



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 002**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02723679 .3**

96 Fecha de presentación : **01.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1372704**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54

Título: **Vehículo de administración en forma de partículas específico para monocitos.**

30

Prioridad: **30.03.2001 US 279769 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73

Titular/es:
GHC RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION
701 Grove Road
Greenville, South Carolina 29605, US

72

Inventor/es: **Wagner, Thomas, E. y**
Yu, Xianzhong

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 318 002 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

Vehículo de administración en forma de partículas específico para monocitos.

5 La medicina basada en la genética implica la administración directa de un producto génico terapéutico o profiláctico codificado en una molécula de ácido nucleico. Para fabricar el producto génico *in situ*, donde es necesario, se utiliza la maquinaria celular normal de transcripción y traducción. Cuando se diseña para integrarse en el complemento genético del paciente, en principio, los defectos genéticos son curables. Además, cuando se usa para administrar agentes profilácticos, como antígenos en un régimen de vacunas, se posibilitan respuestas inmunes cuantitativa o
10 cualitativamente superiores.

Hasta el momento, sin embargo, la medicina basada en la genética ha padecido deficiencias en los sistemas de administración. Aunque están disponibles los sistemas sintéticos (por ejemplo, basados en liposomas) y los sistemas denominados de "ADN desnudo", éstos son notoriamente ineficaces. Así, los vehículos de administración elegidos sin
15 virus modificados. Sin embargo, éstos también padecen deficiencias. Dichas deficiencias incluyen respuestas inmunes limitantes y problemas de fabricación asociados a la obtención del virus infeccioso.

También están disponibles los sistemas biolísticos. Típicamente estos abarcan el recubrimiento de partículas metálicas con ácidos nucleicos y su administración con una "pistola génica". La pistola génica dispara físicamente el ADN al interior de cualquier célula que quede a su alcance. La estrategia biolística, sin embargo, es no específica. Por tanto, no es óptima en los métodos terapéuticos y profilácticos en los que se precisa de una administración específica. Por ejemplo, en los métodos de tratamiento de cáncer, es deseable administrar el producto génico solamente a la célula cancerígena, o a las células inmediatamente próximas.
20

Para aplicaciones de vacuna, el producto se administra de forma deseable específicamente a las mejores células presentadoras de antígeno. Sin embargo, en este aspecto la administración convencional es insuficiente. De hecho, se cree que la mayor parte de presentación de antígeno en los métodos de vacunas genéticas actuales se lleva a cabo a través de células musculares que pueden ser presentadoras de antígeno, pero es mucho menos eficiente que con células presentadoras de antígeno denominadas "profesionales" del linaje de los monocitos.
25

Las células monocíticas desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune. Maduran en las principales células presentadoras de antígeno del cuerpo, los macrófagos y las células dendríticas. Además, al crecer los tumores, como parte del proceso angiogénico, producen factor atractor de macrófago (MAF), que envía células monocíticas al tumor. Por tanto, las células monocíticas, si son dianas específicas, podrían usarse para administrar productos genéticos terapéuticos a células tumorales o para generar una respuesta inmune terapéutica o profiláctica a través de sus propiedades presentadoras de antígeno superiores.
30

Las células monocíticas normalmente patrullan el cuerpo en busca de antígenos extraños, típicamente bacterias. Las células monocíticas fagocitan las bacterias, que son digeridas entonces para producir porciones antigénicas más pequeñas en el lisosoma. Los antígenos bacterianos resultantes son devueltos a la superficie para presentación a los brazos humorales y celulares del sistema inmune.
35

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de sistemas de administración más específicos para fármacos basados en genes. Un sistema de administración adecuado tendría una mayor especificidad que los métodos biolísticos, sería más eficiente que los sistemas sintéticos existentes y sería menos sensible a la desactivación que los sistemas de administración basados en virus.
40

Resumen de la invención

Un objetivo de la invención es proporcionar una composición para la entrada dirigida a una célula monolítica que contiene (i) un ácido nucleico que codifica un antígeno o una proteína terapéutica, (ii) un componente evasor de lisosoma y (iii) una partícula de perla vector que pueda ser fagocitada, en donde dicho componente evasor de lisosoma es un virus infeccioso deficiente, o una parte de un virus. En diferentes realizaciones, el ácido nucleico puede ser ADN ó ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede estar codificado en un vector de expresión que puede contener un promotor nuclear, tal como un promotor CMV. En otras realizaciones, el ácido nucleico puede estar codificado en un vector citoplásmico, tal como un sistema de vector T7. En diferentes realizaciones, el componente evasor de lisosoma puede ser una proteína. El virus puede ser adenovirus y la proteína puede ser proteína pentón de adenovirus. En una realización, la presente invención proporciona una composición para la entrada dirigida a una célula monolítica que implica una forma recombinante no replicativa de un virus capaz de provocar ruptura de lisosoma, en donde el virus es adenovirus y contiene ácido nucleico que codifica un antígeno o gen terapéutico. En algunas realizaciones, la composición puede contener además un componente protector de ácido nucleico tal como protamina, poliarginina, histona, proteínas tipo histona, polímeros policatiónicos sintéticos o proteína de núcleo de un retrovirus con la secuencia de empaquetamiento adecuada incluida en la secuencia de ARN. Los componentes pueden estar unidos a la partícula a través de cualquier medio que permita la unión. En algunas realizaciones, el ácido nucleico y el componente evasor de lisosoma se unen a la partícula mediante unión de anticuerpos. En otras realizaciones, el ácido nucleico y el componente evasor de lisosoma están ligados a la partícula mediante interacciones entre avidina y biotina. En otras realizaciones, el ácido nucleico sirve como vehículo de unión múltiple. La presente invención también proporciona un método para preparar la composición descrita anteriormente. En particular, la presente invención proporciona un
50
55
60
65

método para preparar la composición anteriormente descrita que comprende (i) recubrir una perla vector que puede ser fagocitado con anticuerpo AB-4 de proteína de fibra anti-adenovirus y (ii) unir las partículas de adenovirus a las perlas.

Un objeto de la invención es proporcionar un método *in vitro* para la entrega dirigida de un material biológico en un monolito que implica poner en contacto la composición descrita anteriormente con una célula monolítica, tal como una célula dendrítica o un macrófago. La presente invención también proporciona la composición descrita anteriormente para su uso en un método para la entrega dirigida de un material biológico en un monolito. La presente invención proporciona la composición anteriormente descrita para su uso como sustancia farmacéuticamente activa. En la presente memoria se describe un método de terapia génica que implica administrar la composición anteriormente descrita a una persona que lo necesite en donde el ácido nucleico codifica una proteína terapéutica, tal como una proteína anti-tumoral. La presente invención proporciona el uso de la composición anteriormente descrita, en donde el ácido nucleico codifica una proteína anti-tumoral, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una persona que lo necesite. La presente invención proporciona el uso de la composición anteriormente descrita, en donde el ácido nucleico codifica un antígeno, tal como alérgenos, antígenos víricos, antígenos bacterianos o antígenos derivados de parásitos, para la fabricación de un medicamento para la vacunación génica de una persona que lo necesite. La presente invención también proporciona el uso de la composición anteriormente descrita, en la que el ácido nucleico es un gen anti-tumoral, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en una persona que lo necesite. El gen anti-tumoral puede ser un factor anti-angiogénico, un inmunomodulador o un factor anti-inflamatorio. La presente invención también proporciona el uso de la composición anteriormente descrita, en donde el ácido nucleico codifica un factor anti-inflamatorio, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos, como la artritis, en un paciente. En las realizaciones anteriormente descritas, la composición puede administrarse intravenosa o subcutáneamente.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una fotografía de células murinas monocíticas que han sido tratadas.

