(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 028 783**

(51) Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2015.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2020 PCT/US2020/054952**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2021 WO21072172**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2020 E 20800417 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025 EP 4041400**

(54) Título: **ARN mensajeros que codifican STING e IL-12 y su uso en el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

09.10.2019 US 201962913035 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2025

(73) Titular/es:

TRANSLATE BIO, INC. (100.00%)
200 West Street
Waltham, MA 02451, US

(72) Inventor/es:

COBAUGH, CHRISTIAN;
WOOSTER, RICHARD;
DEROSA, FRANK;
DIAS, ANUSHA y
KARVE, SHRIRANG

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

ARN mensajeros que codifican STING e IL-12 y su uso en el tratamiento del cáncer

ANTECEDENTES

El cáncer es la causa más común de muerte en muchas partes del mundo y cada año se diagnostican más de 2,5 millones de casos de cáncer en todo el mundo. Los recientes avances en nuestra comprensión de la biología molecular del cáncer han demostrado que el cáncer es un trastorno genético que provoca un crecimiento anormal de células enfermas. Existen muchos tratamientos contra el cáncer, incluyendo cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia génica y moléculas pequeñas y proteicas. Sin embargo, estos tratamientos a menudo funcionan mediante interacciones no específicas con dianas celulares, producen efectos secundarios no deseados y no tratan la raíz de la enfermedad. El cáncer sigue siendo altamente resistente a las terapias disponibles en la actualidad.

Lai et al. (J Immunother Cancer. 2018; 6(1): 125) divulgan nanopartículas lipídicas que suministran ARN mensajero de interleucina 12 (IL-12) y suprimen la tumorigénesis en carcinoma hepatocelular impulsado por oncogenes MYC. El documento de patente WO 2017/201325A1 se refiere a composiciones y métodos para la preparación, fabricación y uso terapéutico de combinaciones de polinucleótidos inmunomoduladores (por ejemplo, ARNm) que codifican un polipéptido primario de respuesta inmunitaria (por ejemplo, un polipéptido de interleucina 23 o un polipéptido de interleucina 36γ), y un polipéptido señalizador coestimulador de respuesta inmunitaria (por ejemplo, un polipéptido de OX40L). El documento de patente WO 2018/144775A1 divulga composiciones terapéuticas inmunomoduladoras de un ARNm que codifica un péptido de mutación de oncogén activador y un ARNm que codifica un polipéptido que mejora las respuestas inmunitarias al péptido de mutación de oncogén activador, por ejemplo, un ARNm que codifica un potenciador inmunitario. El documento de patente WO 2013/185069A1 divulga composiciones que comprenden ARNm formulado para administración pulmonar y métodos relacionados para el suministro del ARNm a una célula o tejido no pulmonar. El documento de patente WO 2018/081459A1 divulga ARNm aislados que codifican un polipéptido que mejora las respuestas inmunitarias a un antígeno(s) de interés, tal como polipéptidos que activan la señalización de la vía del interferón de tipo I o la señalización de NFκB. El documento de patente WO 2018/213731A1 se refiere a polinucleótidos que codifican polipéptidos IL-12 anclados que comprenden un polipéptido IL-12 y un dominio de membrana. El documento de patente WO 2016/170176A1 se refiere a composiciones que contienen ARN para su uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades tumorales y/o cancerosas, a una composición farmacéutica, a un kit y a usos de las composiciones que contienen ARN para el tratamiento o profilaxis de enfermedades tumorales y/o cancerosas. El documento de patente WO 2019/183578A1 divulga composiciones que comprenden vesículas extracelulares, por ejemplo, exosomas, agonistas de STING encapsulados y métodos de producción de dichas composiciones. Chang et al. (Hepatology. 2007; 45(3):746-54) divulga que la terapia génica combinada de GM-CSF e IL-12 suprime sinérgicamente el crecimiento de tumores hepáticos ortotópicos. El documento de patente WO 2018/160540A1 se refiere al campo de los ARN terapéuticos para el tratamiento de cánceres de tumores sólidos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona terapéuticos de ARNm mejorados para el tratamiento del cáncer como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona una composición que comprende dos o más ARNm que codifican cada uno una proteína o un péptido encapsulado dentro de una o más nanopartículas lipídicas para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende administrar la composición a un sujeto que lo necesite, en donde dos de los dos o más ARNm codifican un estimulador de genes de interferón (STING) e interleucina 12 (IL-12), respectivamente, y en donde cada una de la una o más nanopartículas lipídicas comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1:15, respectivamente.

