/promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (HCMV-IE). Se pueden seleccionar otros promotores/potenciadores en función de la fuerza de la actividad promotora constitutiva, la especificidad por el tejido diana (p. ej., promotor específico del hígado) u otros factores relacionados con el control deseado sobre la expresión, como se entiende en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, es deseable emplear un promotor inducible tal como tet para lograr una expresión controlada. El gen que codifica rev se proporciona preferiblemente en una construcción de expresión separada, de modo que un sistema vector lentiviral típico de tercera generación implicará cuatro plásmidos: uno para gagpol, rev, envoltura y el vector de transferencia. Independientemente de la generación del sistema de empaquetamiento empleado, gag y pol se pueden proporcionar en una sola construcción o en construcciones separadas.

Agentes de suministro no virales sintéticos

Los agentes no virales sintéticos que son capaces de promover la transferencia y expresión de un polinucleótido de interés también son adecuados para su uso en los métodos de la invención. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, lípidos y polímeros catiónicos. Los agentes de suministro no virales que son lípidos catiónicos se unen al ADN polianiónico. Después de la endocitosis, el ácido nucleico debe escapar del agente de suministro y del compartimento endosómico para que el material genético se incorpore al nuevo anfitrión. Véanse Felgner, P. L. Nonviral Strategies for Gene Therapy Sci. Am. 1997, 276, 102-106; Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringgold, G. M.; Danielsen, M. Lipofectin: A highly efficient, lipid mediated DNA-transfection procedure Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 7413-7417; Felgner, P. L.; Kumar, R.; Basava, C.; Border, R. C.; Hwang-Felgner, J. En; Vical, Inc. San Diego, Calif.: Patente de Estados Unidos Núm. 5.264.618, 1993; Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P. L. Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Formulations J. Biol. Chem. 1994, 269, 2550-2561; Freidmann, T. Sci. Am. 1997, 276, 96-101; Behr, J. P. Gene Transfer with Synthetic Cationic Amphiphiles: Prospects for Gene Delivery Bioconjugate Chem. 1994, 5, 382-389; Cotton, M.; Wagner, B. Non-viral Approaches to Gene Therapy Curr. Op. Biotech. 1993, 4, 705-710; Miller, A. D. Cationic Liposomes for Gene Therapy Angew. Chem. Int. 1998, 37, 1768-1785; Scherman, D.; Bessodes, M.; Cameron, B.; Herscovici, J.; Hofland, H.; Pitard, B.; Soubrier, F.; Wils, P.; Crouzet, J. Application of Lipids and Plasmid Design for Gene Delivery to Mammalian Cells Curr. Op. Biotech. 1989, 9, 480; Lasic, D. D. En Surfactants in Cosmetics; 2^a ed.; Rieger, M. M., Rhein, L. D., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, 1997; Vol. 68, pág. 263-283; Rolland, A. P. From Genes to Gene Medicines: Recent Advances in Nonviral Gene Delivery Crit. Rev. Ther. Drug 1998, 15, 143-198; de Lima, M. C. P.; Simoes, S.; Pires, P.; Faneca, H.; Duzgunes, N. Cationic Lipid-DNA Complexes in Gene Delivery from Biophysics to Biological Applications Adv. Drug. Del. Rev. 2001, 47, 277-294.

Estos agentes de suministro no virales sintéticos tienen dos funciones principales, condensar el ADN que se debe transfectar y promover su unión celular y paso a través de la membrana plasmática y, en su caso, las dos membranas nucleares. Debido a su naturaleza polianiónica, el ADN naturalmente tiene poca afinidad por la membrana plasmática de las células, que también es polianiónica. Varios grupos han informado sobre el uso de complejos catiónicos de lípidos y ácidos nucleicos anfílicos para la transfección *in vivo* tanto en animales como en seres humanos. Por lo tanto, los agentes de suministro no virales sintéticos tienen cargas catiónicas o poliacidáticas. Véase Gao, X; Huang, L. Cationic Liposome-mediated Gene Transfer Gene Therapy 1995, 2, 710-722; Zhu, N.; Liggott, D.; Liu, Y.; Debs, R. Systemic Gene Expression After Intravenous DNA Delivery into Adult Mice Science 1993, 261, 209-211; Thierry, A. R.; Lunardiiskandar, Y.; Bryant, J. L.; Rabinovich, P.; Gallo, R. C.; Mahan, L. C. Systemic Gene-Therapy-Biodistribution and Long-Term Expression of a Transgene in Mice Proc. Nat. Acad. Sci. 1995, 92, 9742-9746. Los compuestos anfílicos catiónicos que poseen dominios tanto catiónicos como hidrófobos se han utilizado previamente para el suministro de información genética. De hecho, esta clase de compuestos se utiliza ampliamente para el suministro intracelular de genes. Tales compuestos catiónicos pueden formar liposomas catiónicos, que son el agente de suministro no viral sintético más popular para estudios de transfección de genes.

Los liposomas catiónicos cumplen dos funciones. En primer lugar, protegen el ADN de la degradación. En segundo lugar, aumentan la cantidad de ADN que ingresa a la célula. Se ha demostrado que tales liposomas son útiles en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Safinya, C. R. describe la estructura del complejo anfílico catiónico-ADN. Véase Radler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. Science 1997, 275, 810-814; Templeton, N. S.; Lasic, D. D.; Frederik, P. M.; Strey, H. H.; Roberts, D. D.; Pavlakis, G. N. Nature Biotech. 1997, 15, 647-652; Koltover, I.; Salditt, T.; Radler, J. O.; Safinya, C. R. Science 1998, 281, 78-81; y Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. Biophys. J. 1999, 77, 915-924. Muchos de estos sistemas para el suministro de genes *in vitro* e *in vivo* se revisan en artículos recientes. Véase Remy, J.; Sirlin, C.; Vierling, P.; Behr, J. Bioconj. Chem. 1994, 5, 647-654; Crystal, R. G. Science 1995, 270, 404-410; Blaese, X.; et. a. Cancer Gene Ther. 1995, 2, 291-297; y Behr, J. P. y Gao, X citados anteriormente. A diferencia de los vectores virales, los complejos de lípidos y ácidos nucleicos se pueden utilizar para transferir cassetes de expresión de tamaño prácticamente ilimitado. Debido a que estos sistemas de suministro sintéticos carecen de proteínas, pueden provocar menos respuestas inmunogénicas e inflamatorias.

Behr divulga numerosos compuestos anfílicos que incluyen dioctadecilamidologlicolispermina ("DOGS") para el suministro de genes. Este material está disponible comercialmente como TRANSFECTAM™. Vigneron describe lípidos catiónicos de guanidinio-colesterol para la transfección de células eucarióticas. Felgner divulga el uso de lípidos catiónicos sintéticos cargados positivamente que incluyen cloruro de N-1-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio

("DOTMA"), para formar complejos de lípido/ADN adecuados para transfecciones. Byk describe lípidos catiónicos en los que la porción catiónica del compuesto anfílico es lineal, ramificada o globular para la transfección génica. Blessing y colaboradores describen un vector catiónico sintético basado en espermina. Safinya describe lípidos catiónicos que contienen un segmento de poli(etilenglicol) para el suministro de genes. Bessodes y colaboradores describen un 5 conector glucosídico que contiene lípidos catiónicos para el suministro de genes. Ren y Liu describen lípidos catiónicos basados en 1,2,4-butanotriol. Tang y Scherman describen un lípido catiónico que contiene un enlace disulfuro para el suministro de genes. Vierling describe compuestos anfílicos catiónicos altamente fluorados como sistemas de transmisión y transporte de genes. Jacopin describe un compuesto anfílico catiónico para el suministro de genes que contiene un ligando de direccionamiento. Wang y colaboradores describen ésteres catiónicos basados en carnitina 10 para el suministro de genes. Zhu describe el uso de un lípido catiónico, cloruro de N[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio para el suministro intravenoso de ADN. Véanse Behr, J. P.; Demeneix, B.; Loeffler, J. P.; Perez-Mutul, J. Efficient Gene Transfer into Mammalian Primary Endocrine Cells with Lipopolyamine Coated DNA Proc. Natl. Acad. Sci. 1989, 86, 6982-6986; Vigneron, J. P.; Oudrhiri, N.; Fauquet, M.; Vergely, L.; Bradley, J. C.; Basseville, M.; Lehn, P.; Lehn, J. M. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, 93, 9682-9686; Byk, G.; BDubertret, C.; Escriou, V.; Frederic, M.; Jaslin, G.; 15 Rangara, R.; Pitard, B.; Wils, P.; Schwartz, B.; Scherman, D. J. Med. Chem. 1998, 41, 224-235; Blessing, T.; Remy, J. S.; Behr, J. P. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8519-8520; Blessing, T.; Remy, J. S.; Behr, J. P. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998, 95, 1427-1431; Schulze, U.; Schmidt, H.; Safinya, C. R. Bioconj. Chem. 1999, 10, 548-552; Bessodes, M.; Dubertret, C.; Jaslin, G.; Scherman, D. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000, 10, 1393-1395; Herscovici, J.; Egron, M. J.; Quenot, A.; Leclercq, F.; Leforestier, N.; Mignet, N.; Wetzer, B.; Scherman, D. Org. Lett. 2001; Ren, T.; Liu, D. 20 Tetrahedron Lett. 1999, 40, 7621-7625; Tang, F.; Hughes, J. A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998, 242, 141-145; Tang, F.; Hughes, J. A. Bioconjugate Chem. 1999, 10, 791-796; Wetzer, B.; Byk, G.; Frederic, M.; Airiau, M.; Blanche, F.; Pitard, B.; Scherman, D. Biochemical J. 2001, 356, 747-756; Vierling, P.; Santaella, C.; Greiner, J. J. Fluorine Chem. 2001, 107, 337-354; Jacopin, J.; Hofland, H.; Scherman, D.; Herscovici, J. J. Biomed. Chem. Lett. 2001, 11, 419-422; y Wang, J.; Guo, X.; Xu, Y.; Barron, L.; Szoka, F. C. J. Med. Chem. 1998, 41, 2207-2215.

25 En la Patente de Estados Unidos Núm. 5.283.185 de Epand et al., los autores de la presente invención describen ejemplos adicionales de compuestos anfílicos que incluyen un vector sintético de colesterol catiónico, denominado "DCcol". Los autores de la presente invención describen, en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.264.618, más compuestos catiónicos que facilitan el transporte de moléculas biológicamente activas al interior de las células. Las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.169.078 y 6.153.434 de Hughes et al. divultan un lípido catiónico que contiene 30 un enlace disulfuro para el suministro de genes. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.334.761 de Gebeyehu et al. describe compuestos anfílicos catiónicos adicionales adecuados para el suministro intracelular de moléculas biológicamente activas. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.110.490 de Thierry describe lípidos catiónicos adicionales para el suministro de genes. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.056.938 de Unger, et al. divulgua compuestos lipídicos catiónicos que contienen al menos dos grupos catiónicos.

35 Los sistemas poliméricos para el suministro de genes son conocidos en la técnica. En la revisión de Han, se comentan la mayoría de los sistemas de polímeros catiónicos comunes, incluidos PLL, poli(L-lisina); PEI, polietilenimina; pDMEAAMA, metacrilato de poli(2-dimetilamino)etilo; PLGA, poli(D,L-lactida-co-glicolido) y PVP (polivinilpirrolidona). Véanse Garnett, M. C. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 1999, 16, 147-207; Han, S.; Mahato, R. I.; Sung, Y. K.; Kim, S. W. Molecular Therapy 2000, 2, 302-317; Zauner, W.; Ogris, M.; Wagner, E. Adv. Drug. Del. Rev. 1998, 30, 97-40 113; Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A. Bioconj. Chem. 1995, 6, 7-20; Lynn, D. M.; Anderson, D. G.; Putman, D.; Langer, R. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 8155-8156; Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 7297-7301; Choi, J. S.; Joo, D. K.; Kim, C. H.; Kim, K.; Park, J. S. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 474-480; Putnam, D.; Langer, R. Macromolecules 1999, 32, 3658-3662; Gonzalez, M. F.; Ruseckaite, R. A.; Cuadrado, T. R. Journal of Applied Polymer Science 1999, 71, 1223-45 1230; Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka, F. C. In Vitro Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers Bioconjugate Chem. 1996, 7, 703-714; Kukowska-Latallo, J. F.; Bielinska, A. U.; Johnson, J.; Spindler, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, 93, 4897-4902; y Lim, Y.; Kim, S.; Lee, Y.; Lee, W.; Yang, T.; Lee, M.; Suh, M.; Park, J. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 2460-2461.

50 A continuación, se describen algunos ejemplos representativos de polímeros catiónicos bajo investigación. Por ejemplo, se han explorado los poli(beta-aminoésteres) y se ha demostrado que condensan el ADN plasmídico en partículas solubles de ADN/polímero para el suministro de genes. Para acelerar el descubrimiento de vectores de transfección sintéticos, Langer informó sobre la síntesis paralela y el escrutinio de una biblioteca de polímeros catiónicos. Wolfert describe vectores catiónicos para terapia génica formados por autoensamblaje de ADN con copolímeros catiónicos de bloques sintéticos. Haensler y Szoka describen el uso de polímeros dendriméricos 55 catiónicos (dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM)) para el suministro de genes. Wang describe un polifosfoéster catiónico para el suministro de genes. Putnam describe un polímero catiónico que contiene imidazol para el suministro de ADN. Véanse Lynn, D. M.; Langer, R. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 10761-10768; Wolfert, M. A.; Schacht, E. H.; Toncheva, V.; Ulbrich, K.; Nazarova, O.; Seymour, L. W. Hum. Gene Ther. 1996, 7, 2123-2133; Haensler, J.; Szoka, F. Bioconj. Chem. 1993, 4, 372; y Wang, J.; Mao, H. Q.; Leong, K. W. J. Am. Chem. Soc. 2001; Putnam, D.; Gentry, C. A.; Pack, D. W.; Langer, R. Proc. Natl. Acad. Sci. 2001, 98, 1200-1205.

60 También se conocen varias patentes que describen polímeros catiónicos para el suministro de genes. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.629.184 de Goldenberg et al. describe copolímeros catiónicos de vinilamina y alcohol vinílico para el suministro de oligonucleótidos. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.714.166 de Tomalia, et

- al, divulga polímeros terminados en amina catiónica dendríticos para el suministro de genes. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.919.442 de Yin et al. describe productos conjugados catiónicos de polímeros hiperramificados en forma de peine para el suministro de genes. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.948.878 de Burgess et al. describe polímeros catiónicos adicionales para la transfección de ácidos nucleicos y el suministro de agentes bioactivos. La 5 Patente de Estados Unidos Núm. 6.177.274 de Park et al. divulga un compuesto para el suministro de genes dirigido que consiste en poli(L-lisina) (PLL) injertada con polietilenglicol (PEG) y un radical de direccionamiento , en donde al menos una función amino libre de la PLL se sustituye con el radical de direccionamiento, y la PLL injertada contiene al menos 50% de grupos funcionales amino libres no sustituidos. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.210.717 de Choi et al. describe una micela polimérica mixta biodegradable utilizada para suministrar un ácido nucleico 10 seleccionado a una célula anfítriona elegida como diana que contiene un copolímero anfífilo de poliéster-policatión y un copolímero anfífilo de poliéster-azúcar. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.267.987 de Park et al. divulga un polí[ácido alfa-(omega-aminoalquil)glicólico] cargado positivamente para el suministro de un agente bioactivo a través de la absorción tisular y celular. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.200.956 de Scherman et al. describe una composición farmacéutica útil para transfectar un ácido nucleico que contiene un polipéptido catiónico.
- 15 Los sistemas de suministro de nanopartículas adecuados para su uso en el suministro de las trampas descritas en el presente documento se divultan en el documento PCT/US2010/044209.

Ligandos de direccionamiento

- Las composiciones pueden comprender adicionalmente un ligando de direccionamiento que está asociado físicamente con el vector.
- 20 Por "ligando de direccionamiento" se entiende una molécula que dirige el vector o una molécula físicamente asociada a una célula o tejido elegidos como diana. Los ligandos de direccionamiento pueden incluir, pero sin limitarse a, moléculas pequeñas, péptidos, lípidos, azúcares, oligonucleótidos, hormonas, vitaminas, anticuerpos o fragmentos de los mismos, ligandos de receptores de membrana específicos, ligandos capaces de reaccionar con un antiligando, péptidos fusogénicos, péptidos de localización nuclear o una combinación de tales compuestos. Los 25 ejemplos no limitantes de ligandos de direccionamiento incluyen asialoglicoproteína, insulina, lipoproteína de baja densidad (LDL), folato, derivados de benzamida y anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra moléculas de la superficie celular. En algunas realizaciones, la molécula pequeña comprende un derivado de benzamida. En algunas de estas realizaciones, el derivado de benzamida comprende anisamida.
- 30 Por "célula elegida como diana" se entiende la célula hacia la que un ligando de direccionamiento recluta una molécula físicamente asociada. El ligando de direccionamiento puede interactuar con uno o más constituyentes de una célula diana. La célula elegida como diana puede ser cualquier tipo de célula o estar en cualquier fase de desarrollo, exhibiendo varios fenotipos y puede estar en varios estados patológicos (es decir, estados anormales y normales). Por ejemplo, el ligando de direccionamiento se puede asociar con constituyentes normales, anormales y/o únicos en un microbio (es decir, una célula procariótica (bacteria), virus, hongos, protozoos o parásitos) o en una célula 35 eucariótica (p. ej., células epiteliales, células musculares, células nerviosas, células sensoriales, células cancerosas, células secretoras, células malignas, células eritroides y linfoideas, células madre). Por lo tanto, el ligando de direccionamiento se puede asociar con un constituyente en una célula diana que es un antígeno asociado a una enfermedad que incluye, por ejemplo, antígenos asociados a tumores y antígenos asociados a enfermedades autoinmunitarias. Tales antígenos asociados a enfermedades incluyen, por ejemplo, receptores de factores de 40 crecimiento, reguladores del ciclo celular, factores angiogénicos y factores de señalización.

- En algunas realizaciones, el ligando de direccionamiento interactúa con una proteína de la superficie celular sobre la célula elegida como diana. En algunas de estas realizaciones, el nivel de expresión de la proteína de la superficie celular que es capaz de unirse al ligando de direccionamiento es mayor en la célula elegida como diana con relación a otras células. Por ejemplo, las células cancerosas expresan en exceso ciertas moléculas de la superficie celular, tales como el receptor HER2 (cáncer de mama) o el receptor sigma. En ciertas realizaciones en las que el ligando de direccionamiento comprende un derivado de benzamida, tal como anisamida, el ligando de direccionamiento dirige la molécula asociada a células que expresan en exceso el receptor sigma, que pueden incluir, pero sin limitarse a, células cancerosas tales como carcinoma de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, carcinoma renal, carcinoma de colon, sarcoma, cáncer de mama, melanoma, glioblastoma, neuroblastoma y cáncer de próstata (Aydar, Palmer y 45 Djamgoz (2004) *Cancer Res.* 64:5029-5035).

- 50 Los términos "cáncer" o "canceroso" se refieren a, o describen, el estado fisiológico en los mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Como se emplea en el presente documento, "células cancerosas" o "células tumorales" se refieren a las células que se caracterizan por este crecimiento celular no regulado. El término "cáncer" abarca todos los tipos de cáncer, incluidos, pero sin limitarse a, todas las formas de carcinomas, melanomas, sarcomas, linfomas y leucemias, incluidos, sin limitación, carcinoma de vejiga, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, carcinoma hepatocelular, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de tiroides.

La célula elegida como diana es aquella que es susceptible de metástasis de un cáncer distante. Como tal, la célula

elegida como diana puede estar en cualquier órgano. En una realización particular, la célula elegida como diana es una célula hepática.

El ligando de direccionamiento se puede asociar físicamente a un vector. Como se emplea en el presente documento, el término "asociado físicamente" se refiere a una interacción covalente o no covalente entre dos moléculas. Como se emplea en el presente documento, los términos "enlace covalente" o "interacción covalente" se refieren a un enlace químico, en donde dos átomos comparten un par de electrones. Se dice que dos moléculas están unidas químicamente entre sí cuando las moléculas tienen al menos un enlace químico entre los átomos que forman las moléculas. Por lo tanto, un enlace químico entre dos moléculas se establece al compartir un par de electrones entre un átomo en una molécula con un átomo en otra molécula. Por ejemplo, un ligando de direccionamiento se puede unir covalentemente a un lípido de la invención a través de uno de los átomos de nitrógeno o uno de los grupos R de los lípidos catiónicos. Un "producto conjugado" se refiere al complejo de moléculas que están unidas covalentemente entre sí. Por ejemplo, el complejo de un lípido unido covalentemente a un ligando de direccionamiento se puede denominar producto conjugado de lípido-ligando de direccionamiento.

Alternativamente, el ligando de direccionamiento se puede unir de forma no covalente a los lípidos de fórmula (I) o derivados activos de los mismos. Los "enlaces no covalentes" o las "interacciones no covalentes" no implican compartir pares de electrones, sino que implican variaciones más dispersas de interacciones electromagnéticas y pueden incluir enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, interacciones de Van der Waals y enlaces hidrófobos. Tales productos conjugados de lípido-ligando de direccionamiento se pueden obtener fácilmente de acuerdo con técnicas ampliamente descritas en la bibliografía.

20 Polinucleótido de interés

Se pretende que el término "polinucleótido" abarque un ácido nucleico singular, así como ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico, p. ej., ARN mensajero (ARNm), ADN plasmídico (ADNp) o ARN de interferencia corto (ARNip). Un polinucleótido puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, lineal o circular. Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (p. ej., un enlace amida, tal como el que se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a uno o más segmentos de ácido nucleico cualesquiera, p. ej., fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. El término "polinucleótido" puede referirse a un ácido nucleico o polinucleótido aislado, en donde por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su entorno nativo. Los ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células anfitrionas heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención incluyen adicionalmente tales moléculas producidas sintéticamente. Los polinucleótidos aislados también pueden incluir vectores de expresión aislados, construcciones de expresión o poblaciones de los mismos. "Polinucleótido" también puede referirse a productos amplificados a partir de sí mismo, como en una reacción en cadena de la polimerasa. El "polinucleótido" puede contener ácidos nucleicos modificados, tales como fosforotioato, fosfato, derivados modificados con átomos anulares y similares. El "polinucleótido" puede ser un polinucleótido natural (es decir, uno que existe en la naturaleza sin intervención humana) o un polinucleótido recombinante (es decir, uno que existe solo con intervención humana). Mientras que los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren ambos a un polímero de nucleótidos, como se emplea en el presente documento, un oligonucleótido tiene típicamente menos de 100 nucleótidos de longitud.

40 Como se emplea en el presente documento, el término "polinucleótido de interés" se refiere a un polinucleótido que se va a suministrar a una célula para provocar un efecto deseado en la célula (p. ej., un efecto terapéutico, un cambio en la expresión génica). Un polinucleótido de interés puede tener cualquier longitud y puede incluir, pero sin limitarse a, un polinucleótido que comprende una secuencia codificante para un polipéptido de interés. En ciertas realizaciones, cuando el polinucleótido se expresa o se introduce en una célula, el polinucleótido de interés o el polipéptido codificado de ese modo tiene actividad terapéutica.

i. Polinucleótidos que codifican polipéptidos

En algunas realizaciones, los sistemas de suministro de polinucleótidos comprenden un polinucleótido que comprende una secuencia codificante para un polipéptido de interés.

50 Para los fines de la presente invención, una "secuencia codificante de un polipéptido de interés" o "región codificante de un polipéptido de interés" se refiere a la secuencia polinucleotídica que codifica ese polipéptido. Como se emplea en el presente documento, los términos "codificante" o "codificado" cuando se utilizan en el contexto de un ácido nucleico específico significan que el ácido nucleico comprende la información requerida para dirigir la traducción de la secuencia de nucleótidos a un polipéptido específico. La información por la que se codifica un polipéptido se especifica mediante el uso de codones. La "región codificante" o "secuencia codificante" es la porción del ácido nucleico que consiste en codones que se pueden traducir a aminoácidos. Aunque un "codón de parada" o "codón de terminación de la traducción" (TAG, TGA o TAA) no se traduce a un aminoácido, se puede considerar que forma parte de una región codificante. Asimismo, un codón de iniciación de la transcripción (ATG) puede o no considerarse parte de una región codificante. Sin embargo, cualquier secuencia que flanquee la región codificante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones y similares, no se considera parte de la región

codificante. En algunas realizaciones, sin embargo, aunque no se considera parte de la región codificante *per se*, estas secuencias reguladoras y cualquier otra secuencia reguladora, en particular las secuencias señal o las secuencias que codifican una etiqueta peptídica, pueden ser parte de la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de interés. Por lo tanto, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de interés comprende la secuencia codificante y, opcionalmente, cualquier secuencia que flanquee la región codificante que contribuya a la expresión, secreción y/o aislamiento del polipéptido de interés.

El término "expresión" tiene su significado tal como se entiende en la técnica y se refiere al proceso de conversión de la información genética codificada en un gen o una secuencia codificante en ARN (p. ej., ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) mediante la "transcripción" de un polinucleótido (p. ej., a través de la acción enzimática de una ARN polimerasa), y para polinucleótidos que codifican polipéptidos, a un polipéptido a través de la "traducción" de ARNm. Por lo tanto, un "producto de expresión" es, en general, un ARN transcrit o a partir del gen (p. ej., antes o después del procesamiento) o un polinucleótido o un polipéptido codificados por un ARN transcrit o a partir del gen (p. ej., ya sea antes o después de la modificación).

Como se emplea en el presente documento, se pretende que los términos "polipéptido" o "proteína" abarquen un "polipéptido" en singular, así como "polipéptidos" en plural, y se refieren a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) conectados linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Así, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede utilizar en lugar de, o indistintamente con, cualquiera de estos términos.

El término "polipéptido de interés" se refiere a un polipéptido que se va a suministrar a una célula o está codificado por un polinucleótido que se va a suministrar a una célula para provocar un efecto deseado en la célula (p. ej., un efecto terapéutico). El polipéptido de interés puede ser de cualquier especie y de cualquier tamaño.

La amplia información de secuencias necesaria para la genética molecular y las técnicas de ingeniería genética está ampliamente disponible públicamente. El acceso a secuencias de nucleótidos completas de genes, secuencias de ADNc, secuencias de aminoácidos y genomas de mamíferos y seres humanos se puede obtener de GenBank en el sitio web www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez. También se puede obtener información adicional de GeneCards, una enciclopedia electrónica que integra información sobre genes y sus productos y aplicaciones biomédicas del Instituto Weizmann de Ciencias del Genoma y Bioinformática (bioinformatics.weizmann.ac.il/cards), también se puede obtener información de secuencias de nucleótidos de la base de datos de secuencias de nucleótidos de EMBL (www.ebi.ac.uk/embl) o del banco de datos de ADN de Japón (DDBJ, www.ddbj.nig.ac.jp). Otros sitios de información sobre secuencias de aminoácidos incluyen el sitio web de recursos de información sobre proteínas de Georgetown (www.pir.georgetown.edu) y Swiss-Prot (au.expasy.org/sprot/sprot-top.html).

Como se comentó anteriormente, las composiciones de la invención pueden comprender material genético, tal como un polinucleótido de interés, p. ej., ADNp (ADN plasmídico), que cuando se transcribe produce una trampa. En tales realizaciones, el material genético puede ser parte de un casete de expresión. Además, los polinucleótidos comprenden una secuencia codificante que se encuentra en un casete de expresión.

Los términos "introducción" o "introducir" cuando se refieren a un polinucleótido se refieren a la presentación del polinucleótido a una célula de tal manera que el polinucleótido obtiene acceso a la región intracelular de la célula.

El casete de expresión comprende una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células que se utilizarán para la expresión, conectadas operablemente a un polipéptido de interés. Se pretende que "conectado operablemente" signifique que la secuencia de nucleótidos de interés (es decir, una secuencia codificante para un polipéptido de interés) está conectada a la secuencia o las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (p. ej., en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula cuando el casete de expresión o vector se introducen en una célula). Las "secuencias reguladoras" incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Véase, por ejemplo, Goeddel (1990) en *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185 (Academic Press, San Diego, California). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células anfítrionas y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células anfítrionas (p. ej., secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del casete de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula anfítriona que se debe transformar, el nivel de expresión del elemento silenciador o polipéptido de interés deseado, y similares. Tales cassetes de expresión incluyen típicamente uno o más sitios para enzimas de restricción situados apropiadamente, para facilitar la introducción del ácido nucleico en un vector.

Se apreciará adicionalmente que los elementos promotores y/o reguladores apropiados se pueden seleccionar fácilmente para permitir la expresión de las unidades de transcripción/elementos silenciadores relevantes en la célula de interés. En ciertas realizaciones, el promotor utilizado para dirigir la expresión intracelular de un elemento silenciador es un promotor de la ARN polimerasa III (Pol III). Las referencias que analizan varios promotores de Pol III

incluyen, por ejemplo, Yu et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99(9), 6047-6052; Sui et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99(8), 5515-5520 (2002); Paddison et al. (2002) Genes and Dev. 16, 948-958; Brummelkamp et al. (2002) Science 296, 550-553; Miyagishi (2002) Biotech. 20, 497-500; Paul et al. (2002) Nat. Biotech. 20, 505-508; Tuschl et al. (2002) Nat. Biotech. 20, 446-448. De acuerdo con otras realizaciones, se puede utilizar un promotor para la ARN polimerasa I, p. ej., un promotor de ARNt. Véanse McCown et al. (2003) Virology 313(2):514-24; Kawasaki (2003) Nucleic Acids Res. 31 (2):700-7. En algunas realizaciones en las que el polinucleótido comprende una secuencia codificante para un polipéptido de interés, se puede utilizar un promotor para la ARN polimerasa II.

Las secuencias reguladoras también pueden ser proporcionadas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados se obtienen a partir de polioma, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus de Simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procarióticas y eucarióticas, véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Véase, Goeddel (1990) en *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185 (Academic Press, San Diego, California).

La transcripción *in vitro* se puede realizar utilizando una variedad de sistemas disponibles que incluyen los sistemas de promotor/polimerasa T7, SP6 y T3 (p. ej., los disponibles comercialmente de Promega, Clontech, New England Biolabs y similares). Los vectores que incluyen el promotor T7, SP6 o T3 son bien conocidos en la técnica y se pueden modificar fácilmente para dirigir la transcripción de elementos silenciadores.

PEGilación

La PEGilación del vector mejora la semivida en circulación del sistema de suministro al reducir el aclaramiento del vector por el sistema reticuloendotelial (RES). Si bien no está sujeto a ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, se cree que un vector PEGilado puede evadir el sistema RES bloqueando estéricamente la opsonización de las partículas (Owens y Peppas (2006) *Int J Pharm* 307: 93-102). Para proporcionar suficiente impedimento estérico para evitar la opsonización, la superficie exterior del vector debe estar completamente cubierta por moléculas de PEG en la configuración de "cepillo". Con una cobertura de superficie baja, las cadenas de PEG tendrán típicamente una configuración de "hongo", en donde las moléculas de PEG se ubicarán más cerca de la superficie del vehículo lipídico. En la configuración de "cepillo", las moléculas de PEG se extienden más lejos de la superficie de la partícula, mejorando el efecto de impedimento estérico. Sin embargo, el hacinamiento de PEG en la superficie puede disminuir la movilidad de las cadenas de polímero y, por lo tanto, disminuir el efecto de impedimento estérico (Owens y Peppas (2006) *Int J Pharm* 307: 93-102). La conformación de PEG depende de la densidad superficial y la masa molecular del PEG sobre la superficie del vector. El factor de control es la distancia entre las cadenas PEG sobre la superficie del vehículo (D) con respecto a su dimensión de Flory, R_F , que se define como $aN^{3/5}$, en donde a es la longitud de persistencia del monómero, y N es el número de unidades de monómero en el PEG (Nicolás et al. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1463:167-178). Se pueden definir tres regímenes: (1) cuando $D > 2 R_F$ (hongos interdigitados); (2) cuando $D < 2 R_F$ (hongos); y (3) cuando $D < R_F$ (cepillos) (Nicolás et al.).

Composiciones farmacéuticas

Los lípidos y los sistemas de suministro de la invención son útiles en sistemas de cultivo de tejidos de mamíferos, en estudios con animales y con fines terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas se pueden utilizar lípidos catiónicos citotóxicos de fórmula (I), y sistemas de suministro que comprenden un lípido catiónico de fórmula (I), en donde los lípidos catiónicos de fórmula (I) tienen actividad citotóxica, sistemas de suministro que comprenden un lípido catiónico de fórmula (I), en donde el compuesto bioactivo tiene actividad terapéutica, y sistemas de suministro que comprenden un lípido catiónico citotóxico de fórmula (I) y un compuesto bioactivo con actividad terapéutica. Por lo tanto, el objeto de estudio de la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden lípidos catiónicos citotóxicos de fórmula (I) o sistemas de suministro que comprenden lípidos catiónicos de fórmula (I).

Las composiciones divulgadas en el presente documento se pueden formular para el suministro, es decir, la administración al sujeto, por cualquier vía disponible que incluye, entre otras, las vías parenteral (p. ej., intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. En algunas realizaciones, la vía de suministro es intravenosa, parenteral, transmucosa, nasal, bronquial, vaginal y oral.

Las composiciones se pueden formular como una sal farmacéuticamente aceptable. La frase "sal o sales farmacéuticamente aceptables", como se emplea en el presente documento, significa aquellas sales de los compuestos divulgados en el presente documento que son seguras y eficaces para su uso en un sujeto y que poseen la actividad biológica deseada. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de grupos ácidos o alcalinos presentes en los compuestos de la invención. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, sales hidrocloruro, hidrobromuro, hidroyoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, borato, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencensulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), mesilato. Algunos de los compuestos divulgados en el presente documento pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con varios aminoácidos. Las sales alcalinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc y dietanolamina. Para una revisión de las sales farmacéuticamente

aceptables véase Bergé et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19. Las sales de los lípidos descritos en el presente documento se pueden preparar, por ejemplo, haciendo reaccionar el equivalente apropiado del compuesto con el ácido o la base deseados en solución. Una vez completada la reacción, las sales se cristalizan a partir de la solución mediante la adición de una cantidad adecuada de disolvente en el que la sal es insoluble.

5 Como se emplea en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica o cosmética. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.

10 Como apreciaría un experto normal en la técnica, una composición farmacéutica divulgada en el presente documento se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral (p. ej., intravenosa), intramuscular, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; 15 antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples preparados a partir de vidrio o plástico.

20 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen típicamente soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. En 25 algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. En general, el portador relevante puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso 30 de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En algunas realizaciones, se incluyen en la formulación agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, o cloruro de sodio. La absorción prolongada de la formulación inyectable se puede lograr incluyendo en la formulación un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (p. ej., lípido catiónico citotóxico de fórmula (I) o un sistema de suministro que comprende un lípido catiónico de fórmula (I)) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En ciertas realizaciones, las soluciones para inyección están 40 libres de endotoxinas. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los demás ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En aquellas realizaciones en las que se utilizan polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, las soluciones se pueden preparar mediante secado a vacío y liofilización, lo que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada de forma estéril.

45 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y utilizar en forma de tabletas, trociscos o cápsulas, p. ej., cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un portador fluido para su uso como enjuague bucal. Los agentes aglutinantes farmacéutica o cosméticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, 50 cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa; un agente desgregante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como esteарат de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Las 55 composiciones para administración oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o para mejorar la absorción.

Para la administración mediante inhalación, las composiciones divulgadas en el presente documento se pueden suministrar en forma de pulverización en aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador. También se pueden utilizar aerosoles líquidos, polvos secos y similares.

La administración sistémica de las composiciones divulgadas en el presente documento también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para la barrera que se deba atravesar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Las composiciones descritas en el presente documento también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicerídos) o enemas de retención para suministro rectal.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación como se emplea en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para como dosificaciones unitarias para el sujeto que se vaya a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociada con el portador farmacéutico o cosmético requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por, y dependen directamente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se deba lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de preparar tal compuesto activo para el tratamiento de individuos. En otra parte del presente documento se proporciona orientación sobre la dosificación.

Como se emplea en el presente documento, cuando se hace referencia a las composiciones descritas en el presente documento, se entiende que la "actividad terapéutica" es aquella capaz de provocar un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado cuando se administra a un sujeto que lo necesita.

Como se emplean en el presente documento, los términos "tratamiento" o "prevención" se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una infección o enfermedad particulares o signo o síntoma de las mismas y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una infección o enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la infección o enfermedad. En consecuencia, el método "previene" (es decir, retrasa o inhibe) y/o "reduce" (es decir, disminuye, retarda o mejora) los efectos perjudiciales de una enfermedad o trastorno en el sujeto que recibe las composiciones de la invención. El sujeto puede ser cualquier animal, incluido un mamífero, tal como un ser humano, e incluidos, pero sin limitarse de ningún modo a, animales domésticos, tales como sujetos felinos o caninos, animales de granja, como, pero sin limitarse a, sujetos bovinos, equinos, caprinos, ovinos y porcinos, animales salvajes (ya sea en libertad o en un zoológico), animales de investigación, tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, etc., especies de aves, tales como pollos, pavos, pájaros cantores, etc., es decir, para uso médico veterinario.

Cualquier tipo de afección no deseada o enfermedad se puede tratar terapéuticamente con las composiciones divulgadas en el presente documento. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección no deseada que se va a tratar es un cáncer. Como se describe en otra parte del presente documento, el término "cáncer" abarca cualquier tipo de crecimiento celular no regulado e incluye todas las formas de cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer que se debe tratar es un cáncer colorrectal. Los métodos para detectar la inhibición del crecimiento o progresión del cáncer son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, medir el tamaño del tumor primario para detectar una reducción en su tamaño, un retraso en la aparición de tumores secundarios, una ralentización del desarrollo de tumores secundarios, una disminución de la aparición de tumores secundarios y una ralentización o disminución de la gravedad de los efectos secundarios de la enfermedad.

Un experto en la técnica entenderá que la administración de las composiciones descritas en el presente documento se puede utilizar sola o junto con otras modalidades terapéuticas, incluidas, entre otras, terapia quirúrgica, radioterapia o tratamiento con cualquier tipo de agente terapéutico, tal como un fármaco. En aquellas realizaciones en las que el sujeto padece cáncer, las composiciones descritas en el presente documento se pueden suministrar combinadas con cualquier agente quimioterapéutico bien conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, el compuesto bioactivo citotóxico y las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar simultáneamente al sujeto, donde el compuesto bioactivo citotóxico y las composiciones descritas en el presente documento están presentes en una sola composición que se administra al sujeto. Alternativamente, en otras realizaciones, el compuesto bioactivo citotóxico y las composiciones descritas en el presente documento se administran secuencialmente en composiciones separadas. Por "secuencialmente" se entiende que las dos composiciones se administran una después de la otra al sujeto, con dos administraciones separadas de dos composiciones distintas, en donde una composición comprende el compuesto bioactivo citotóxico y la otra composición comprende las composiciones descritas en el presente documento.

Cuando se administran a un sujeto que lo necesita, las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender adicionalmente un ligando de direccionamiento, como se analiza en otro lugar del presente documento. En estas realizaciones, el ligando de direccionamiento dirigirá el ligando o complejo asociado físicamente a una célula o tejido elegido como diana dentro del sujeto. En algunas realizaciones, el sistema de suministro dirigido es citotóxico.