La Figura 2 es una fotografía de monocitos sanguíneos periféricos humanos que han sido tratados con perlas de AD-GFP y que se han cultivado en RPMI 1640, FBS al 10%, 100 U/mL de IL4 y 800 U/mL de GM-CSF durante 7 días. La absorción de las perlas de AD-GFP no afecta a la maduración de las células a células dendríticas, tal como evidencian los bordes con forma de dedos dentados de las células.

Descripción detallada de la invención

Introducción

La presente invención proporciona una composición basada en matriz sólida para la entrega dirigida a una célula monocítica (denominada a partir de aquí "perla vector"). Una perla vector básica de acuerdo con la presente invención está compuesta generalmente por un componente de ácido nucleico, un componente evasor de lisosoma y una partícula que puede ser fagocitada por células monocíticas. La perla vector es altamente específica para células fagocíticas tales como células monocíticas, que incluyen células dendríticas y macrófagos. Esta alta selectividad para células monocíticas hace que la perla vector sea extremadamente útil para métodos de medicina génica, que requieren la introducción y la expresión de genes en células del linaje monolítico, tal como la vacunación génica, la terapia génica y el tratamiento de cáncer.

Los monocitos son células inmunes fagocíticas que ingieren y presentan antígenos grandes tales como bacterias. La presente invención aprovecha esta propiedad de tal modo que se proporcionan vectores en un sustrato que "parece" una bacteria. Así, se cree que el tamaño de la partícula de perla vector contribuye a la elevada especificidad de la perla vector por células monocíticas. Un tamaño preferido para la partícula de perla vector es aquel que se aproxima al tamaño de los antígenos bacterianos que ingieren típicamente las células monocíticas. Generalmente, la partícula vector tendrá un tamaño de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5 micrones, pero más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 micrón. Desde el punto de vista de la captación, es preferible el extremo más pequeño de los intervalos, ya que se aproximan más fielmente al tamaño de una bacteria. Por otro lado, en términos de fabricación, se prefieren perlas ligeramente más grandes, debido a que es menos probable que se agreguen y, por tanto, con partículas más grandes es más fácil la liberación de los compuestos ligados.

Por supuesto, la perla vector no está limitada ni en forma ni en material. En suma, la partícula de perla vector puede tener cualquier forma, tamaño o material que permita que la perla vector sea fagotizada por células monocíticas. Debido a la comodidad a la hora de la fabricación, una estructura de matriz preferida tiene un centro ferromagnético cubierto con un recubrimiento polimérico. Las partículas ferromagnéticas preferidas son Dynabeads™ (DynaL Biotech). Las Dynabeads™ son microesferas de poliestireno monodispersas que están disponibles en diferentes tamaños y que están recubiertas con diversos materiales (véase <http://www.dynalbiotech.com/>). Otras ferropartículas preferidas son las micropérlas. Dichas perlas son preferidas debido a que se puede emplear una separación magnética para liberar los componentes ligados de los libres durante el procesado.

Componente de Ácido Nucleico

La partícula de perla vector básica de la presente invención generalmente lleva unida a ella un componente de ácido nucleico. El componente de ácido nucleico típicamente codifica un ácido nucleico o proteína terapéuticos o antígenicos. El componente de ácido nucleico está compuesto por ADN, ARN o ambos, ADN y ARN. Este componente contiene típicamente las señales necesarias para la traducción y/o la transcripción (es decir, en definitiva puede codificar una proteína o un producto de ARN).

El especialista en la técnica será consciente inmediatamente del gran número de proteínas terapéuticas que pueden ser empleadas en el presente sistema de vectores. Normalmente, se tratará de proteínas anti-tumorales. Aunque las proteínas terapéuticas pueden ser bastante inespecíficas, ya que estarán localizadas predominantemente en la proximidad inmediata de un tumor, preferiblemente son específicas de tumor. Los ejemplos de proteínas terapéuticas adecuadas incluyen factores anti-angiogénicos e interleuquinas.

Ejemplos de antígenos útiles en las aplicaciones de vacunas incluyen alérgenos, antígenos víricos, antígenos bacterianos y antígenos derivados de parásitos.

Los antígenos preferidos incluyen antígenos asociados a tumores, con los que el especialista en la técnica estará familiarizado (por ejemplo, antígeno carcinoembrionario, antígeno de membrana específico de próstata, antígeno de melanoma, antígeno de adenocarcinoma, antígeno de leucemia, antígeno de linfoma, antígeno de sarcoma, MAGE-1, MAGE-2, MART-1, Melan-A, p53, gp100, antígeno asociado a carcinoma colónico, antígeno asociado a carcinoma de pecho, Muc1, Trp-2, telomerasa, PSA y antígeno asociado a carcinoma renal). Los antígenos víricos también son preferidos. Los antígenos víricos adecuados incluyen VIH, VEB y virus del Herpes. En una realización, el ácido nucleico codifica una inserción de epítipo gp41 lineal (LLELDKWASL), que ha sido identificada como construcción útil para mejorar la inmunogenicidad contra VIH-1 Env (Liang y col., *Vaccine*, 16; 17 (22): 2862-72, Julio de 1999).

El componente de ácido nucleico de forma beneficiosa está codificado en un vector de expresión, que es capaz de expresar el ARN y/o los productos proteicos del componente de ácido nucleico. Normalmente el vector comprende secuencias reguladoras, que incluyen por ejemplo un promotor, ligado operativamente a la secuencia codificadora. El vector también puede comprender una secuencia de marcador seleccionable, por ejemplo para la propagación *in vitro* en sistemas bacterianos o de cultivos celulares. Los vectores de expresión preferidos comprenden un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuados, y también cualesquier posiciones de unión de ribosomas necesarias, una posición de poliadenilación, posiciones de separación dador y aceptor, secuencias de finalización de la transcripción, y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. Las secuencias de ADN derivadas del genoma de SV40 o de citomegalovirus (CMV), por ejemplo, el origen de SV40, el promotor temprano, las posiciones de potenciador, divisor y de poliadenilación pueden usarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Las señales de inicio específicas también pueden ser requeridas para una traducción eficaz de las secuencias codificadoras de genes diana insertados. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en los que el componente de ácido nucleico incluye su propio codón de inicio y las secuencias adyacentes son insertadas en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias otras señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en los que sólo se usa una porción de un marco de lectura abierta (ORF), deben proporcionarse señales de control de la traducción exógenas, que incluyen, quizás, el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificadora deseada para asegurar la traducción de una diana completa.