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm comprenden un primer ARNm que codifica una primera proteína o péptido encapsulado dentro de una primera nanopartícula lipídica y un segundo ARNm que codifica una segunda proteína o péptido encapsulado con una segunda nanopartícula lipídica.

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm comprenden al menos tres ARNm que codifican STING, IL-12 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), respectivamente. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm comprenden al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, ligando de tirosina cinasa 3 similar a FMS (FLT-3L) y GM-CSF, respectivamente. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm comprenden al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, 3 que contiene el dominio de pirina de la familia NLR (NLRP3) y GM-CSF, respectivamente. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm comprenden al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, interleucina 2 (IL-2) y GM-CSF, respectivamente.

En algunas realizaciones, el STING es una forma mutante del STING. En algunas realizaciones, la forma mutante permite que el STING sea constitutivamente activo.

En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 50 % con respecto a un control 7 días después de la administración de una dosis inicial. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 60 % con respecto a un control 10 días después de la administración de una dosis inicial. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 70 % con respecto a un control 10 días después de la administración de una dosis inicial. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 80 % con respecto a un control 10 días después de la administración de una dosis inicial. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 80 % con respecto a un control 20 días después de la administración de una dosis inicial. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 85 % con respecto a un control 20 días después de la administración de una dosis inicial. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 90 % con respecto a un control 20 días después de la administración de una dosis inicial.

En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 15 % con respecto a un control. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 10 % con respecto a un control. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 5 % con respecto a un control.

En algunas realizaciones, el control es un sujeto con el mismo estado de enfermedad sin tratamiento. En algunas realizaciones, el control es un peso corporal del sujeto antes de la administración de la composición.

En algunas realizaciones, la primera nanopartícula lipídica comprende un primer lípido catiónico y la segunda nanopartícula lipídica comprende un segundo lípido catiónico, en donde el primer lípido catiónico es diferente del segundo lípido catiónico.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en cKK-E12, OF-02, C12-200, MC3, DLinDMA, DLinkC2DMA, ICE (basado en imidazol), HGT5000, HGT5001, HGT4003, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA y DMDMA, DODAC, DLenDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, 3-(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)-6-(4-((2-hidroxidodecil)(2-hidroxiundecil)amino)butil)-1,4-dioxano-2,5-diona (Diana 23) y 3-(5-(bis(2-hidroxidodecil)amino)pentan-2-il)-6-(5-((2-hidroxidodecil)(2-hidroxiundecil)amino)pentan-2-il)-1,4-dioxano-2,5-diona (Diana 24). En algunas realizaciones, el lípido catiónico es cKK-E12.

En algunas realizaciones, la composición se administra por vía subcutánea. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía subcutánea. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intradérmica. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra mediante administración pulmonar. En algunas realizaciones, la composición se administra mediante nebulización.

En algunas realizaciones, la administración de la composición comprende inyectar una dosis única. En algunas realizaciones, la administración de la composición comprende inyectar múltiples dosis periódicamente. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 100 mg de ARNm. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 50 mg de ARNm. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 25 mg de ARNm. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 10 mg de ARNm. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 1 µg - 1 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 1 µg - 100 µg de ARNm.

En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 0,1 µg. En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 0,3 µg. En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 0,5 µg. En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 1 µg. En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 5 µg. En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 10 µg. En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 25 µg. En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 50 µg. En algunas realizaciones, la dosis única es o las dosis múltiples son 100 µg.

En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,01 µg de ARNm/kg de peso corporal - 10 mg de ARNm/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,01 µg de ARNm/kg de peso corporal - 8 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,01 µg de ARNm/kg de peso corporal - 6 mg de ARNm/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,01 µg de ARNm/kg de peso corporal - 5 mg de ARNm/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg de ARNm/kg de peso corporal - 5 mg de ARNm/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg de

ARNm/kg de peso corporal - 1 mg de ARNm/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg de ARNm/kg de peso corporal - 0,5 mg de ARNm/kg de peso corporal.

En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples comprende la misma cantidad de dosis de ARNm. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples comprende una cantidad de dosis diferente de ARNm.

En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples se inyectan con 1 día a 3 semanas de diferencia. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples se inyecta diariamente. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples se inyecta con 3 días de diferencia. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples se inyecta semanalmente. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples se inyecta con 10 días de diferencia. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples se inyecta dos veces por semana. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples se inyecta mensualmente. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples se inyecta bimensualmente.

En algunas realizaciones, el ARNm comprende uno o más nucleótidos modificados. En algunas realizaciones, el ARNm comprende una región no traducida en 5' (5' UTR) y/o una región no traducida en 3' (3' UTR). En algunas realizaciones, el ARNm comprende una región no traducida en 5' (5' UTR). En algunas realizaciones, el ARNm comprende una región no traducida en 3' (3' UTR).