En ciertas realizaciones, la célula o el tejido elegidos como diana estarán enfermos o se caracterizarán por la afección no deseada.

Dosificación

El suministro de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones descritas en el presente documento se puede obtener mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de este agente. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis" se entiende la concentración de las composiciones descritas en el presente documento que es suficiente para provocar el efecto terapéutico deseado.

Como se emplea en el presente documento, "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados clínicos o bioquímicos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar una o más veces.

10 La cantidad eficaz de las composiciones descritas en el presente documento variará según el peso, el sexo, la edad y el historial médico del sujeto. Otros factores que influyen en la cantidad eficaz pueden incluir, pero sin limitarse a, la gravedad de la afección del sujeto, el trastorno que se está tratando y, si se desea, el agente terapéutico adyuvante que se administra junto con el lípido o el complejo que contiene lípidos. Los métodos para determinar la eficacia y la dosificación son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Isselbacher et al. (1996) *Harrison's Principles of Internal Medicine* 13^a ed., 1814-1882.

15 La composición farmacéutica se puede administrar a varios intervalos y durante diferentes períodos de tiempo según se requiera, p. ej., varias veces al día, diariamente, cada dos días, una vez a la semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, entre 2 a 8 semanas, entre aproximadamente 3 a 7 semanas, aproximadamente 4, 5 o 6 semanas, y similares. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el momento necesarios para tratar eficazmente a un sujeto, incluidos, pero sin limitarse a, la gravedad de la enfermedad, el trastorno o la afección no deseada, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades o afecciones no deseadas presentes. Generalmente, el tratamiento de un sujeto puede incluir un solo tratamiento o, en muchos casos, puede incluir una serie de tratamientos.

20 25 Debe entenderse que las dosis apropiadas de las composiciones descritas en el presente documento dependen de su potencia y se pueden adaptar opcionalmente al receptor particular, por ejemplo, mediante la administración de dosis crecientes hasta que se logre una respuesta deseada preseleccionada. Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen la actividad de las composiciones específicas descritas en el presente documento empleadas, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad que se deba modular.

30 35 40 45 50 En otra realización de la invención, se administra de forma intermitente una dosis terapéuticamente eficaz de las composiciones descritas en el presente documento. Por "administración intermitente" se entiende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de las composiciones descritas en el presente documento, seguida de un período de interrupción, que a continuación está seguido por otra administración de una dosis terapéuticamente eficaz, y así sucesivamente. La administración de la dosis terapéuticamente eficaz se puede lograr de manera continua, como por ejemplo con una formulación de liberación sostenida, o se puede lograr de acuerdo con un régimen de dosificación diaria deseado, como por ejemplo con una, dos, tres o más administraciones por día. Por "período de tiempo de interrupción" se entiende la interrupción de la administración de liberación sostenida continua o diaria de las composiciones descritas en el presente documento. El período de tiempo de interrupción puede ser más largo o más corto que el período de administración de liberación sostenida continua o diaria. Durante el período de tiempo de interrupción, el nivel del efecto de las composiciones descritas en el presente documento en el tejido relevante está sustancialmente por debajo del nivel máximo obtenido durante el tratamiento. En algunas realizaciones, el período de interrupción depende de la concentración de la dosis eficaz. El período de interrupción puede ser de al menos 2 días, al menos 4 días o al menos 1 semana. En otras realizaciones, el período de interrupción es de al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses o más. Cuando se utiliza una formulación de liberación sostenida, el período de interrupción se debe extender para tener en cuenta el mayor tiempo de residencia de las composiciones descritas en el presente documento en el sitio terapéutico. Alternativamente, la frecuencia de administración de la dosis eficaz de la formulación de liberación sostenida se puede disminuir en consecuencia. Un programa intermitente de administración de las composiciones descritas en el presente documento puede continuar hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y, finalmente, se logre el tratamiento de la enfermedad o afección no deseada.

55 Un experto con un conocimiento práctico normal de la técnica tras la revisión del objeto de estudio divulgado en el presente documento apreciaría que las composiciones divulgadas actualmente, incluidas las sales farmacéuticamente aceptables y las composiciones farmacéuticas de las mismas, se pueden administrar directamente a una célula, un cultivo celular, un medio de cultivo celular, un tejido, un cultivo de tejido, un medio de cultivo de tejido y similares. Cuando se hace referencia a las composiciones descritas en el presente documento, el término "administrar" y sus derivados comprenden cualquier método que permita que el compuesto entre en contacto con una célula. Las composiciones divulgadas en el presente documento, o las sales farmacéuticamente aceptables o las composiciones farmacéuticas de las mismas, se pueden administrar (o poner en contacto con) una célula o un tejido *in vitro* o *ex vivo*. Las composiciones divulgadas en el presente documento, o las sales farmacéuticamente aceptables o las

composiciones farmacéuticas de las mismas, también se pueden administrar (o poner en contacto con) una célula o un tejido *in vivo* mediante administración a un sujeto individual, p. ej., un paciente, por ejemplo, mediante administración sistémica (p. ej., administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o intracraeal) o aplicación tópica, como se describe en otra parte del presente documento.

5 **IV. Artículos de fabricación**

El artículo de fabricación puede incluir un vial u otro recipiente que contenga una composición adecuada para el presente método junto con cualquier portador, ya sea seco o en forma líquida. El artículo de fabricación incluye adicionalmente instrucciones en forma de etiqueta en el envase y/o en forma de prospecto incluido en una caja en la que se empaqueta el envase, para llevar a cabo el método de la invención. Las instrucciones también se pueden imprimir en la caja en la que se empaqueta el vial. Las instrucciones contienen información tal como información de dosificación suficiente y administración para permitir que el sujeto o un trabajador en el sector administre la composición farmacéutica. Se prevé que un trabajador en el sector incluya a cualquier médico, enfermera, técnico, cónyuge u otro cuidador que pueda administrar la composición. La composición farmacéutica también puede ser autoadministrada por el sujeto.

10 15 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

El desarrollo y uso de un modelo animal ortotópico singénico de metástasis colorrectal en el hígado confiable ha permitido una mayor investigación sobre el papel de CXCL12 en la conducción de la formación de metástasis colorrectal en el hígado. Este modelo, referido por primera vez por Zhang et al., involucra células CT-26 FL3 (2,0 × 10⁶) que son inoculadas en la pared del ciego y producen una alta incidencia de metástasis en el hígado (~90%) (Zhang, Y., et al., Development and Characterization of a Reliable Mouse Model of Colorectal Cancer Metastasis to the Liver. *Clin Exp Metastasis*, 30(7), 2013). A través del establecimiento de una línea celular CT-26 FL3 (que expresa establemente los genes marcadores RFP/Luc), se utilizó el análisis bioluminiscente de luciferasa para demostrar que la inyección intravenosa (IV) de nanopartículas de galactosa-PEG-LCP suministra ADNp que codifica una pequeña proteína trampa (28,6 kD) contra CXCL12/SDF-1 con dominio de unión de anticuerpo modificado genéticamente prepara al hígado para resistir las lesiones metastásicas.

Materiales y métodos

1. Materiales

30 Se adquirió 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-[succinil(poliétilenglicol)-2000]-N-hidroxisuccinimida (DSPE-PEG2000-N-hidroxil succinimida (NHS)) de NOF Corporation (Tokio, Japón). Se adquirió ¹⁷⁷LuCl₃ radiactivo en HCl 0,05 N de PerkinElmer, Inc. y se utilizó inmediatamente después de su recepción. Se sintetizó DSPE-PEG2000-galactosa mediante la conjugación de 10 eq. de 4-aminofenil β-d-galactopiranósido y 1 eq. de DSPE-PEG2000-NHS en tampón PBS, seguido de extracción con cloroformo y diáisisis contra agua utilizando un tubo de diáisisis MWCO 1000. Todos los demás lípidos se adquirieron de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). Los péptidos se adquirieron de 35 Elim Biopharmaceuticals, Inc. (Hayward, CA); monocíclico abreviado como mc. La tinción de ácido nucleico de Hoechst 3342 se adquirió de ThermoFischer Scientific (Grand Island, NY). El kit de marcaje de ADNc de Cy3 fluorescente se adquirió mediante (kit Mirus LabelIT, Mirus Bio, Madison, WI). La luciferina se adquirió de Promega Corporation (Madison, WI). Los plásmidos que codifican la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) fueron preparados a medida por Bayou Biolabs (Harahan, LA). Los kits de ELISA, IF e IHC, así como todos los anticuerpos, incluidos anti-His-tag, anti-CXCL12 y anti-CD8, así como los anticuerpos secundarios, se adquirieron a través de Abcam (Cambridge, MA). Los kits de ensayo de Invasión y Migración se adquirieron a través de EMD Millipore, (Billerica, MA). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se utilizaron sin purificación adicional. Se adquirieron ratones hembra BALB/c de seis semanas de edad (~18 g cada uno) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA).

45 **2. Métodos**

Supresión *in vitro* de la migración y la invasión a través de la proteína trampa contra CXCL12: La proteína modificada genéticamente (trampa contra CXCL12) se probó para determinar su capacidad para suprimir la migración e invasión de CT-26 FL3. Se utilizó el ensayo de migración celular de 96 pocillos por quimiotaxis y de invasión celular de 24 pocillos (EMD Millipore, Billerica, MA). Las células se privaron de alimento durante 24 h y se sembraron en placas 50 Transwell a una densidad de 0,5 X10⁶ células/ml en medio libre de suero. Un grupo de células permaneció en medio sin suero, mientras que todos los demás grupos permitieron la adición de la quimiotaxis (quimioatravente) CXCL12 (100 ng/ml) a la bandeja de alimentación. Además, tres grupos en los que estaba presente CXCL12 permitieron la adición de medio sin suero (sin tratamiento), trampa contra CXCL12 (2, 4, 8, 12 µg/ml) o un mAb contra CXCL12 disponible comercialmente (Abcam) (1, 2, 4 µg/ml). Incubación a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ durante 4 y 24 55 h (Migración), y durante 24 h (Invasión). Las células fueron desalojadas, recolectadas y lisadas de la parte inferior de la placa de migración/invasión. Se añadió tampón de lisis junto con luciferina (solución de ensayo de luciferasa), que se analiza mediante un lector de placas bioluminiscentes. Se restaron los pocillos de fondo y se informó de la cuantificación con respecto a los no tratados (sin quimioatravente CXCL12).

Preparación y caracterización de LCP cargado con ADN: Se preparó LCP utilizando un protocolo modificado. Se prepararon dos microemulsiones separadas (60 mL cada una) de Igepal 520 y ciclohexano (3:7 v/v) y se pusieron bajo agitación. Se preparó una solución de ADN (180 µg), a la que se añadieron 1.800 µL de CaCl₂ 2,5 M. A esta solución, se le añadió péptido de octaarginina (mc-CR8C) a una razón N:P de 2:1 (~200 µg) y se añadió inmediatamente a la microemulsión. También se preparó una solución de Na₂HPO₄ (1800 µL, 50 mM) y se añadió a la otra microemulsión. Cada microemulsión se dejó en agitación durante 20 min. La microemulsión que contenía Na₂HPO₄ se añadió a la microemulsión que contenía el ADN/Péptido/CaCl₂. Esta solución se dejó en agitación durante 5 min antes de añadir 1200 µL de DOPA 20 mM (en CHCl₃). Después de la adición de DOPA, la microemulsión se dejó en agitación durante 30 min más. Se añadió un volumen igual de EtOH del 100% (120 mL) para romper la emulsión. La mezcla se transfirió a tubos de centrífuga cónicos de 50 mL y se centrifugó a 10.000 g durante 20 min. Después de decantar el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con EtOH del 100% para eliminar las trazas de Igepal y/o ciclohexano. A continuación, el precipitado se secó bajo N₂, y se resuspendió en CHCl₃. Esta solución se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min para eliminar los agregados grandes y se recuperó el sobrenadante que contenía los "núcleos" de LCP (ADN y péptido atrapados dentro de un nanoprecipitado de fosfato de calcio soportado, y rodeado por una monocapa lípida de DOPA).

Para caracterizar la eficiencia de captura del ADN, el ADNc se marcó con Cy3 (kit Mirus LabelIT, Mirus Bio, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Tal Cy3-DNA se formuló en los núcleos de LCP, después de lo cual se evaluó la recuperación mediante espectrometría de fluorescencia. Otros estudios utilizaron la tinción de ácido nucleico de Hoescht para confirmar la eficiencia de captura del ADN en la que se encapsuló el ADNp/péptido, los núcleos se lisaron en tampón de ácido acético, el péptido/ADN se disoció mediante la adición de proteasa K, y se añadió tinción de Hoescht y se evaluó mediante espectrometría de fluorescencia. Los núcleos de LCP marcados con ¹⁷⁷Lu se prepararon como se describe anteriormente, en los que incorporó ADNp/péptido junto con ¹⁷⁷LuCl₃ a la solución de CaCl₂ de la emulsión de calcio. Tras la co-precipitación de las dos emulsiones, los núcleos LCP marcados con ¹⁷⁷Lu se recolectaron como se describe anteriormente, con centrifugación en CHCl₃ eliminando los agregados que contenían ¹⁷⁷Lu. Los núcleos de LCP finales encapsularon 80% de ¹⁷⁷Lu. Se produjo Gal-LCP-ADNp/mc-CR8C final mediante desecación de una mezcla de lípidos y núcleos libres y rehidratación mediante una solución acuosa de sacarosa al 5%. Se encontró que la proporción de núcleos frente a lípidos del foliolo externo para una formulación de partículas final óptima era de 11 mg de núcleo: 600 µL DOTAP (20 mM): 600 µL Colesterol (20 mM): 500 µL DSPE-PEG2000 (20 mM). Allí, se utilizaron 35% en moles de DOTAP, 35% en moles de colesterol y 30% en moles de DSPE-PEG2000 (o 25% en moles de DSPE-PEG y 5% en moles de DSPE-PEG-Gal) como lípidos del foliolo externo. El potencial zeta y el tamaño de partícula de LCP se midieron utilizando un Malvern ZetaSizer Nano Series (Westborough, MA). Las imágenes TEM de LCP se adquirieron utilizando un TEM JEOL 100CX II (JEOL, Japón).

Farmacocinética, biodistribución y distribución celular de Gal-LCP-ADNp/mc-CR8C: La farmacocinética y la biodistribución cuantitativa se determinaron mediante co-encapsulación de ADNp con ¹⁷⁷Lu, como se describió anteriormente. Tales métodos se han utilizado previamente para determinar con precisión la biodistribución de LCP. A ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad (6 ratones utilizados para cada grupo) se les inyectó individualmente (0,2 mL, equilibrados en osmolaridad con la adición de sacarosa) LCP a 0,5 mg de ADNp/kg, correspondiente a una dosis de 1×10^8 cpm/kg de ¹⁷⁷Lu. Para el análisis farmacocinético, la sangre se recuperó en varios puntos de tiempo (0,5, 1, 2, 4, 8, 12 y 16 h) mediante sangrado por muesca en la cola. Para el análisis de biodistribución, 16 h después de la administración de LCP, se recogieron la sangre y los órganos principales (se utilizaron 6 ratones para cada punto de tiempo). La radioactividad en la sangre y los tejidos en ambos estudios se midió utilizando un contador γ. El análisis se realizó bajo un modelo de dos compartimentos utilizando Phoenix WinNonlin (Versión 6.3, Pharsight Corporation; Mountain View, CA).

Aumento de la dosis génica *in vivo* y tiempo de expresión: Se inyectó una formulación de LCP dirigidos por galactosa que contenían ADN de Trampa contra pCXCL12, que contenía una Etiqueta His en el extremo C-terminal (0,2 mL, equilibrados en osmolaridad con la adición de sacarosa) a ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad (0,1, 0,5 o 1 mg de ADN/kg, 3 ratones utilizados para cada grupo) a través de la vena de la cola. Se realizaron el análisis de transferencia Western y la cuantificación después de la administración IV en la vena de la cola de concentraciones crecientes de LCP con ADN de trampa contra pCXCL12 para determinar si la expresión depende de la dosis. Los ratones fueron sacrificados 24 h después de la administración. Se recogieron el hígado, bazo, pulmones, riñón, corazón y sangre y se homogeneizaron en tampón RIPA. La concentración de proteína total en el producto lisado se determinó a través de un kit de ensayo de proteína con ácido bicinchonírico (BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL). Posteriormente, se cargaron 50 µg de proteína total para análisis western. La proteína trampa contra CXCL12 deseada tiene un peso molecular de 28,6 kD. Se utilizó GAPDH como control de carga. Se utilizó anticuerpo de ratón con etiqueta de his(6x) como anticuerpo primario. La expresión de la trampa contra pCXCL12 se cuantificó como el aumento relativo de la intensidad de HRP sobre el grupo tratado con PBS.

También se utilizó el kit ELISA de etiqueta de His en el que se cargaron 5 µg de proteína total para un análisis de expresión adicional. El kit proporcionó proteínas patrón que contenían una etiqueta de His para su uso como control de calibración patrón. Por lo tanto, la cuantificación de la expresión de proteínas se puede medir mediante análisis ELISA. Tras los estudios de aumento de dosis y expresión, se eligió la dosis de 0,5 mg de ADN/kg para estudios terapéuticos *in vivo*.

Se inyectó una formulación de LCP dirigidos por galactosa que contenía ADNp que codificaba la Trampa contra

pCXCL12, que contenía una etiqueta de His en el extremo C-terminal (0,2 ml, equilibrada en osmolaridad con la adición de sacarosa) a ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad (0,5 mg de ADN/kg × 3 QOD, 3 ratones utilizados para cada grupo) a través de la vena de la cola. Se realizaron el análisis de Transferencia Western y la cuantificación después de la administración IV en la vena de la cola de LCP con ADN de la trampa contra pCXCL12 para determinar

- 5 el tiempo de expresión transitoria. Los ratones fueron sacrificados 1, 2, 4 u 8 días después de la administración. Se recogieron el hígado, bazo, pulmones, riñón, corazón y sangre y se homogeneizaron en tampón RIPA. El contenido de proteína se midió utilizando BCA. Posteriormente, se cargaron 50 µg de proteína total para análisis western. Todos los geles se cargaron con un órgano específico y una muestra patrón de hígado con el fin de analizar los niveles de expresión de órgano frente a hígado y mantener la coherencia en la cuantificación de la expresión de órgano e hígado.
- 10 La expresión de la trampa contra pCXCL12 se cuantificó como el aumento relativo de la intensidad de HRP sobre el grupo tratado con PBS.

Estudios de Toxicidad y Patología: Los ratones se trataron con la trampa contra pCXCL12, pGFP, LCP cargado con blanco (0,5 mg de ADN/kg × 3, QOD) (se utilizaron tres ratones para cada grupo). Además, a otro grupo de tratamiento se le administró proteína trampa contra CXCL12 libre (1,0 mg de proteína/kg × 3, QOD). Se sacrificó a los ratones 24 h después de la inyección final en la vena de la cola. Se obtuvo suero de los ratones mediante punción cardíaca y centrifugación. El daño hepático y renal se evaluó midiendo los niveles de AST, ALT y BUN en las muestras de suero. Los niveles de células sanguíneas, incluidos glóbulos blancos, linfocitos, granulocitos y monocitos, se midieron con análisis de sangre total. Estas medidas fueron cuantificadas por los Laboratorios de Química Clínica Animal y Expresión Génica en UNC Chapel Hill. Adicionalmente, los órganos principales de cada ratón se recogieron, fijaron y procesaron posteriormente para la tinción tricrómica. Las imágenes de las secciones de tejido se recogieron utilizando un microscopio óptico Nikon con un objetivo de 10x.

Supresión de la metástasis en hígado *in vivo*: A los ratones se les inocularon 2x10⁶ células CT-26 FL3 RFP/Luc en la pared del ciego. El tratamiento con 10 µg (ADNp) de Gal-LCP-trampa contra pCXCL12/mc-CR8C los días 10, 12 y 14 se administró a través de la vena de la cola IV (n=7). Los grupos de control incluyeron PBS/sin tratar (n=7) y Gal-LCP-GFP/mc-CR8C (n=6). Se siguió la progresión de la masa tumoral mediante la administración de 200 µl de luciferina (10 mg/ml). Se registraron imágenes bioluminiscentes de luciferasa IP 10 minutos después de la administración de luciferina. La masa tumoral del ratón el día 24 se muestra arriba en una imagen bioluminiscente utilizando IVIS con cámara Kodak. Después de 24 días, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los hígados. La cuantificación de la carga tumoral en los hígados se cuantificó utilizando el soporte lógico image J. La cuantificación se muestra arriba en la que se encontró que la carga tumoral se redujo en más de 85% en comparación con los grupos de control. Se estudiaron análisis adicionales de la carga metastásica posterior al tratamiento en otros órganos. La metástasis del ratón se evaluó el día 24 en el que los ratones se trataron con 200 µl de Luciferina (10 mg/ml). Se tomaron imágenes de los ratones, se sacrificaron y a continuación se extrajeron los órganos y se colocaron en una solución de luciferina (1 mg/ml) y se tomaron imágenes para la bioluminiscencia.

35 Análisis estadístico: Los datos se expresaron como media ± desviación típica (DT). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student cuando solo se compararon dos conjuntos de valores, y el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett cuando los datos involucraban tres o más grupos. *, **, *** denotan p< 0,05, 0,01 y 0,001 respectivamente y se consideró significativo y se documentó en la figura o en la leyenda de la figura. En todas las estadísticas, los grupos se comparan con el control no tratado.

40 Ejemplo 1

Formulación de nanopartículas de galactosa-LCP con ADNp/mc-CR8C

Hu et al. informaron por primera vez sobre la formulación y suministro de Galactosa-LCP con carga de ADNp/mc-CR8C al hígado (hepatocitos) de ratones (Hu, Y., et al., A Highly Efficient Synthetic Vector: Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo. *ACS Nano*, 2013. 7(6): pág. 5376-5384). Como se informó, se utilizó una 45 microemulsión inversa para preparar nanopartículas de fosfato de calcio (CaP) recubiertas con 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfato (DOPA) (LCP "núcleos amorfos"). Estos núcleos pueden encapsular tanto el ADN (60% de eficiencia) como los péptidos catiónicos, lo que produce un tamaño de núcleo que oscila entre 15 y 25 nm de diámetro. La estructura del núcleo hueco se puede visualizar bajo Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (**Fig. 3A/B**). Posteriormente, la monocapa de DOPA que rodea el núcleo de CaP permite la adición de los lípidos catiónicos del folíolo exterior (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), colesterol lípido auxiliar y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanamina-N-[succinil(poletilenglicol)-2000 (DSPE-PEG2000)) para ayudar en la evasión de RES, produciendo partículas de menos de 60 nm (LCP "final", 40-60 nm de diámetro, que se muestra en **Fig. 3A-C** que puede penetrar fácilmente las fenestraciones sinusoidales hepáticas.

Ejemplo 2

55 Determinación del tamaño de nanopartículas de LCP

Se encontró a través de la dispersión dinámica de luz que el diámetro hidrodinámico y la carga superficial de la partícula de LCP eran aproximadamente 45 nm y 10 mV (**Fig. 3C**). La dispersión dinámica de luz indicó que LCP se dispersaba de forma restringida alrededor de 45 nm de diámetro, con un potencial zeta positivo (alrededor de +10 mV)

debido a la carga catiónica de DOTAP junto con la capacidad de blindaje catiónico de DSPE-PEG2000. La mezcla de LCP y liposomas da como resultado un promedio z de 236 ± 32 nm; n=6. Se encontró que la solución era estable en suero bovino fetal al 10% durante al menos 24 horas a 37°C en el que no se observó un aumento significativo en el promedio z. (Fig. 3D).

5 Ejemplo 3

Eficiencia de encapsulación de ADNp en núcleos de LCP

La determinación de la carga de ADNp de Galactosa-LCP con ADNp/mc-CR8C se logró lisando los núcleos en un entorno de tampón de ácido acético (pH = 4). El ADN se disoció del péptido mediante la adición de una solución de proteasa K. La adición de la tinción de Hoechst permitió una lectura fluorescente cuantitativa para determinar la eficiencia de encapsulación del ADN. Se encontró que la eficiencia de encapsulación del ADN era de aproximadamente 50-60%, lo que corresponde estrechamente a la formulación Hu et al. (Hu, Y., et al., A Highly Efficient Synthetic Vector: Nonhydrodynamic Delivery of DNA to Hepatocyte Nuclei in Vivo. *ACS Nano*, 2013. 7(6): pág. 5376-5384).

Ejemplo 4

15 PK de nanopartículas de Galactosa-LCP-ADNp/mc-CR8C y acumulación en órganos/hígado

La especificidad hepática, la farmacocinética y la distribución en órganos se determinaron mediante la incorporación de radioisótopo Lu¹⁷⁷ al núcleo de LCP con ADNp/mcCR8C. Las partículas de Galactosa-LCP con trampa contra pCXCL12/mc-CR8C (pTrap LCP) que contenían Lu¹⁷⁷ se inyectaron a través de la vena de la cola a ratones BALB/c normales. Mediante la PK y el perfil de distribución en órganos se encontró que las nanopartículas de galactosa-LCP exhiben una distribución de dos fases con una $T^{1/2}\alpha$ y $T^{1/2}\beta$ de 20 min y 1054 minutos respectivamente, y que se acumulaba en el hígado aproximadamente 50% de LCP 16 h después de la inyección IV (Fig. 4). La inyección en la vena de la cola de las partículas de LCP con pTrap sin el direccionamiento de galactosa mostró una disminución significativa en la acumulación en el hígado, aproximadamente 10-15% de acumulación, que es comparable a los valores referidos por Hu et al.

25 Ejemplo 5

Perfil de expresión en el hígado de CXCL12 endógeno *in vivo*

Para validar los niveles de expresión de CXCL12 endógeno en el hígado de ratones BALB/C enfermos (modelo de metástasis colorrectal en hígado), los autores de la presente invención extrajeron, fijaron con formalina, cortaron en parafina y evaluaron la cantidad de CXCL12 mediante tinción inmunofluorescente con un anticuerpo contra CXCL12 primario y anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia (Alexa Fluor 594). Adicionalmente, los autores de la presente invención evaluaron si el suministro de su LCP con pTrap produciría una disminución de la señal fluorescente debido a la captura de CXCL12, así como una disminución de la inflamación debido a la disminución de las lesiones metastásicas. Por lo tanto, 10 días después de la administración IV final de LCP con pTrap (10 μg de ADNp QOD \times 3), los autores de la presente invención recolectaron los hígados, fijaron los hígados con formalina, los cortaron en parafina y utilizaron tinción inmunofluorescente contra CXCL12 (color Rojo). Se estudiaron cinco grupos (cuatro de los cuales contenían CCR), incluidos los no tratados (sin CCR), no tratados (PBS), galactosa-LCP con pGFP/mc-CR8C (LCP con pGFP), LCP con pTrap (10 μg), LCP con pTrap (10 μg QOD \times 3). Los resultados se muestran en Fig. 5a, en la que los no tratados y los tratados con pGFP no tenían una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia, y tenían un aumento de aproximadamente 5 a 6 veces en la expresión de CXCL12 en comparación con el hígado no tratado de ratones sin CCR. Sin embargo, ambos grupos de LCP con pTrap (10 μg \times 1 y 10 μg QOD \times 3) mostraron una disminución de 2,5 y 5 veces en la intensidad de la fluorescencia, respectivamente, en comparación con los no tratados, alcanzando finalmente los niveles iniciales de CXCL12 encontrados en el hígado no tratado de ratones sin CCR ($p<0,05$) (Fig. 5A). Debido a la disminución de CXCL12 encontrada en el hígado después del tratamiento con LCP con pTrap (10 μg \times 1 y 10 μg QOD \times 3), los autores de la presente invención tuvieron más secciones para determinar el efecto sobre la población de células T CD8 del hígado (color verde), MDSC, y células T reguladoras que se cree que son reclutadas por CXCL12 endógeno. Se estudiaron cuatro grupos, incluidos sanos (sin CCR), sin tratar (tumor), sin tratar (estroma) y LCP con pTrap (10 μg en días alternos \times 3). Los resultados se muestran en la Figura 5B, en la que los grupos de LCP con pTrap (10 μg QOD \times 3) mostraron una disminución de la intensidad fluorescente en comparación con los no tratados ($p<0,05$) (Fig. 5B).

50 Ejemplo 6

Expresión/distribución en órganos *in vivo* de trampa contra CXCL12 después de la administración de LCP con pTrap

El suministro de LCP con pTrap a través de la administración intravenosa en la vena de la cola en ratones BALB/c produce que casi 50% de la dosis inyectada se acumule en el hígado (Fig. 4B). Hu et al. informaron de que la mayoría de LCP se absorbe y se expresa en los hepatocitos. Hu et al. también mostraron que la disminución de la densidad de PEG y la ausencia del ligando de direccionamiento de galactosa, desplazaron la captación preferentemente hacia

las células de Kupffer, disminuyendo los niveles de expresión del ADNp. Por lo tanto, para asegurar la captación y la expresión en hepatocitos, los autores de la presente invención imitaron la densidad de PEG (30% en moles de entrada) y el ligando de direccionamiento de galactosa utilizado en la formulación de Hu et al. Los autores de la presente invención investigaron más a fondo la expresión preferencial de la trampa contra pCXCL12 en el hígado frente a otros órganos/suero para asegurarse de tener una expresión específica preferencial en el hígado de esta trampa contra CXCL12. Con el fin de determinar la expresión en órganos de la trampa contra pCXCL12, los autores de la presente invención han incorporado una etiqueta de His en el extremo C-terminal, que permite el análisis ELISA y de transferencia western a través de un mAb con Etiqueta de His (**Figura 5D, 5E, y 5F**). Los ratones se trataron con dosis crecientes de LCP con pTrap (0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg). A través de análisis ELISA y transferencia Western, los autores de la presente invención observaron después de 24 h un aumento dependiente de la dosis en la expresión hepática sin que se encontrara expresión en otros órganos o suero distintos de la diana (**Figura 5D y 5E**). Otros estudios en los que se administró LCP con pTrap (0,5 mg/kg QOD x 3) y los ratones fueron sacrificados los días 1, 2, 4 y 8. Los órganos se recolectaron y analizaron a través de transferencia western utilizando anti-mAb con etiqueta de His. (**Figura 5F**). Estos resultados demuestran claramente que el vector de galactosa-LCP permite una expresión transitoria preferencial en el hígado, con una expresión mínima en cualquier otro órgano o suero. (**Figura 5D, 5E, y 5F**). Posteriormente, los autores de la presente invención informaron de que la expresión hepática tiene propiedades transitorias en las que se encuentra que la expresión dura hasta 8 días después de la inyección final (10 µg ADNp; 0,5 mg/kg QOD x3). (**Figura 5F**).

La expresión preferencial del Plásmido de la Proteína Fluorescente Verde (pGFP) y el plásmido trampa contra CXCL12 (pTrap) en el hígado frente a otros órganos/suero se muestra en **Figura 5A**. A través del análisis de microscopía fluorescente de secciones de órganos los días 2, 4 y 8 después de la inyección final de LCP con pGFP, los autores de la presente invención pudieron demostrar una expresión transitoria específica de hígado que duraba hasta 4 días. No se encontró señal de GFP en ninguna otra sección de órgano principal. Además, se encontró que la expresión de GFP estaba predominantemente en la población de hepatocitos dentro del hígado. (**Fig. 5A**).

25 Ejemplo 7

Disminución de la incidencia y la carga tumoral de metástasis colorrectal en el hígado en ratones después de la administración de LCP con pTrap

Los autores de la presente invención examinaron el efecto de LCP con pTrap sobre la incidencia y la carga de metástasis encontradas en ratones. A los ratones se les inocularon $2,0 \times 10^6$ células CT-26 FL3 (*RFP/luc*) ortotópicamente en la pared del ciego. En esta serie de experimentos, los tratamientos comenzaron 10 días después de la inoculación en el ciego. Se exploraron tres grupos de tratamiento, incluido PBS (sin tratar), un control de vector que consistía en LCP con pGFP y LCP con pTrap. La administración de los tres grupos de tratamiento se inició el día 10 después de la inoculación, en el que se administraron inyecciones intravenosas en la vena de la cola (10 µg de ADNp) los días 10, 12 y 14. Se siguió la carga tumoral total del ratón mediante la administración IP de 200 µl de luciferina (10 mg/ml) seguido de análisis bioluminiscente. La carga tumoral total del ratón se registró semanalmente y se utilizó para clasificar los ratones en grupos de tratamiento antes del día 10, la carga tumoral total del ratón el día 24 después de la inoculación se muestra en **Figura 13**. El día 24, se administraron IP 200 µl de luciferina (10 mg/ml), los ratones fueron sacrificados debido a la gran carga de tumor primario en el ciego. Los órganos se recogieron y se enjuagaron en PBS antes de colocarlos en una solución de luciferina diluida (1 mg/ml). Los hígados y otros órganos se analizaron mediante generación de imágenes bioluminiscentes para determinar la carga tumoral de metástasis (**Fig. 6A y 6B**). Después del análisis bioluminiscente, los hígados se enjuagaron en PBS, se fijaron en solución de formalina, se cortaron y se tiñeron con tinción tricrómica para un análisis morfológico adicional (**Fig. 6C**). Está claro a partir de la luciferasa (intensidad bioluminiscente) que con PBS y LCP con pGFP existen grandes cargas tumorales metastásicas en el hígado (**Fig. 6A y 6B**), que posteriormente hacen que la cirrosis y el tejido fibrótico se vuelvan más prominentes (**Fig. 6C**). Por el contrario, los ratones tratados con LCP con pTrap (10 µg de ADNp) tres veces (QOD) mostraron una reducción significativa (reducción de 10 veces en la carga de metástasis en el hígado) y aproximadamente una reducción de 70-80% en la incidencia de formación de metástasis en el hígado. La zona fibrótica detectada a través del análisis microscópico de las secciones de hígado teñidas con tinción tricrómica fue significativamente menor en las muestras de ratones LCP con pGFP que en las muestras de control ($p<0,01$) (**Fig. 6C**). Este es el primer informe hasta donde saben los autores de la presente invención que ha expresado con éxito una proteína terapéutica mediante el suministro de ADNp en un vector no viral específico del hígado, lo que produce eficacia terapéutica. Además, los autores de la presente invención observaron que no solo se reducen la carga y la incidencia de la metástasis, sino que no se encuentra que la metástasis migre e invada otros órganos. (**Fig. 6B**).

Ejemplo 8

55 Las células T específicas del cáncer mejoran la eficacia antimetástasis de la terapia con LCP con pTrap

La disminución de las poblaciones de MDSC y Treg en el hígado después del tratamiento con LCP con pTrap, junto con la presencia de linfocitos CD8+, implican un cambio de un entorno protumoral (inmunosupresor) a uno antitumoral dentro del hígado. Por lo tanto, los autores de la presente invención examinaron la capacidad de los linfocitos T citotóxicos (CTL) para disminuir el establecimiento de metástasis en el hígado después de la terapia con LCP con pTrap. Para investigar la capacidad de LCP con pTrap para mejorar la destrucción de células T CD8 específicas del

cáncer, los autores de la presente invención estudiaron la eficacia anticancerosa de LCP con pTrap en ratones con una población agotada de células T CD8+. Los autores de la presente invención siguieron un protocolo similar al referido por Harimoto et al., en el que ≥95% de la población de células T CD8+ se agotó después de dos inyecciones intraperitoneales de 400 µg de anti-Lyt2.2 (2,43; IgG2b de rata) (14). A los ratones se les inoculó CCR de acuerdo con el modelo singénico ortotópico descrito anteriormente, seguido de agotamiento de células T antes del tratamiento. En esta serie de experimentos, los tratamientos comenzaron 10 días después de la inoculación en el ciego. Los animales se dividieron en tres grupos de tratamiento: sin tratar (PBS), LCP con pTrap con anti-CD8 (Anti-Lyt2.2) y LCP con pTrap con un control de isótipo de anticuerpo (control de isótipo de IgG2b de rata). Para mantener el agotamiento de la población de células T CD8+, se administró una inyección intraperitoneal de Anti-Lyt2.2 o IgG de control de isótipo (400 µg) los días 8 y 10. El tratamiento se inició el día 10 después de la inoculación, con inyección intravenosa en la vena de la cola (10 µg ADNp) los días 10, 12 y 14. Los ratones fueron sacrificados debido a la gran carga tumoral primaria en el ciego el día 21, y la carga tumoral hepática se determinó a través de generación de imágenes bioluminiscentes (Fig. 7). Todos los ratones tratados con PBS desarrollaron grandes lesiones tumorales metastásicas en el hígado (Fig. 7). Los ratones con células T agotadas tratados con anti-Lyt2.2 seguido de tres dosis de LCP con pTrap (10 µg de ADNp) mostraron una carga tumoral hepática similar a la de los ratones no tratados. Por el contrario, los ratones tratados con el anticuerpo IgG2b de control de isótipo seguido de LCP con pTrap mostraron una reducción de 5 veces en la carga de metástasis en el hígado y una disminución de aproximadamente 80% en la incidencia de metástasis en el hígado en comparación con los animales no tratados. Estos resultados muestran que la presencia de CTL junto con la reducción de CXCL12 disminuyen el riesgo de establecer lesiones metastásicas en el hígado.

20 Ejemplo 9

La reducción de la carga metastásica se asocia con una mayor supervivencia en el modelo de metástasis de cáncer de mama en el hígado

Los autores de la presente invención examinaron el efecto de LCP con pTrap sobre la mediana de supervivencia y la carga tumoral hepática en un modelo agresivo de metástasis en el hígado de cáncer de mama en ratón. El modelo de metástasis en el hígado de cáncer de mama consiste en la implantación hemiesplénica de una línea celular 4T1 de cáncer de mama murino altamente metastásico. Estos estudios modelaron el patrón de atención clínica, en donde se reseca el tumor primario y la muerte suele resultar de la carga metastásica. A ratones BALB/c se les inocularon 1,0 x 10⁶ (0,1 ml) de células 4T1 (GFP/Luc) en la mitad del bazo, que se había atado y separado en dos mitades antes de la inoculación del tumor. El hemi-bazo que recibió las células se resecó 10 minutos después de la inoculación para disminuir el crecimiento del tumor primario. En esta serie de experimentos, los tratamientos comenzaron el día de la inoculación debido a la rápida migración de las células al hígado, a menudo en el plazo de los 5 minutos posteriores a la inoculación (15). Los autores de la presente invención estudiaron cuatro grupos de tratamiento para el modelo de metástasis en el hígado de cáncer de mama: sin tratar (PBS), LCP con pGFP con anti-CD8 (10 µg, 0,5 mg/kg de ADNp y 400 µg, 20 mg/kg de anti-Lyt2.2), LCP con pTrap con anti-CD8 (10 µg, 0,5 mg/kg de ADNp y 400 µg, 20 mg/kg de anti-Lyt2.2), y LCP con pTrap con isótipo IgG (10 µg, 0,5 mg/kg de ADNp y 400 µg, 20 mg/kg de Isotipo IgG). Se administraron PBS, LCP con pGFP o LCP con pTrap por vía IV a través de inyecciones en la vena de la cola en días alternos comenzando el día 0 y finalizando el día 6. La administración de anti-Lyt2.2 o control de Isotipo de IgG implicó dos inyecciones IP los días 0 y 2. La progresión del tumor fue verificada mediante generación de imágenes bioluminiscentes (Fig. 8A). Los ratones se sacrificaron cuando se aplicaba una de las siguientes condiciones: aumento o pérdida de peso drástico superior a 10% en una semana o signos claros de angustia, tales como deshidratación, inactividad o dificultad para respirar/respiración débil. Tres ratones de cada grupo fueron sacrificados 10 días después de la inoculación, sus órganos fueron recolectados y enjuagados en PBS, y los hígados fueron analizados para determinar la carga tumoral mediante análisis de citometría de flujo (Fig. 8B). Los ratones que no recibieron tratamiento con LCP con pTrap desarrollaron grandes lesiones tumorales metastásicas en el hígado durante la primera semana después de la inoculación (Fig. 8A y 8B). Por el contrario, los ratones tratados con LCP con pTrap mostraron una reducción en la carga de metástasis en el hígado y una disminución en la incidencia de formación de metástasis en el hígado, así como un aumento de casi el doble en la mediana de supervivencia en comparación con todos los demás grupos de tratamiento (14 frente a 25 días) (Fig. 8C).