Estas señales exógenas de control de la traducción y estos codones de inicio pueden proceder de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, de terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner y col., *Methods in Enzymol.* 153: 516-544 (1987)). Algunos vectores de expresión apropiados se describen en Sambrook y col., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989), cuya descripción se incorpora a la presente memoria a modo de referencia. Si se desea, para mejorar la expresión y facilitar un plegamiento adecuado de la proteína, se puede optimizar el contexto de codón y el emparejamiento de codones de la secuencia, tal como se explica en Hatfield y col., Patente de EE.UU. N° 5.082.767.

Los promotores incluyen CMV inmediatamente temprano, HSV timidina quinasa, SV40 temprano y tardío, LTRs de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. Un promotor preferido es CMV. Los ejemplos de vectores incluyen pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia). Los marcadores seleccionables incluyen CAT (cloranfenicol transferasa). Los vectores preferidos también incluyen vectores citoplásmicos, como el sistema de vector T7. Véase Wagner y col., Patente de EE.UU. N° 5.591.601 (7 de Enero de 1997).

Componente Evasor de Lisosoma

Además del componente de ácido nucleico, la partícula de perla vector básica de la presente invención generalmente también tiene unida a ella un componente evasor de lisosoma. El papel del componente evasor de lisosoma con respecto a la perla vector es asistir a dicho vector a la hora de escapar del entorno agresivo del lisosoma. A parte de los descritos en la presente memoria, el especialista en la técnica será consciente de numerosos ejemplos de este tipo de moléculas.

Cuando una célula monocítica ingiere un antígeno grande, se forma una vesícula fagocítica (fagosoma) que rodea al antígeno. A continuación, un lisosoma especializado contenido en la célula monocítica se fusiona con el fagosoma recién formado. En la fusión, el antígeno grande fagocitado se expone a varias moléculas altamente reactivas así como a una mezcla concentrada de hidrolasas lisosomales. Estas moléculas altamente reactivas y estas hidrolasas lisosomales digieren el contenido del fagosoma. Por tanto, mediante la unión de un componente evasor de lisosoma a la partícula, el ácido nucleico que también está unido a la partícula escapa de la digestión por parte de los materiales del lisosoma y entra en el citoplasma del monocito intacto. Los sistemas anteriores fallaban a la hora de reconocer la importancia de esta importante características y, por tanto, obtenían niveles mucho menores de expresión que la presente invención. Véase Faló y col., WO 97/11605 (1997). Cabe destacar que la expresión “componente evasor de lisosoma” abarca el lisosoma/fagosoma fusionado descrito anteriormente.

El componente evasor de lisosoma es un virus infeccioso deficiente, o parte de un virus, que es capaz de evadir o de romper el lisosoma. Por ejemplo, el componente evasor de lisosoma puede incluir proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, polímeros biomiméticos, microorganismos y combinaciones de los mismos. Cabe destacar que el término “proteína” abarca una molécula polimérica que comprende cualquier número de aminoácidos. Por tanto, una persona con un conocimiento ordinario en la técnica sabría que “proteína” abarca un péptido, lo que generalmente es considerado una proteína “corta”. Los componentes evasores de lisosoma incluyen proteínas, virus o partes de virus. La proteína de pentón de adenovirus, por ejemplo, es un complejo bien conocido que permite que el virus evada/rompa el lisosoma/fagosoma. Por tanto, tanto el adenovirus intacto como la proteína de pentón aislada, o una porción de la misma (véase, por ejemplo, Bal y col., *Eur. J. Biochem.* 267: 6074-81 (2000)), pueden utilizarse como componente evasor de lisosoma. Los péptidos fusogénicos derivados de secuencias N-terminales de subunidad de hemaglutinina HA-2 del virus de la gripe también pueden usarse como componente evasor de lisosoma (Wagner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7934-7938, 1992).

Los ejemplos de otros componentes evasores de lisosoma abarcados por la presente invención son discutidos en Stayton y col., *J. Control Release*, 1; 65(1-2): 203-20, 2000.

Componente de Protección de Ácido Nucleico

Además de los componentes descritos anteriormente que generalmente están unidos a la partícula de perla vector, tanto directamente como a través de la unión unos con otros (por ejemplo, un adenovirus recombinante que codifica un ácido nucleico), también se pueden unir otros componentes a la partícula o a un componente que ya está unido a la partícula. Por ejemplo, opcionalmente se puede añadir un componente protector de ADN a la perla vector básica descrita anteriormente, especialmente cuando el componente de ácido nucleico no está asociado a un virus o a una porción del mismo. Generalmente, el componente protector de ADN no estará unido directamente a la perla. El componente protector de ácido nucleico incluye cualquier componente que pueda proteger ADN ó ARN unido a la perla de la digestión durante una exposición breve a enzimas líticas antes o durante la ruptura del lisosoma. Los componentes protectores de ácido nucleico preferidos incluyen protamina, poliarginina, polilisina, histona, proteínas tipo histona, polímeros policationicos sintéticos y proteína de núcleo de un retrovirus con la secuencia de empaquetamiento apropiada incluida en la secuencia de ARN.

En una realización de la presente invención, la perla vector comprende (1) una forma recombinante, opcionalmente no replicativa y/o no infecciosa, de un virus que contiene un ácido nucleico que codifica un antígeno o gen terapéutico, y (2) una partícula que pueda ser fagotizada. El virus puede ser un virus de ARN, como un retrovirus, o un virus de ADN, como un adenovirus. En esta realización, el propio virus es capaz preferiblemente de producir ruptura lisosomal. En otras palabras, el ácido nucleico y los componentes evasores de lisosoma son ambas partes integrales del virus. Los virus preferidos incluyen VIH, adenovirus, virus de Sindbis, y versiones recombinantes e híbridas de los mismos. Un virus particularmente preferido es un híbrido VIH-adenovirus, que es esencialmente un adenovirus recombinante que ha sido diseñado para expresar antígenos de VIH. Los virus pueden unirse a las perlas directamente, usando métodos convencionales. Véase Hammond y col., *Virology* 254: 37-49 (1999).

Puesto que la infección vírica no es esencial en la presente invención para que el componente de nucleótido alcance el citoplasma de la célula monocítica, el virus también puede ser deficiente en replicación/infección. Un método para producir un adenovirus deficiente en replicación/infección contemplado por la presente invención consiste en alterar la proteína de fibra del virus. Por ejemplo, un virus en el que se modifica la proteína de fibra mediante mutaciones específicas para permitir que la proteína de fibra se una a un anticuerpo pero no a su receptor celular cognato puede usarse en la presente invención.