Ejemplo 10

50 Reducción del establecimiento de metástasis en el hígado por LCP con pTrap, proteína Trap y antagonista de CXCR4

Los autores de la presente invención compararon la eficacia de diferentes modalidades terapéuticas [proteína trampa anti-CXCL12, antagonista de molécula pequeña CXCR4 (AMD3100) y LCP con pTrap] para reducir el establecimiento de metástasis en el hígado utilizando una línea celular de cáncer colorrectal humano (HT-29) en ratones atípicos inmunodeficientes. El modelo de metástasis de cáncer colorrectal en hígado humano se estableció de acuerdo con el mismo procedimiento de implantación hemiesplénico que el anterior, utilizando la línea celular de cáncer colorrectal HT-29, que tiene una alta expresión de CXCR4 (Fig. 11). En esta serie de experimentos, los tratamientos comenzaron nuevamente el día de la inoculación debido a la rápida migración de las células al hígado en el plazo de los 5 minutos posteriores a la inoculación (15). Los cinco grupos de tratamiento estudiados para el modelo de metástasis de cáncer colorrectal en el hígado fueron sin tratamiento (PBS), LCP con pGFP (10 µg, 0,5 mg/kg de ADNp), LCP con pTrap (10 µg, 0,5 mg/kg de ADNp), proteína trampa contra CXCL12 libre (10 µg, 0,5 mg/kg de proteína) y AMD3100 (100 µg, 5,0

mg/kg). Los tratamientos se administraron IV mediante inyección en la vena de la cola en días alternos, se iniciaron el día 0 y terminaron el día 16 (**Fig. 9A**). Los ratones se sacrificaron el día 36, se recogieron sus hígados y se enjuagaron en PBS, y los nódulos tumorales se resecaron de los hígados y se pesaron (**Fig. 9B**). Los ratones que no recibieron tratamiento con LCP con pTrap o AMD3100 desarrollaron numerosas lesiones tumorales metastásicas en el hígado (**Fig. 9B**). Por el contrario, los ratones tratados con LCP con pTrap o AMD3100 mostraron una reducción en la carga de metástasis en el hígado y una menor incidencia de formación de metástasis en el hígado durante el tratamiento en comparación con todos los demás grupos de tratamiento.

Ejemplo 11

Efectos de LCP con pTrap sobre la función hepática, renal y sanguínea (análisis de toxicidad)

La administración de LCP con pTrap (10 µg QOD x 3) no mostró cambios significativos en los niveles de ALT, AST, creatinina o BUN, así como ningún signo de toxicidad en el análisis de secciones histológicas tricrómicas de ningún órgano 24 h después de la inyección IV final en la vena de la cola (**Fig. 10A y 10B**). Un análisis adicional de los niveles de células inmunitarias/sanguíneas no mostró signos de cambio en comparación con los ratones no tratados (**Fig. 10A**). El análisis toxicológico también se confirmó en secciones de órganos con tinción histológica tricrómica en las que todos los tratamientos mostraron morfología tisular/celular normal (**Fig. 10B**).

Ejemplo 12

Terapia combinada

Materiales y métodos

Se adquirió sal de amonio de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol-2000)] (DSPE-PEG) de NOF (Ebisu Shibuya-ku, Tokio). El ácido dioleoil fosfatídico (DOPA) y la sal cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) se adquirieron de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EE. UU.). El colesterol y la protamina se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Todos los demás productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich si no se menciona específicamente (St. Louis, MO, EE. UU.).

Construcción del gen de la trampa contra CXCL12: Las secuencias codificantes de los dominios VH y VL de unión a CXCL12 se utilizaron para el ensamblaje del gen de la trampa. La secuencia final de la trampa contra CXCL12 codifica un péptido de señalización, un dominio VH, un conector flexible, un dominio VL, una etiqueta E y una etiqueta de His(6x), respectivamente. El ADNc completo se clonó en pCDNA3.1 entre los sitios NheI y Xhol y la precisión se confirmó mediante la secuenciación del ADN.

Construcción del gen de la trampa contra PDL1: Las secuencias codificantes del dominio extracelular de PD-1 humano o de ratón y el dominio de trimerización de CMP1 humano o de ratón se utilizaron para el ensamblaje del gen de la trampa contra PD-L1. La secuencia final de la trampa contra PD-L1 codifica un péptido de señalización, el dominio de unión a PD-L1 de PD-1, un conector flexible, un dominio de trimerización, una etiqueta E y una etiqueta de His(6x), respectivamente. El ADNc completo se clonó en pCDNA3.1 entre los sitios NheI y Xhol y la precisión se confirmó mediante la secuenciación del ADN.

Líneas celulares: La línea celular de tumor primario KPC98027 derivada del modelo de ratón de adenocarcinoma ductal pancreático KPC (LSL-*kras*^{G12D}+/+; LSL-*Trp53*^{R172H}+/+; *Pdx-1-Cre*, sobre fondo C57Bl/6) fue proporcionada por el Dr. Serguei Kozlov (Instituto Nacional del Cáncer, Centro de Investigación Preclínica Avanzada) y cultivada en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco: Mezcla de Nutrientes F-12 (DMEM/F12) con un suplemento de suero bovino fetal (FBS) al 10% (Gibco) y Penicilina/Estreptomicina al 1% a 37°C y CO2 al 5% en atmósfera humidificada. Se realizó la transfección de líneas celulares con lentivirus en las que las células KPC98027 se transfecaron de forma estable con el vector que porta proteína fluorescente roja mCherry (RFP), luciferasa de luciérnaga (Luc) y el gen de resistencia a puromicina. Se seleccionaron células KPC98027 transfecadas estables (KPC98027 RFP/Luc) en presencia de puromicina.

Modelo KPC de aloinjerto ortotópico en ratones: Se recogieron células KPC98027 subconfluentes (con o sin RFP/Luc) y se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) justo antes de la implantación. El modelo KPC de aloinjerto ortotópico se estableció mediante inyección ortotópica de 1×10^6 células en la cola del páncreas. En resumen, se anestesieron ratones C57Bl/6 de ocho semanas de edad mediante inyección IP de solución de ketamina/xilazina y se colocaron en posición supina. Se realizó una incisión en la línea media para exteriorizar el bazo y el páncreas. Utilizando una jeringa con medidor de insulina, se inyectaron 1×10^6 células en 40 µl en la cola del páncreas. Y la pared abdominal y la piel se cerraron con suturas de ácido poliglicólico 6-0. El lugar de la inyección se selló con un adhesivo tisular (3M, St. Paul, MN) y se esterilizó con alcohol del 70% para destruir las células cancerosas que pudieran haberse filtrado.

Anticuerpos: Los anticuerpos primarios, primarios y secundarios conjugados fluorescentes utilizados para inmunotinciones (IF) y citometría de flujo (cit. de flujo) se enumeran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el estudio

Anticuerpos	Compañía	Catálogo	Aplicación
Anti-αSMA	Abcam	Ab5694	IF
Anti-CD31	Abcam	Ab28364	IF
Anti-SDF1 (CXCL12)	Abcam	Ab9797	IF
Anti-PDL1	Abcam	Ab80276	IF
Anti CD8α (conjugado con FITC)	BD	553031	cit. de flujo
Anti CD4 (conjugado con FITC)	BD	561828	cit. de flujo
Anti-FOXP3 (conjugado con PE)	BD	560408	cit. de flujo
Anti-CD11b (conjugado con FITC)	BD	553310	cit. de flujo
Anti-Grl (Ly-6G y Ly-6C) (conjugado con PE)	BD Pharmingen TM	553128	cit. de flujo
Anti-CD206 (conjugado con PE)	BD		cit. de flujo
Anti-CCR7 (conjugado con APC)	BD		cit. de flujo
APC Rata IgG2b, Control de isótipo κ	BD Pharmingen™	553991	cit. de flujo
Anti-IgG de conejo (Conjugado con Alexa Fluor® 647)	Cell Signaling	4414	IF, cit. de flujo
Anti-IgG de conejo de Cabra-HRP	Santa Cruz	Sc-2030	WB
Anti-RFP	Invitrogen	R10367	WB

Preparación y Caracterización de LPD: Se prepararon LPD a través de un proceso de autoensamblaje por etapas basado en protocolos bien establecidos en la técnica. Brevemente, se disolvieron DOTAP y colesterol (1:1, mol/mol)

5 en cloroformo y se eliminó el disolvente. A continuación, la película lipídica se hidrató con agua destilada para obtener la concentración final de 10 mmoles/l de colesterol y DOTAP. Despues, el liposoma se extruyó secuencialmente a través de membranas de policarbonato de 200 nm y 100 nm (Millipore, MA) para formar liposomas unilamelares de 70-100 nm. Los núcleos de poliplex LPD se formularon mezclando 140 μ l de 36 μ g de protamina en glucosa al 5% con un volumen igual de 50 μ g de plásmido (ya sea pcDNA 3.1 como plásmido de control o plásmidos que codifican la trampa contra CXCL12 o PDL1) en glucosa al 5%.

10 La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y a continuación, se añadieron 60 μ l de colesterol/liposomas DOTAP (10 mmoles/l cada uno). La inserción posterior de DSPE-PEG al 15% se realizó adicionalmente a 60°C durante 15 minutos. El tamaño y la carga superficial de las NP se determinaron mediante una serie Malvern ZetaSizer Nano (Westborough, MA). Se adquirieron imágenes TEM en las que las NP se tiñeron negativamente utilizando un TEM JEOL 100 CX II (JEOL, Japón).

15 Biodistribución y distribución celular de NP de LPD: Se incorporó aproximadamente el 0,1% del colorante hidrófobo Dil a los liposomas DOTAP para formular las NP de LPD marcadas con Dil. Veinticuatro horas después de la inyección intravenosa de NP de LPD marcadas con Dil, los ratones se sacrificaron y se recogieron los órganos principales y los tumores. La distribución de las NP de LPD en los órganos principales se visualizó cuantitativamente con IVIS® Kionetics Optical System (Perkin Elmer, CA). La longitud de onda de excitación se fijó en 520 nm, mientras que la longitud de onda de emisión se fijó en 560 nm. Los hígados y los tumores se seccionaron adicionalmente mediante un criostato (H/I Hacker Instruments & Industries, Winnsboro, SC) para cuantificar la distribución de NP de LPD dentro de los tejidos. La acumulación y distribución de NP antes o después del tratamiento con NP de LPD con trampa Combo en los tumores se compararon adicionalmente y se cuantificaron ($n = 4$).

20 Distribución celular transitoria, local e intratumoral de la proteína trampa: Se inyectó la formulación de NP de LPD con ADN de trampa contra pCXCL12, ADN de trampa contra pPD-L1 encapsulados (50 μ g de plásmido/ratón) por vía intravenosa a ratones que portaban aloinjertos de KPC98027 RFP/Luc (inyección diaria, dos veces en total). Tanto el ADN de la trampa contra pCXCL12 como el ADN de la trampa contra PD-L1 contienen una etiqueta de His en el extremo C-terminal, que se puede utilizar como rastreador de la expresión de la proteína trampa. Los días 1, 3, 5 después de la inyección final, se sacrificaron los ratones, se recogieron los órganos principales y los tumores y se homogeneizaron en

tampón RIPA. La concentración de proteína total en el producto lisado se determinó a través de un kit de ensayo de proteína de ácido bicinconílico (BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL). La eficiencia de transfección y expresión de la proteína con etiqueta de His en órganos y tumores de diferentes puntos de tiempo se cuantificaron utilizando ELISA (Cell biolabs, INC., n = 4). La proteína trampa contra CXCL12 también se inyectó directamente por vía intravenosa a los 5 ratones y se comparó con la contraparte del plásmido en biodistribución y nivel de acumulación en los puntos de tiempo controlados. A los ratones que portaban KPC98027 RFP/Luc también se les inyectaron dos dosis diarias de NP de LPD que encapsulaban el ADN de pGFP. Tres días después de la inyección final, los tejidos tumorales se crioseccionaron y 10 se procesaron con tinción del marcador de fibroblastos α SMA, el marcador de leucocitos CD45 y el marcador endotelial CD31. Las células tumorales se transfecaron previamente con RFP. Se observó la expresión de la proteína GFP en diferentes poblaciones celulares dentro de los tejidos tumorales utilizando un microscopio óptico Nikon (Nikon Corp., Tokio). El % de células positivas para GFP en cada población celular se cuantificó utilizando la imagen J de 5 imágenes 15 representativas de cada tipo de tinción. He aquí un ejemplo del cálculo:

$$\% \text{ de células } CD45^+ \text{ GFP}^+ = \frac{\% \text{ de Células } CD45^+ \text{ GFP}^+}{\% \text{ de Células GFP}^+}$$

Inhibición del Crecimiento Tumoral, supresión de metástasis y análisis de supervivencia:

Se establecieron ratones que portaban aloinjertos KPC98027 RFP/Luc como se mencionó anteriormente. Los tratamientos se iniciaron el día 13. A continuación, los ratones se aleatorizaron en 6 grupos (n = 5 ~ 7) de la siguiente manera: grupo sin tratar (PBS), NP de LPD Ctrl (encapsuladas con el esqueleto de pcDNA3.1), NP de trampa contra CXCL12/Ctrl, NP de trampa contra PD-L1/Ctrl, NP de trampa Combo y proteína trampa combo libre. Se realizaron inyecciones intravenosas cada dos días para un total de 4 dosis de 50 μ g por plásmido/ratón. El crecimiento tumoral se controló mediante IVIS® Kinetics Optical System (Perkin Elmer, CA) cada cinco días. Los aumentos de los volúmenes tumorales se calcularon como la radiancia de las intensidades y se normalizaron con el volumen tumoral inicial (Vt/V0). También se controló la supervivencia a largo plazo en ratones portadores de aloinjertos KPC98027 20 RFP/Luc con diferentes tratamientos (n = 7, en cada grupo de tratamiento). Los ratones fueron controlados durante más de dos meses. Las curvas de Kaplan-Meier y la Mediana de Supervivencia se cuantificaron y calcularon utilizando la Image J. Para el estudio de la metástasis, los ratones con tumores se trataron con PBS (n = 5), NP de trampas 25 contra CXCL12 (n = 4), NP de trampa contra PD-L1 (n = 4), y trampas Combo (n = 5). Un mes después de la inoculación, se inyectaron a los ratones 10 mg/ml de luciferina y se sacrificaron. A continuación, se extrajeron los 30 órganos principales y los tumores, se colocaron en una solución de luciferina (5 m/ml) y se obtuvieron imágenes para determinar la bioluminiscencia. A continuación, los órganos principales se fijaron y procesaron con tinción H&E para observar la patología de la metástasis tumoral en cada órgano.

Ensayo ELISpot para la producción de IFN- γ : La reestimulación de células de bazo para ratones portadores de aloinjertos KPC98027 o KPC98027 RFP/Luc se realizó como se describió anteriormente. En resumen, 13 días después de la 35 inoculación del tumor, se recolectaron bazos de ratones sanos, ratones portadores de KPC98027 y KPC98027 RFP/Luc y se separaron en suspensiones de células individuales en condiciones estériles. Siguiendo las instrucciones del ensayo BD™ ELISPOT, las células se sembraron a 2×10^5 por pocillo en una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura. A continuación, las suspensiones de células individuales se co-cultivaron con productos lisados de células KPC98027, KPC98027 RFP/Luc inactivadas o productos lisados de células de bazo de ratones sanos a 37°C durante 40 h. A su debido tiempo, las células se eliminaron mediante varios pasos de lavado. La producción de INF- γ se midió mediante la adición de anticuerpos de detección seguida de la amplificación del producto conjugado enzimático. Las señales de puntos rojos se desarrollaron con un conjunto de sustratos BD ELISpot y se calcularon manualmente.

Ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR): El ARN total se extrajo de los tejidos tumorales utilizando un kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). El ADNc se transcribió de forma inversa utilizando el First-Strand Synthesis System para 45 RT-PCR (Invitrogen, Grand Island, NY). Se amplificaron cien ng de ADNc con el sistema Taqman Universal Probes Supermix (Bio-rad, Hercules, CA). Todos los cebadores específicos de ratón para las reacciones de RT-PCR se enumeran en la Tabla 4 (Life Technologies, Grand Island, NY). Se utilizó GAPDH como control endógeno. Las reacciones se realizaron con el sistema de PCR en tiempo real 7500 y los datos se analizaron con el Soporte Lógico 7500.

Tabla 4

Cebador	Biosistemas aplicados/Referencia
IFN- γ de ratón	Mm01178820_m1
IL12 α de Ratón	Mm00446190_m1
TNF- α de Ratón	Mm00443260_g1
IL4 de Ratón	Mm00441242_m1
IL10 de Ratón	Mm00441242_m1
GAPDH de Ratón	Mm99999915_g1

5 Ensayo de citometría de flujo: Los linfocitos inmunitarios infiltrantes de tumores se analizaron mediante citometría de flujo. En resumen, los tejidos se recogieron y se digirieron con collagenasa A y ADNasa a 37°C durante 40-50 min. Después de la lisis de los glóbulos rojos, las células se dispersaron con 1 ml de PBS. Para la tinción de citocinas intracelulares, se hizo que el tampón de penetración (BD) penetrara en las células de los tejidos siguiendo las instrucciones del fabricante. Diferentes linfocitos inmunitarios (5×10^6 /mL) se tiñeron con los anticuerpos conjugados con fluoresceína mencionados en la sección anterior.

10 10 Tinción de inmunofluorescencia: Después de la etapa de desparafinización, recuperación del antígeno y permeabilización, las secciones de tejido se bloquearon en albúmina de suero bovino (BSA) al 1% a temperatura ambiente durante 1 h. Los anticuerpos primarios conjugados con fluoróforos (BD, Franklin Lakes, NJ) se incubaron durante la noche a 4°C y los núcleos se contratiñeron con medio de montaje que contenía DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Todos los anticuerpos se diluyeron de acuerdo con el manual del fabricante. Las imágenes se tomaron mediante microscopía de fluorescencia (Nikon, Tokio, Japón). Se analizaron cuantitativamente tres campos microscópicos seleccionados al azar utilizando el soporte lógico Image J.

15 15 Ensayo TUNEL: Los ensayos TUNEL se llevaron a cabo utilizando un DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los núcleos celulares que se tiñeron con fluorescencia con FITC (verde) se definieron como núcleos positivos para TUNEL. Los portaobjetos se cubrieron con 4,6-diaminidino-2-fenil-indol (DAPI) Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los núcleos positivos para TUNEL se controlaron mediante microscopía de fluorescencia (Nikon, Tokio, Japón). Tres campos microscópicos seleccionados al azar se analizaron cuantitativamente utilizando Image J.

20 20 Evaluación de morfología H&E y análisis de química sanguínea: Cuatro días después del tratamiento final del estudio de inhibición tumoral, todos los ratones con diferentes tratamientos se sometieron a un ensayo de toxicidad. Se recogieron tanto sangre completa como suero. Se contaron y compararon los componentes celulares de la sangre completa. La creatinina, el nitrógeno ureico en sangre (BUN), la aspartato aminotransferasa sérica (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) en el suero se analizaron como indicadores de la función renal y hepática. Los órganos, incluidos el corazón, el hígado, el bazo, los pulmones y los riñones, se recogieron y se fijaron para la tinción con H&E en el centro de histología de la UNC para evaluar la toxicidad específica del órgano.

25 30 Análisis estadístico: Se realizó una prueba t de Student de dos colas o un análisis de varianza de una vía (ANOVA) al comparar dos grupos o más de dos grupos, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el Soporte lógico Prism 5.0. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas si el valor de p era inferior a 0,05.

Distribución y expresión transitoria y local de ADNp (trampa o GFP) dentro del microentorno tumoral después de la administración de LPD con ADNp

35 35 La LPD suministra preferentemente macromoléculas, incluido ADN plasmídico, ARNip y ARNm, a los tumores para la terapia contra el cáncer. Para preparar LPD, se condensó ADN plasmídico (ADNp) con protamina catiónica para formar un núcleo complejo ligeramente aniónico. El núcleo se recubrió adicionalmente con los liposomas catiónicos preformulados (DOTAP, colesterol y DSPE-PEG). Las imágenes TEM confirmaron el tamaño de LPD (~70 nm) e indican su forma esférica y distribución homogénea (**Fig. 14A**). Se incorporó aproximadamente 0,1% de Dil a la membrana lipídica de LPD como un rastreador *in vivo* para evaluar la biodistribución de LPD marcada con Dil.

40 40 El modelo de tumor pancreático KPC desmoplásico se generó a partir de la inyección ortotópica de las células KPC98027 primarias en la cola del páncreas. Las NP de LPD marcadas con Dil se inyectaron por vía intravenosa a ratones. Veinticuatro horas después de la inyección, se analizó la acumulación de NP en los órganos principales. De acuerdo con otras NP de tamaño similar, el hígado fue el principal órgano que absorbió NP de LPD (**Fig. 14B**). Además del hígado, el tumor es otro sitio importante de acumulación de NP (**Fig. 14B**). Los datos de criosección de tejido sugieren la distribución dispersa de NP marcada con Dil en todos los tejidos hepáticos, con más de 40% de las células hepáticas marcadas (**Fig. 14C**). Por el contrario, solo menos de 25% de las células tumorales absorbieron las NP Dil, y la distribución de las NP dentro de los tumores fue heterogénea y desigual, principalmente debido a la alta presión fluídica intersticial (IFP) y la gruesa matriz extracelular dentro del microentorno del tumor pancreático. La distribución de la proteína GFP en el hígado y el tumor se comparó adicionalmente como una indicación de la eficiencia de transfección del plásmido suministrado con LPD (pGFP). A pesar de la mayor acumulación de NP en el hígado, la expresión de GFP es extremadamente baja en comparación con los tumores (**Fig. 14C**). Esto se puede atribuir a que las células de Kupffer, que se localizaron en la vecindad de los vasos sanguíneos, fagocitaron de forma no específica las NP de LPD. La eficiencia de transfección del plásmido en células de Kupffer es relativamente baja. Por lo tanto, los resultados de los autores de la presente invención demuestran que el plásmido que encapsula LPD se puede administrar y expresar localmente dentro del cáncer de páncreas KPC.

50 55 Se realizó una tinción de inmunofluorescencia para determinar la acumulación de LPD en varias poblaciones celulares dentro de la masa tumoral en bloque (**Fig. 14D**). La expresión transgénica estable de RFP y anticuerpo conjugado con fluoróforo contra α SMA, CD45 y CD31 de ratón, definió poblaciones de células tumorales, fibroblastos, leucocitos y células endoteliales, respectivamente. Los resultados muestran que las células tumorales son una de las principales

poblaciones celulares que captan NP; más de 60% de las células tumorales expresaron GFP. Además, más de ~30% de los fibroblastos absorben LPD cuatro días después de la inyección intravenosa de LPD con pGFP (dos dosis diarias), lo que representa ~30% del total de células positivas para GFP. Por el contrario, la expresión de GFP en leucocitos y célula endoteliales es insignificante, lo que confirma que los fibroblastos son los principales sitios inespecíficos del estroma para la distribución de NP y la expresión de plásmidos. Debido a la distribución adyacente a las células tumorales de los fibroblastos, la expresión de la trampa secretada por los fibroblastos beneficiaría a las células tumorales por su efecto de vecindad en lugar de un sitio inespecífico que disminuye la concentración terapéutica de los fármacos que se acercan a las células tumorales.

Posteriormente, la distribución y expresión de la proteína trampa (ya sea PDL1 o CXCL12) se evaluó a través de ELISA por medio de la etiqueta de His direccionable incorporada al extremo C-terminal de la trampa (**Fig. 14E**). También se inyectó y comparó la proteína trampa pura (trampa contra CXCL12). Después de dos dosis diarias de la NP con plásmido trampa y proteína trampa, los ratones se sacrificaron los días 2, 4 y 6 y se demostró la transfección transitoria del plásmido y la expresión en el tumor (**Fig. 14E**) en lugar de otros órganos. Por el contrario, la trampa de proteína se aclaró rápidamente, con una concentración significativamente más baja en todos los órganos en el tiempo verificado.

Estos resultados demuestran que el vector LPD permite la expresión transitoria preferencial del plásmido trampa dentro de los tumores, en particular, fibroblastos y células tumorales, con una expresión mínima en cualquier otro órgano. Los autores de la presente invención informan de que la expresión en el tumor mantiene propiedades transitorias en las que se encuentra que la expresión dura hasta 4 días después de la inyección del plásmido trampa (**Fig. 14E**).

20 La terapia combinada con NP de LPD que encapsula el ADN de la trampa contra pCXCL12 y NP de LPD que encapsula el ADN de la trampa contra pPD-L1 mejoró la respuesta antitumoral contra aloinjertos de KPC y suprimió la metástasis

Estudio previo de Feig et al. sugirió que la inhibición de la interacción de CXCL12 con CXCR4 descubre la actividad antitumoral de anti PD-L1 (Feig et al., Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer, PNAS, 10 de diciembre de 2013; 110 (50): 20212-7). Debido a la característica de expresión local y transitoria del plásmido suministrado por el vector de LPD, los plásmidos que codificaban la trampa contra PD-L1 y la trampa contra CXCL12 se encapsularon en el vector de LPD, por separado, y se administraron como regímenes combinados para el tratamiento del cáncer de páncreas KPC. Se inoculó ortotópicamente KPC98027 RFP/Luc en la cola del páncreas. El programa de dosificación de NP de LPD se presenta en **Figura 15A**. Se establecieron como controles PBS, NP de LPD que encapsulan el esqueleto de pcDNA3.1 (NP Ctrl), proteínas trampa combo libres. Se evaluó, **A**) y se cuantificó, **B**) el volumen de tumor correlacionado con el número de fotones emitidos por el tumor. Los resultados demostraron que la monoterapia con las NP de trampa contra CXCL12 como con las NP de trampa contra PDL1 mostró una eficacia antitumoral mínima a dosis bajas (**Fig. 15D**). La eficacia antitumoral de la monoterapia aumentó ligeramente pero solo fue efectiva parcialmente al aumentar la dosis (**Fig. 15E**). Por el contrario, el grupo de NP con trampa combo inhibió significativamente el crecimiento tumoral ($P < 0,01$) en comparación con el grupo de PBS. El peso del tumor del grupo de combo disminuyó drásticamente tanto a dosis bajas como altas (**Fig. 15E**). Mientras tanto, la proteína trampa combo libre solo mostró un efecto anticanceroso leve pero no significativo, lo que sugiere las ventajas de utilizar plásmido en lugar de proteína (**Fig. 15A y 15B**). Adicionalmente, en un análisis de supervivencia general después del último día de tratamiento, la mediana de supervivencia mejoró en la terapia de NP con trampa combo (63,5 días) en comparación con otros grupos de tratamiento (40,5, 49, 47, 50 días para los grupos con PBS, NP Ctrl, NP de trampa contra CXCL12 y NP de trampa contra PDL1, respectivamente; **Fig. 15C**), transmitiendo no solo un potente efecto terapéutico sino también una respuesta general duradera. Esto es compatible con la observación de Feig et al. que habían utilizado una combinación de un antagonista de CXCR4 y un anticuerpo anti-PD-L1 para inhibir el crecimiento del tumor KPC (Feig et al., Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer, PNAS, 10 de diciembre de 2013; 110 (50): 20212-7). Los datos de la **Fig. 15** sugirieron que las NP de trampa contra CXCL12 combinadas con NP de trampa contra PD-L1 de hecho exhibieron una eficacia antitumoral superior en el modelo de ratón con tumor KPC desmoplásico.

Adicionalmente, se controló la metástasis de tumores en órganos principales un mes después de la inoculación de aloinjertos de KPC. De acuerdo con los pacientes que tienen adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), el hígado y el pulmón son los principales sitios de metástasis para los modelos KPC ortotópicos (**Fig. 16A**). También se observaron tumores en bazo y riñón debido a la invasión dentro de la cavidad peritoneal. La histología muestra grandes nódulos de metástasis en el pulmón, el bazo y el hígado del grupo de control (**Fig. 16B**). La monoterapia puede suprimir levemente la metástasis tumoral, solo la terapia combo pudo inhibir significativamente o incluso anular la metástasis. (**Fig. 16A y 16B**). Por lo tanto, era evidente que la estrategia de NP de trampa combo era capaz de reducir la metástasis tumoral.

La infiltración mejorada de células T al microentorno tumoral explica el efecto antitumoral superior de las NP de trampa combo

La respuesta de las células T específicas de las células cancerosas fue referida anteriormente en el modelo KPC y se confirmó adicionalmente en el presente documento mediante el Ensayo ELISpot (**Fig. 17A**). La **Fig. 17A** muestra los

datos del ensayo ELISpot de INF- γ utilizando esplenocitos de animales portadores de tumores. El extracto de células KPC, con o sin los marcadores RFP/Luc transfectados, podría estimular la secreción de IFN- γ por los esplenocitos, pero no así los extractos de esplenocitos normales. Los datos indican que el tumor KPC podría inducir una respuesta de células T específica del tumor. La respuesta inmunitaria observada en los ratones portadores de tumores no estaba dirigida a la luciferasa o a los marcadores de fluorescencia roja, sino a los antígenos asociados a tumores aún por identificar. Sin embargo, la ausencia de un aumento significativo en las células T CD8+ secretoras de IFN- γ de los bazos de ratones tratados con NP de trampa contra PD-L1 y NP de trampa contra CXCL12 (ya sea con monoterapia o con terapia combo) indica que el efecto antitumoral de las NP de trampa combo no se logró mediante el cebado sistémico mejorado de las células T CD8+ específicas del cáncer (**Fig. 17B**). Dado que las actividades de ELISpot eran relativamente débiles (**Fig. 17A** y **17B**), una vacuna que pudiera potenciar la actividad de los linfocitos T citotóxicos específicos del cáncer mejoraría aún más la actividad terapéutica de las trampas.

Para determinar si el efecto inmunoterapéutico fue causado por una mayor acumulación de células T entre las células cancerosas, la distribución de las células T (CD3+) en el páncreas se demostró mediante inmunofluorescencia (**Fig. 18A**). Se demostró que las células T estaban ubicadas principalmente en el límite entre el tumor y el tejido pancreático normal en el control de PBS. Se encontraron pequeñas cantidades de células T en la región del tumor, pero estaban ubicadas en el área del estroma. El páncreas de los animales tratados con la trampa contra PD-L1 mostró cierta penetración de células T en la región del tumor, pero los tratados con NP de trampa contra CXCL12 (con o sin la NP de trampa contra PD-L1) mostraron una extensa infiltración de células T en la región del tumor. La localización de las células T en la región del tumor se cuantifica en la **Figura 18B**. Los tumores se recogieron adicionalmente y se dispersaron en células individuales. Las células CD3+CD8+ se analizaron con citometría de flujo (**Fig. 18C**). Los resultados, nuevamente, confirmaron que las células T CD8+ aumentaron significativamente en los tumores de los ratones tratados con NP de trampa combo. Por lo tanto, los autores de la presente invención concluyeron que la trampa contra CXCL12, en lugar de la trampa contra PD-L1, fue el factor principal que mejoró la infiltración de células T. Adicionalmente, se evaluó el papel de las células T CD8+ en la terapia con NP de trampa combo mediante el agotamiento de células T CD8+ utilizando anticuerpos monoclonales contra CD8 (**Fig. 18D** y **18E**). Se demostró que las NP de trampa combo ralentizaban significativamente el crecimiento tumoral, pero no cuando se eliminaban las células T CD8. Colectivamente, la infiltración mejorada de células T en el microentorno tumoral es una de las principales razones que dan como resultado el efecto antitumoral superior de las NP de trampa combo.

Cambios en las células inmunitarias infiltrantes de tumores y niveles de citocinas en el microentorno tumoral

Para dilucidar adicionalmente por qué la estrategia con NP de trampa combo podría mejorar de manera eficiente la infiltración y acumulación de células T alrededor de las células tumorales, los autores de la presente invención evaluaron a continuación los cambios de los distintos subconjuntos mieloides relacionados y las citocinas en el microentorno tumoral después de diferentes tratamientos con NP de trampa, que participan en una complicada red de interacción para enmascarar la actividad antitumoral de las células T CD8+.

Dado que los subconjuntos inmunosupresores, tales como las células T reguladoras (Treg), las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y los macrófagos asociados a tumores (TAM) son los productos infiltrados mieloides dominantes dentro de los modelos PDAC desmoplásicos, los autores de la presente invención examinaron la acumulación de estas células inmunosupresoras dentro de los microentornos tumorales tanto por citometría de flujo como por inmunotinción de secciones tumorales. Las MDSC se verificaron como el primer subconjunto regulador. Como se muestra en **Figura 19A** y **19B**, los porcentajes de MDSC en el grupo de trampa sola (ya sea trampa contra CXCL12 o trampa contra PDL1) y el grupo combinado fueron mucho más bajos que los de los grupos de control. Dado que las MDSC pueden establecer tolerancia inmunológica mediante la inducción del desarrollo de Treg, el bloqueo de MDSC puede conducir a la inhibición de Treg. Por lo tanto, los autores de la presente invención detectaron el porcentaje de Treg en los tejidos tumorales, como se muestra en **Figura 19A** y **19B**. De acuerdo con las tendencias de MDSC, el grupo tratado con NP de trampa contra CXCL12 y el grupo combinado exhibieron menos células Treg que los grupos de control. Sin embargo, las NP de trampa contra PD-L1 aumentaron ligeramente la infiltración de células T, lo que también fue observado por Feig. et al utilizando el inhibidor del punto de control PD-L1 (Feig et al., Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer, PNAS, 10 de diciembre de 2013; 110 (50): 20212-7). Lo más probable es que esto se deba al hecho de que la interacción PD-L1/PD1 regula negativamente la proliferación y activación de Treg al controlar la fosforilación de STAT-5. El macrófago es otro componente importante del microentorno inmunitario tumoral supresor. Como se muestra en **Figura 19A**, tanto la monoterapia con PD-L1 como la terapia combo pueden disminuir significativamente los macrófagos acumulados y convertirlos de manera eficiente en macrófagos favorables al estado M1 (**Fig. 19B**). Por lo tanto, hubo una remodelación significativa del TME supresor por las trampas a favor de la terapia.

Para correlacionar la observación de subconjuntos inmunosupresores con el nivel de CXCL12 y PD-L1, a continuación, los autores de la presente invención probaron la eficiencia neutralizante de las NP con trampa suministradas por vía intravenosa (**Fig. 20A** y **20B**). Se demostró que las NP con trampa contra CXCL12, pero no las NP con trampa contra PD-L1, pueden neutralizar de manera eficiente la CXCL12 secretada intratumoralmente, lo que conduce a una disminución sustancial de la proteína detectada por un anticuerpo primario anti-CXCL12 y, posteriormente, inhibe la infiltración de MDSC y Treg a través de la interacción mediada por CXCL12/CXCR4. Mientras que el nivel general de PD-L1 no solo disminuyó al aplicar NP de trampa contra PD-L1, sino que también se vio afectado parcialmente por el tratamiento con trampa contra CXCL12. Esto probablemente se deba al hecho de que las células mieloides pueden

inducir la expresión de PD-L1 en células tumorales de una manera dependiente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)/proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Por lo tanto, el reclutamiento reducido de células mieloídes por CXCL12 disminuyó el nivel de PD-L1. El agotamiento eficiente de las células MDSC y Treg facilita posteriormente la infiltración de células T efectoras dentro del microentorno tumoral, lo que explica la eficacia antitumoral superior.

A continuación, los autores de la presente invención verificaron los niveles de citocinas en el tejido tumoral local para ver si el grupo de combo podía o no revertir el microentorno supresor como lo muestran los niveles de citocinas (**Fig. 21**). IL-4 e IL-10 se conocen como citocinas Th-2 que son críticas para la inmunosupresión para promover la metástasis del cáncer. Por su parte, IFN-γ, IL-12α y TNF-α (consideradas como citocinas Th-1) son las citocinas secretadas por las células T citotóxicas que facilitan la destrucción y lucha de las células T contra la progresión tumoral. En el grupo de monoterapia con NP de trampa contra CXCL12, aunque IL-12α e IFN-γ aumentaron e IL-4 disminuyó sustancialmente, IL-10 siguió aumentando, lo que sugiere un microentorno ligeramente supresor. De manera similar, en el grupo con NP de trampa contra PD-L1, a pesar del aumento del nivel de las citocinas Th1 en general, las citocinas supresoras permanecen constantemente altas. Sin embargo, en el grupo combinado, tanto IL-4 como IL-10 se redujeron significativamente. Mientras tanto, IL-12α, TNF-α e IFN-γ aumentaron drásticamente, lo que indica un cambio de fenotipo M2 a M1 a un microentorno inmunoestimulante. En consecuencia, esto activaría el reclutamiento de linfocitos para que actúen como depuradores, facilitaría la presentación del antígeno tumoral y daría como resultado una destrucción específica del tumor intensificada mediada por células T citotóxicas.

Cambios en los vasos tumorales y los fibroblastos asociados a tumores

Los fibroblastos asociados a tumores (TAF) y la angiogénesis impiden la infiltración de linfocitos T citotóxicos en el tejido tumoral. El efecto de las NP con trampa sobre los TAF se investigó mediante la tinción de α-actina de músculo liso (αSMA), un marcador de TAF, y CD31, un marcador de la vasculatura. La densidad y la fluorescencia media se detectaron mediante microscopía de fluorescencia. Se seleccionaron al azar cinco campos microscópicos para el análisis. Como se muestra en **Figura 22A**, la densidad de CD31 en los grupos mono y combo fue menor que la del grupo de control. El grupo de combo, en particular, demuestra una normalización sustancial de los vasos sanguíneos (**Fig. 22B**). El vaso sanguíneo se descomprimió significativamente y, posteriormente, aumentó la perfusión de NP y se extendió la distribución después de múltiples tratamientos con la trampa combo (**Fig. 23**). El vaso sanguíneo normalizado es el resultado de la liberación de IFP, que se debe principalmente a la disminución del estroma y la densidad celular.

Por lo tanto, a continuación, los autores de la presente invención evaluaron la densidad de fibroblastos. Se demostró que el grupo de NP con trampa combo exhibió la densidad más baja de αSMA. Curiosamente, los autores de la presente invención descubrieron que solo la trampa contra CXCL12, pero no la trampa PD-L1, da como resultado la disminución de αSMA tanto en la monoterapia como en la terapia combo (**Fig. 22A y 22B**). Consecuentemente, los autores de la presente invención observaron que el colágeno, una de las principales matrices extracelulares secretadas por los fibroblastos, se redujo drásticamente tanto en el grupo tratado con NP de trampa contra CXCL12 como con NP de trampa combo (**Fig. 24**). Por lo tanto, los autores de la presente invención concluyeron que las NP de la trampa contra CXCL12 no solo aumentaron la infiltración de células T, descubrieron la eficacia antitumoral de la trampa contra PD-L1 al ajustar el microentorno inmunológico supresor, sino también agotaron el contenido de fibroblastos y colágeno. Dado que los fibroblastos se consideran la principal fuente de CXCL12 en el microentorno tumoral de KPC, un bucle autocrino mediado por CXCR4 puede explicar la disminución de fibroblastos y la remodelación del estroma.