Otro método para producir un virus deficiente en replicación/infección contemplado por la presente invención es provocar intencionadamente la desnaturalización del componente vírico responsable de la capacidad de infección. En el caso del adenovirus, por ejemplo, la proteína de fibra podría ser alterada durante la preparación del virus; para el VIH podría ser la proteína de sobre (env). Un método para producir un retrovirus deficiente en replicación/infección contemplado por la presente invención incluye la eliminación de las membranas exteriores del retrovirus de tal modo que sólo queden las partículas del núcleo del retrovirus. Si un virus deficiente en replicación/infección preparado como se ha descrito anteriormente se une a la partícula de perla vector, también se puede unir a la partícula un componente protector de ARN, tal como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones terapéuticas, es beneficioso para el vector que se integre de forma estable en el cromosoma de la célula diana. Por ejemplo, un modo de lograr una integración estable es a través del uso de un híbrido de adenovirus. Tal híbrido de adenovirus implica, por ejemplo, un vector adenovírico que porta secuencias 5' y 3' de repetición terminal largas (LTR) de retrovirus flanqueando el componente de ADN que codifica un ácido nucleico o proteína terapéuticos o antigénicos y un gen integrasa de retrovirus (véase Zheng y col., *Nature Biotechnology*, 18: 176-180, 2000). En otras realizaciones, se prefiere la expresión temporal y se pueden emplear virus citoplásmicos, como el virus de Sindbis. En dichos casos, cuando no existe un componente evasor de lisosoma natural en el virus se añade uno. Por ejemplo, para este propósito en el caso del Sindbis o de otros virus de este tipo, se pueden modificar para expresar toda, o parte, la proteína de pentón de adenovirus.

Métodos para Unir los Componentes a la Partícula

La unión de los componentes discutidos anteriormente a la partícula de perla vector se lleva a cabo empleando cualquier medio. Como se ha establecido anteriormente, los diversos "componentes" incluyen un ácido nucleico, un componente evasor de lisosoma, que pueden estar ambos presentes en un virus. Los métodos preferidos para la unión incluyen la unión de anticuerpos, la interacción biotina-avidina y el reticulado químico. Las partículas de perla vector pueden prepararse con anticuerpos químicamente ligados, con avidina o con otras posiciones de unión selectiva.

La unión de anticuerpos puede producirse a través de una interacción de anticuerpos. Los anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla que incluyen fragmentos de cadena sencilla Fv (scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), fragmentos de unión de epítomos y formas humanizadas de cualquiera de los anteriores.

En general, las técnicas de preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales, así como de hibridomas capaces de producir los anticuerpos deseados, son bien conocidas en la técnica (Campbell, A.M., *Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, Holanda (1984); St. Groth y col., *J. Immunol. Methods* 35: 1-21 (1980); Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de célula B humana (Kozbor y col., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole y col., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), pág. 77-96).

Un ejemplo de unión de anticuerpos abarcada por la presente invención implica un único anticuerpo que se fija químicamente a la partícula de perla vector. El anticuerpo es específico para el componente que va a unirse a la partícula. Alternativamente, se pueden usar dos anticuerpos. En este caso, un anticuerpo, unido a la perla, es específico para el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo es específico para el componente que se va a unir a la perla. Así, el anticuerpo específico de componente se une al componente, y ese anticuerpo, a su vez, se une a través del anticuerpo ligado a la perla. Por ejemplo, se puede unir un anticuerpo de cabra o de conejo anti-ratón a la perla, y usarse un anticuerpo monoclonal de ratón para ligar el componente específico.

En otro ejemplo de unión de anticuerpos, se emplea proteína A, o una molécula similar con afinidad por anticuerpos. En este ejemplo, las perlas se recubren con proteína A que se une a un anticuerpo, que a su vez se une al componente que se está incorporando a la perla.

La unión a través de interacción biotina-avidina puede llevarse a cabo, por ejemplo, uniendo avidina a la partícula de perla vector y uniendo biotina al componente que va a ligarse. El reticulado químico puede llevarse a cabo empleando cualquier método convencional conocido por el especialista en la técnica.

Otro mecanismo de unión implica que el ácido nucleico sirva como vehículo de unión múltiple. Se diseñan oligonucleótidos sintéticos de ácido nucleico de proteína (PNA) de pinza para unirse específicamente a diferentes secuencias de ácido nucleico. El PNA es un análogo de ácido polinucleico con una cadena principal de péptidos en lugar de una cadena principal de desoxirribosofosfato. Éstos pueden unirse directamente a la perla o pueden derivatizarse para lograr una unión conveniente, proporcionando con ello un medio específico de secuencia para la unión de ácido nucleico. Cada oligonucleótido pinza puede estar derivatizado o unido a diferentes ligandos o moléculas, y estar diseñado para ligar diferentes secuencias de ácido nucleico. Se cree que el PNA interacciona con el ADN a través de interacciones de par de bases Hoogsteen y que se forma una pinza triple estable PNA-ADN-PNA (Zelphati y col. *BioTechniques*, 28: 304-316, 2000).

Por tanto, en una realización, se emplea una pinza para ligar el componente de ácido nucleico a la perla y se usa otra para ligar el componente evasor de lisosoma al componente de ácido nucleico. Es posible tener muchas interacciones de este tipo. Por ejemplo, una "pinza" que comprende biotina puede ser una secuencia específicamente ligada por un sitio al ácido nucleico. La unión a una partícula recubierta con avidina se produce a través de interacciones biotina-avidina. En otro sitio del ácido nucleico, otra "pinza" con un componente evasor de lisosoma/fagosoma puede ser una secuencia específicamente ligada. Opcionalmente, una "pinza" con un componente protector de ADN puede ser una secuencia específicamente ligada al ácido nucleico por otro sitio diferente. Los ejemplos de oligonucleótidos pinza se describen en <http://www.genetherapysystems.com/02pgenegrip.htm> y <http://www.genetherapysystems.com/02pna0.htm>.

En el caso de la unión de virus a la perla, ésta también puede llevarse a cabo modificando el virus para que exprese determinadas proteínas en su superficie. Por ejemplo, la proteína env de VIH podría ser reemplazada por la proteína pentón de adenovirus, o por una porción de la misma. A continuación el virus recombinante podría ser ligado a través de un anticuerpo anti-pentón, con la unión a la perla mediada, por ejemplo, por otro anticuerpo o proteína A. En esta realización, la proteína pentón también serviría como componente evasor de lisosoma.

Formulación

La perla vector puede formularse para su administración parenteral mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. Las formulaciones para inyección pueden estar presentes en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar la forma de suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. La perla vector también puede formularse usando un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes son bien conocidos en la técnica, pero típicamente se encuentran en una disolución acuosa tolerable. Las disoluciones acuosas tolerables son aquellas que son esencialmente no tóxicas. Los excipientes preferidos son inertes o potenciadores.

Métodos Terapéuticos

La perla vector de la invención es altamente selectiva para células como las células monocíticas. Por lo tanto, es útil para cualquier aplicación que implique la introducción selectiva de un componente de ácido nucleico en una célula monocítica, incluyendo la vacunación génica, el tratamiento de cáncer y la terapia génica. Los métodos típicos incluyen poner en contacto una célula monocítica con una perla vector.

La perla vector puede ponerse en contacto con células monocíticas tanto *in vivo* como *in vitro*. Por tanto, se contemplan métodos tanto *in vivo* como *in vitro*. Para los métodos *in vivo*, la perla vector generalmente se administra parenteralmente, normalmente intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente o intradermalmente. Puede administrarse, por ejemplo, mediante inyección de bolo o mediante infusión continua. En los métodos *ex vivo*, las células monocíticas se ponen en contacto fuera del cuerpo y las células puestas en contacto son administradas entonces al paciente. Las células también se administran parenteralmente, típicamente mediante infusión.

En el campo de la vacunación, las células monocíticas, que incluyen células dendríticas y macrófagos, son consideradas células presentadoras de antígeno (APCs) “profesionales” y, por tanto, son el sitio ideal para la expresión de una vacuna genética. Es bien sabido que dicha expresión de un antígeno dentro de una APC es mucho más eficaz en la generación de una respuesta inmune celular fuerte que la expresión del mismo antígeno en otro tipo de célula. Por lo tanto, la capacidad de la perla vector de la presente invención para dirigir la expresión de un antígeno de vacunación a células presentadoras de antígeno “profesionales” (células monocíticas) potencia drásticamente la eficacia de una vacuna genética.

La presente invención ofrece una mejora sustancial respecto a las vacunas de la técnica anterior debido a que la perla vector puede inyectarse directamente al paciente, y aún así es capaz de administrar directamente el antígeno a las mejores células presentadoras de antígeno del cuerpo, las células de origen monocítico, como los macrófagos y las células dendríticas. Los métodos anteriores que tenían como dianas dichas células se basan principalmente en aislar las células monocíticas de un paciente y manipularlas *in vitro* para después devolverlas al cuerpo del paciente. Aunque dicho escenario se contempla dentro de la invención, el hecho de que esta etapa no sea necesaria constituye una mejora sustancial. En otras palabras, la perla vector puede ser administrada como una vacuna convencional, lo que reduce sustancialmente el coste ya que se requiere un menor nivel de especialización. Además, se contempla que una alteración de la ruta de administración puede alterar las células monocíticas tomadas como diana. Por ejemplo, en el caso de una inyección intravenosa las dianas deberían ser los macrófagos, mientras que en el caso de una inyección subcutánea las dianas deberían ser las células dendríticas.

Los métodos típicos para la vacunación génica que implican la perla vector de la presente invención incluyen la administración, generalmente subcutánea o intravenosa, a un paciente de una perla vector que contiene ácido nucleico que codifica un antígeno. Alternativamente, se pueden poner en contacto células monocíticas con el vector *ex vivo* y a continuación se administran parenteralmente dichas células al paciente. Además, el método *ex vivo* puede modificarse mediante linfocitos T aislados, usando las células monocíticas expuestas para generar *ex vivo* células T citotóxicas específicas de antígeno, que entonces pueden ser administradas al paciente. El especialista en la técnica estará familiarizado con este tipo de estrategias.

Además de las estrategias de vacunación mejoradas, dirigir la expresión génica al linaje de células monocíticas usando la perla vector de la presente invención es eficaz en el tratamiento de cáncer. Un tipo de tratamiento de cáncer contemplado en la presente invención implica dirigir un gen terapéutico a un tumor. Se sabe que como los tumores, los tumores primarios y las metástasis crecen más allá de unos pocos milímetros en diámetro y se vuelven deficientes en oxígeno, segregan proteínas señal para provocar varios eventos requeridos para la supervivencia del tumor. Dichos eventos incluyen la secreción de señales que inducen la angiogénesis. Como parte de un mecanismo de inducción angiogénica, los tumores hipóxicos segregan una proteína quemoquina de señalización con la función de atraer monocitos al tumor. Los tumores así atraídos a los sitios de tumores en crecimiento se vuelven entonces macrófagos y asisten en la inducción de la angiogénesis tumoral. Por tanto, un método efectivo de ataque génico terapéutico a

tumores implica la administración de una cantidad efectiva de una perla vector que contiene un gen anti-tumoral a un paciente de cáncer, bien directamente o a través de una célula expuesta *ex vivo*. Las células monocíticas que contienen la perla vector fagotizada deberían ser atraídas a los sitios de desarrollo tumoral y administrar el gen tumoral terapéutico selectivamente al tumor.

En una realización, el gen anti-tumoral es un factor anti-angiogénico, como la endostatina o la angiostatina. Se contempla que dicho tratamiento es altamente efectivo debido a que utiliza los monocitos, que normalmente administran factores pro-angiogénicos al tumor, como vehículo de administración para factores anti-angiogénicos.

En otra realización, el gen anti-tumoral puede ser un inmunomodulador o un factor anti-inflamatorio. Se contemplan inmunomoduladores tales como IL-2 e IL-12. Además, los factores anti-inflamatorios no sólo serían útiles en el tratamiento de tumores, sino que también lo serían en el tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos como la artritis. Los efectos anti-inflamatorios de la invención, como los efectos anti-tumorales, se basan en la capacidad de las células monocíticas para alojar en el tejido concreto. Es bien conocido que los monocitos son atraídos por las citas de la respuesta inflamatoria, como por las de la artritis. Otros ejemplos de inmunomoduladores y anti-inflamatorios incluyen GM-CSF y receptor TNF-alfa soluble.

Otro uso de la perla vector abarcada por la presente invención es en terapia génica convencional. Los métodos típicos de terapia génica que implican a la perla vector de la presente invención incluyen la administración a un paciente de una perla vector que contiene un ácido nucleico que codifica un gen terapéutico, o una célula que contiene dicho vector, a un paciente. El ácido nucleico codifica cualquier gen terapéutico.

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan únicamente a efectos ilustrativos y no deben considerarse limitaciones de esta invención. Existen muchas variaciones aparentes dentro del alcance de esta invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la construcción de una perla vector típica.