Evaluación de la toxicidad para los diferentes tratamientos y análisis de química sanguínea

Los resultados de la evaluación de patología toxicológica demostraron que no hubo cambios morfológicos notables en el corazón, el hígado, el bazo, los pulmones y los riñones para las NP en monoterapia y de trampa combo (**Fig. 25**). Sin embargo, se detectaron vacuolización celular, células degenerativas descamadas y necrosis focal en tejidos hepáticos y renales de ratones en los grupos con PBS y NP Ctrl, lo que sugiere daños hepáticos y renales graves, que muy probablemente se debieron a la carga tumoral. Consecuentemente, el análisis del valor bioquímico del suero demostró toxicidad hepática (AST y ALT) o renal (creatinina y BUN) causada por la progresión del tumor en estos dos grupos, pero no en los ratones tratados con NP de trampa combo (**Tabla 6**). Además, los recuentos de células sanguíneas completas (**Tabla 5**) permanecen constantes dentro de los intervalos normales para todos los grupos, lo que sugiere que no se produce anemia o inflamación sistémica después de los tratamientos.

Tabla 5. Recuentos completos de células de ratones tratados con diferentes grupos

Núm. Muestra	GB	LINF	GRAN	MONO	HCT	GR	HGB	PLAC
Sano	5,8±0,1	3,8±0,6	1,1±0,3	0,8±0,3	46,2±3,1	9,8±1,0	14,9±1,3	1036,0±92,7
PBS	5,5±0,7	3,7±0,4	1,3±0,2	0,6±0,1	42,7±0,8	9,5±0,2	14,0±0,4	1159,5±34,7
Trampa de proteínas	6,3±0,2	4,0±0,6	1,6±0,4	0,7±0,1	46,8±0,3	10,2±0,1	14,9±0,3	1220,5±46,7

Núm. Muestra	GB	LINF	GRAN	MONO	HCT	GR	HGB	PLAC
NP de Trampa combo	5,8±1,2	3,1±0,7	2,1±0,3	0,6±0,2	41,7±0,7	9,2±0,2	13,6±0,3	1182,3±25,8
NP Ctrl	5,8±1,2	1,4±0,2	1,8±0,9	0,6±0,3	38,1±1,9	8,6±0,3	12,5±0,6	951,0±13,1

* Los números en negrita indican que el valor está por encima del intervalo normal

Tabla 6. Análisis del valor bioquímico en suero

Núm. Muestra	BUN mg/dl	Creatinina mg/dL	AST U/L	ALT U/L
Salud	22,0±2,5	0,2±0,0	186,7±30,2	24,7±10,6
PBS	24,0±4,8	0,4±0,1	360,0±58,8	68,0±3,6
Trampa de proteínas	33,0±2,5	0,2±0,0	134,0±8,2	21,0±8,9
NP de trampa combo	26,0±2,5	0,2±0,0	173,3±23,1	28,0±8,6
NP Ctrl	30,0±0,2	0,4±0,0	406,0±124,1	74,0±4,8

* Los números en negrita indican que el valor está por encima del intervalo normal

5 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de conocimiento práctico de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

Lista de secuencias

<110> The University of North Carolina at Chapel Hill

Huang, Leaf

Goodwin, Tyler

Liu, Rihe

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA REDUCCIÓN DE METÁSTASIS

<130> 035052/482902

<150> 62/232,169

<151> 24-09-2015

<160> 66

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Trampa contra CXCL12-hSDA-1

<400> 1

ES 2 907 486 T3

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Lys
35 40 45

Val Ser Ala Lys Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Arg Arg Arg Arg Thr Ala Asn Phe Arg Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro
145 150 155 160

Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His His His His His
165 170 175

5 <210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Dominio VH de Trampa contra CXCL12-hSDA-1

<400> 2

ES 2 907 486 T3

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Lys Val Ser Ala Lys
20 25 30

Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Arg Arg Arg Arg Thr Ala Asn Phe Arg Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H1 de Trampa contra CXCL12-hSDA-1

10

<400> 3

Gly Val Lys Val Ser Ala Lys Asn Met Ala
1 5 10

15 <210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> CDR-H2 de Trampa contra CXCL12-hSDA-1

<400> 4

Ser Ile Asn Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> CDR-H3 de Trampa contra CXCL12-hSDA-1

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Thr Ala Asn Phe Arg Tyr
1 5 10

ES 2 907 486 T3

<210> 6
<211> 176
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Trampa contra CXCL12-hSDA-2

10 <400> 6
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys
35 40 45

Ile Asn Asn Lys Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Gln Lys Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Ala Arg Thr Ala Asp Lys Leu Gly
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr
145 150 155 160

Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His His His His His
165 170 175

<210> 7
15 <211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Dominio VH de Trampa contra CXCL12-hSDA-2

<400> 7

ES 2 907 486 T3

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Asn Asn Lys
20 25 30

Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Gln Lys Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Ala Arg Thr Ala Asp Lys Leu Gly Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR1-H1 de Trampa contra CXCL12-hSDA-2

<400> 8
Gly Phe Lys Ile Asn Asn Lys Val Met Ala
1 5 10

15 <210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CDR1-H2 de Trampa contra CXCL12-hSDA-2

<400> 9
Thr Ile Gln Lys Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

25 Gly
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR3-H3 de Trampa contra CXCL12-hSDA-2

<400> 10
Glu Ser Ala Arg Thr Ala Asp Lys Leu Gly Tyr
35 1 5 10

<210> 11

ES 2 907 486 T3

<211> 177
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Trampa contra CXCL12-hSDA-3

<400> 11
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Gly Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Ser
35 40 45

Phe Thr Thr Lys Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Lys Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Leu Thr Gln Arg His Gly His Ala Lys Leu
115 120 125

Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro
145 150 155 160

Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His His His His
165 170 175

10 His

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio VH de Trampa contra CXCL12-hSDA-3

20 <400> 12
Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Ser Phe Thr Thr Lys
20 25 30

ES 2 907 486 T3

Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Lys Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Leu Thr Gln Arg His Gly His Ala Lys Leu Lys Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H1 de Trampa contra CXCL12-hSDA-3

10

<400> 13

Gly Asp Ser Phe Thr Thr Lys Asn Met Ala
1 5 10

<210> 14

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> CDR-H2 de Trampa contra CXCL12-hSDA-3

<400> 14

Ala Ile Ser Lys Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> CDR-H3 de Trampa contra CXCL12-hSDA-3

<400> 15

Leu Thr Gln Arg His Gly His Ala Lys Leu Lys Tyr
1 5 10

35 <210> 16

<211> 288

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

ES 2 907 486 T3

<400> 16

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15Tyr Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
35 40 45Leu Thr Val Tyr Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60Leu Glu Trp Val Gly Ala Leu Trp Gly Ser Gly Gly Thr Glu Tyr Asn
65 70 75 80Ser Asn Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln Gly Leu Asn Tyr Gly Ser Leu Phe Asp
115 120 125Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
145 150 155 160Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
165 170 175Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Tyr Ser Leu Ser Trp Tyr Gln
180 185 190
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Val Lys
195 200 205Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
210 215 220Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
225 230 235 240Tyr Tyr Cys Lys Gln Tyr Trp Asn Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
245 250 255Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr
260 265 270Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His His His His His
275 280 285

<210> 17

ES 2 907 486 T3

<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Dominio VH de Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Val Tyr
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ala Leu Trp Gly Ser Gly Gly Thr Glu Tyr Asn Ser Asn Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gln Gly Leu Asn Tyr Gly Ser Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio VL de Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

20 <400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Tyr Ser
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Ala Val Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln Tyr Trp Asn Thr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 19

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR-H1 de Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

10

<400> 19

Gly Phe Ser Leu Thr Val Tyr Ser Val His
 1 5 10

<210> 20

<211> 16

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> CDR-H2 de Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

<400> 20

Ala Leu Trp Gly Ser Gly Gly Thr Glu Tyr Asn Ser Asn Leu Lys Ser
 1 5 10 15

25 <210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> CDR-H3 de Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

<400> 21

Asp Gln Gly Leu Asn Tyr Gly Ser Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

35

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> CDR-L1 de Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

<400> 22
 Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Tyr Ser Leu Ser
 5 1 5 10

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR-L2 de Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

15 <400> 23
 Asn Ala Val Lys Leu Glu Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR-L3 de Trampa contra CXCL12-VH/VL-4

25 <400> 24
 Lys Gln Tyr Trp Asn Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 25
 30 <211> 690
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Trampa contra PD-L1

<400> 25
 atgaaatggg tcacctttat cagcctgctg ttccctgttca gcagcgccta cagcggatcc 60
 ggtccgccta ccttagtcc ggcactgctg gttgttaccc aaggtgataa tgcaaccttt 120
 acatgcagct ttagcaatac cagcggaaagc tttgttctga attggtatcg tatgagcccg 180
 agcaatcaga ccgataaaact ggcagcattt ccggaaagatc gtagccagcc tggtcaggat 240
 agccgttttc gtgttaccca gctgccaat ggtcgtgatt ttcatatgag cgttgttcgt 300
 gcacgtcgta atgatagcgg cacatatctg tgtggtgcaa tttagcctggc accgaaagca 360
 cagattaaag aaagcctgcg tgcagaactg cgtgtgaccc aacgtcgtgc agaaggcccg 420
 caaccgcaac cgaaaccgca gccgaaaccg gaaccggaac cgcaaccgca aggcggttct 480
 gaggaagacc cctgtgcctg tgagtccata ctgaaatttg aggccaaggt ggagggtctg 540
 ctgcaggccc tgaccagggaa gctggaagct gtgagcgggc ggctggctgt cctggagaac 600
 agaatcatcg cggccgctgg cgccccctgtg ccttattcctg atccccctgga acctagaggc 660
 ggcagccacc accaccatca ccactgtatga 690

40 <210> 26
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 907 486 T3

<220>

<223> Trampa contra PD-L1

5 <400> 26
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser Gly Ser Gly Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val
 20 25 30

Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser
 35 40 45

Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr
 50 55 60

Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp
 65 70 75 80

Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met
 85 90 95

Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly
 100 105 110

Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala
 115 120 125

Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Gly Pro Gln Pro Gln Pro
 130 135 140

Lys Pro Gln Pro Lys Pro Glu Pro Gln Pro Gln Gly Ser
 145 150 155 160

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Leu Lys Phe Glu Ala Lys
 165 170 175

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
 180 185 190

Gly Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Ile Ala Ala Gly Ala
 195 200 205

Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Gly Ser His His
 210 215 220

His His His His
 225

10 <210> 27
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 27

ES 2 907 486 T3

Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn
 1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu
 20 25 30

Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala
 35 40 45

Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val
 50 55 60
 Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala
 65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala
 85 90 95

Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr
 100 105 110

Glu Arg Arg Ala Glu
 115

5 <210> 28
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

10 Ala Glu
 130

<210> 29

ES 2 907 486 T3

<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 29
Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro
35 40 45

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln
50 55 60

Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg
65 70 75 80

Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr
85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
115 120 125

Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln
130 135 140

<210> 30

<211> 117

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn
1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu
20 25 30

Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala
35 40 45

Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile
50 55 60

ES 2 907 486 T3

Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr
65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His
85 90 95

Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr
100 105 110

Glu Arg Ile Leu Glu
115

<210> 31

<211> 147

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu Thr
1 5 10 15

Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu Asn Trp Asn
35 40 45

Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn
50 55 60

Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His Pro Lys Ala
100 105 110

Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile
115 120 125

Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys Pro Glu Gly
130 135 140

Arg Phe Gln
145

10

<210> 32

<211> 143

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 32

ES 2 907 486 T3

Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala
 1 5 10 15

Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu
 20 25 30

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro
 35 40 45

Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln
 50 55 60

Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His
 65 70 75 80

Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile
 85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu
 100 105 110

Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser
 115 120 125

Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln
 130 135 140

<210> 33

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 33

Pro Leu Thr Phe Ser Pro Thr Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn
 1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Lys Leu
 20 25 30

Asn Trp Tyr Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala
 35 40 45
 Phe Cys Asn Gly Tyr Ser Gln Pro Val Arg Asp Ala Arg Phe Gln Ile
 50 55 60

Val Gln Leu Pro Asn Gly His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Ala
 65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Pro
 85 90 95

Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr
 100 105 110

10 Glu Arg Ile Leu Glu
 115

<210> 34

ES 2 907 486 T3

<211> 143

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

5 <400> 34

Leu Glu Val Leu Asn Lys Pro Trp Arg Pro Leu Thr Phe Ser Pro Thr
1 5 10 15

Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Lys Leu Asn Trp Tyr Arg Leu Ser Pro
35 40 45

Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn Gly Tyr Ser Gln
50 55 60

Pro Val Arg Asp Ala Arg Phe Gln Ile Val Gln Leu Pro Asn Gly His
65 70 75 80

Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile
85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Pro Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
100 105 110

Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Pro
115 120 125

Thr Arg Tyr Pro Arg Pro Ser Pro Lys Pro Glu Gly Gln Phe Gln
130 135 140

<210> 35

<211> 220

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

ES 2 907 486 T3

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg
210 215 220

<210> 36

<211> 200

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

ES 2 907 486 T3

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro
195 200

<210> 37
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37

ES 2 907 486 T3

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg
145 150 155 160

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg
210 215

<210> 38

<211> 200

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

ES 2 907 486 T3

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
20 25 30

Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu
100 105 110

Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp
165 170 175

Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser
180 185 190

Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg
195 200

<210> 39
<211> 219
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 39
Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser

ES 2 907 486 T3

1

5

10

15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Gln Lys Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Lys Glu Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Glu Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Ser Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Phe Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Val
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Met Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Met Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Ser Leu Ser Gly Glu Thr
145 150 155 160

Thr Val Thr Thr Ser Gln Thr Glu Glu Lys Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

Val Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe His Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Val His Ser Gly Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Val Pro Arg Leu Pro His Asn Arg
210 215

<210> 40

<211> 200

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 40

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Phe Gly

ES 2 907 486 T3

1 5 10 15
 Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
 20 25 30

Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
 35 40 45

Ser Gln Ser Gln Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Leu Leu Pro Leu Gly
 50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln
 65 70 75 80

Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
 85 90 95

Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Val Arg Ile Asp Thr Gly Ile Leu
 100 105 110

Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Ile Cys Gln Ala Arg Gly
 115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140

Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Asn Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp
 165 170 175

Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser
 180 185 190

Trp Met Glu Pro Lys Val Pro Arg
 195 200

<210> 41

<211> 43

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Leu Val Lys Phe Gln Ala Lys
 1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
 20 25 30

Lys Arg Leu Ala Ile Leu Glu Asn Thr Val Val
 10 35 40

<210> 42

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

ES 2 907 486 T3

<400> 42
 Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Leu Val Thr Phe Gln Ala Lys
 1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
 20 25 30

Lys Arg Leu Ala Ile Leu Glu Asn Thr Val Val
 35 40

5 <210> 43
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 43
 Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Leu Val Lys Phe Gln Ala Lys
 1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Ser Pro Leu Glu Ala Val Ser
 20 25 30

Lys Arg Leu Ala Ile Leu Glu Asn Thr Val Val
 35 40

15 <210> 44
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 Leu Arg Ser Pro Cys Glu Cys Glu Ser Leu Val Glu Phe Gln Gly Arg
 1 5 10 15

Thr Leu Gly Ala Leu Glu Ser Leu Thr Leu Asn Leu Ala Gln Leu Thr
 20 25 30

Ala Arg Leu Glu Asp Leu Glu Asn Gln Leu Ala Asn Gln Lys
 35 40 45

20 <210> 45
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 45
 His Asp Gln Cys Lys Cys Glu Asn Leu Ile Met Phe Gln Asn Leu Ala
 1 5 10 15

Asn Glu Glu Val Arg Lys Leu Thr Gln Arg Leu Glu Glu Met Thr Gln
 20 25 30

Arg Met Glu Ala Leu Glu Asn Arg Leu Arg Tyr Arg
 35 40

30 <210> 46
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 907 486 T3

<400> 46

Thr Glu Asp Ala Cys Gly Cys Glu Ala Thr Leu Ala Phe Gln Asp Lys
 1 5 10 15

Val Ser Ser Tyr Leu Gln Arg Leu Asn Thr Lys Leu Asp Asp Ile Leu
 20 25 30

Glu Lys Leu Lys Ile Asn Glu Tyr Gly Gln Ile His Arg
 35 40 45

<210> 47

5 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 47

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Leu Lys Phe Glu Ala Lys
 1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
 20 25 30

Gly Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Ile
 10 35 40

<210> 48

15 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 48

Leu Arg Ser Pro Cys Glu Cys Glu Ser Leu Val Glu Phe Gln Gly Arg
 1 5 10 15

Thr Leu Gly Ala Leu Glu Ser Leu Thr Gln Asn Leu Ala Arg Leu Thr
 20 25 30

Glu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Asn Gln Leu Ala Ser Arg Lys
 35 40 45

20 <210> 49

<211> 45
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 49

Thr Gln Asp Gln Cys Lys Cys Glu Asn Leu Ile Gln Phe Gln Asn Leu
 1 5 10 15

Ala Asn Glu Glu Val Arg Lys Leu Thr Gln Arg Leu Glu Glu Met Thr
 20 25 30

Gln Arg Met Glu Ala Leu Glu Asn Arg Leu Arg Tyr Arg
 35 40 45

30 <210> 50

<211> 43
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 50

ES 2 907 486 T3

Asp Gln Cys Lys Cys Glu Asn Leu Ile Leu Phe Gln Asn Val Ala Asn
 1 5 10 15

Glu Glu Val Arg Lys Leu Thr Gln Arg Leu Glu Glu Met Thr Gln Arg
 20 25 30

Met Glu Ala Leu Glu Asn Arg Leu Lys Tyr Arg
 35 40

<210> 51

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Glu Asp Ala Cys Gly Cys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Gln Glu Lys Val
 1 5 10 15

10

Ser Ser His Leu Gln Lys Leu Asn Thr Lys Leu Asp Asn Ile Leu Lys
 20 25 30

Lys Leu Lys Val Thr Glu Tyr Gly Gln Val His Arg
 35 40

<210> 52

<211> 43

15 <212> PRT

<213> Ceratotero simum

<400> 52

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Val Lys Phe Gln Ala Lys
 1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
 20 25 30

Lys Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Val
 35 40

20

<210> 53

<211> 43

<212> PRT

<213> Nanospalax galili

25

<400> 53

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Val Arg Phe Glu Ala Lys
 1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
 20 25 30

Lys Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Val
 35 40

30 <210> 54

<211> 43

<212> PRT

<213> Bison bison

<400> 54

ES 2 907 486 T3

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Val Lys Phe Gln Thr Lys
1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Lys Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Ile Val
35 40

<210> 55

<211> 43

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 55

Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Ile Val Arg Phe Glu Ala Lys
1 5 10 15

Val Glu Gly Leu Leu Gln Asp Leu Thr Arg Lys Leu Glu Ala Val Ser
20 25 30

Lys Arg Leu Ala Val Leu Glu Asn Arg Val Ile
35 40

10

<210> 56

<211> 46

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

15

<400> 56

Glu Thr Gln Asp Gln Cys Lys Cys Glu Asn Leu Ile Gln Phe Gln Asn
1 5 10 15

Leu Ala Asn Glu Glu Val Arg Lys Leu Thr Gln Arg Leu Glu Glu Met
20 25 30

Thr Gln Arg Met Glu Ala Leu Glu Asn Arg Leu Arg Tyr Arg
35 40 45

20 <210> 57

<211> 26

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 57

Glu Asp Ala Cys Ser Cys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Gln Glu Lys Val
1 5 10 15

25

Ser Ser His Leu Gln Lys Leu Asn Thr Thr
20 25

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia conectora

35

<220>

<221> REPETICIÓN

<222> (1)..(11)

La secuencia conectora <223> se puede repetir n veces, en donde n=1-20

<400> 58
 Gly Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Lys
 1 5 10

5
 <210> 59
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> secuencia conectora

15 <220>
 <221> REPETIR
 <222> (1)..(5)
 La secuencia conectora <223> se puede repetir n veces, en donde n=1-20

<400> 59
 Gly Gly Gly Gly Ser
 20 1 5

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
 1 5 10 15

30 <210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <400> 61
 Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro
 1 5 10 15

40 <210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Camelus dromedario

<400> 62
 Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Glu Pro Glu
 45 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 1543
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

<220>
 <223> Trampa contra CXCL12

<400> 63

ES 2 907 486 T3

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggtca ttagttcata	60
gccccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccgcct ggctgaccgc	120
ccaaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact attacggta aactgcccac ttggcagttac	240
atcaagtgtta tcataatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg	300
cctggcatta tgcccagttac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
tattagtcat cgcttattacc atgggtatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat	420
agcggtttga ctcacgggaa tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagttgt	480
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgccc ccattgacgc	540
aaatggcgg taggcgtgtta cggtgggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta	600
gagaacccac tgcttactgg cttatcgaaa ttaatacgac tcactataagg gagacccaag	660
ctggctagcc accatgaaat gggtcacccctt tatcagcctg ctgttcctgt tcagcagcgc	720
ctacagcggaa tccgaggtgc agctgggtgaa atctggcggaa ggactgggtgc agcctggcgg	780
ctctctgaga ctgtcttggc cggccagcgg cttcagcctg accgtgtact ctgtgcactg	840
ggtgcgccag gccccaggca aaggactgga atgggtggga gccctgtggg gctctggcgg	900
aaccgagttac aacagcaacc tgaagtcccc gttcaccatc agccgggaca ccagcaagaa	960
caccgtgtac ctgcagatga acagcctgca ggccgaggac accgcccgtt actattgcgc	1020
cagagatcag ggcctgaact acggcagccct gttcgactat tggggccagg gcacactcgt	1080
gaccgtgtct agcggaggcg gaggaagtgg cggagggggta tctggccgcg gaggcagcga	1140
tattcagatg acccagttccc ccagcagccct gaggcgcctct gtgggcgaca gagtgaccat	1200
cacctgtcggtt gccagcgaga gcatcagcta cagcctgtcc tggatcagc agaagcccg	1260
caaggccccca aagctgtcgtta tctacaacgc cgtgaagctg gaaagccgcg tgcccagcag	1320
attttccggc agcggctctg gcaccgactt caccctgacc atcagctccc tgcagcccgaa	1380
ggacttcgccc acctactact gcaaggacta ctggaacacc cccttcaccc tgcgacaggg	1440
caccaagggtg gaaatcaaga gagcggccgc tggcgccct gtgccttatac ctgatcccct	1500
ggaacctaga ggcggcagcc accaccacca tcaccactga tga	1543

<210> 64

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

ES 2 907 486 T3

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85

<210> 65

<211> 93

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
85 90

10

<210> 66

<211> 18818

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 66

ES 2 907 486 T3

cttcaggct tctggacag atcctaggc cagctgccc cctgatttg tggcaaagaa	60
aaaaagaaga agaagaagcg agaggcgatg gcgttgctt tggccagatt taagggcaag	120
cgaggctgcg cgccgtccc gcagggtcgg atctccgagc tccagggcgc ccctccaccc	180
gggtgttagat ttcccgcgga ccccttcgccc ctcccggtt tcatcagctg cgccaggatg	240
gagctggcca gagctctggg agcggggagg gaggcgccgc caccagaggg cgccggagcc	300
ccagcgctgc ggccgggtgag cggccaggct ccccgccca gcccagcaaa ggcctgggaa	360
cgcccgacgg ctgccttctt cactggaccc cactgccttc agttcttaa gagcaggggcc	420
aagtcagtgg ggttcccggc tccaagccca gtgcccaggg tgggtgggtg ggtgggtggg	480
tgggtggatg gatggatgaa tggatggatg gagtgccggc ccacagccat ctaacggcca	540
aagtggtttt ggaaaaaaaaa tgcacagaag acacctactc ccaccagcgg agttccggag	600
ccctcgcagc ctccctgtga ccgcctccgc ctaatgcagc cgctgaccgc ccactccccg	660
acggccagga ctccccaggg acagggacgt gtccccaggg caggccctg gatggacgcg	720
gcgactgacc ccacttcgct ggacgctgtg ctggaaagga cacagagagg tggctgggac	780
agcctgcggt cacaaagcga ggcccaaagg ggcgctctcc tcaccccccac gcctcctggg	840
tgccgacctg caccctccct tcgcccacccg actggggcca tctggatgt ctgggggtta	900
tccggagggc taagcaccgc cgagggacgg ctccgtgggaa agagtttct ggacccagaa	960
ggcagacgcc agtagtactg tcctaggagt cggaggtcgg ggtggggag ttctcagctc	1020
tttgggtcgc acggagcttt tcttggtaa ggcagtaagt acttaggtt aaaggactta	1080
cttacagcta ccatttattt agtactgtct gcttgcaga cacgatgcag agaatttcgc	1140
ggcgtggggc gggcttcatt gaatctcccg tcccactccg cgggggtgggc ctgtgattag	1200
ctcatttcac cattgagagg tcggaagtac aaaggctaca ttgcctttta ctgagagccg	1260
ccggcgcctt ctgctttgtt tgtacaggcg aggaaactga ggctcggctg gtggcccg	1320
gggcttggag tccgagccac gctgactgca aagacgggtc tcattccgc agatcgagct	1380
ctgcccggcg ctgcggccca agccgggcag gtggcgagct tgagccccc cgcacagaaa	1440
gcaggacccc ctggctgcc ttggccgccc accgcccagca ggccctccgc ccggactaa	1500
cttgcattgtt ttgcattcag ttccgcctt cggaaaggccc cgtccgcag	1560
ctttccacgc ggcggccact ttacgcctaa ggtcctcagt ctctccagtg gggccctgtc	1620
acagggacaa taagcggccc tccagccggc gtgcgtcagg ctgcggaccc cactgcagac	1680
cgggccagcg gtgcggggcc cagccggagcc tgagaaggtc aaaggccgga ggcactgcg	1740

ES 2 907 486 T3

cctcgggagc acagagggag cgaggaggagg gogaaggggg tgggtggggg gtgccgcccga	1800
gggagtcgca cgtcagagac cccggccacg gccagcactc ggctccgggc cgcgcctca	1860
ccgcgcgccc cgccccgccc cgcctggctc tcccctctaa agcgcggc ggcgcctcc	1920
caccggcgca ctttcaactt cgcgtcccg cattgcccgc tcggcggtccg gccccggacc	1980
cgcgcgtcgc cgccccggcg cccggccgca cgcgcctatga acgccaaggt cgtggtcgtg	2040
ctgggtccctcg tgctgaccgc gctctgcctc agcgacggta agtgcgcctcg gcggggaggc	2100
cctggcgagg cggccctggc gaggctctgg gttcggctc cgcggcgcg cagagccgc	2160
gctccctgc ctgcgcggc agtttgcggc gcccgcacaca gtgggggtgg aggcaagctcg	2220
cttagctggg cgctctggtg cgggttagcg ttcaaagccc tactttgcg ccgagggttt	2280
gtgacctgca gagagcgacc gcctgacctc aagctggctg cagagcgagg tcagccggga	2340
caactgggca ggaacgcccc aagagagcgt tcgggactgg cgcgggaagg cgcgagggtg	2400
gggagccgcg gaccccgac ccctgcctgc ccaccctcca cccactgcct tcccgctgcg	2460
ggctcggttt ccacaggcga atgggctccg aggtccctgct ggcacagtg ctggaggctcg	2520
ggcggtgcgt ggcgagagcg cgcttgcaa agttcgccctc atgcccgcac ttgaggctgt	2580
gaggtcccgat gcagccgcgc agcctccgct ccctgcgaag ccgatccctc cccacacacc	2640
tcgcggggct ctggccagg cgcgggggg ctgcgcggcg cagctgtcgg gcttgcgcca	2700
cccgccaggc cgcgcttctg cacagctcg cggtccgcag cgacgcggac ctggcgccgc	2760
gtccagccgc tgtcttcctg tctcttcctg gttcacctg agagaggccc agggaccctc	2820
cgagcctcac acgccccctc cccagctccc caaacacacc tgcagacagg ctctttgtc	2880
accagctggc caagcgctt gccccagaat gagagctgca gcaaagtca atctccaagg	2940
ccctgggcca ctggaaaccg tgggtcccg tttcaactggg agagggcttt tttctttct	3000
ttcgctgaag agaaactcgc tgcgtgtca caggacaccg atgcaaacca aaataaactg	3060
ttgcctctga acacacaaaaaaa caaaaccctg tggctcaggc cgctgagctt cttggctgt	3120
gaagtttcct gcaaagagtt gaaggacact ctgagtgctc ttgcagccgc gggctgtcga	3180
ggcccagcgc gcctcgagcc ctggctggg ttgggtgcaga cgtggccccc gcttcctagc	3240
tggcttggac tgtgcgtctgg tgtgagcagg accagcgcag ctgagtcggg ctggagaagc	3300
tggcagcct ggggtcggtgg cggactgcct aagtgttaag gacacagact gaaggcaatt	3360
ggaaatgttc gtcgttgatg aaaagtccct gaggctgtgt ctgcacactg accccccccc	3420
ccccccgcaa gtcatggggc atgtttctag ttttattgc tggatattct tctgttcctg	3480
taaggtctct ggtttggca gttattgact gattgggtggg atgagcgcgg aggtgtcaca	3540
gtgcgcgcgt ctgggaaatg gtgcgtcccc ctccccggag ggctggagag aggattggaa	3600

tgaggaacct	cggctttga	gttatgggtg	caactgacct	gggggaagca	cagagacgtg	3660
gggttcatcc	cagactccctc	ctggcctggg	aagggtgaca	tggccctca	agttgc	3720
ttggcagcca	agtaaccagg	gcaggagcct	gggctccagg	cagatctgct	ccttacacac	3780
atcgccagaa	tgtttgttt	tgtttgttt	tccctcacc	tcacagtgcc	tatgtgcc	3840
ctatccccac	acttagtcct	caagctgcac	tacagagaga	gctggccag	gggtcctgcc	3900
cctccccat	tggctgactt	ccgtcaggca	gctggccct	tgggttccc	gggcttaaac	3960
tcagggtggg	cccccttccc	aagctgttt	ggaggggcca	gctgggtcc	tgtctctgca	4020
ttagactgga	gggctttctg	aaaactcctg	gagccaagct	cacccggtcc	caaatccggg	4080
gtaccatcag	agccagtcag	gactttgcc	ggtacacgga	tttacatcca	gaacgggtgg	4140
gaaagttgt	cttactgaca	aaaagctgga	ggaaggagca	catgaggtac	acacgagacc	4200
atgttctttt	ggtaagcaca	cctggggct	ctgtcacttt	aaaaagacot	gttgaattc	4260
gctgcttgc	aggcgggcct	tagtgcctgg	gagtagaagc	aagaattgt	tttgaaggaa	4320
atggataatc	ccaggggggt	gagggggaga	ggagagagag	cctgtgtgtt	gagctctgaa	4380
taggctctga	tttctggcct	catcaccact	gcttgggtgg	ggggccagag	gagcttctct	4440
cctctggcg	ctggagagtc	acagccccac	ccatcccagc	ggggccggct	gcagcaactg	4500
cccttggctg	catacttca	agctcaactgt	tgccgggagg	gggcttgc	ctcaactaccg	4560
gcctcctatt	ctcctgctcc	accccaacc	cacccctgc	ctcagcttgg	aaggcccaa	4620
aagaaatcca	gggaaacctg	gaggcacaac	actcaggagc	gtttagctcc	tcagttaccc	4680
aggctgcagg	ccccggccct	gggggtggct	ttcccagggt	atctggttac	agtgcagtgc	4740
tgacttcccc	tgcagggtcc	cagtgcagct	gttggaaagct	ggccccagag	gtgccttct	4800
ggagtttagat	caggtgtAAC	tgtgaaggct	gtttaggtc	tctccagtgc	catgagtcac	4860
cagcaccctg	atgcgggtct	tttcctgggt	tttcaggag	ttgcatttgg	tcctggggac	4920
aaggaagtgg	ggggacaagt	gttccacttt	tcctgcaact	tggggctga	atacacaatg	4980
caattcctag	tccacatcat	ccctcaattt	attgcagtct	gtaaaaaaa	taaaataaaa	5040
tgagccctt	actcaagatt	tcctcctact	tcccccagcat	tctttcccaa	agggtcagaa	5100
tttcagaacc	acagagggtct	ctcagaactt	tgttaaacagg	caaacttaaa	aaaaagaaaa	5160
aaagaaaaaa	aatctctgga	ccaaatattc	ttagacatat	atthaatctc	tgtgaaagg	5220
atccacaagt	tcaaataatt	tgggttatta	agtggggctt	ggataaaatc	ttcaaggaaa	5280
aaagaaaaac	aaaagcaca	cacaaatccc	agccctccag	ggcttgc	cctatattta	5340
aagggtgagc	agtgggttct	gcaggagccc	cttgcattt	tacactaatg	agtgtcaatt	5400
atggcatttt	gtaaatttgt	gatttgcaa	agatcttaat	acaattcctg	aggctacagc	5460
atccctgcct	aggcaatgaa	aaccacattt	aactccagct	ccactaatct	ctaagccttg	5520

ggaaaaagtgc tgggcagaag gtgggtcctt ggctgctct caggggactc acaggtagga	5580
agccagccag gattctttg tgcctccag agcttaggt gaatgtgagg aggggtctct	5640
gggggtggggg agggcagcat tcctgagtagc tactgtgctt cctggctaga ggcctgtgcc	5700
agaggagaga ggccagggag cctggagccct cttgtccccc tttctttcc ctgagtaggg	5760
agatcttct cagttgtccc ttgaggaatt tttttacaa agagtaactg gaaatttcag	5820
taccttggac tgaaaccgtt atctactata attactacct ttatctttag acactgagca	5880
ggtggcttct aatttaatct cccccctcat ctaggctccg gctctccca ggcctgttgg	5940
gctccttggcc ctgtagaagc tgagcctgag ctcagccagc actcaactgtg ttgcctgagg	6000
agatggcctt tcccaacata caccagtaac ctggaactta ccccaagtat gccgtctatt	6060
gatccttaat cgctgcacca actgctgcag cccagacaca cattaccaaa atctggcagg	6120
gtagtaaagt gccttgttgc cttacacttct tctagggaaag cccgtcagcc tgagctacag	6180
atgcccattgc cgattcttcg aaagccatgt tgccagagcc aacgtcaagc atctcaaaat	6240
tctcaacact ccaaactgtg cccttcagat tggtaagtc ttgaaattga acatcatcta	6300
acgaacatag ttgcattcaa cgaacatagt aacatctaacc cccaggatctt ttaaagggtgt	6360
agaggtgaca agccaagtgt ccaaccattga acttggcata attagtggca gctattctta	6420
tcatgaggac cttagtatgt ccaccaggca ttaattttaa aagccgcctt tggcctgggc	6480
accctgctgt gctcgttagta gttctcttctt cttccaaac ctgtgttctt cagcacagca	6540
cagctggatg ctggagaaac tatgggttc accaagggtt tggctgaagc ctatgtaaatt	6600
agccagccct tagctaataa cagtgataac tggcctgcca gtttcgggaa tctgtatgccc	6660
tacattaact cacaagaccc aaatgcagtt taagtccctt ttaaccattt ggtgaaactt	6720
caacattttc agctcaattt cctgtatattt ctcaagtaca acatatgagg ttttgggttt	6780
atttgggtgtg gatggcagcc actaacattt gattttattt atttgggaaa caaagaccaa	6840
aatcacacat ccacaagaca ggaagatctc agctgggtac agaagacccg gagaaatgcg	6900
ggaagaaaagc catgtgcttgc aaagccctct catgctcaag aggtcctgtg tctgaacacg	6960
ggaaagcgag ggctcaggga gtctcctgga gaggattga ttgctcagaa gttcttagtgc	7020
taaaaatggg gtggggagac agcagttgga accaaagcta caactttccc aagacttttc	7080
cacccaacac caaatgttt tactttgtat tttagaaaaac ttttttttagt tttgagttaa	7140
ccctttactg ctttgaatgt gtttggattt tacagtatgt tttagggccc tagaaaatga	7200
atgttttttc agtactttgc ctacaacatg atactttatc ttttggtaag agtattttaa	7260
agatgctcaa tttagctagc ttggacactgc tttacagcac tgatcatgt ggttactgg	7320
cctggaaatg caccttgaag ttgaagatgc caaatacaat tctcaggatctt gagcagacac	7380

taaattaaca aagaataggc cccagatttg gaccccaatg tgggttgctc cgagccacac	7440
ccatctctgc accccctttc acctaatttga caggctgctt gaagactccc tgggtgcccc	7500
tgaaccactg ttctggggct tagctgtctt caagaccctt aagtacttgg gctgcatgag	7560
attacctggc accaaaggc tttctggcaa gagatccaga gagatgaaat caggccttcc	7620
ccaggagttt gcatgttaggg aagcttttaa gagtgtgaac ttttaaaaaa caaatgagac	7680
caagaaaacat tcagtgaact tggaaaatct ttctagaaac tattttctgg taagccacct	7740
gcactgcccc tccccctccct ggctggtcac ccccccggtc agaccgcggt gacttctggc	7800
aggcctcctt cctccaggct tcctcatgcc catccttaag tcggccctat atctatcaag	7860
atgaccatc caaataaacc tctgctctgt tgctctccat tctccctcc ccaggtgcct	7920
agagcatcct gtcgtccccct tcctcagttt cctctgtatg ctttgatgac ccccccggcg	7980
tatttgctcc tgattttccc ttccccgttta tttactctcc aagctcctac ttatccttca	8040
aaggcagctc aaatgtcccc ttacatgaat tccccgtcac tgccccggaa agacttctgt	8100
tcacatttcc atgtctctgc aatggaaactt cctgcactgc cagcgcgttag cttccccag	8160
cacaccgcga gcacccctgg agcctgagcg taccaagtgg agcacggggt gccagcgagg	8220
gcccttagatg ggtgtgggg gagcggatgc acacgttgca gcccgcctt cctctgtgc	8280
agccgcacac tggccattt ctgtttcac agagcccgcc tgaagaacaa caacagacaa	8340
gtgtgcattt acccgaagct aaagtggatt caggagtacc tggagaaagc tttaaacaag	8400
taagcacaac agccaaaaaag gactttccgc tagacccact cgagaaaaac taaaaccttgc	8460
ttagagatga aaggccaaag acgtggggga gagggggcct taaccatgatg gaccaggtgt	8520
gtgtgtgggg tgggcacatt gatctggat cgggcctgag gtttgcacgc atttagaccc	8580
tgcatttata gcatacggta tgatattgca gcttatattc atccatgccc tgtacctgtg	8640
cacccgtggaa cttttattac tggggttttt ctaagaaaaga aattgttata tcaacagcat	8700
tttcaaggcag ttagttccctt catgatcatc acaatcatca tcattctcat tctcattttt	8760
taaatcaacg agtacttcaa gatctgaatt tgggttggtt ggagcatctc ctctgctccc	8820
ctggggagtc tgggcacagt caggtgggtgg cttaacaggg agctggaaaaa agtgccttt	8880
cttcagacac tgaggctccc gcagcagcgc ccccccggaa aggaaggcct ctgtggcact	8940
cagataccga ctggggctgg gcgcgcac tgccttcacc tcctcttca acctcagtga	9000
ttggctctgt gggctccatg tagaagccac tattactggg actgtgctca gagacccttc	9060
tccctagctat tcctactctc tccccgactc cgagagcatg cttaatcttgc ttctgtcttc	9120
tcatttctgt agcctgatca gcgcgcacc agccggaaag agggtgattt ctggggctcg	9180
tgccctgcat ccctcttcctc ccaggccctg ccccacagct cggcccttct gtgagatccg	9240
tctttggctt cctccagaat ggagctggcc ctctcttgc gatgtgttaat ggtccccctg	9300