Un ejemplo de perla vector comprende un adenovirus que ha sido modificado para contener el gen que codifica Proteína Fluorescente Verde (GFP) unida a una Dynabead (Ad-GFP-perla). Para fabricar la Ad-GFP-perla, en primer lugar se resuspendieron enérgicamente Dynabeads (Dynal, producto N° 115.19) y se transfirió la cantidad deseada de perlas a un tubo adecuado para el dispositivo magnético. Las perlas fueron lavadas tres veces con 1-2 mL de tampón (RPMI con un 1% de FCS) con ayuda magnética. Las perlas fueron resuspendidas de nuevo al volumen original de tampón. A continuación, con el objetivo de recubrir las perlas con el anticuerpo AB-4 de proteína de fibra anti-adenovirus (Neomarker, N° de catálogo MS-1027), se añadieron 2 microgramos de IgG de ratón por 107 perlas. Después de rotar la mezcla perlas/anticuerpos durante 30 minutos a temperatura ambiente, las perlas fueron lavadas 3 veces con tampón (PBS más un 1% de BSA) usando ayuda magnética. Las perlas recubiertas fueron resuspendidas de nuevo al volumen original de tampón (PBS más un 1% de BSA). Con el objetivo de ligar las partículas de adenovirus (Quantum, Ad5.CMV5-GFP) a las perlas, se añadieron $0,5 \times 10^8$ partículas víricas/107 perlas. Después de rotar la mezcla durante 30 minutos a 4°C, las perlas fueron lavadas de 3 a 4 veces con tampón (PBS más un 1% de BSA) usando ayuda magnética. Finalmente, las perlas fueron resuspendidas en un volumen de tampón apropiado (PBS más un 1% de BSA, pH 7,4) para su uso *in vitro* o *in vivo*.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que las células monocíticas captan específicamente la perla vector de la invención *in vitro*. En este experimento, el vector Ad-GFP del Ejemplo 1 fue incubado con un cultivo mixto que contenía monocitos. El examen con microscopio reveló altos niveles de expresión de GFP únicamente en las células monocíticas.

En este ejemplo, se obtuvieron 50-100 mL de sangre de un donante humano y se llevaron a tubos de heparina sódica. La sangre se diluyó 1:1 con 1X PBS. 8 mL de la sangre diluida fueron dispuestos en capa sobre 4 mL de Ficoll-Paque Plus a temperatura ambiente en un tubo de centrifuga 15 mL. Los tubos fueron centrifugados a 400 g a temperatura ambiente durante 30 minutos. La capa de PBMC fue retirada con cuidado del gradiente Ficoll usando una pipeta pasteur y se llevó a un tubo de centrifuga limpio de 15 ó 50 mL. Se añadieron 4 volúmenes de 1X PBS a los tubos y los tubos fueron invertidos para mezclar. Los tubos se centrifugaron a 100 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 10 mL de 1X PBS y los tubos se invirtieron para mezclar las células. Los tubos se centrifugaron a 100 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se llevó a cabo una lisis AKC durante 5 minutos a temperatura ambiente y las células fueron peletizadas y lavadas con 1X PBS. Las PBMC fueron suspendidas en 5 mL de medio celular dendrítico completo (RPMI1640 + 10% de FBS + 800 U/mL de GM-CSF + 1000 U/mL de IL-4). Las células PBMC se llevaron entonces a placas de 6 pocillos. A continuación, las AD-GFP-perlas preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1 se añadieron al cultivo con diferentes relaciones célula - perla. La placa fue balanceada para hacer que los vectores se distribuyesen uniformemente por el cultivo. La expresión de GFP se siguió diariamente con un microscopio de fluorescencia. El medio de cultivo fue refrescado cada dos días. La diferenciación de PBMC en células dendríticas fue seguida a través de la observación de la morfología única de las células dendríticas.

Se prepararon macrófagos de cavidad peritoneal de ratón inyectando 3 mL de 1X PBS en la cavidad peritoneal. Tras un masaje suave, la disolución inyectada fue recuperada y las células se llevaron a una placa de cultivo. Tras una hora

de incubación las células no ligadas fueron eliminadas, mientras que las células ligadas fueron retenidas y cultivadas en DMEM más un 10% de FBS. A continuación las células fueron llevadas a placas de 6 pocillos. A continuación, las AD-GFP-perlas preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1 fueron añadidas al cultivo con diferentes relaciones célula - perla. La placa fue balanceada para hacer que los vectores se distribuyesen uniformemente por el cultivo. La expresión de GFP fue seguida diariamente con un microscopio de fluorescencia. El medio de cultivo fue refrescado cada dos días. La diferenciación de PBMC en células dendríticas se siguió a través de la observación de la morfología única de las células dendríticas. La placa fue balanceada para hacer que los vectores se distribuyesen uniformemente por el cultivo.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que las células monocíticas captan específicamente la perla vector de la invención *in vivo* y que las células que han captado el vector migran a los nodos linfáticos mimetizando la respuesta inmune normal. Esto es una prueba del principio de que las células monocíticas, una vez que fagocitan el vector, migran activamente al sistema linfático, en donde se genera la respuesta inmune. El vector del Ejemplo 1 fue inyectado IP en ratones en la línea media. Después de 24 horas, se extirparon los nodos linfáticos de las axilas y se examinaron al microscopio. Se observaron monocitos que expresaban altos niveles de GFP.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra la perla vector de la invención provoca una respuesta inmune específica. En este ejemplo, la perla vector de la invención se usa para vacunación génica. Se observa una respuesta inmune excepcionalmente fuerte que resulta de la vacunación con perlas. Se vacunaron dos ratones macho adulto C57B16 mediante inyección subcutánea de 5×10^8 micropérlas de 2,5 micrones recubiertas con Ad5, CMV-GFP en 250 μ L el primer día, el día 7 y el día 14. En el día 21 estos ratones fueron sacrificados, se extirparon los bazo y a partir de ellos se prepararon linfocitos. Estos linfocitos y linfocitos de ratones C57B16 no inmunizados fueron co-cultivados entonces durante 7 días en pocillos separados de una placa de microtitulación con células B16 (antecedente de C57B16) transfectadas previamente con el gen CMV-GFP y que expresan GFP en una relación aproximadamente 1:1. Las células de estos co-cultivos fueron usadas a continuación con una relación de células efectoras (linfocitos co-cultivados) a células diana de 1000:1 en un ensayo CTL estándar.

Para el ensayo CTL, primero se incubaron otras células B16 adicionales que expresan GFP en cromato sódico radiomarcado (^{51}Cr), se lavaron y se usaron como células diana. Estas células diana fueron incubadas a continuación durante 4 horas con los linfocitos estimulados de los dos ratones vacunados (Grupo Experimental), de dos ratones C57B16 no inmunizados (Grupo de Control), con medio RPMI sólo (Grupo de Liberación Espontánea) y con un 2% de Triton X 100 (Grupo de Liberación Máxima). La radioactividad resultante de la liberación de ^{51}Cr interno (una medida de la lisis celular) de las células de cada uno de estos cultivos de incubación se determinó a través del conteo de la radioactividad en alícuotas de sobrenadante procedente de cada uno de dichos cultivos de incubación tras una ligera centrifugación. El conteo promedio del grupo de liberación máxima fue 5160,5 CPM, del grupo de liberación espontánea fue 2941,5 CPM, del grupo de control fue 3015,5 CPM y del grupo experimental fue 5175,5 CPM. Estos resultados muestran claramente que los ratones vacunados con perlas desarrollaron una fuerte respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) frente a la vacunación, llevando a cabo la lisis del 100% de las células diana de este ensayo CTL.

Cuando este experimento se repitió exactamente como se ha indicado excepto en que los linfocitos usados en el ensayo CTL final se tomaron directamente de los bazo de ratones vacunados sin la semana de co-cultivo con células que expresan GFP, el ensayo CTL mostró que los linfocitos no estimulados, en una relación de células efectoras a células diana de sólo 100:1, provocaron la lisis del 34% de las células diana. Dicha actividad CTL sin pre-estimulación a través de un co-cultivo es altamente inusual y sugiere una respuesta inmune excepcionalmente fuerte como resultado de la vacunación con perlas.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que solo se obtienen niveles bajos de expresión cuando el componente evasor de lisosoma se omite del sistema.

Para fabricar la perla vector de este ejemplo, se clonó un oligonucleótido dúplex de sitio GeneGrip de Gene Therapy System en un vector T7T7/T7GFP. Entonces se usó una marca de PNA de biotina pGeneGrip para marcar el anterior vector T7 para formar una construcción vector T7T7/T7GFP/ PNA pGeneGrip. A continuación, se pusieron en contacto Dynabeads recubiertas con estreptavidina en una relación apropiada con la construcción vector T7T7/T7GFP/ PNA pGeneGrip. Después de un lavado intenso, las perlas fueron mezcladas con polimerasas de ARN T7 y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos para producir vectores perla de vector T7T7/T7GFP/ PNA pGeneGrip.

Se prepararon células macrófagas tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. A continuación se añadieron perlas vector T7T7/T7GFP/ PNA pGeneGrip al cultivo con diferentes relaciones de célula a perla. La placa se balanceo para hacer que los vectores se distribuyesen uniformemente por el cultivo. La expresión de GFP se siguió diariamente a través de un microscopio de fluorescencia. El medio de cultivo fue refrescado cada dos días. Solo se detectaron unas pocas células que parecieran tener una ligera expresión de GFP. La fluorescencia verde débil podía observarse visualmente a través del microscopio pero era difícil, o imposible, observarla en las microfotografías o distinguir este nivel

de expresión de la fluorescencia de fondo de las micrografías. También se llevó a cabo una tinción inmunocitoquímica para determinar el nivel de expresión de GFP usando anticuerpos anti-GFP. El nivel de expresión de GFP fue detectable pero muy bajo.

5 Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra que las células monocíticas humanas captan específicamente la perla vector de la invención *in vitro*. Después de que las células se hayan diferenciado en células dendríticas, las células continúan expresando niveles altos de GFP. Por tanto, la perla vector puede ser fagocitada por las células monocíticas y esto no interfiere con su maduración a células dendríticas.

En este experimento se ponen en contacto monocitos sanguíneos periféricos humanos con el vector Ad-GFP del Ejemplo 1. A continuación se cultiva la mezcla durante 7 días en RPMI 1640, 10% de FBS, 1000 U/mL de IL4 y 800 U/mL de GM-CSF. Después de 7 días, el 50% de las células expresa altos niveles de GFP. Las células diferenciadas tenían la morfología característica de las células dendríticas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la administración dirigida a una célula monocítica que comprende:

- (i) ácido nucleico que codifica un antígeno o proteína terapéutica;
- (ii) un componente evasor de lisosoma; y
- (iii) una partícula perla vector que puede ser fagocitada;

en donde dicho componente evasor de lisosoma es un virus o parte de virus deficiente en infección.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN y ARN.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico es codificado en un vector de expresión.

4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho vector de expresión contiene un promotor nuclear.

5. La composición de la reivindicación 4, en la que dicho promotor es un promotor CMV.

6. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico está codificado en un vector citoplásmico.

7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho vector citoplásmico es un sistema de vector T7.

8. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho virus es adenovirus.

9. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho componente evasor de lisosoma es una proteína.

10. La composición de la reivindicación 1, que además comprende un componente protector de ácido nucleico.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicho componente protector de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en protamina, poliarginina, polilisina, histona, proteínas tipo histona, polímeros policationicos sintéticos y proteína de núcleo de un retrovirus con la secuencia de empaquetamiento apropiada incluida en la secuencia de ARN.

12. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico y dicho componente evasor de lisosoma están unidos a la partícula mediante una unión a través de anticuerpo.

13. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico y dicho componente evasor de lisosoma están unidos a la partícula a través de una interacción entre avidina y biotina.

14. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico sirve de vehículo de unión múltiple.

15. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho componente evasor de lisosoma es la proteína pentón de adenovirus.

16. Un método *in vitro* para la administración dirigida de un material biológico a un monocito, que comprende poner en contacto la composición de la reivindicación 1 con una célula monocítica.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicha célula monocítica es una célula dendrítica o un macrófago.

18. La composición de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso como sustancia farmacéuticamente activa.

19. El uso de la composición de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el ácido nucleico codifica una proteína antitumoral, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una persona que lo necesite.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la proteína antitumoral es un factor anti-angiogénico o una interleuquina.

21. El uso de la composición de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el ácido nucleico codifica un antígeno, tal como alergen, antígenos víricos, antígenos bacterianos o antígenos derivados de parásitos, para la fabricación de un medicamento para vacunación génica de una persona que lo necesite.

22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el antígeno es un antígeno asociado a tumor, en particular un antígeno carcinoembrionario, un antígeno de membrana específico de la próstata, un antígeno de melanoma, un antígeno de adenocarcinoma, un antígeno de leucemia, un antígeno de linfoma, un antígeno de sarcoma, MAGE-1, MAGE-2, MART-1, Melan-A, p53, gp100, un antígeno asociado a carcinoma colónico, un antígeno asociado a carcinoma de pecho, Muco, Trp-2, telomerasa, PSA ó un antígeno asociado a carcinoma renal.

23. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el antígeno vírico es VIH, VEB o virus del Herpes, en particular en el que el ácido nucleico codifica la inserción de epítipo gp41 lineal LLELDKWASL.

24. El uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 21 a 23, en el que las células monocíticas se ponen en contacto con el vector *ex vivo*.

25. El uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que las células monocíticas puestas en contacto se usan para generar *ex vivo* células T citotóxicas específicas de antígeno.

26. El uso de la composición de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el ácido nucleico es un gen antitumoral, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en una persona que lo necesite.

27. El uso de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el gen antitumoral es un factor anti-angiogénico, en particular como la endostatina o la angiostatina, un inmunomodulador, en particular como IL-2 e IL-12, o un factor anti-inflamatorio.

28. El uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 18 a 23, 26 ó 27, en el que la composición se administra intravenosa o subcutáneamente.

29. El uso de la composición de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el ácido nucleico codifica un factor anti-inflamatorio, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos como la artritis en un paciente.