cttacccgca aaagacaagt ct当地acagaa tcaaatgcaa ttttaatct gagagctgc	9360
tttgagtgac tgggtttgt gattgcctct gaaggctatg tatgccatgg aggcaactaac	9420
aaactctgag gtttccgaaa tcagaagcga aaaaatcagt gaataaacca tc当地ttgcc	9480
actacccctt cctgaaggcca cagcagggtt tcaggttcca atcagaactg ttggcaaggt	9540
gacatttcca tgcataaaatg cgatccacag aaggctcctgg tggtaattgt aacttttgc	9600
aaggcatttt tttatataat ttttgc当地 cattttttt tacgttctt tagaaaacaa	9660
atgtatttca aaatataat atagtc当地ac aattcatata tt当地gaagtgg agccatata	9720
atgtcagtag tttatacttc tctattatct caaactactg gcaatttgc当地 aagaaatata	9780
tatgatataat aaatgtgatt gcaggttttca aatgttagcc acagtgtatt tt当地tacttgc	9840
tactaaaatt gtatcaaatg tgacattata tgc当地ctagca ataaaatgct aattgttca	9900
tggtaaaac gtc当地tactgt atgtggaaat tt当地tacct gaaataaaat tc当地tagtt	9960
tttagttaggg agcttataga cgtttctggt tt当地tagtt aaggctgc当地 gcagtc当地gt	10020
gtctgagacc ccttctcaca gccc当地atgtgt gacagtc当地t gggctttct cacgagcaga	10080
tttagatctgc agctcaagtt tt当地gatctt tt当地ttttt ttttaacccg attgaaatag	10140
cagtc当地tgggtt tttctgaaga ataatatttgc当地tactaat tc当地tccccc tccctccccc	10200
tc当地tgggttcc tc当地taacttc cccatgtat cccagagac tcaaccctag taatataac	10260
cttttacatt ttccc当地atgtat cccatgtat gactccaggc catggtaat atgaagctt	10320
cacagggaca ggtggc当地tca cccatataat cattaaatac cattcagctt gaatcatttt	10380
aatgtgacag tcacgagcc gttgctctaa taaaatctg ctaaccagct ct当地cccttg	10440
ctctccagaa caatcgat cattcccagg agtgttccaca ggc当地tctaga aaggggaaagg	10500
tgggaccact gc当地tttttc tc当地tctctg aatggcagtc tgaacctggg gc当地cagcc	10560
tccaaaacgt tattcaattt gaaatgc当地a catttcttag agaaagctaa gagttcagcc	10620
ctgcatttgc当地t aagaagaaaa agtccc当地atga gaggcaggca gggtgggggtg acaaggacca	10680
cgatggccag cctggccctg ggtgtaccct gagatgtgga tt当地tgc当地cc ccaatggaa	10740
tc当地gttgc当地t gttggcagat tggcagtc当地t tcaaccat tc当地aaatgt gttcttaggag	10800
cccatgtatc当地t atttgttgc当地t atggaaaggaa atgtccat当地t tattttaatg aattactgtat	10860
aaacagtgc当地t tt当地accaggc gc当地tccaggc ctgagactga aggccacagtt taaccatgtac	10920
acgggccc当地t gt当地aaatctt atgc当地actg agacgaaactt tt当地tttccat当地t	10980
aatgggttctat ctaat当地ttat ctaagggggc gc当地gagaaga aaaatgtggg aaaaagaaaa	11040
agataggaaa aaagaagcga cagaagaaga gaaaggctgc ccagaaaagg aaaaactgtat	11100
tatctgccc当地t ctc当地gatgg accacagttc acttgc当地tcc ggc当地ttgtt aat当地tgc当地t	11160

gatcctcctc caggacagac ccccatgcag actgggcagg ggctcagact tccgtgggg	11220
agcagtgttt tgctgcctg ccagccacac cggcttctgt atttatgtgc ttttaaggc	11280
ccttgttggt ctgctaagtt atgaagaaag tagttgtgca gagactgggg cgggggtctg	11340
tgacgcggag cctgtgtgct caggactctg tccagaatag cctggagct ccaggaatgc	11400
ccaggttgct gagcccccac gcccgcctc cacttcctct cttagaaggc ctgcgtcac	11460
tggggagctc accagctcca cacacttgca gtctgcattc ctgtggagac caggctgtgg	11520
ccacctggcc agtgtgcagg gcaacctgtct agcccagcag aggtggcctc gccaggaagg	11580
gggtgtgcca cccctctgtg gccctcagga aaggtaaaa ctgactgacc cttaggaatg	11640
ggccctggct tttccaaat acccattgcc ttccctcca gcactctgac acctggaaag	11700
gggcttcttc agcccctctt tcctgggttgg tggagtgcc tttatccccaa agcccggttgg	11760
ggtttctgca aactgtgtgg ggtgagcccg agggaatgtct gcattctcag agagcagatg	11820
tgaaacact ttcaggagg ctcccttttggcaattctc ttttagagtct ttaaacgggt	11880
cccccacgtg gaggacagat gtgctatgga actttgcaag ggtcctgaat ccctgggat	11940
cccagccctgt cccctcccgcc tcctcgctg atggcgtgtg ctccagctgc agggcacagc	12000
tgcctctgtc ctcattcatg ggaaataacct tatctgccta aagcaaatac cacttaagct	12060
ctaggaactt tcctgcaccc tcctccctg cccatgtaga tgtatgtgtt agattttttgg	12120
gcaagttct ctaatctgga ccgggaggat ggaagagcaa ggacccatt tcagtagtgc	12180
tcggaaaaag gatgcgttga atttctcagc cttctccac ctcacataaa cacccggcca	12240
ccctgcaccc ggatcctggg tcataatttt aataatgca gaaagagaaaa gtgggtggag	12300
gatggagcac atggaattca ggagaaaacc cacaagacc cctgcgtgc agacacaccc	12360
tgtcccgag cgtgggtgtcc cctttagctttaatgagctc cctgtatca cagccatgcc	12420
ttctcctcgat tggggagggttgc tccttaggtatc cttcagccaa agacctttgt ttcccgtgc	12480
tatctctttt acctggacaa ctctccgtgc ccacgttctt cttgcacca ctgggggtca	12540
caggcctgag ccctgggtac aggggtgcac tagtcttctg ccctccccac ctcttaaggc	12600
acagagctgt tgggtgggttgc ccctgggttgc cccatccttc ccgtggaaagc cagtagccac	12660
tctagtcaccc gggactcttgc acaaaagcgc cccgagaggg caaacctgtg cccccataact	12720
ccgcctgcatt ctccggactc cacatgcagc agggctttgt gcctggggag ggggtggccag	12780
tctgtccctgg tcagttatgaa aagctgttgg ccccttaggg acagagggcc cagctaaaggc	12840
tgcctgagga tacaaactgc ttgctatccc actcctgggg agcagggtct gcagggactg	12900
agagtgggttc ccaccttgag aacgcgtgc aggtccgtcc tgcgtatgttgc tcttgcgtgt	12960
actgtatgttgc ccctgggggc tcactgtgttgc ttacaagtgg cttgtgaagc tcctggagc	13020
aggtggtaca cccagtgctg aagacaggggt cgccgtggaa gagcgaagag cctgaccggg	13080

attcctggtg ggttgaaact aggaagtgc cacaccagtc agagccaaat gaggggtgcg	13140
ctatggtcac tgctctgtcc agcatgcgtt cctcctggga ggtcctggcc acctgtgcac	13200
ccacccctgt gccaccccca gcagtcacac ctggggccac ctacggtggc atggccctgt	13260
gctgagaggc cccgagggcg aagggttaact ggaagccacg aaagtgcctc ttggacagc	13320
cgaggccagg atgcagggca gcagcatcct gagcctcagc cccacgcgg tgccggtaa	13380
gcagtgtgcc ctgtccccgt cgtatgacca ctctgatggg cctctctgtg cttcgtgcg	13440
tctgccacgc ccagtgcctg ccacgtgtct gtccctctgct ttctgccatc catggtccc	13500
tccgcttcag cctggctgcg tctcgactc coctcccgta tgggtgcga ggcctctga	13560
agggagatgc atggccaagg tggcaacttg gaagttagggg ttggcccaag ggcctccgg	13620
caggccgctg tcctgctgga gctggctggg tggggggga acctgcctta atgggtttc	13680
cctctgttct tgtcaacagg aggttcaaga tggaggggg tcagacgcct gaggaaccct	13740
tacagtagga gcccagctt gaaaccagtg ttagggaaagg gcctgccaca gcctccctg	13800
ccagggcagg gccccaggca ttgccaaggg ctttggggg cacactttgc catattttca	13860
ccatttgatt atgttagcaaa atacatgaca ttatattttc atttagttt attattcagt	13920
gtcaactggcg acacgttagca gcttagacta aggccattat tggacttgcc ttatttagt	13980
gtctttccac ggagccactc ctatgactca gggctcctgg gttttgtatt ctctgagctg	14040
tgcaggtggg gagactgggc tgagggagcc tggcccatg gtcagcccta gggggagag	14100
ccaccaagag ggacgcctgg ggggccagg accagtcaac ctgggcaaag cctagtgaag	14160
gcttctctct gtgggatggg atgggtggagg gcccacatggg aggctcaccc ctttccat	14220
ccacatggga gcccggctcg ctttctctgg gaggccagca gggctaccct gagctgggg	14280
agcagtgtga ggccaggca ggtgagacc cagccctcat cccgagcacc tccacatct	14340
ccacgttctg ctcatcattc tctgtctcat ccatcatcat gtgtgtccac gactgtctcc	14400
atggcccccgc aaaaggactc tcaggaccaa agcttcatg taaactgtgc accaagcagg	14460
aaatgaaaat gtctgtt acctgaaaac actgtgcaca tctgtgttctt gtttggaaa	14520
ttgtccattt tccaatccta tggtttgtt caaagccagc gtccctctt gtgaccaatg	14580
tcttgatgca tgcactgttc cccctgtgca gcccgtgagc gaggagatgc tcctggcc	14640
ctttgagtgc agtcctgtatc agagccgtgg tctttgggg tgaactaccc tggttccccc	14700
actgatcaca aaaacatggt gggccatgg gcagagccca agggaaattcg gtgtgcacca	14760
gggttgaccc cagaggattt ctgccccatc agtgcctccct cacatgtcag tacccaaa	14820
ctagggccaa gcccaggact gcttgaggaa aacaaggatt cacaacttgt ttttgggg	14880
taaaacccag tccacaaaat aaccaatcct ggacatgaag attctttccc aattcacatc	14940

taacctcatc ttcttcacca tttggcaatg ccatcatctc ctgccttcct cctggccct	15000
ctctgctctg cgtgtcacct gtgcttcggg cccttccac aggacatttc tctaagagaa	15060
caatgtgcta tgtgaagagt aagtcaacct gcctgacatt tggagtgttc cccttcact	15120
gagggcagtc gatagagctg tattaagcca cttaaaatgt tcactttga caaaggcaag	15180
cacttgtggg tttttgtttt gttttcatt cagtttacg aatacttttgc cctttgatt	15240
aaagactcca gttaaaaaaaaa attttatga agaaagtggaa aaacaaggaa gtcaaagcaa	15300
ggaaactatg taacatgttag gaagtaggaa gtaaattata gtgatgtat cttgaattgt	15360
aactgttctt gaatttaata atctgttaggg taatttagtaa catgtgttaa gtatttcatt	15420
aagtatttca aattggagct tcatggcaga aggcaaaccc atcaacaaaaa attgtccctt	15480
aaacaaaaat taaaatccctc aatccagcta ttttatatttgg aaaaaataga gcctgaggaa	15540
tctttacttag ttataaagat acagaactctt tcacaaaccc ttgtttttttt acctctcact	15600
ataccgtat aattggattt tcagtgggc agtcattatc caggtatcc aagatatttt	15660
aaaatctgtc acgtagaact tggatgtacc tgcccccaat ccatgaaccca agaccattga	15720
attcttgggtt gaggaaacaa acatgaccct aaatcttgac tacagtcagg aaaggaatca	15780
tttcttatttc tcctccatgg gagaaaaatag ataagagtag aaactgcagg gaaaattatt	15840
tgcataacaa ttccctactt aacaatcgc tccttcctgg agactgccc gctaaagcaa	15900
tatgcattta aatacagtct tccatttgca agggaaaagt ctcttgcataat ccgaatctct	15960
ttttgttttcaactgcttag tcaagtgcgt ccacgagctg ttacttaggg atccctcatc	16020
tgtccctccg ggacctgggt ctgcctctac ctgcacactcc ctgggtctcc ctgtaaacctc	16080
ttcagaggcc ctgcgtgcgc gctctgtatc aggaccaga ggaaggggcc agaggctcg	16140
tgactggctg tgggtttggaa ttgagttgtt ggcacgtgtt tgggtgtgg tgggtcccc	16200
tctgtccagg cactgagata ccagcgagga ggctccagag ggcactctgc ttgttattag	16260
agattacctc ctgagaaaaa aggtccgat tggagcagag gggctgaata gcagaaggaa	16320
gcacccccc caaccttaga tggatcttgc tttccatttgc gatctcatttgc gacccttcca	16380
tgggtgtatc gtctgactgg tggatcttgc gtgggtccctt tgactggag ttgtcgct	16440
ttccctagggtt ctacaccctt ttccagctgg atgagaattt gaggctctgc atccctctac	16500
agagcttccc tgactcatc tgaaggagcc ccatttcctgg gaaatattcc ctgaaactt	16560
ccaaatcccc taagcagacc actgataaaaaa ccattgttagaa aatttggat tttgcaccc	16620
cgctggactc tcagtttctgc agcagtgaat gattcagtgt taaatgtat gaatactgtat	16680
ttttgttatttgc ttcaatttgc atctccaga taatgtggaa atggccagg agaaggccaa	16740
ttccctatacg cagcgtgcctt taaaaataaa ataagaaaca actctttgag aaacaacaat	16800
ttctacttttgc aagtcatcacc aatgaaaaaaa tggatgtatgc ctataattt tcctaataaa	16860

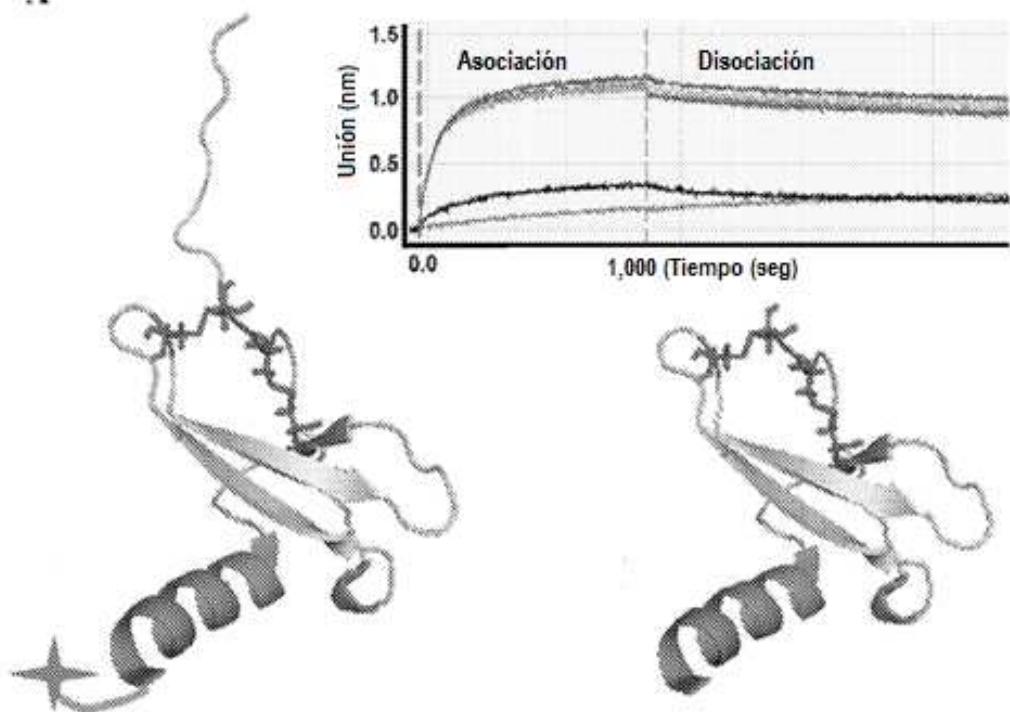
gttctgtact caaatgtgc caccaacagt ttgaaattag tgttactact tggaatttc	16920
tggacgtgct tttttcccc acaaacccaa aactgagggt tgttaatcc tggctacagt	16980
ggttcatgga aaacaggcga ttgtaatcat gtaatcaca gctgagaatt ctggaggcat	17040
acttgcctct tctggacagc tgatccttag cagggaaagg tgctccctt tctctgagtg	17100
tctttgattt tgctagaatt gttctgaaa ggcgcgcctg tcctccactc cacaaggat	17160
ggtttgc aagggtctca ggtatttctt gacagctgtg aggaggaaag cttccactt	17220
gcccttctca gtcctggag aatgcaacag aggtctggcc ctgatggtaa ttgctgagga	17280
ccagcactct gtgtgtttcc tgcaactgcac agagacctt cttggaaagcc gacacgattc	17340
tctcacctag caatggctag ccagaactgt cttggacatg gggcatagga gatgagccca	17400
gcagacaggt tctggcttc acagaggtaa goccttaaca ctctctagca cattctctgt	17460
catccacagt caactttgtt agaaaggaga gtcagcacaa aagttccgaa tgtctgagtc	17520
agattgtccg gtcctccaag ccctttccc cattggtcca gatgtgatca catcatccca	17580
tgccaaatct tcccatgact taatggatg gccgtcatgt gggtgctaag ctgcagatgg	17640
actggggaaag gaagaagggt tagagcagggc cgggaaggc agcgtgggt cagggaccc	17700
gtgcagggtgt gaagatcagt agactggggc ttgcgtccca ttcaactctc gtcctctg	17760
tgatttgaga tgcattccctt gatctctctg agttccagtc tcccagctgc aacactgaag	17820
cttattactg ccaacggtca agaggattag actgggagag tgtgtgaaag aagctagctt	17880
ttgagggaca ggacaaagcc cgccccctcca ccctgaaaat tccccattt gtcctctc	17940
tccacctcct gttccctgag gtccacagag ctagaataag acccacatct gcctctgctg	18000
agcccccttaa caaagctcag agaccaaggg agcaggaagt gacctggaag ctgagcctgc	18060
ccctcagcta aaggatgggg agaagtcact gggtcgcatac ccctgtatct ccggcacacc	18120
acactgctat cctagcactg ggaatcgaca atggccaaac cttcaaaaat gacctggcat	18180
cagaaagaaa gcctgagccc tggcatgctt gatttccc ctcattact tggccaacaa	18240
cagctgtgat gcctctctg caccgcagga gtgtggggag caagacacac tcactcta	18300
tccatgaagc ctgcagtcg gcccgtgccg tggagaagt gggattttc atagattgt	18360
gtgcattcag gcatcaggaa agcgtaaaac agaaaagacc cctaacttag gcatcagtaa	18420
ggatttgctt aaaaagcgct ggtgaagggtg agacctgaga aaagtggatt ctggggag	18480
gtggctact gagcccatga gggctggcat ggagagccca ggtgttatcc tcctgtgaat	18540
tggaaagggg gcttattcta gaagccggag gtgtagctca cacagggagt ctggcatgg	18600
gggcacaggg cactgggtt cagttccctt attccatca cttgtggag gcacaaacac	18660
agctgagaaa gctggacccc cacggtgatg gggccctc agcacggctg attgcatgga	18720
gtggacactg gatgcatatt gcaggccat ctgattttct gtcacaggag tacaaggctg	18780
tgattcaaca gcatcggtt ttgccttctt tctctgtg	18818

REIVINDICACIONES

1. Un trímero formado a partir de tres polipéptidos de fusión, en donde cada polipéptido de fusión comprende un dominio extracelular de PD-1, un conector flexible y un dominio de trimerización, dicho trímero capaz de unirse a una proteína que interactúa con el dominio extracelular de PD-1, incluyendo PD-L1, PD-L2 y CD80.
- 5 2. El trímero de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de fusión tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 26, opcionalmente en donde el polipéptido de fusión es SEQ ID NO: 26.
3. El trímero de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de fusión está codificado por una secuencia de ácido nucleico con al menos 70% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25, opcionalmente en donde el polipéptido de fusión está codificado por SEQ ID NO: 25.
- 10 4. El trímero de la reivindicación 1, en donde el dominio extracelular de PD-1 tiene al menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34, opcionalmente en donde el dominio extracelular de PD-1 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34.
5. El trímero de la reivindicación 1, en donde el trímero es capaz de unirse a PD-L1 con una afinidad de aproximadamente 16 picomolar.
- 15 6. El trímero de la reivindicación 1, en donde el trímero es un homotrímero.
7. El trímero de la reivindicación 1, en donde el trímero es un heterotrímero.
8. El trímero de la reivindicación 1, en donde el dominio de trimerización se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 y 57.
- 20 9. El trímero de la reivindicación 1, en donde el conector flexible se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61 y 62.
10. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.

Figura 1A-B

A



B

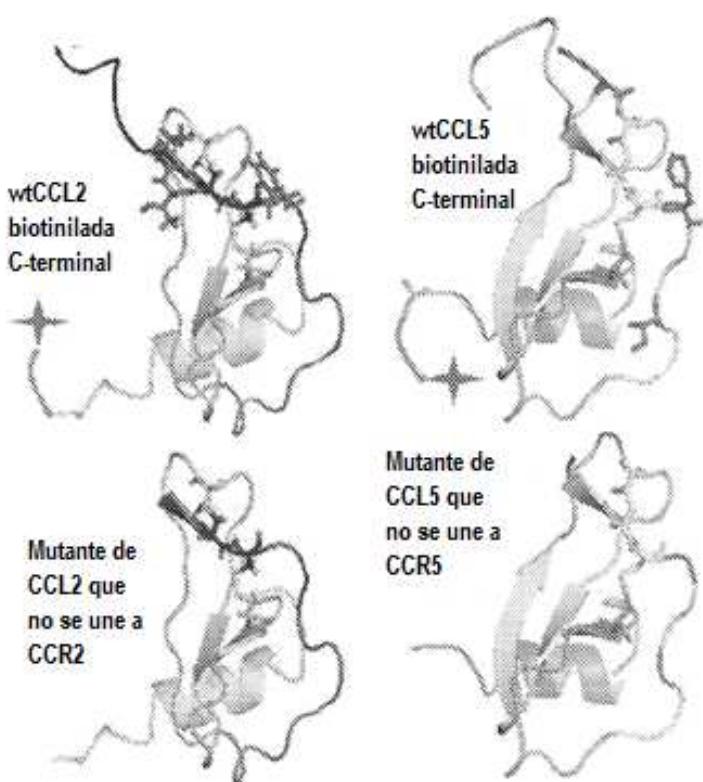


Figura 1C

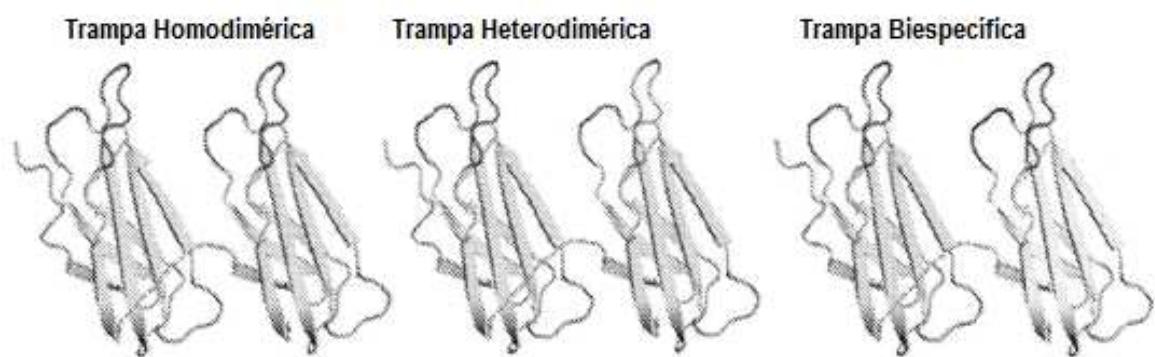


Figura 1D

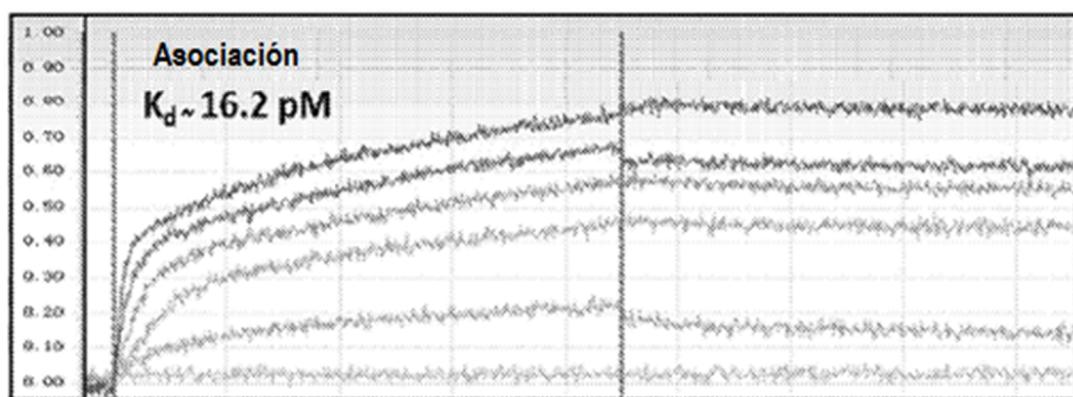
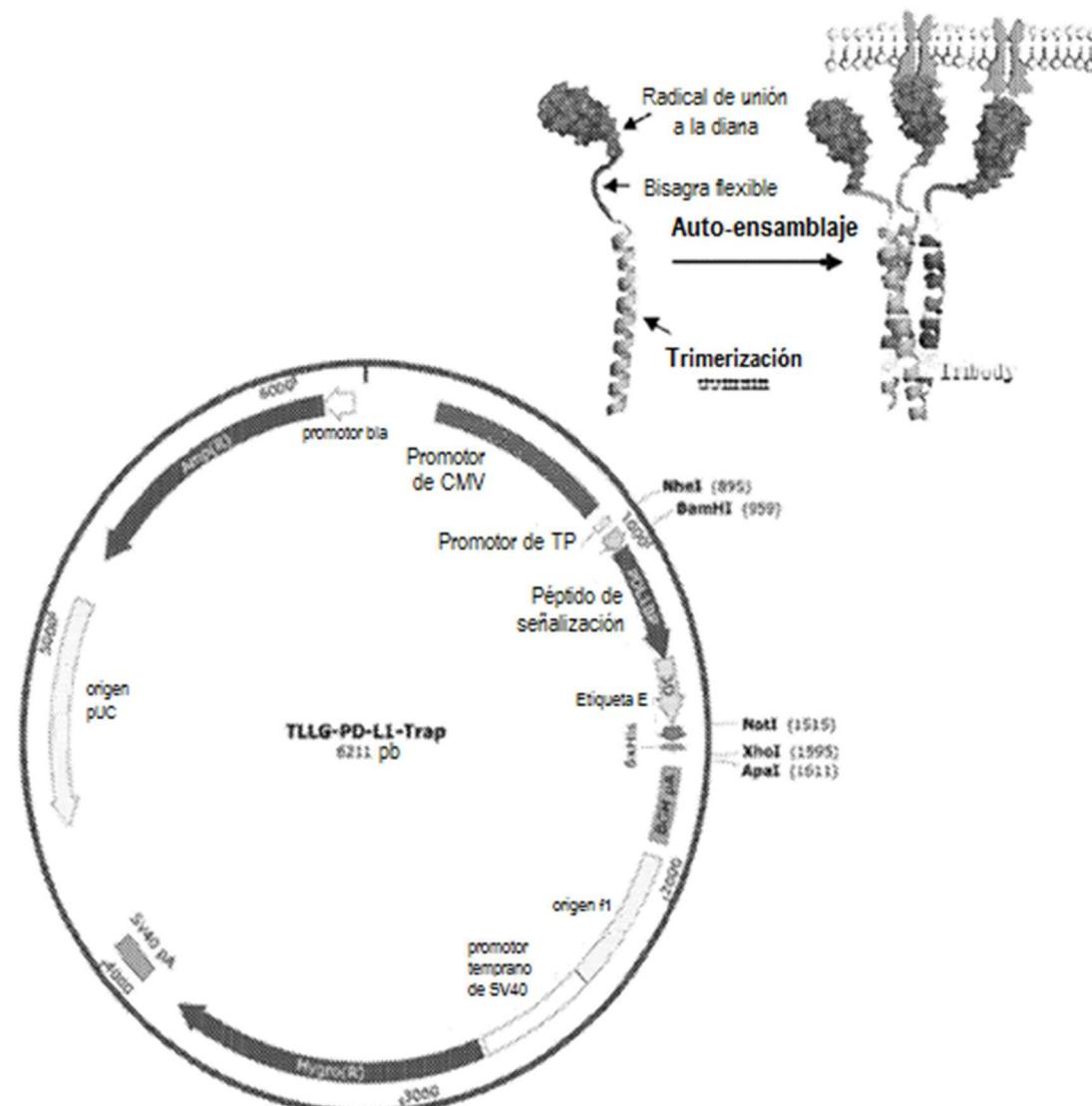


Figura 2A-C

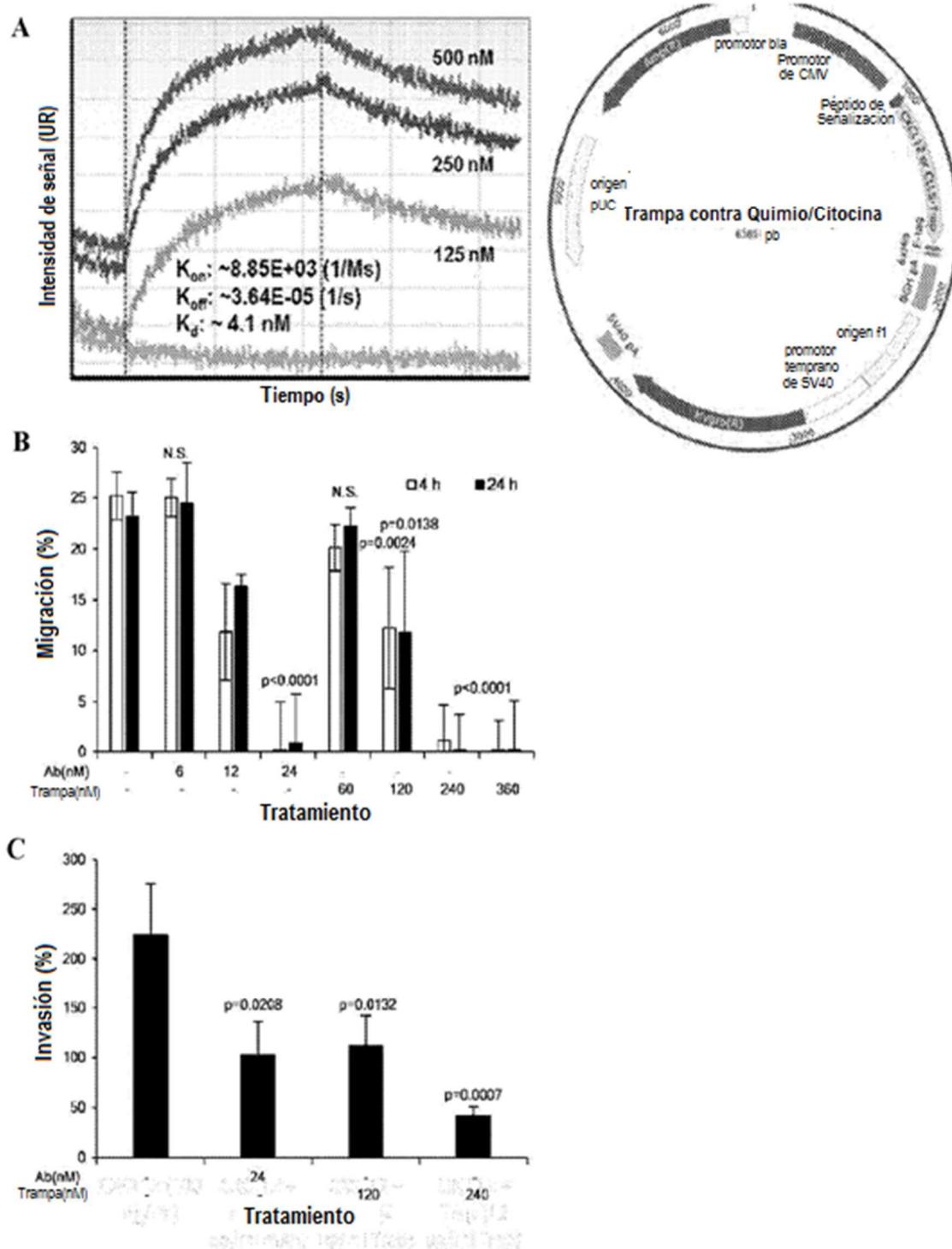


Figura 3A-B

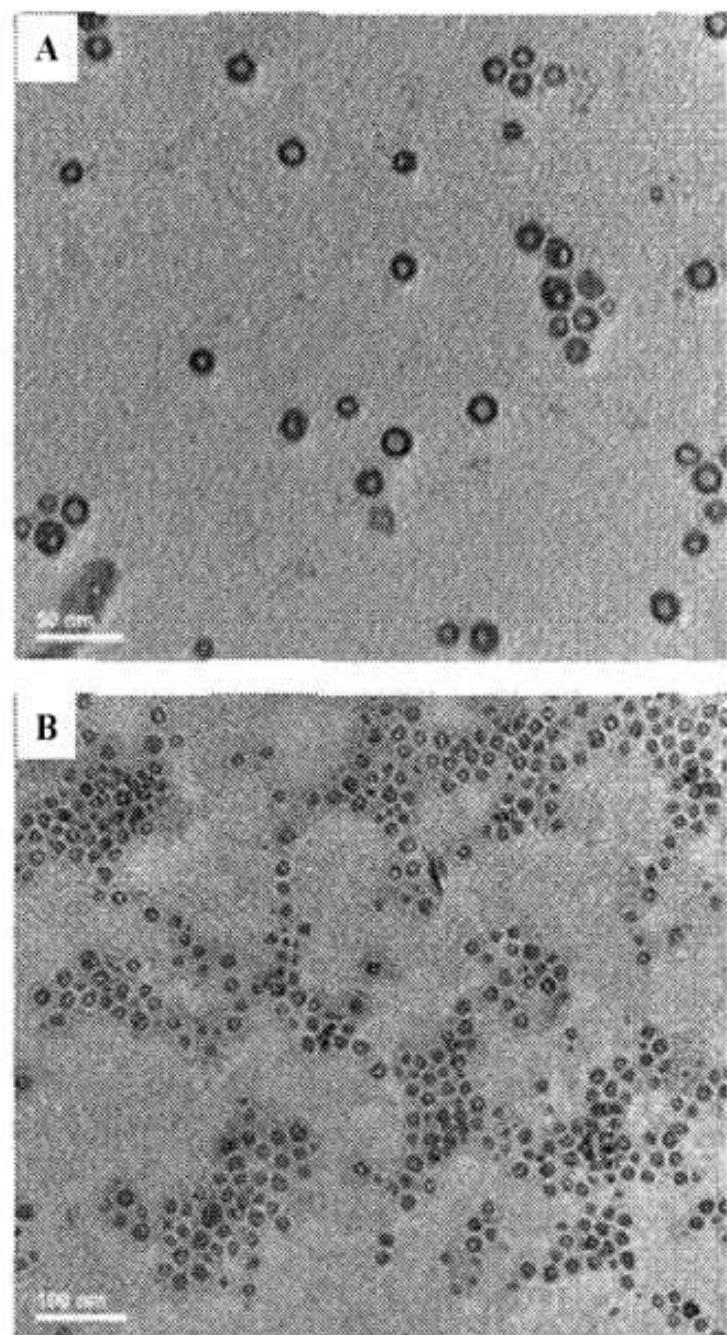
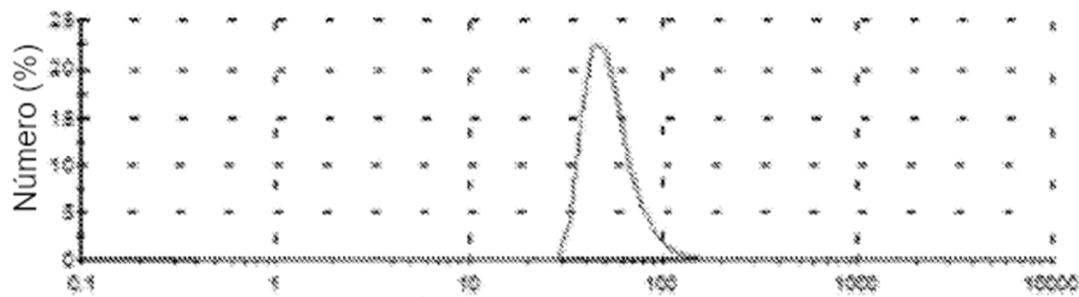
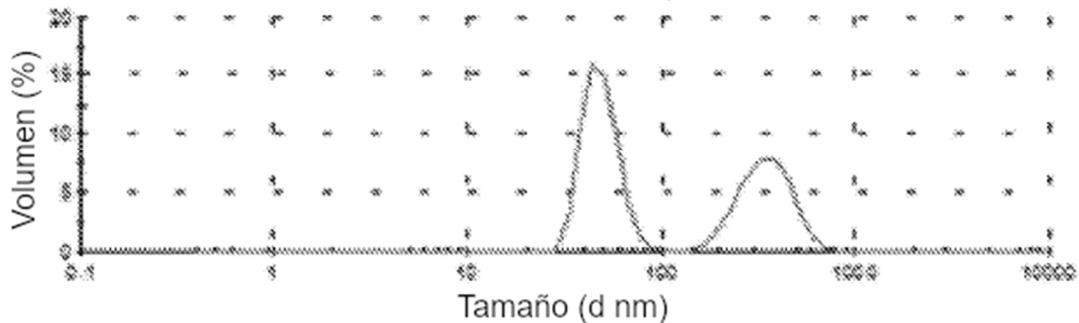