30. El uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 27 a 29, en el que los inmunomoduladores y anti-inflamatorios incluyen GM-CSF y receptor TNF-alfa soluble.

31. Un método para preparar la composición de la reivindicación 12 comprende:

- (i) recubrir una perla vector que pueda ser fagocitada con anticuerpo AB-4 de proteína de fibra anti-adenovirus; y
- (ii) ligar las partículas de adenovirus a las perlas.

32. La composición de la reivindicación 1 para su uso en un método para la administración dirigida de un material biológico a un monocito.

33. La composición de la reivindicación 32, en la que el monocito es una célula dendrítica o un macrófago.

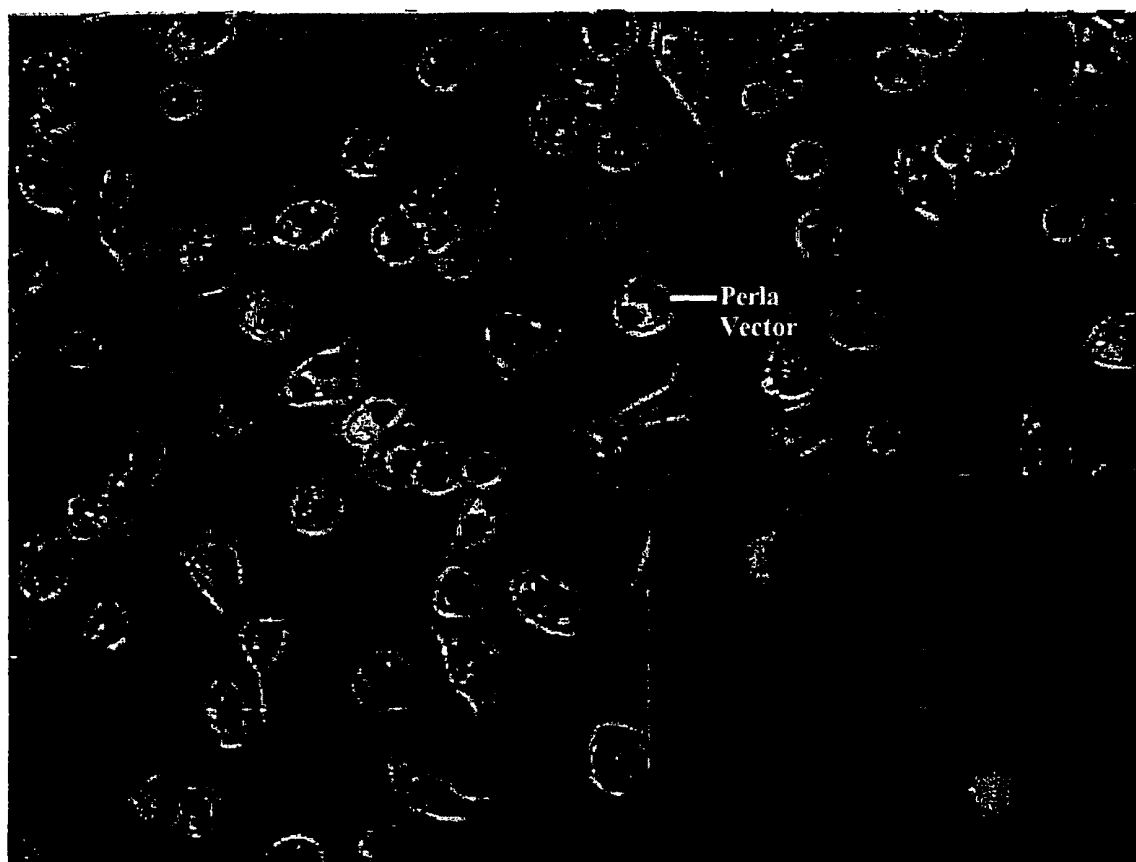


Figura 1

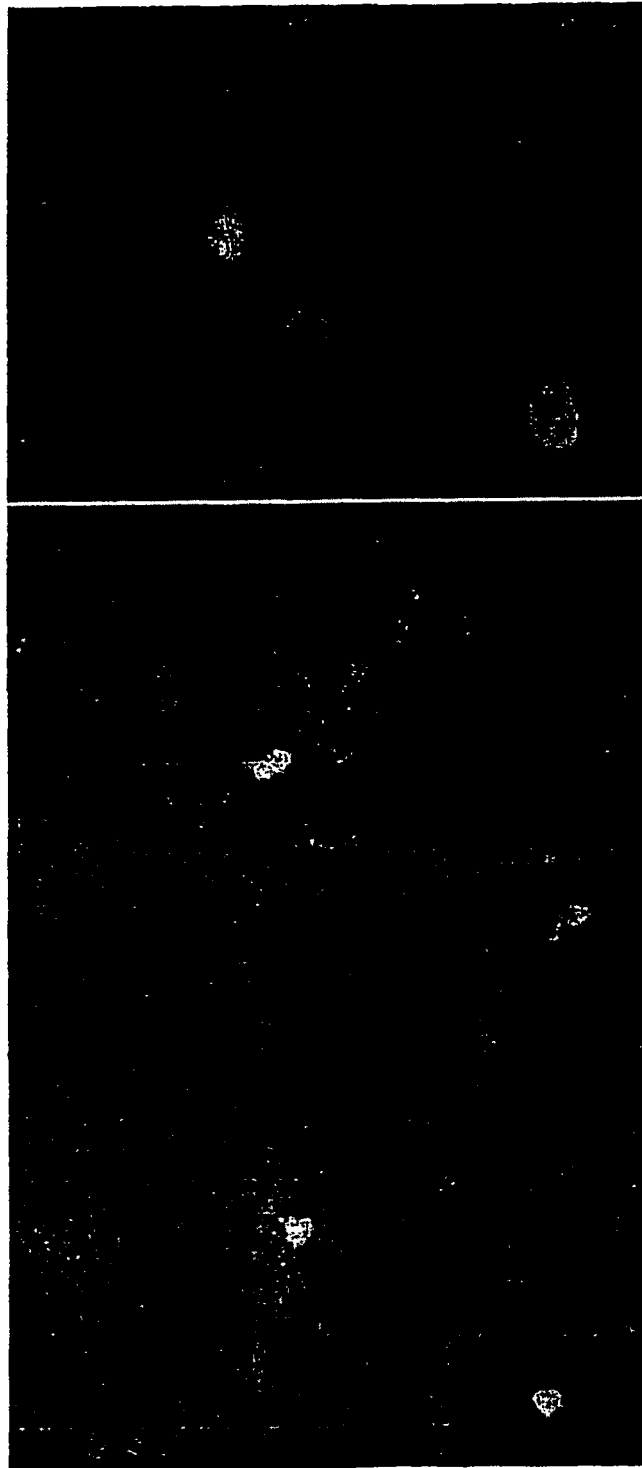


Figura 2