Figure 3C

Distribución de Tamaño por Número



Distribución de Tamaño por Volumen



Distribución de Tamaño por Intensidad

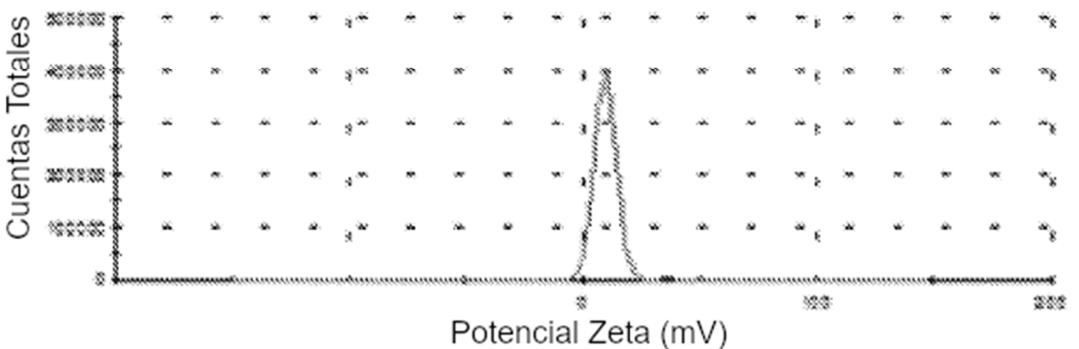
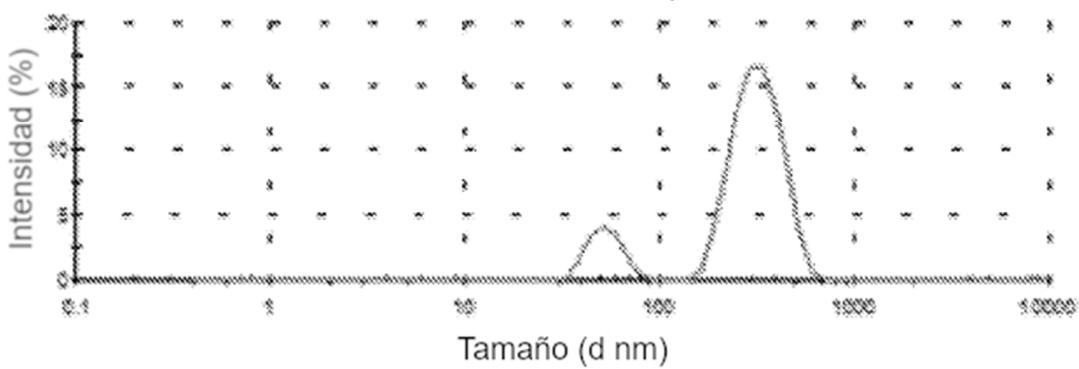


Figura 3D-E

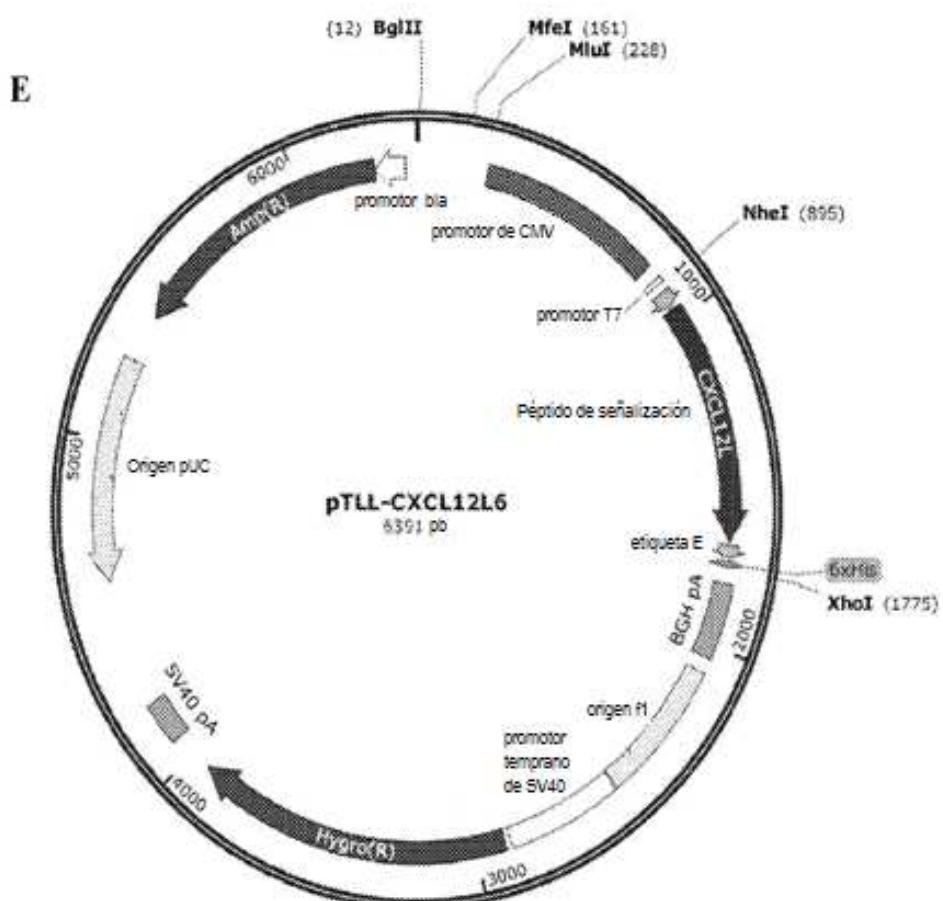
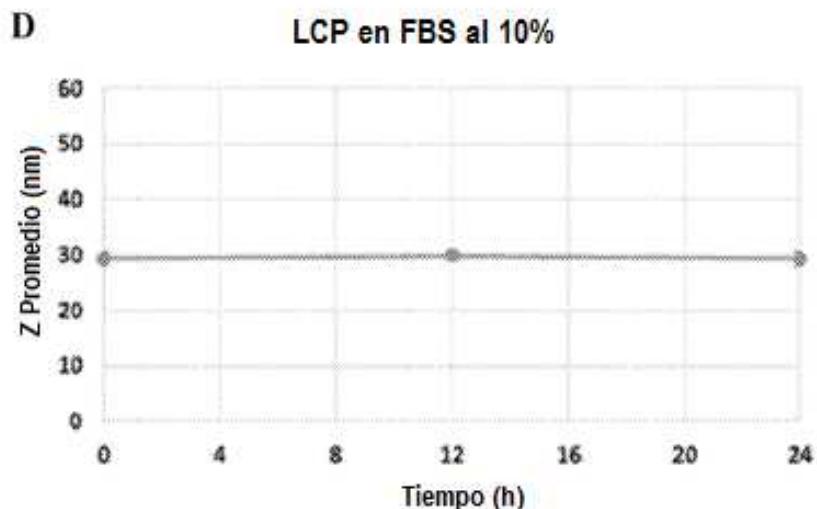


Figura 3F

GTIGACATTGATTATTGACTAGTTATTAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTCATAGCCC
ATATATGGAGTTCCCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGA
CCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAGTAGTAACGCCAATAGGGACTTCCAT
TGACGTCAATGGGTGGACTATITACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT
ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCCACTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGATTTC
TGGTATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGATTTC
CAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGGCACCACCAAAATCAACGGGACTTCC
AAAATGTCGTAACAACCTCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGT
CTATATAAGCAGAGCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAAAT
ACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGTAGCCACCATGAAATGGGTACCTTATCAGCC
TGCTGTTCTGTTAGCAGCGCCTACAGCGGATCCGAGGTGCACTGGTGAATCTGGCGGAG
GACTGGTGAGCCTGGGGCTCTGAGACTGTCTTGCCGCCAGCGGCTTCAGCCTGACCGT
GTACTCTGTGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGGAGCCCTGTG
GGGCTCTGGCGGAACCGAGTACAACAGCAACCTGAAGTCCCCTGACCATCAGCGGGACA
CCAGCAAGAACACCGTGTACCTGCAAGATGAAACAGCCTCGGGGGGAGGACACCGCCGTGTAC
TATTGCGCCAGAGATCAGGGCCTGAACTACGGCAGCCTGTTGACTATTGGGGCCAGGGCACA
CTCGTGACCGTGTCTAGCGGAGGGCGAGGAAGTGGCGGAGGGGATCTGGCGGCGAGGCAG
CGATATTAGATGACCCAGTCCCCAGCAGCCTGAGCGCCTCTGTTGACAGAGTGTACCAT
CACCTGTCGGGCCAGCGAGAGCATCAGCTACAGCCTGTCCTGGTATCAGCAGAACGCCGCAA
GGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAACGCCGTGAAGCTGGAAGCGGGCGTCCCAGCAGATTTC
CGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCTCCCTGAGCCCAGGGACTTCG
CACCTACTACTGCAAGCAGTACTGGAACACCCCTTACCTTGGACAGGGCACCAAGGTGGA
AATCAAGAGAGCGGCCGCTGGCGCCCCCTGTGCCTTATCCTGATCCCCTGGAACCTAGAGGCGG
CAGCCACCACCATCACCACTGATGA (SEQ ID NO: 63)

Figura 4A-B

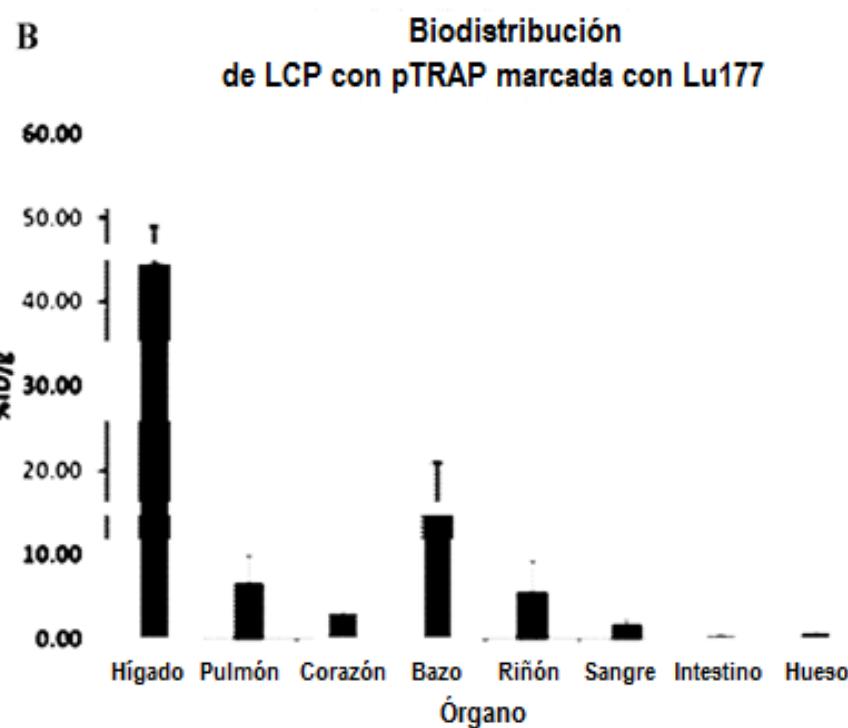
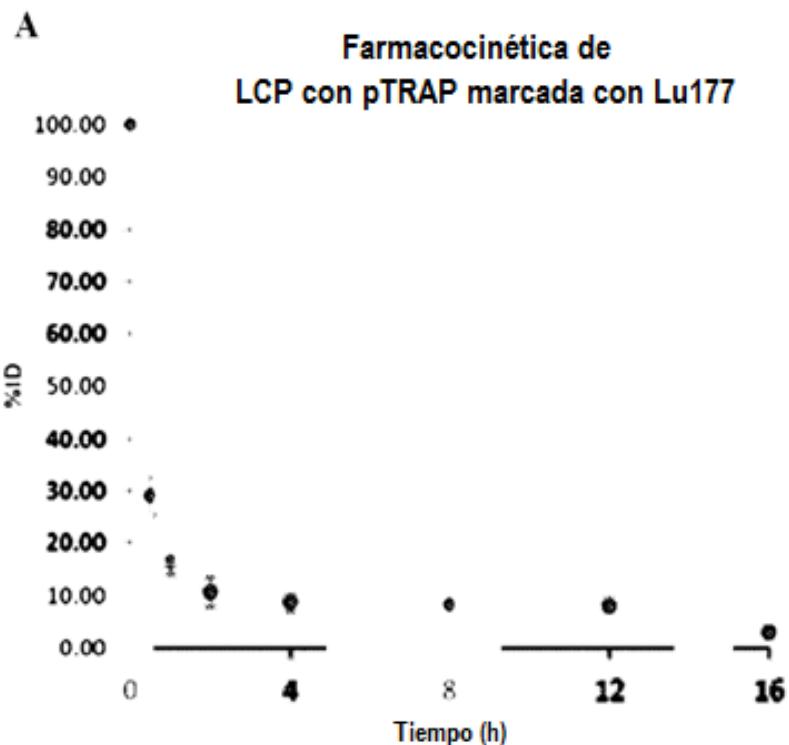
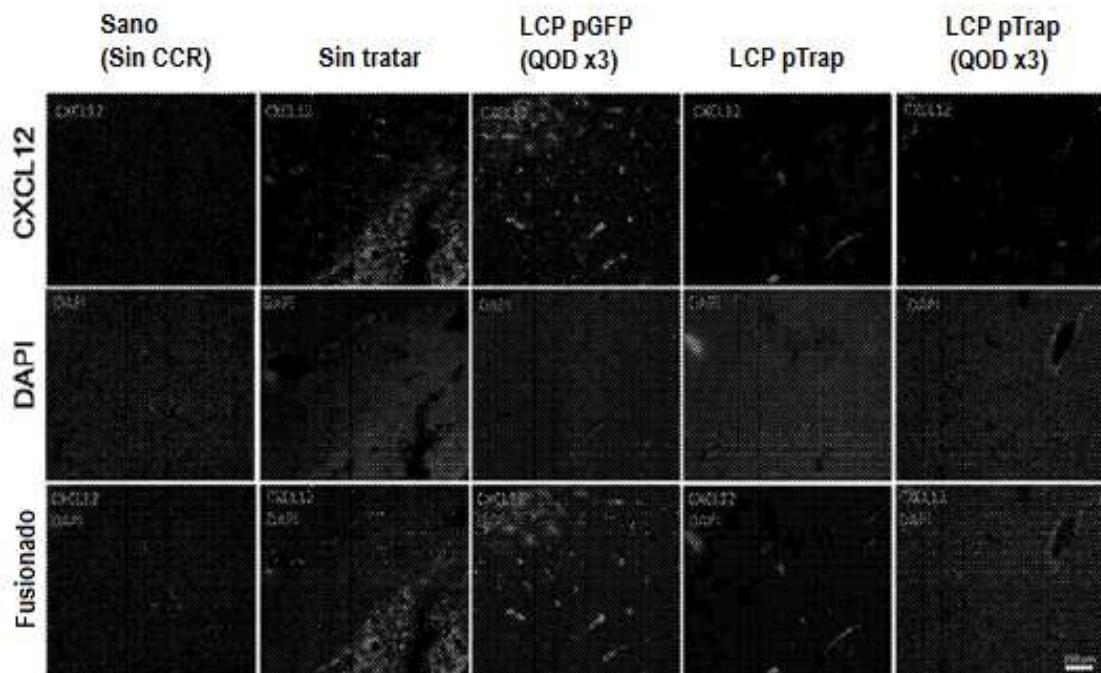


Figura 5A



Expresión en hígado de CXCL12

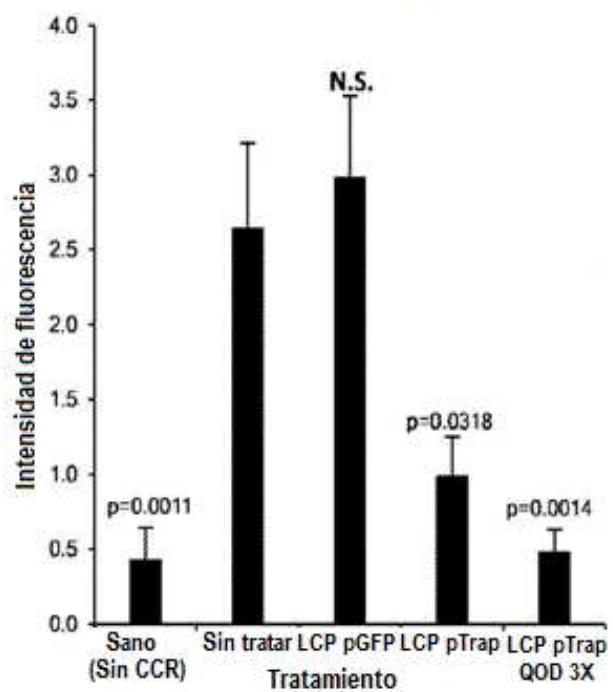


Figura 5B

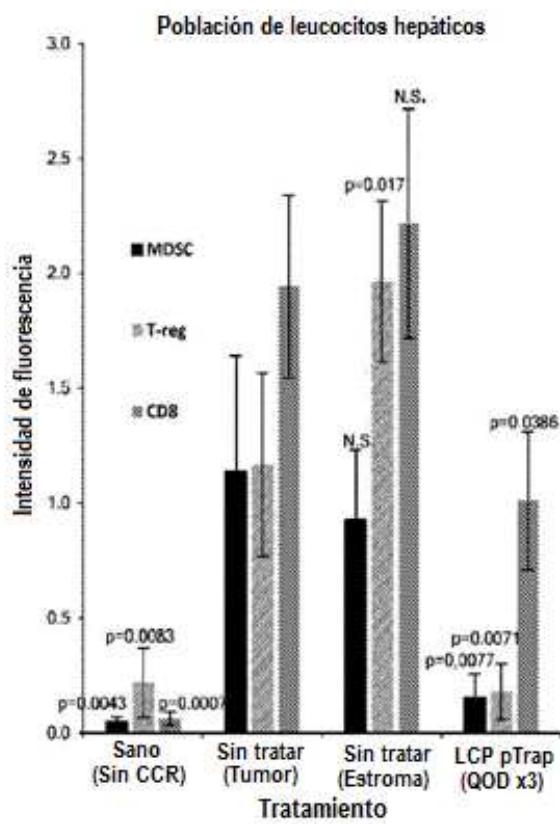
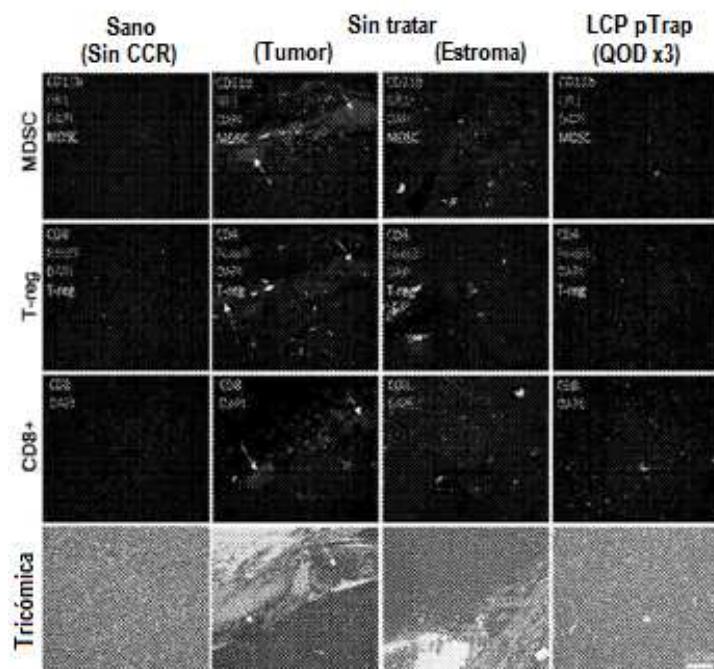


Figura 5C

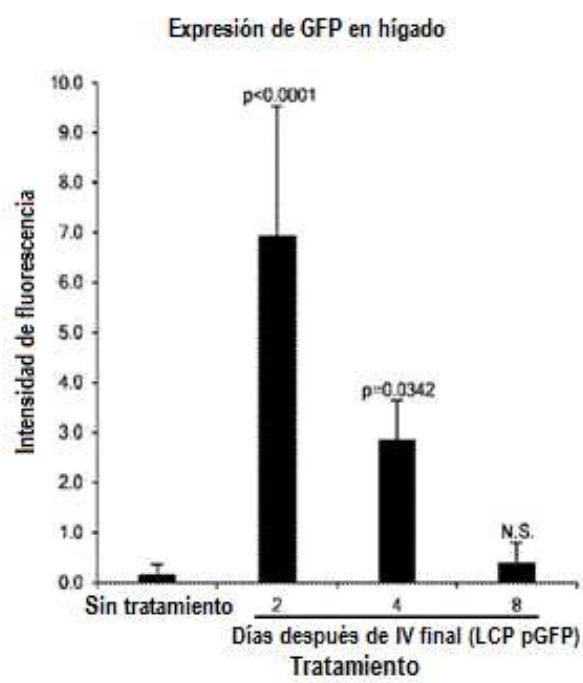
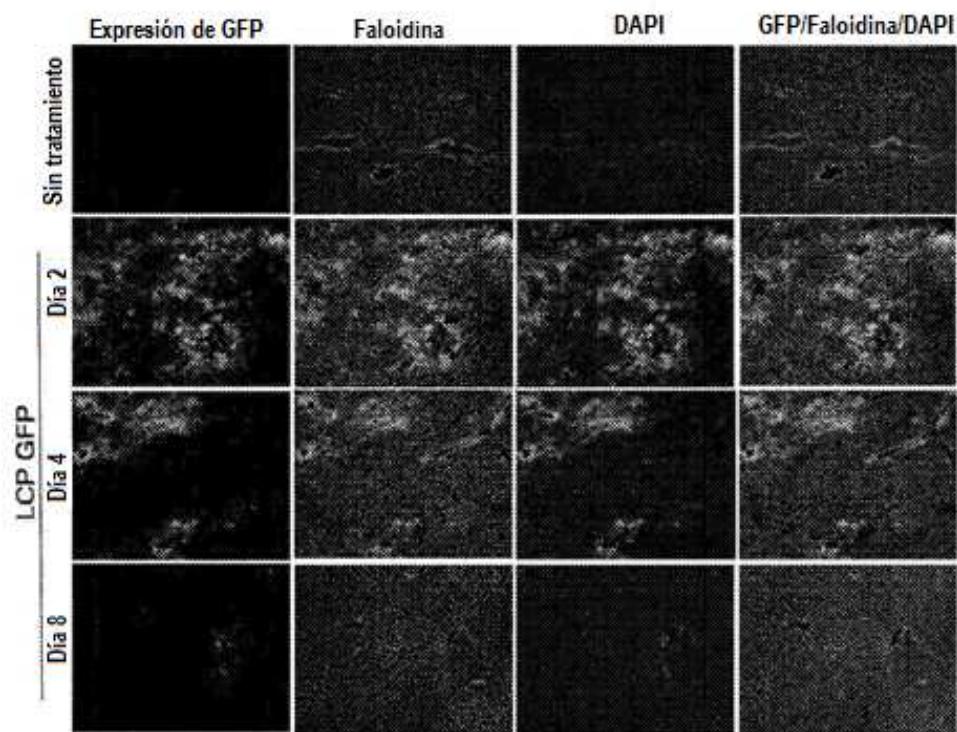


Figura 5D-E

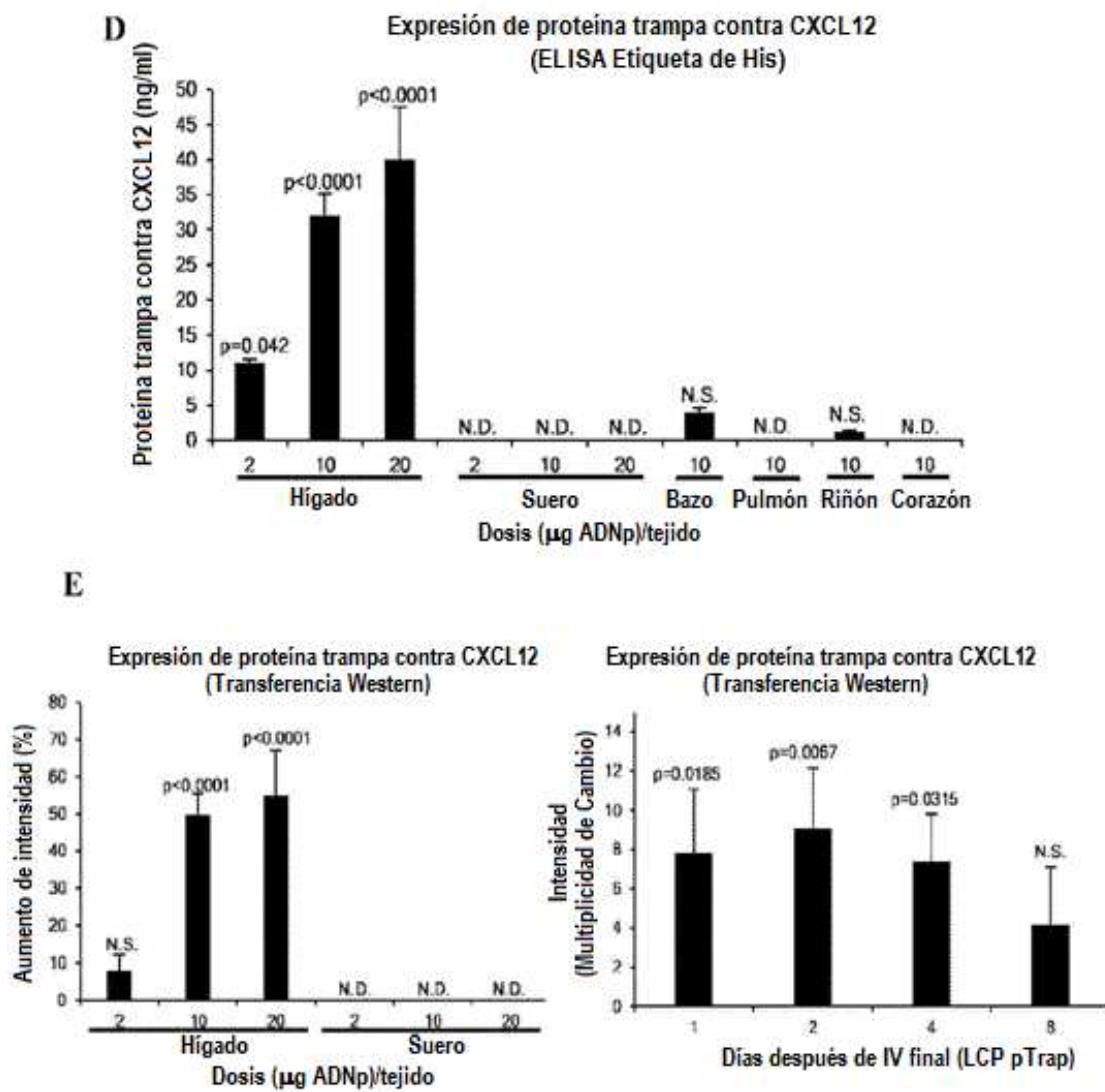


Figura 5F

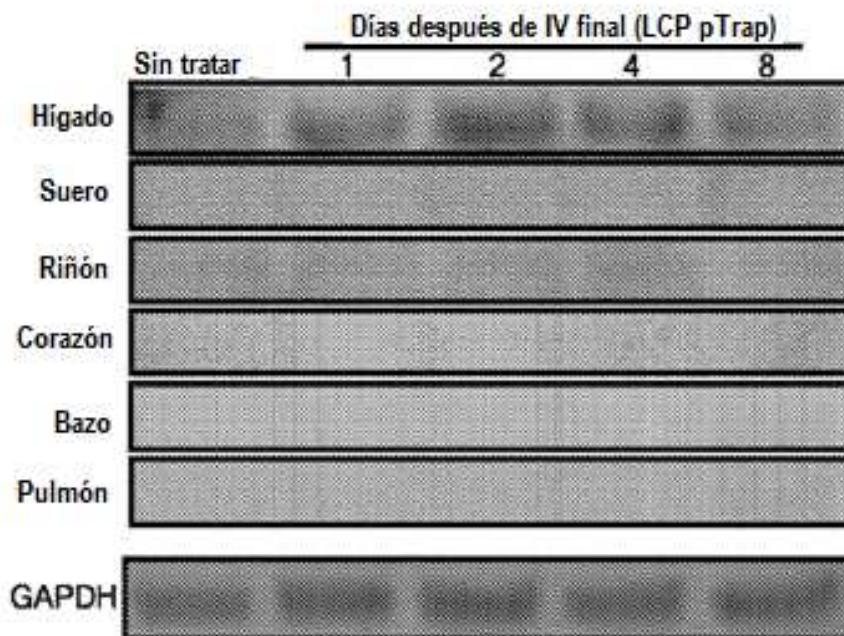


Figura 6A

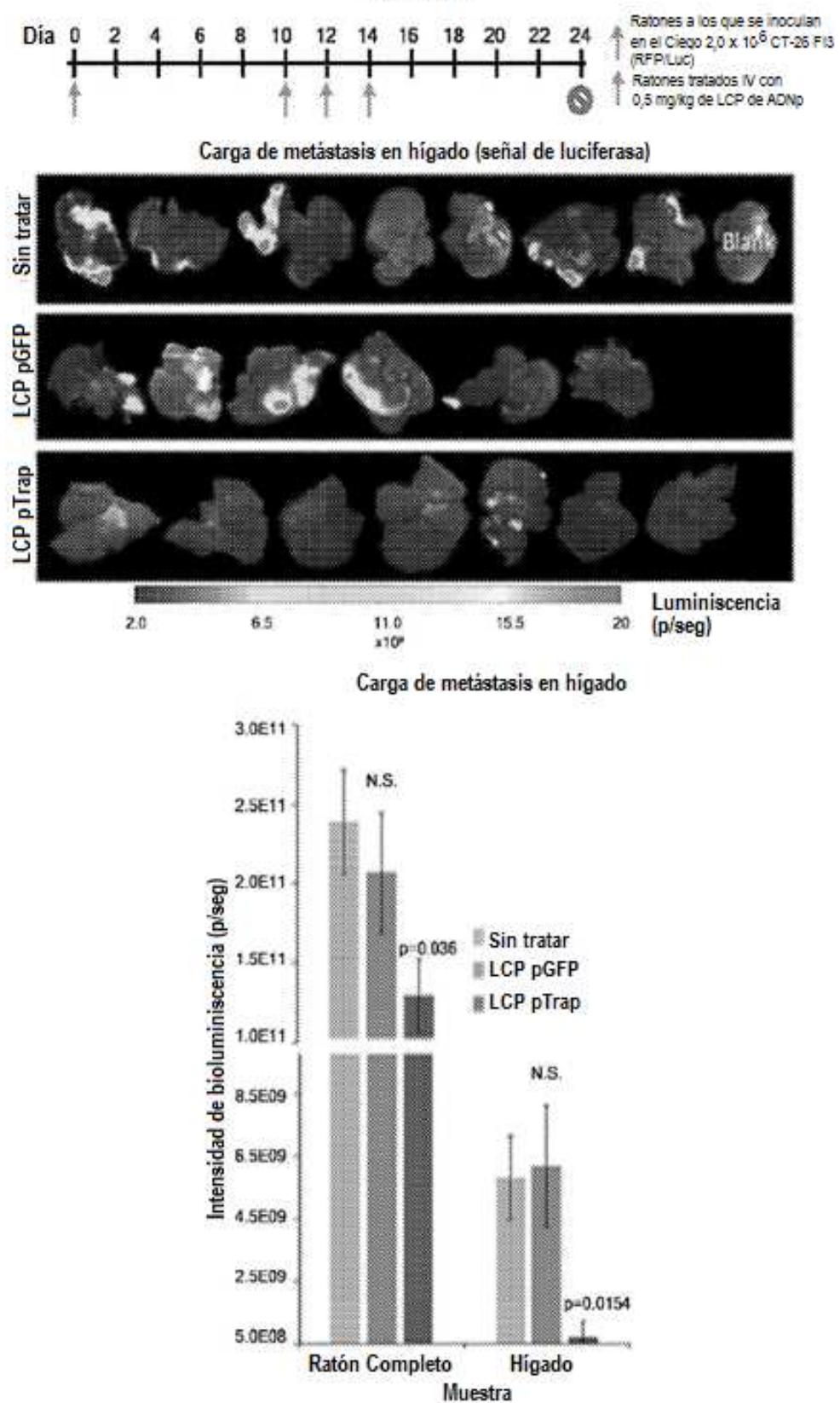


Figura 6B

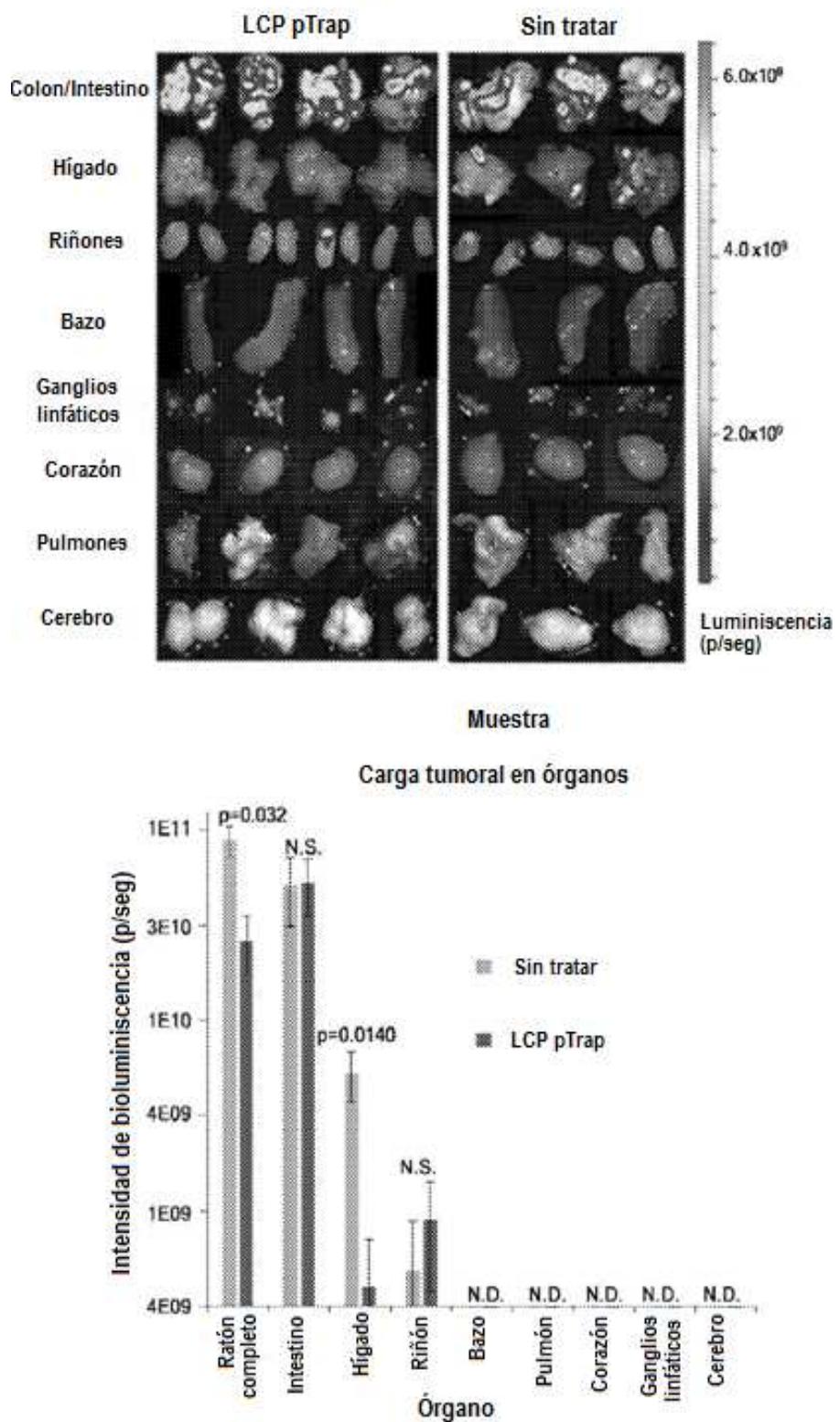


Figura 6C

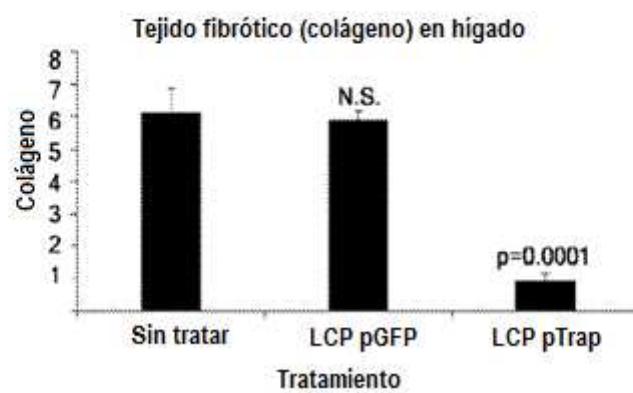
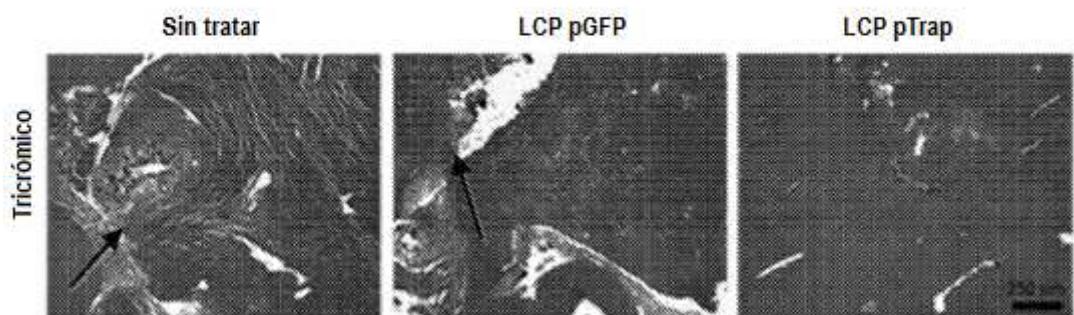


Figura 7

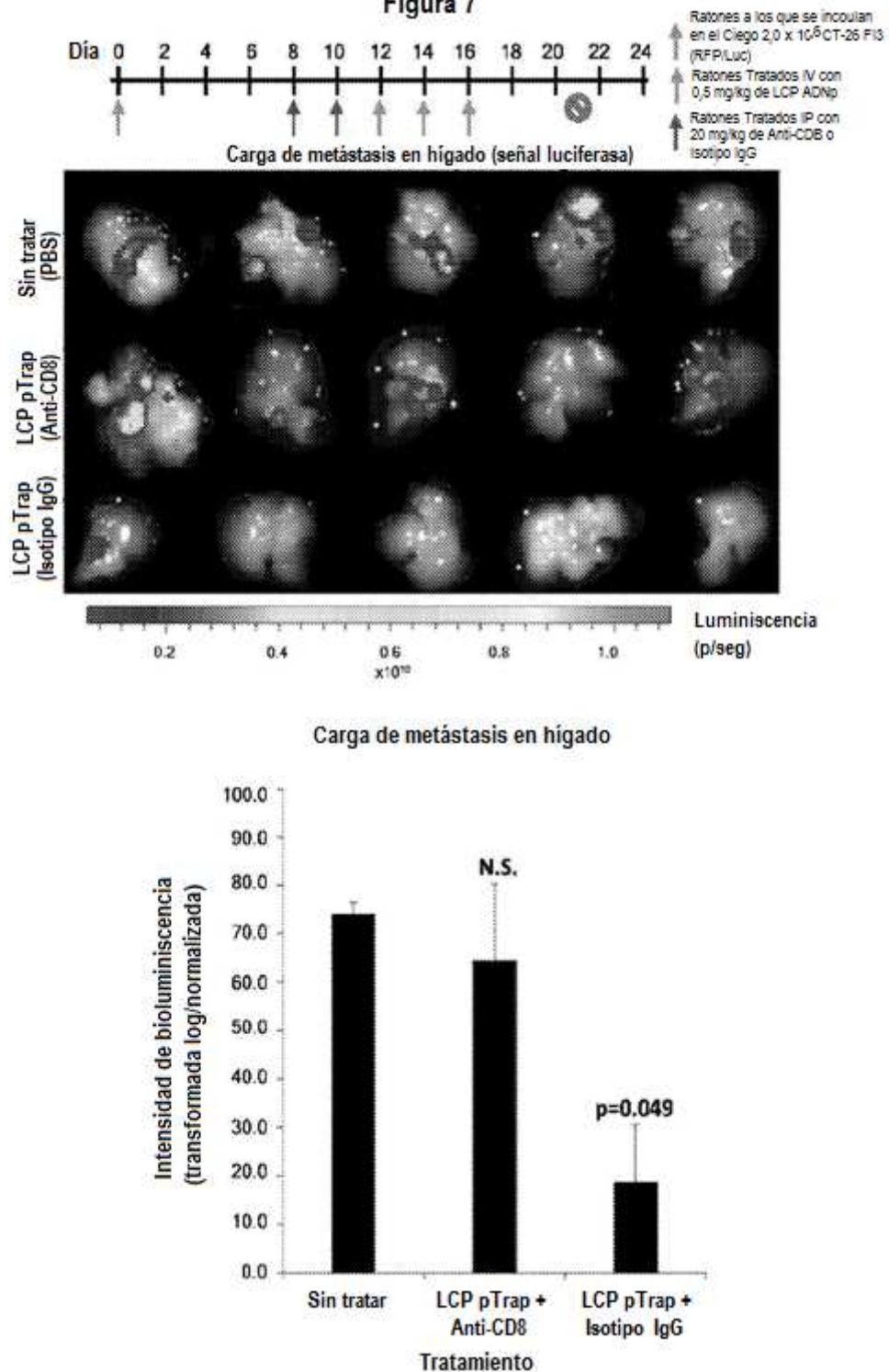


Figura 8a

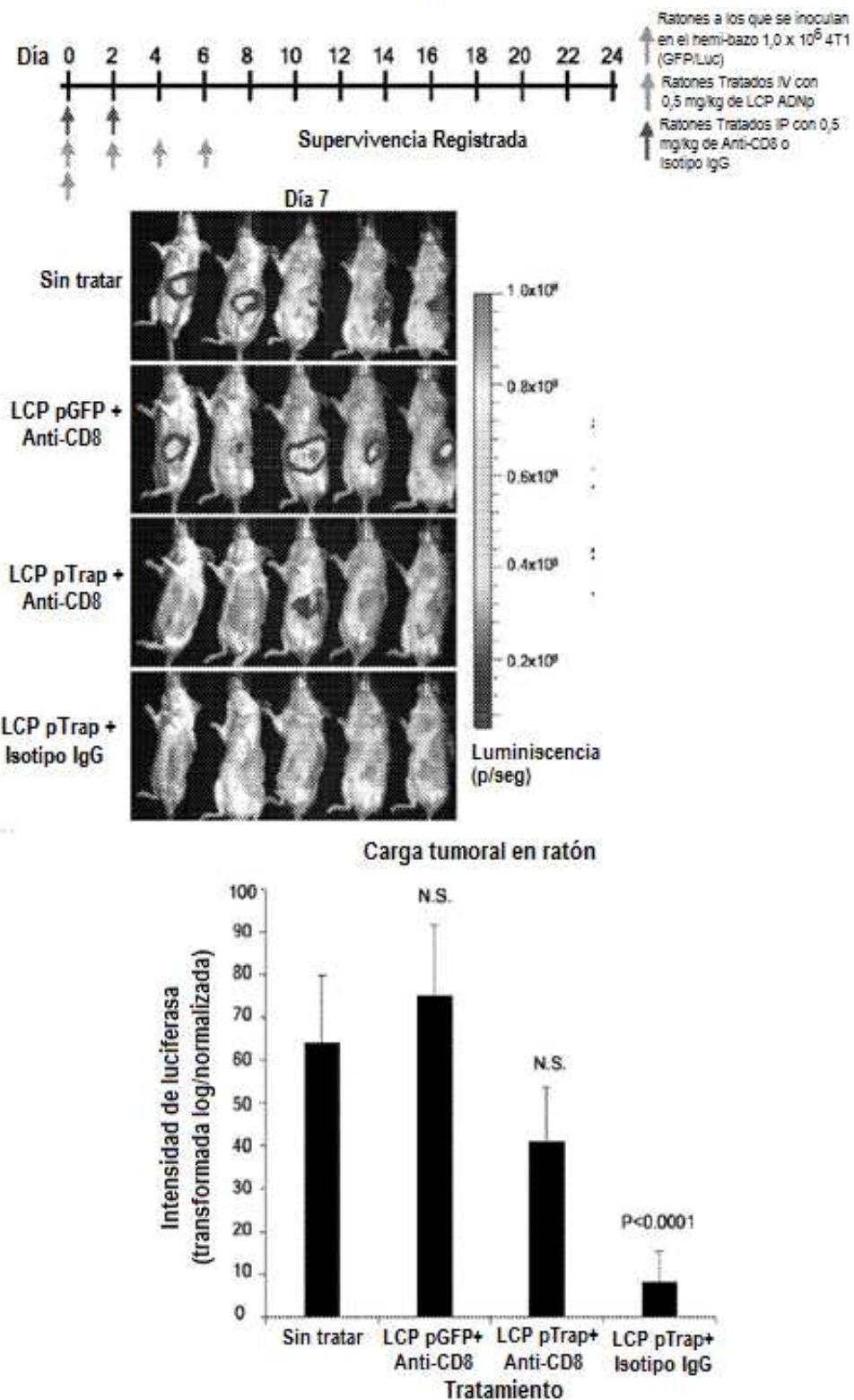


Figura 8B-C

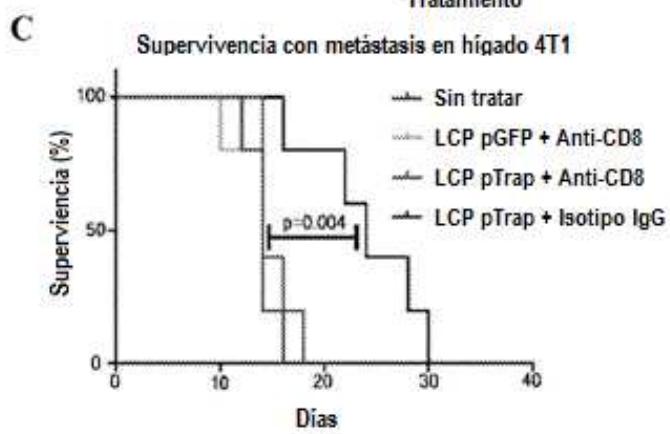
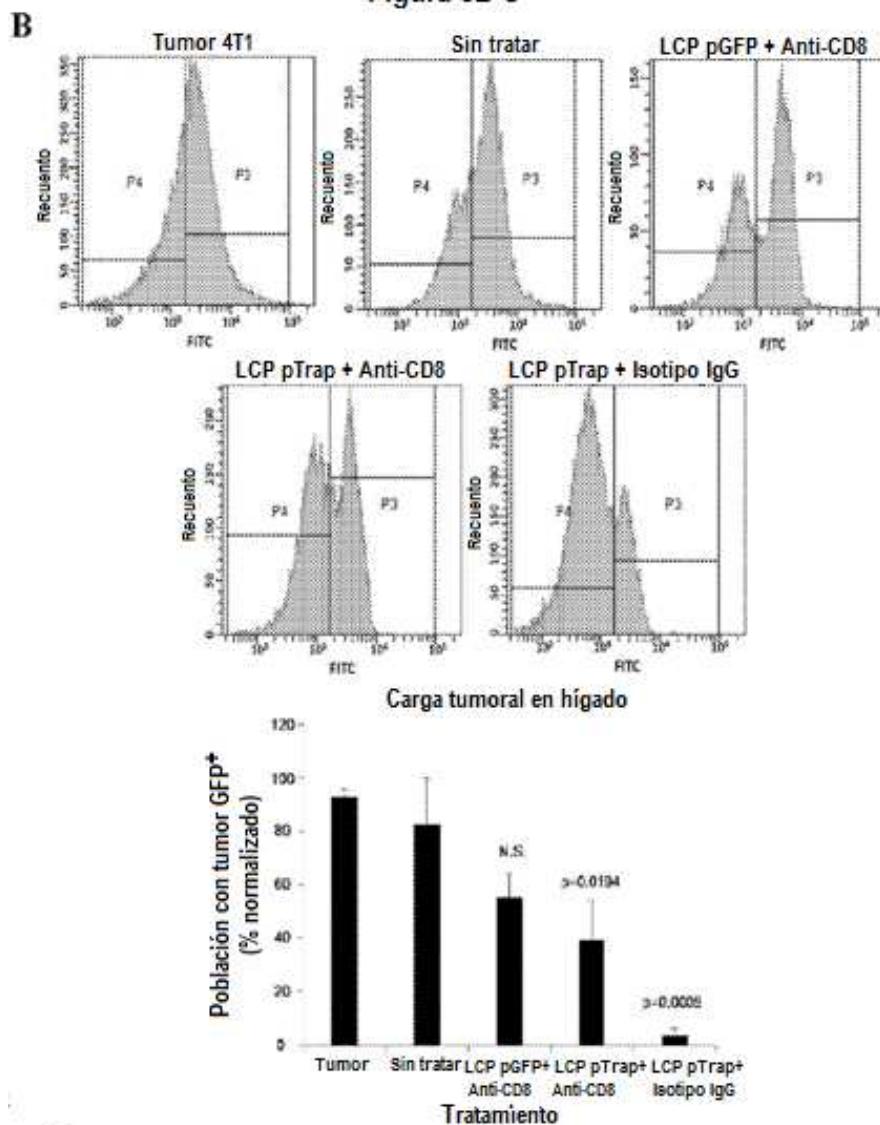


Figura 9A-B

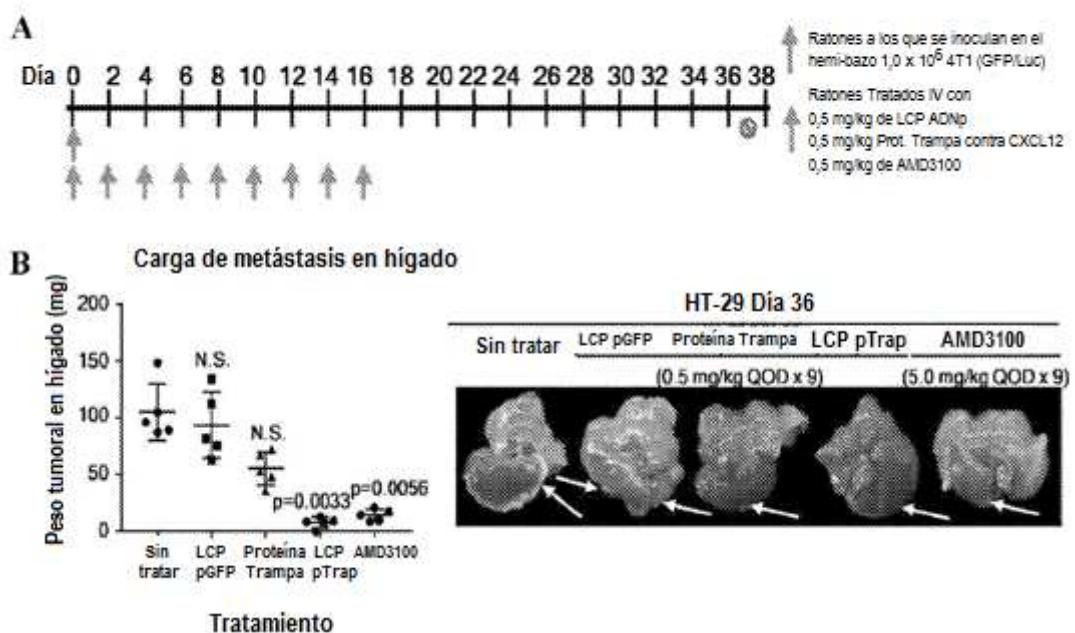


Figura 10A

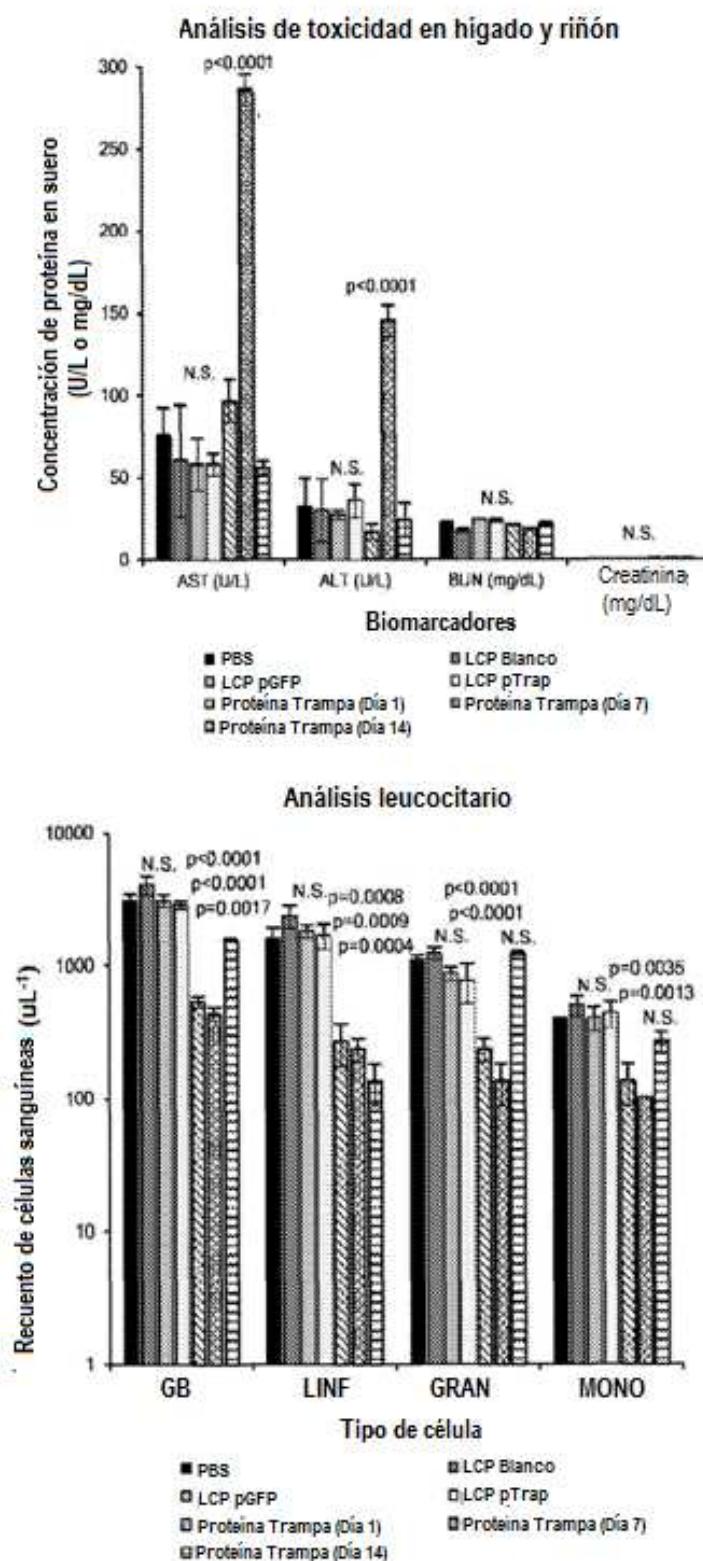


Figura 10B

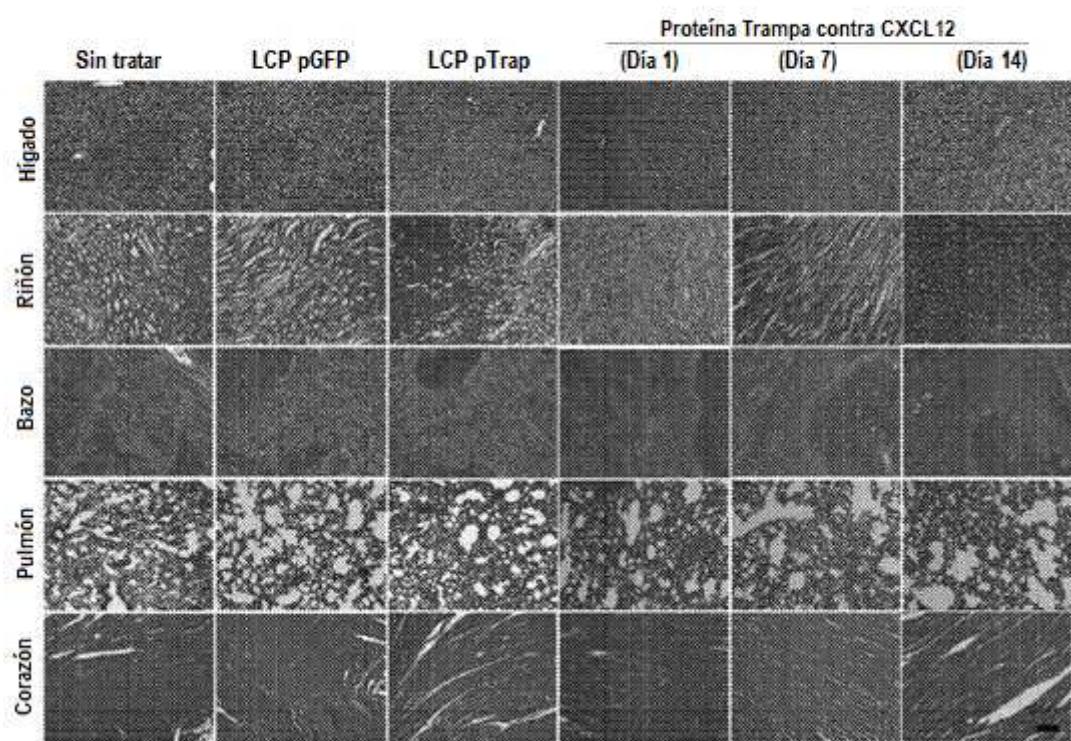


Figura 11

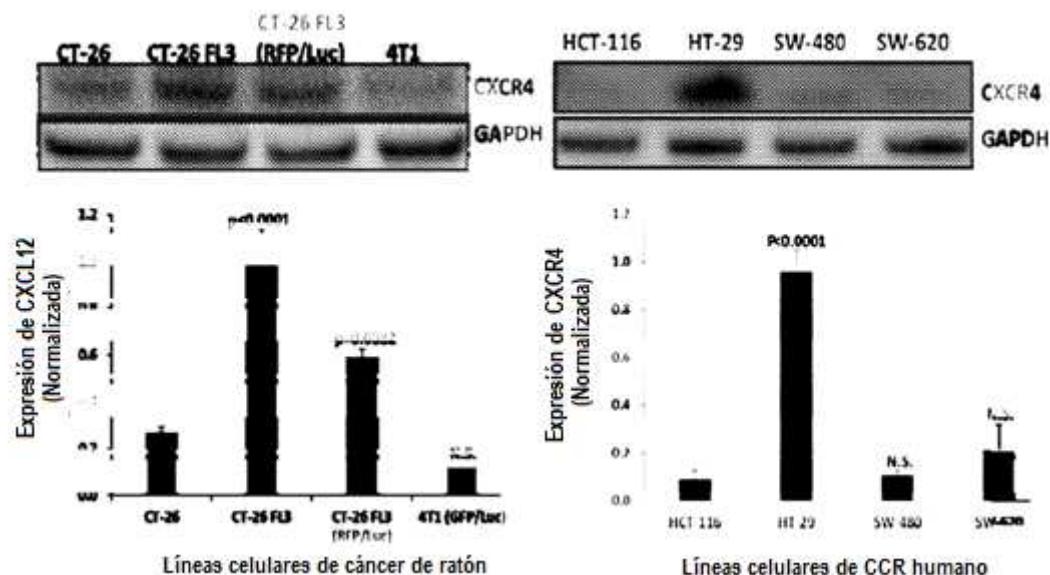


Figura 12

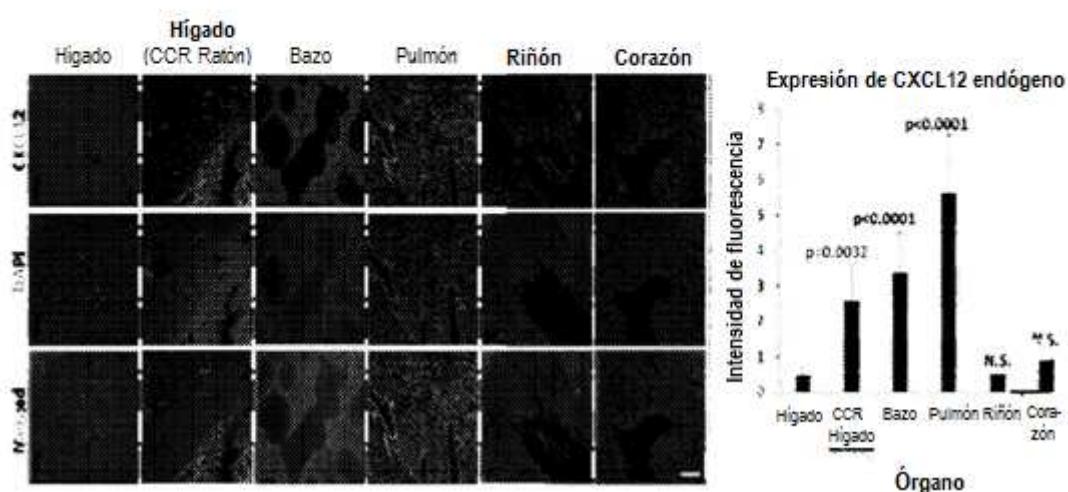


Figura 13

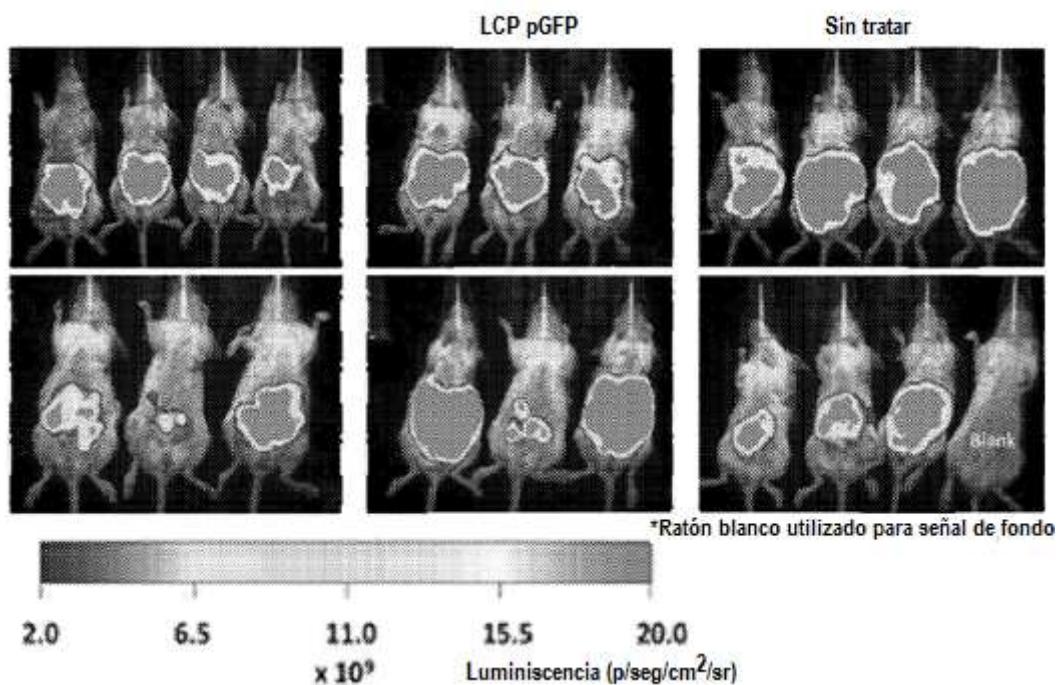


Figura 14A-C

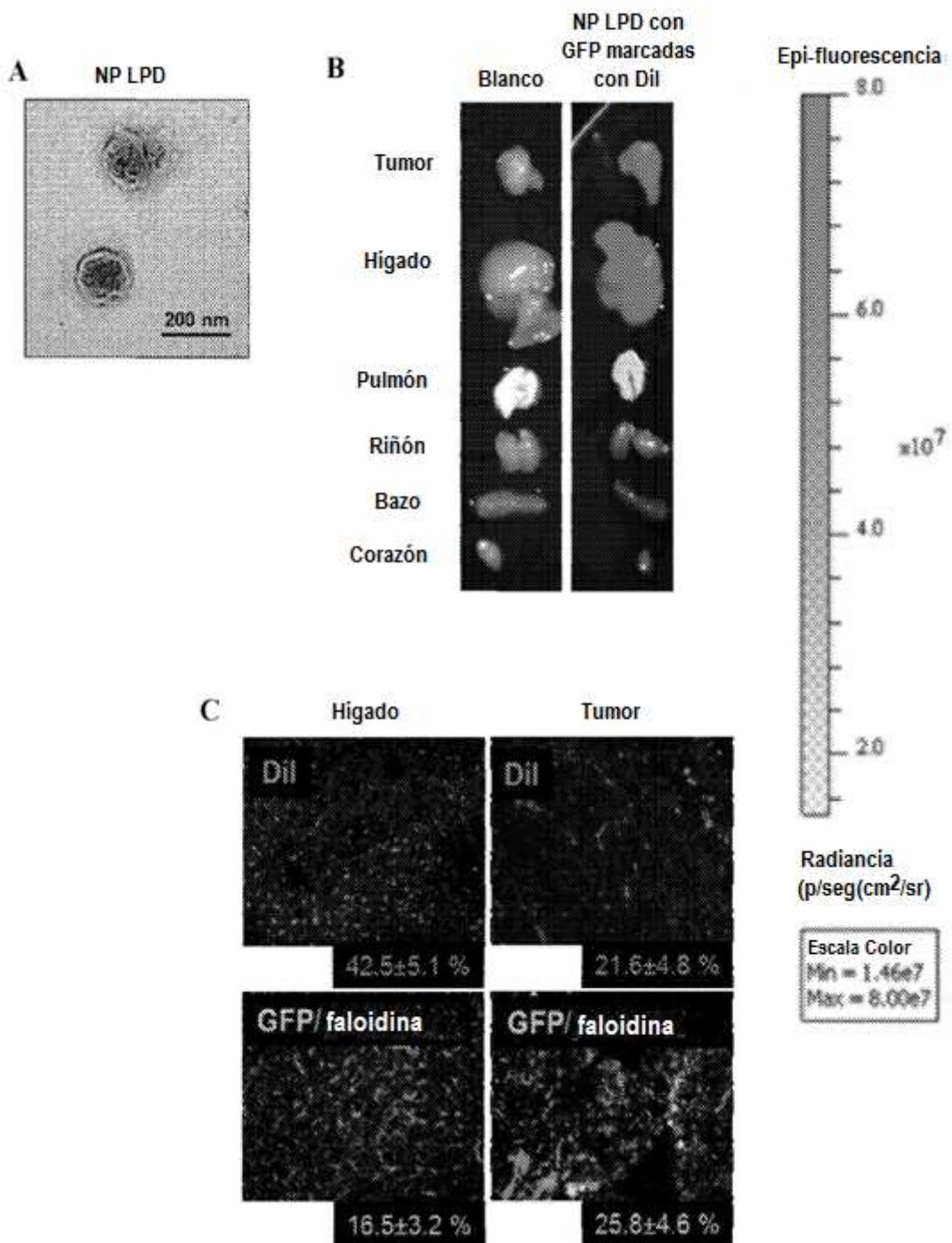


Figura 14D

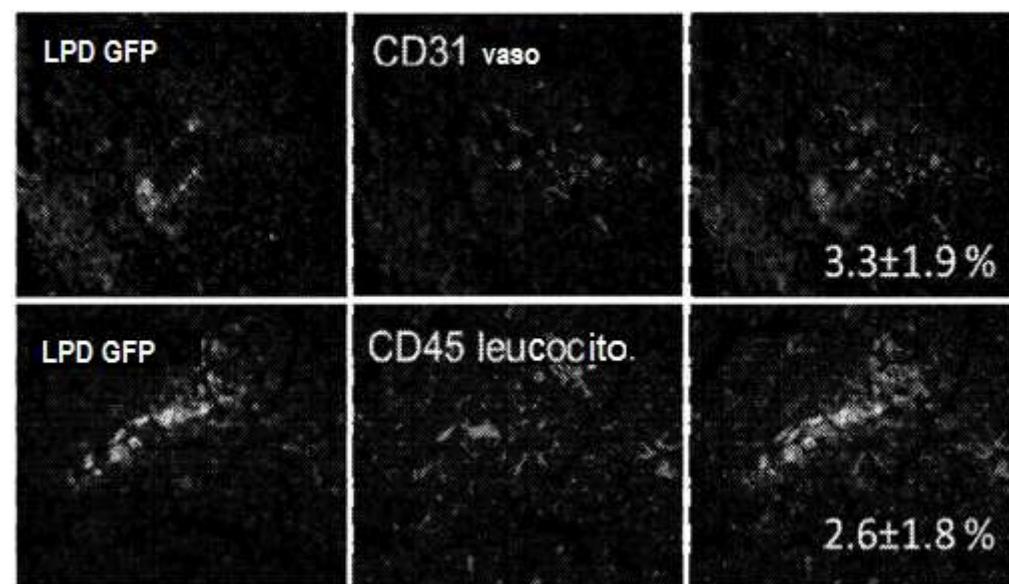
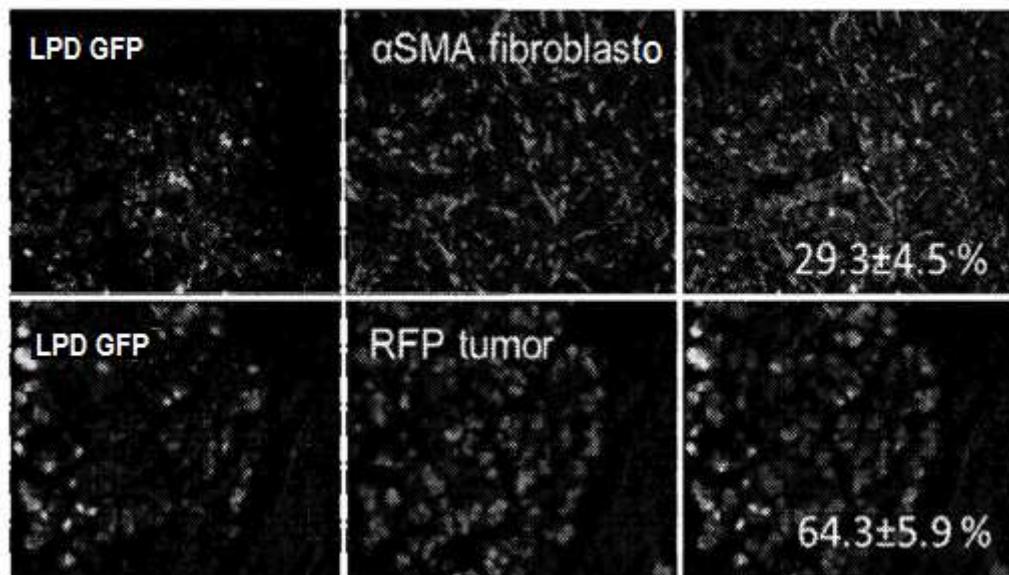


Figura 14E

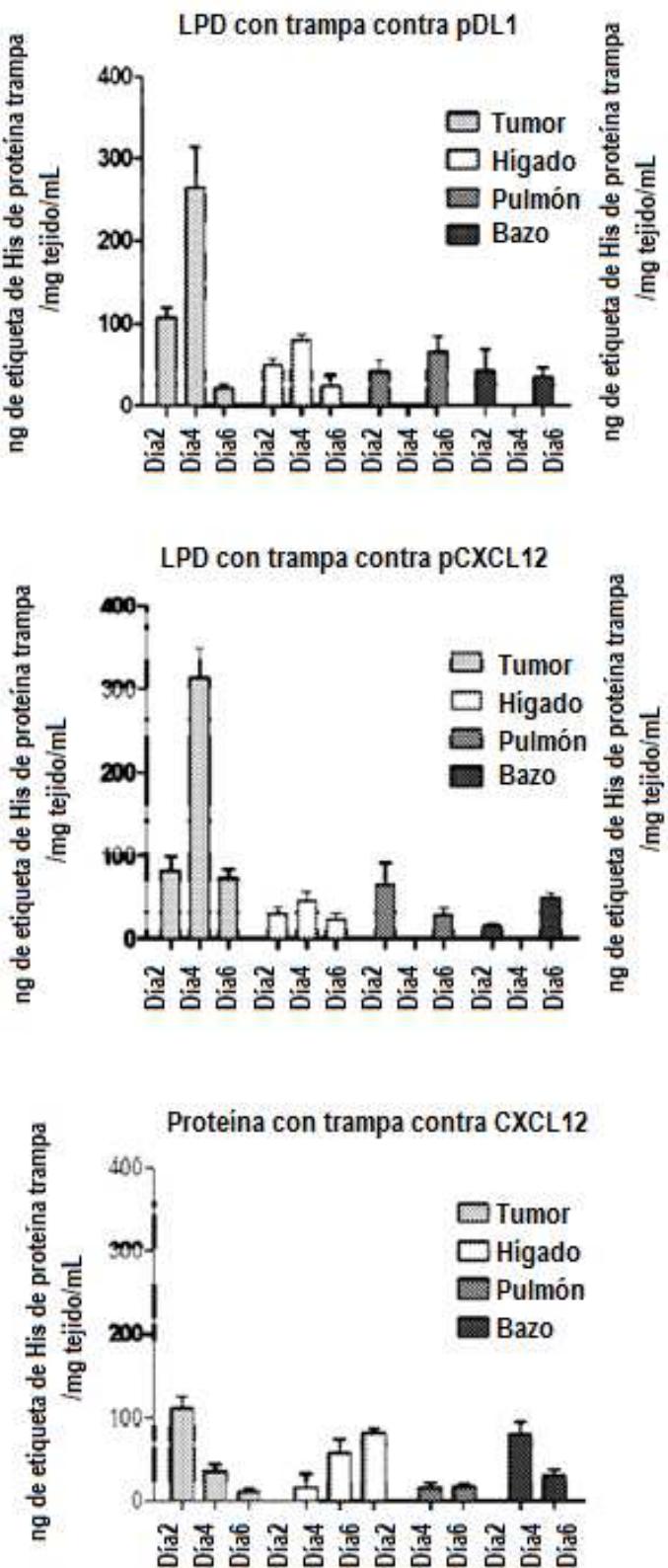
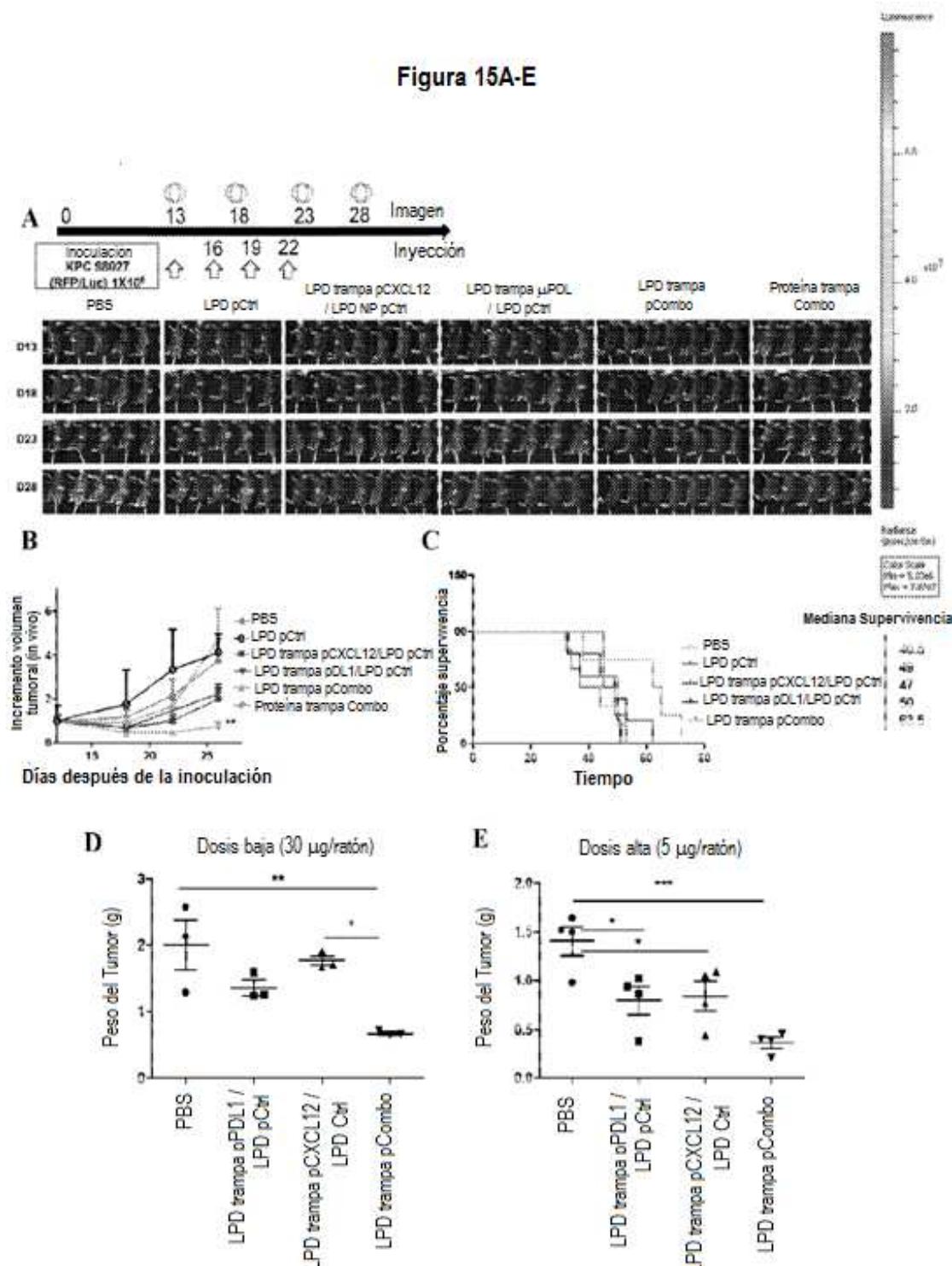


Figura 15A-E



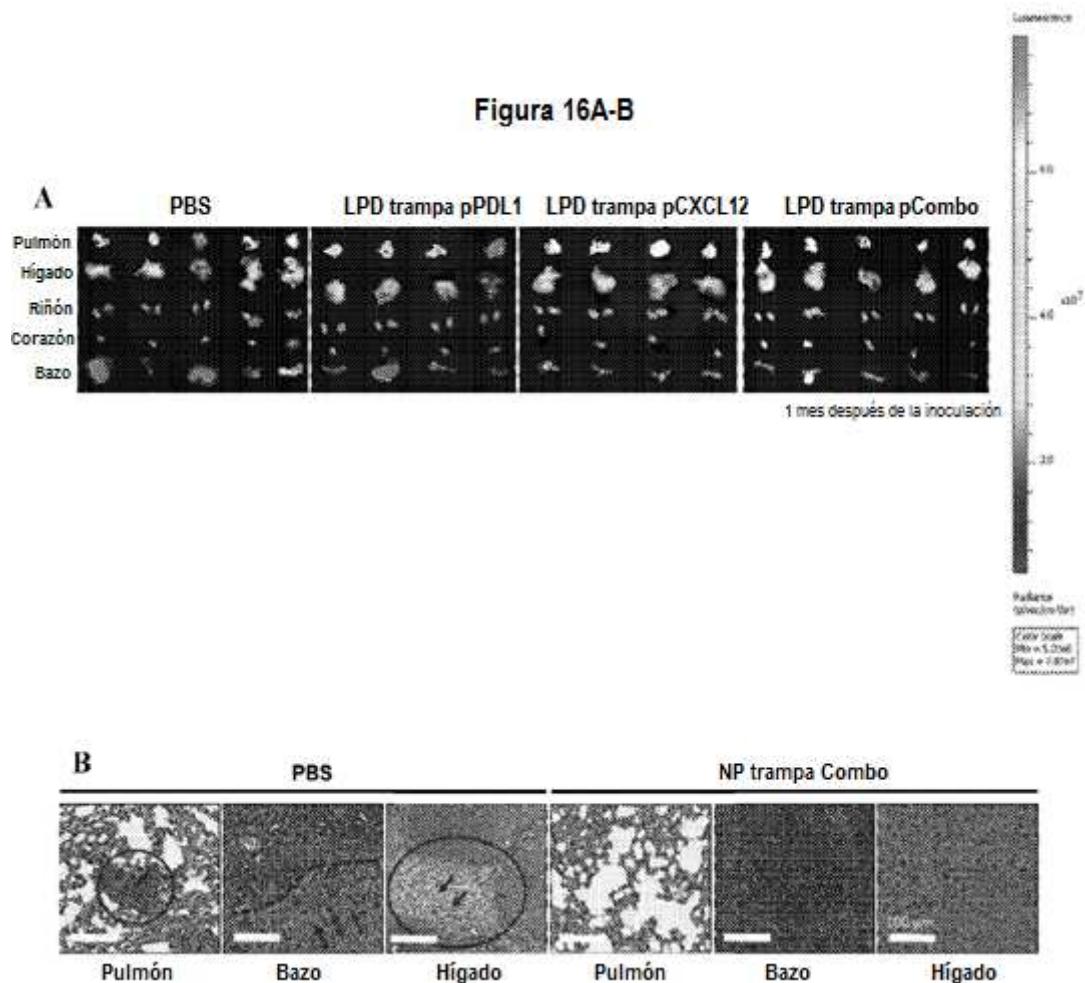


Figura 17A-B

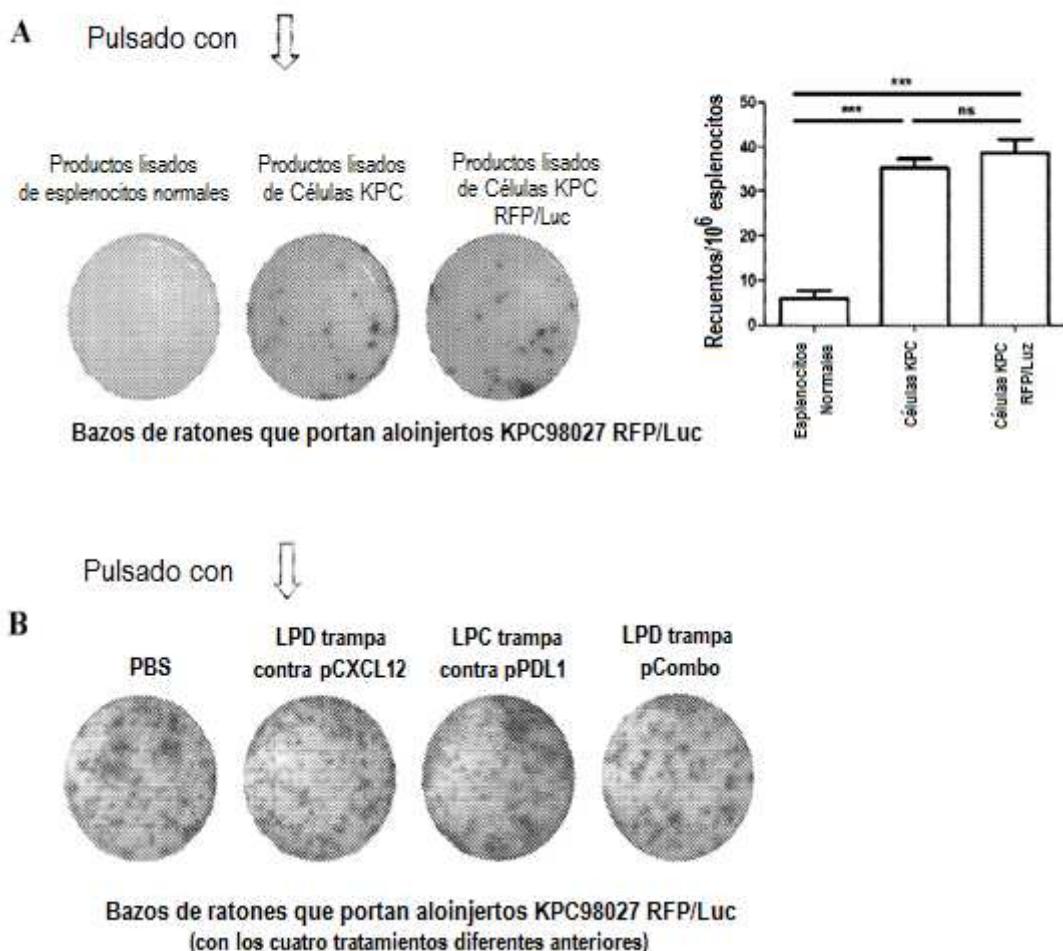


Figura 18A

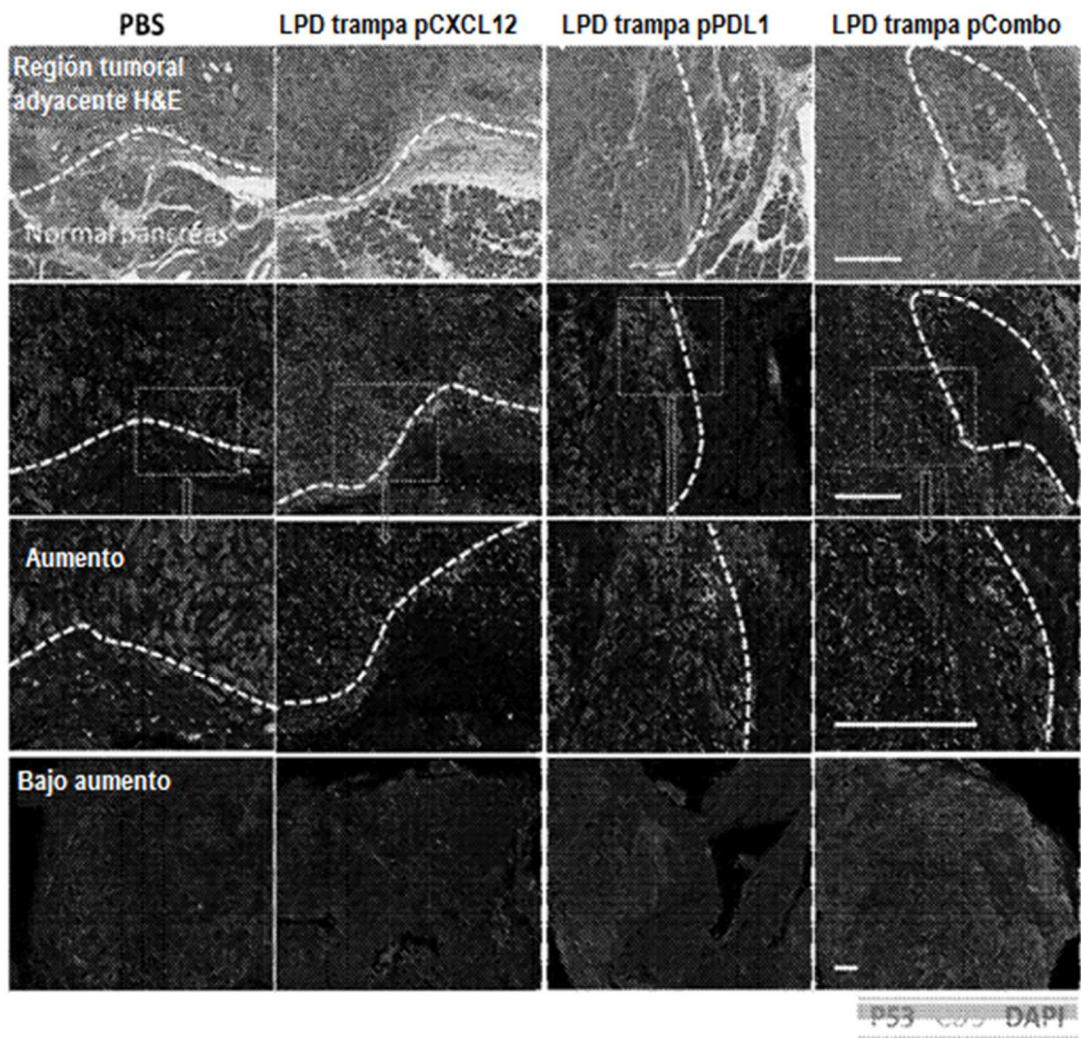
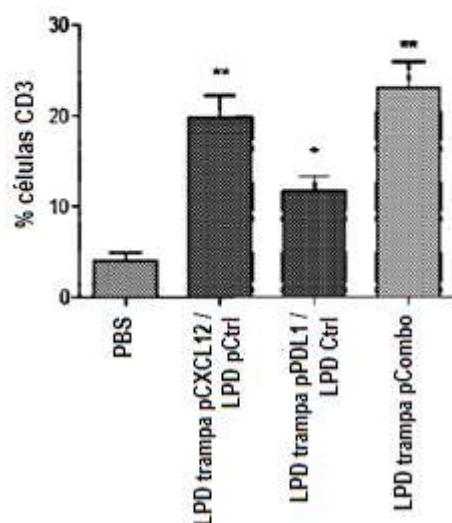
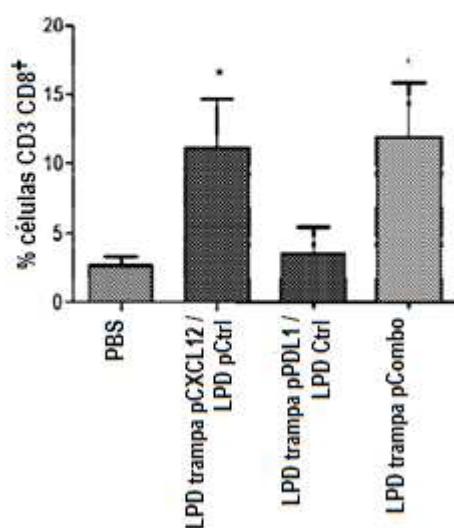


Figura 18B-C

B Cuantificación de las Imágenes dentro de las Regiones Tumorales



C Cuantificación por Citometría de Flujo dentro de las Regiones Tumorales



Luminiscencia

Figura 18D-E

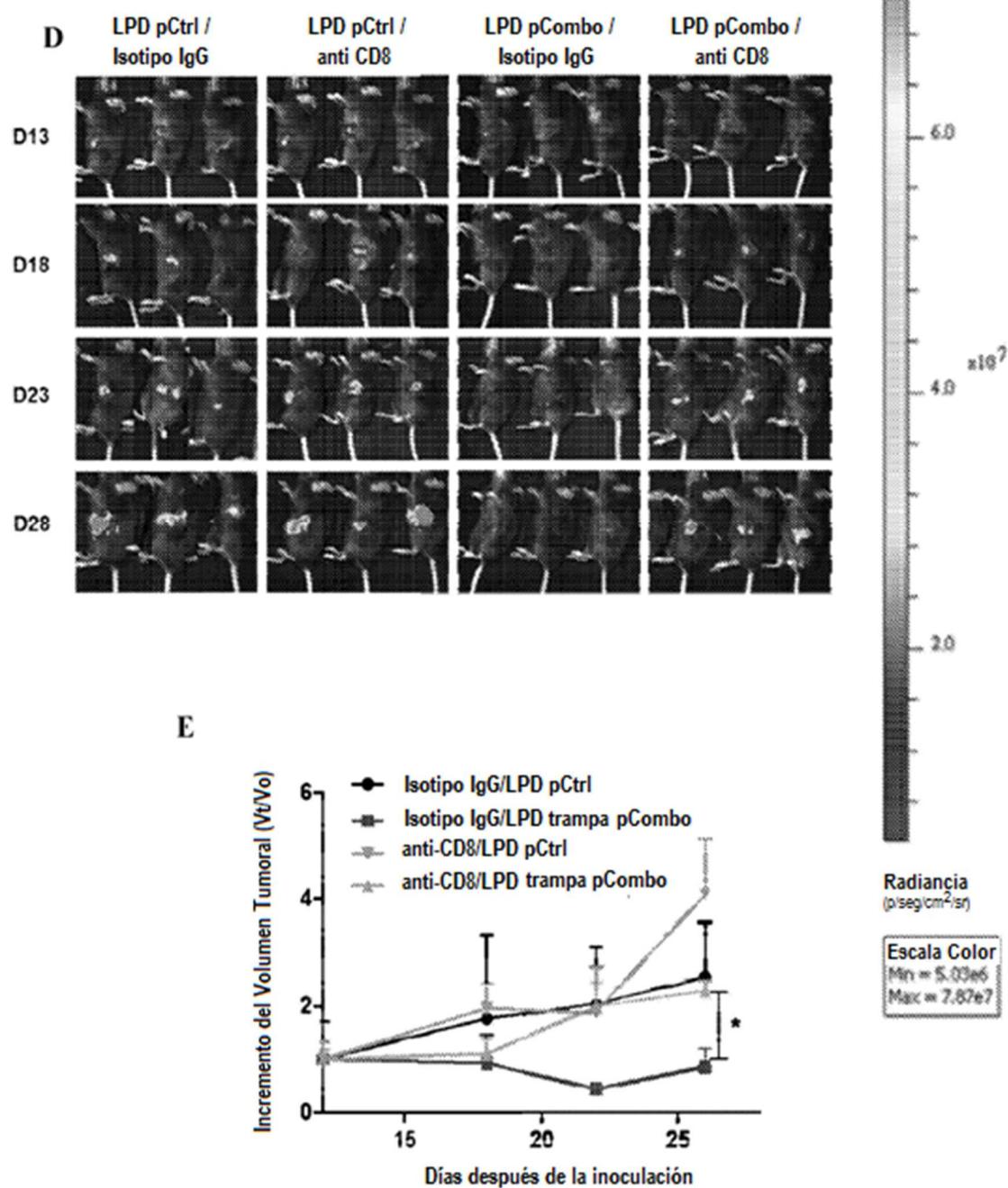


Figura 19A

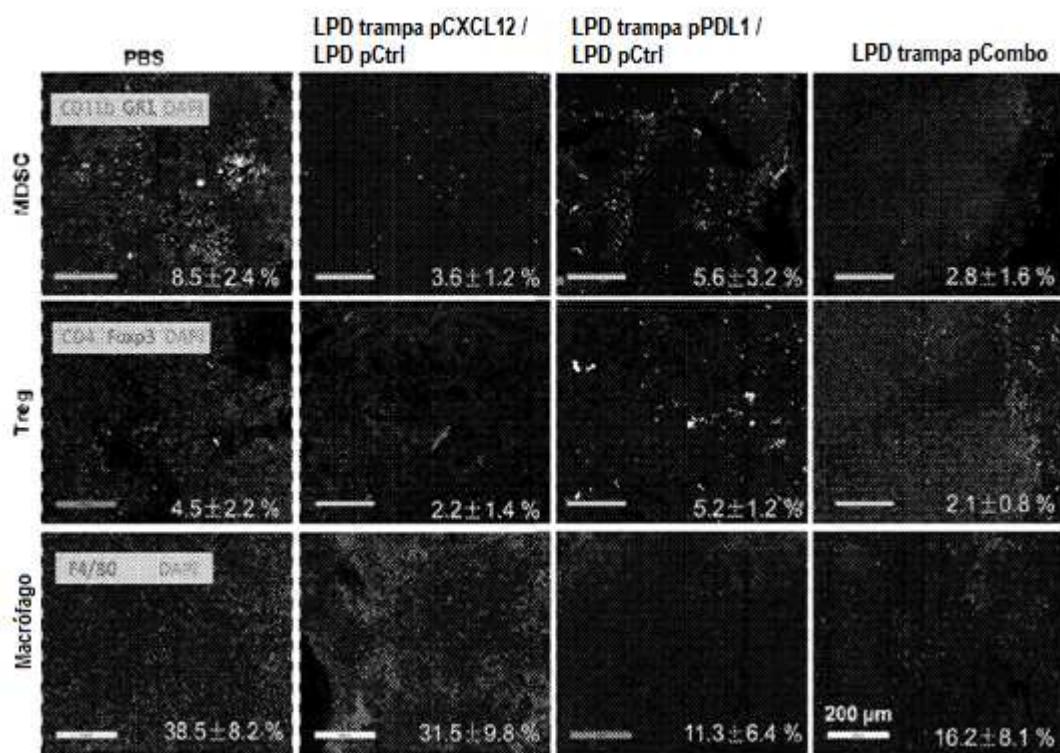


Figura 19B

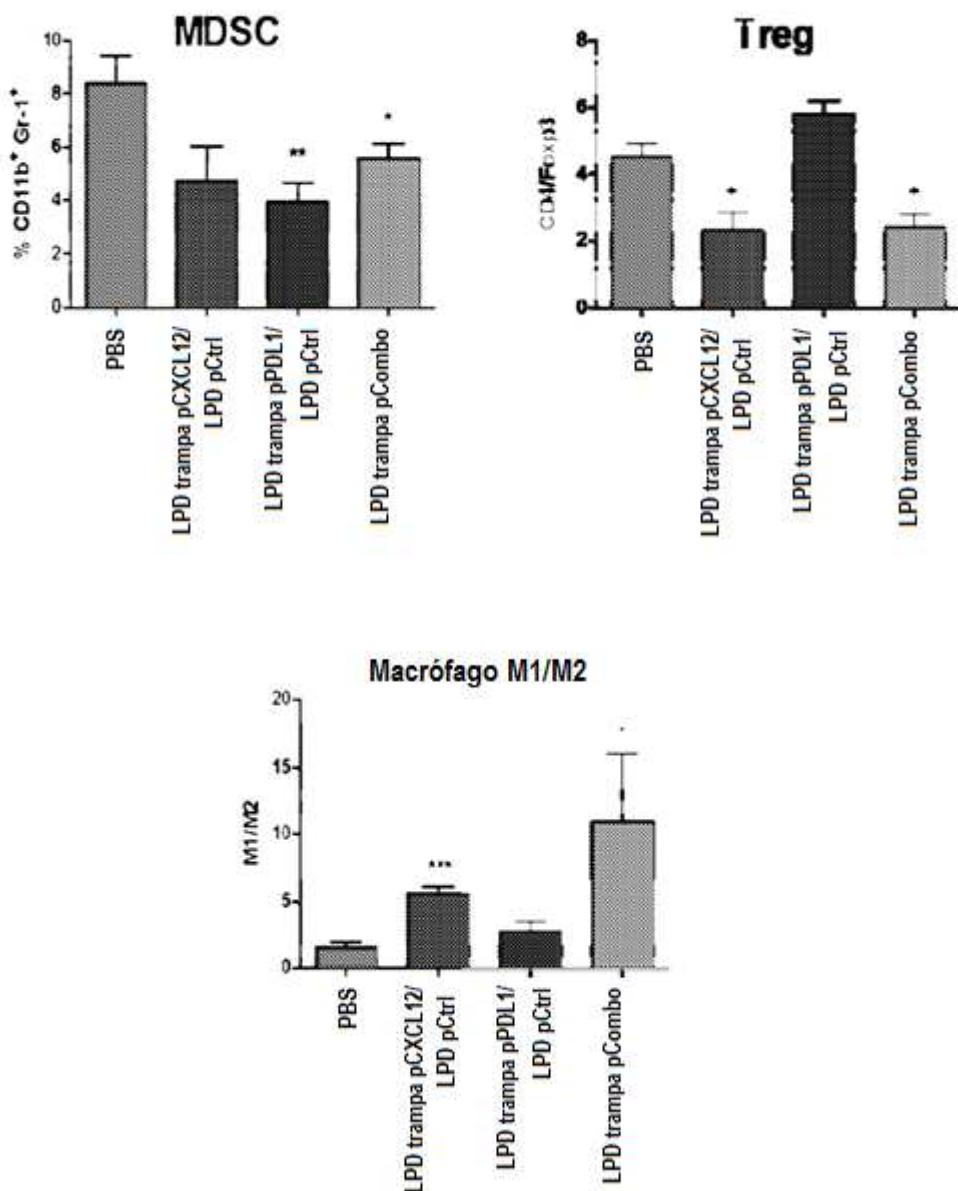


Figura 20A-B

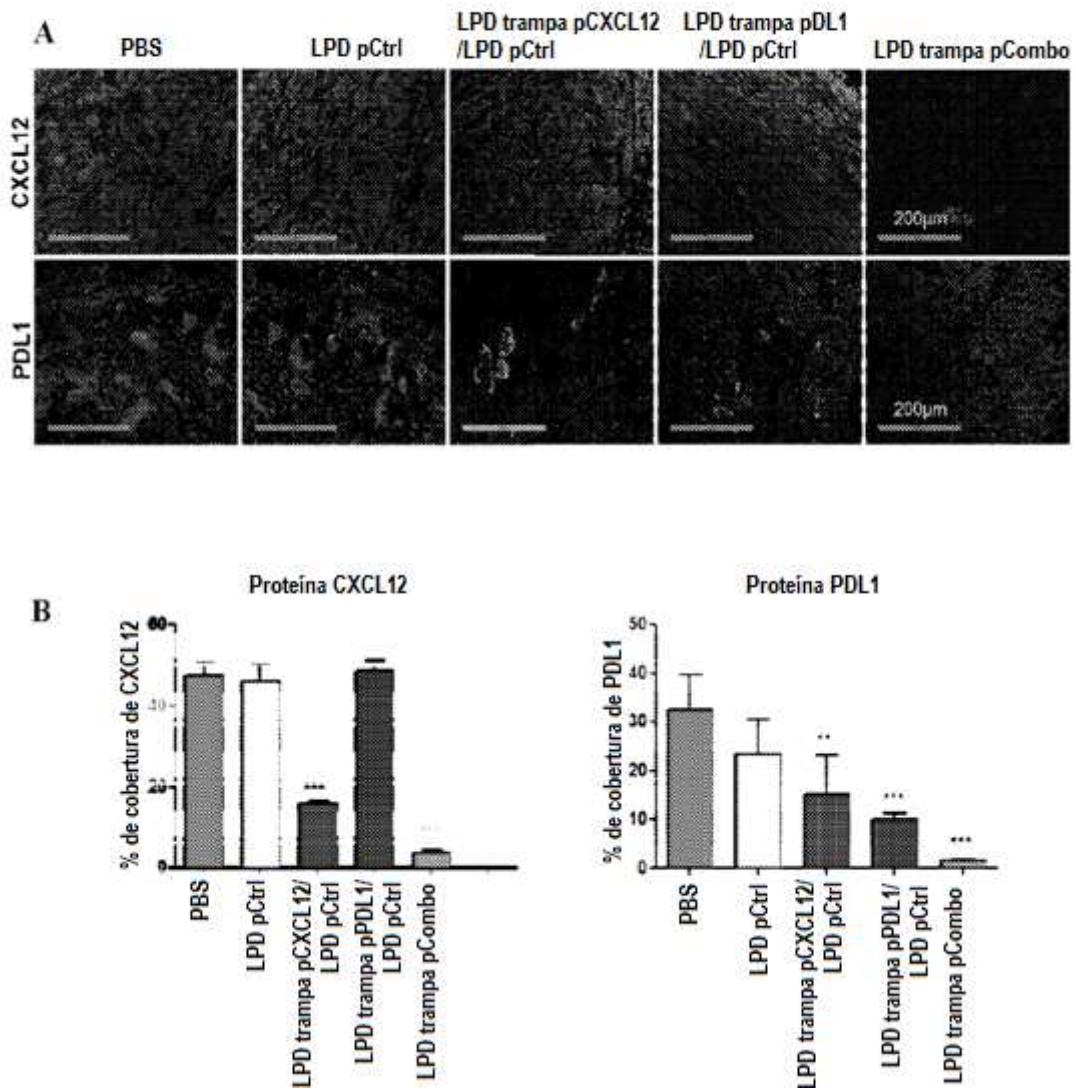


Figura 21

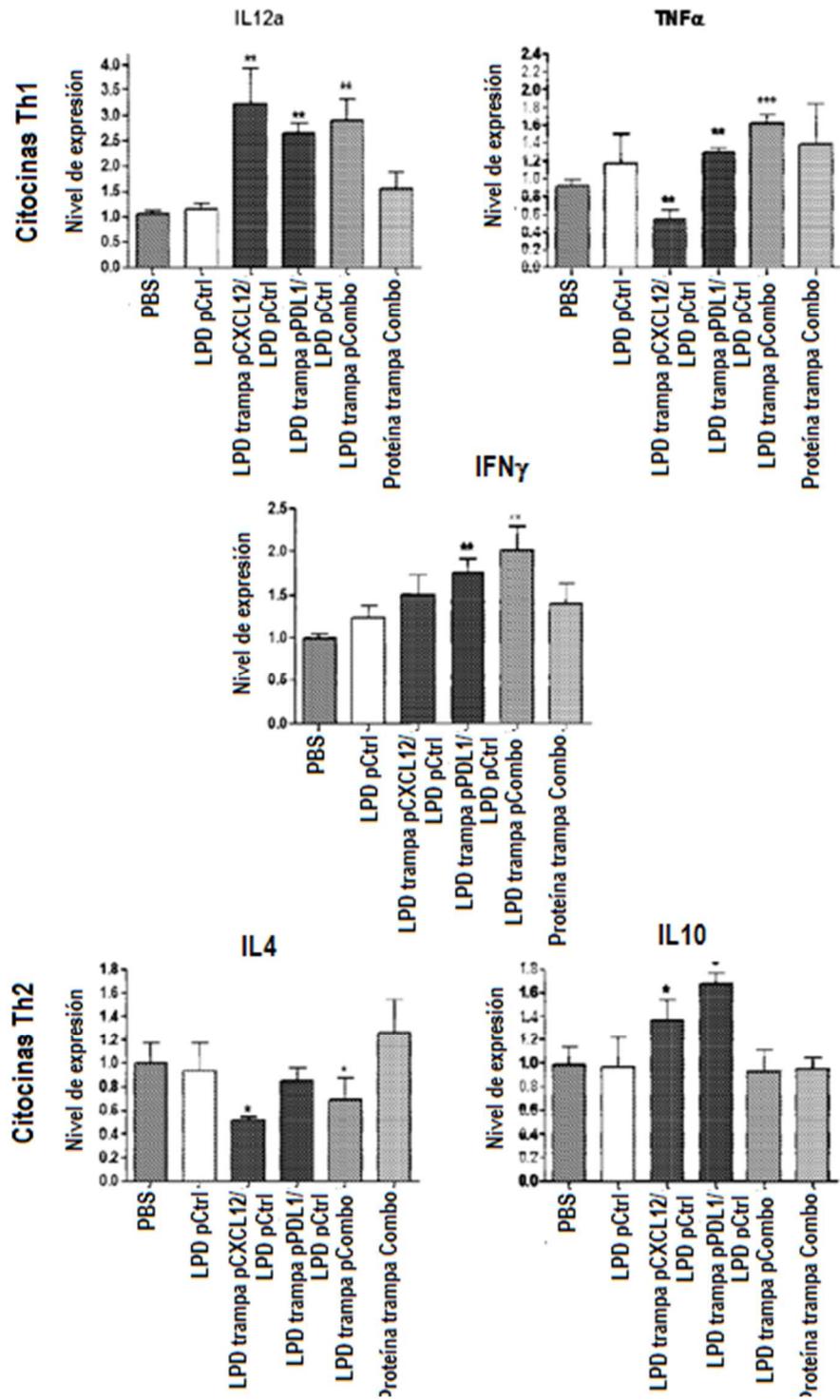


Figura 22A-B

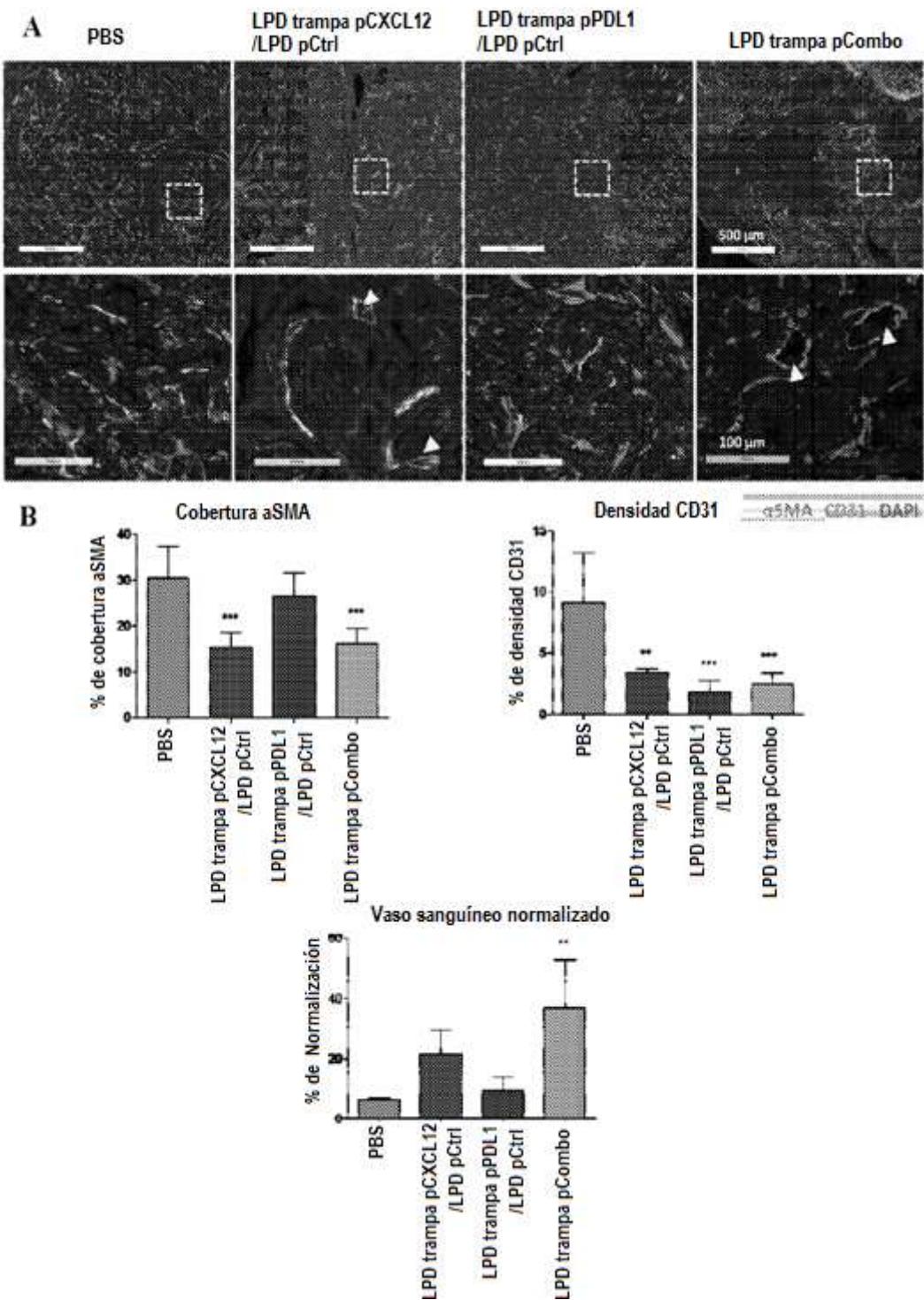


Figura 23

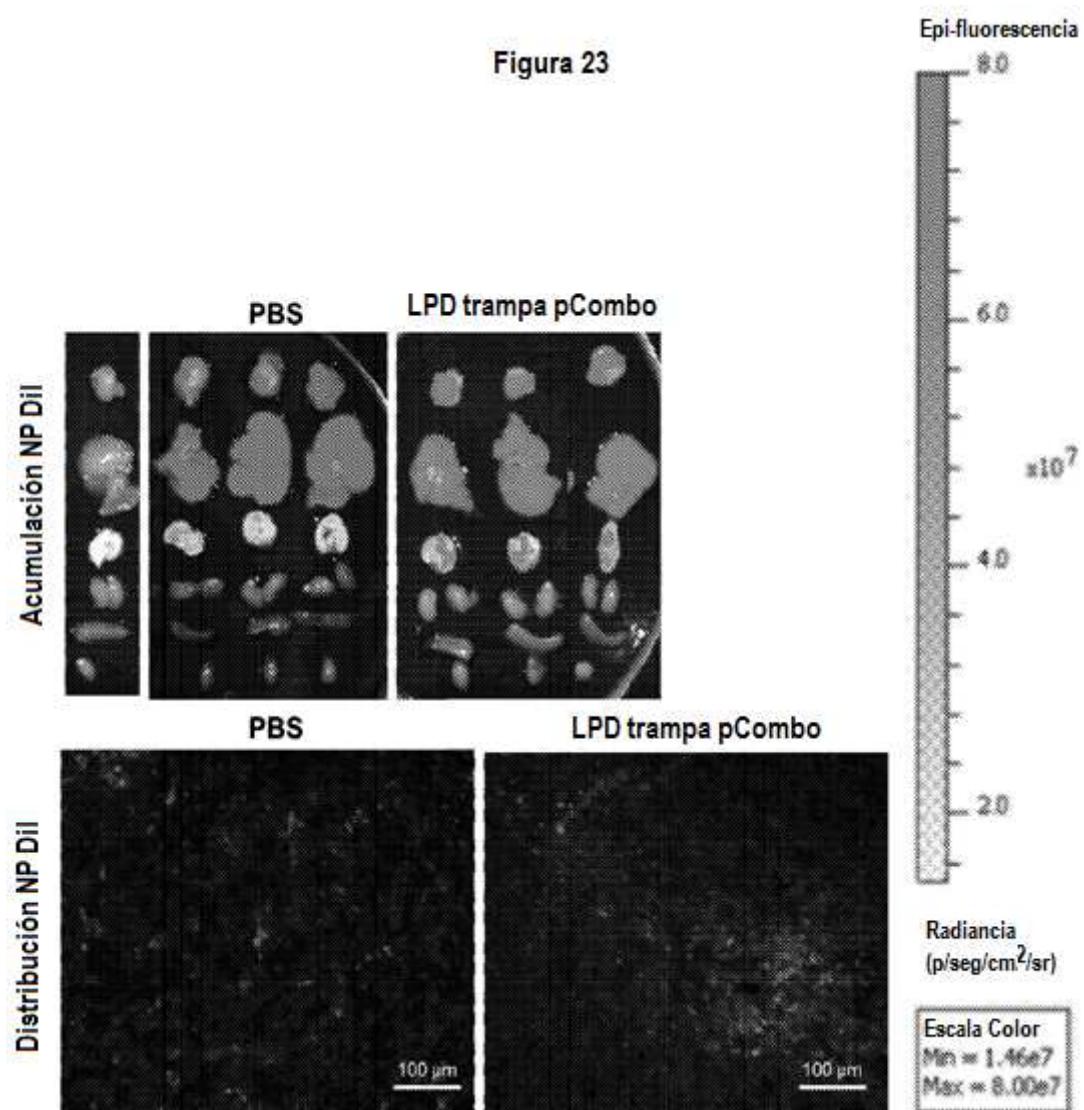


Figura 24

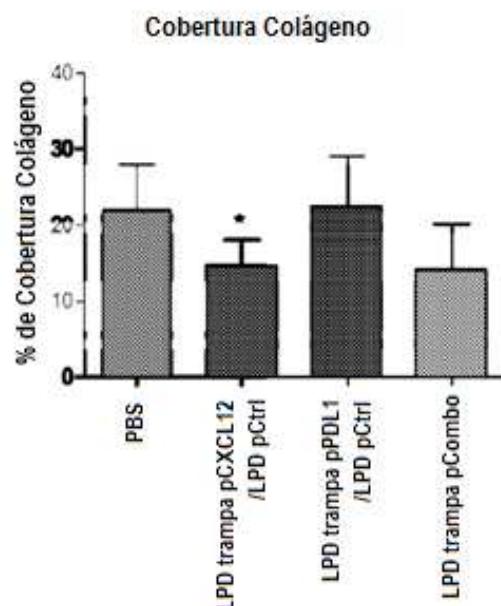
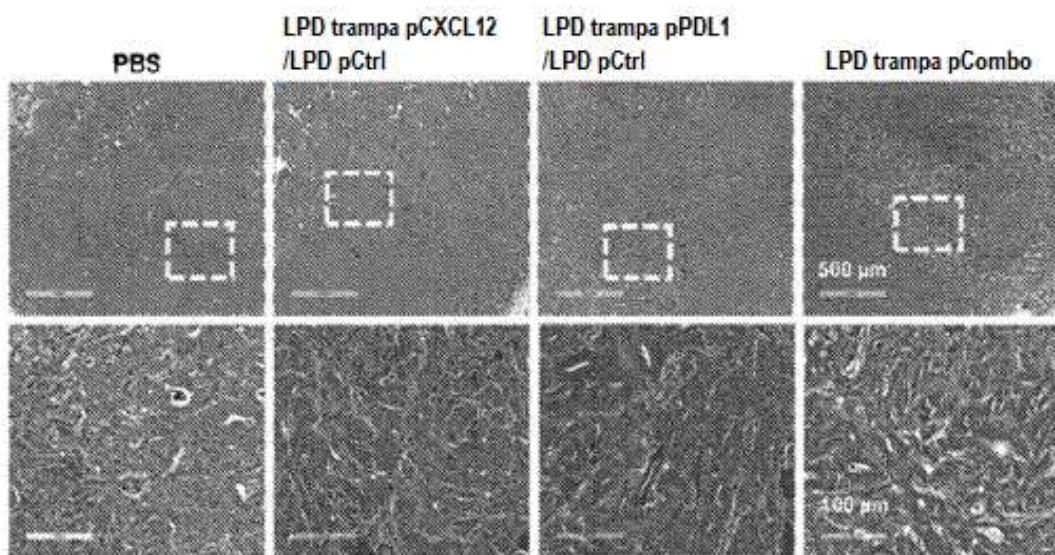


Figura 25