En algunas realizaciones, la administración de la composición activa los linfocitos T en el sujeto. En algunas realizaciones, al sujeto se le administra además una composición que comprende un inhibidor del punto de control. En algunas realizaciones, al sujeto no se le administra una composición que comprende un inhibidor del punto de control. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe PD1, PD-L1, CTLA-4, B7, BTLA, HVEM, TIM-3, GAL-9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe PD1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe CTLA-4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe B7. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe BTLA. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe HVEM. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe TIM-3. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe GAL-9. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe LAG3. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe VISTA. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe KIR. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe 2B4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe CD160. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe CGEN-15049. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe CHK1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe CHK2. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe A2aR.

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm se encapsulan dentro de la misma nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm se encapsulan dentro de nanopartículas lipídicas separadas.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más ARNm que codifican cada uno una proteína o un péptido encapsulado dentro de una o más nanopartículas lipídicas para tratar el cáncer, en donde dos de los dos o más ARNm codifican IL-12 y STING, respectivamente, en donde la una o más nanopartículas lipídicas comprenden cada uno un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1-15, respectivamente, y al menos una de las una o más nanopartículas lipídicas comprende cKK-E12, OF-00, OF-01, OF-02 o OF-03 como un lípido catiónico.

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican STING, IL-12 y GM-CSF. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican STING, IL-12, FLT-3L y GM-CSF. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican STING, IL-12, NLRP3 y GM-CSF. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican STING, IL-12, IL-2 y GM-CSF.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un ARNm adicional que codifica un inhibidor del punto de control. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inhibe PD1, PD-L1, CTLA-4, B7, BTLA, HVEM, TIM-3, GAL-9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR o una combinación de los mismos.

La administración de la composición puede dar lugar a un efecto abscopal. La administración de la composición puede dar lugar a un efecto abscopal.

La administración de la composición puede dar lugar a un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral de un tumor no tratado superior al 50 % en relación con un control 7 días después de la administración de una dosis inicial.

La administración de la composición puede dar lugar a un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral de un tumor no tratado superior al 60 %, superior al 70 % o superior al 80 % con respecto a un control 10 días después de la administración de una dosis inicial.

La administración de la composición puede dar lugar a un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral de un tumor no tratado superior al 80 %, superior al 85 % o superior al 90 % con respecto a un control 20 días después de la administración de una dosis inicial.

La administración de la composición puede aumentar la supervivencia de un sujeto que tiene cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los dibujos son para fines ilustrativos, no para limitación.

La **FIG. 1** es un gráfico que representa datos de comparación sobre la eficacia de diferentes ARNm-LNP en la actividad antitumoral *in vivo*. El volumen tumoral medio de cada grupo se midió a lo largo del estudio después de la administración intratumoral de ARNm-LNP a ratones MC38 según la dosis y la frecuencia como se muestra en la Tabla 2.

La **FIG. 2** es un gráfico que representa el porcentaje medio del volumen tumoral de los Grupos B-I en comparación con el grupo control, Grupo A.

La **FIG. 3** es un gráfico que representa el porcentaje medio de inhibición del volumen tumoral de los Grupos B-I en comparación con el grupo control, Grupo A.

La **FIG. 4** es una gráfica de dispersión que representa el volumen tumoral de ratones individuales en cada grupo el día 46. Se indica el volumen tumoral medio de cada grupo.

La **FIG. 5** es una serie de tablas que muestran los volúmenes tumorales (mm^3) de ratones individuales en cada Grupo A (**FIG. 5A**), Grupo B (**FIG. 5B**), Grupo C (**FIG. 5C**), Grupo D (**FIG. 5D**), Grupo E (**FIG. 5E**), Grupo F (**FIG. 5F**), Grupo G (**FIG. 5G**), Grupo H (**FIG. 5H**) y Grupo I (**FIG. 5I**). Los valores de media y desviación estándar se indican en las dos últimas filas. El espacio en blanco indica la muerte. El tamaño de la muestra para cada grupo fue de 10.

La **FIG. 6** es un gráfico que representa el cambio porcentual medio del peso corporal a lo largo del período de estudio en comparación con el peso corporal el día 1.

La **FIG. 7** es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral después de la administración de ARNm de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos, un control negativo o un control de vehículo en ratones modelo de cáncer de ratón MC38.

La **FIG. 8** es una serie de gráficos que muestran la supervivencia de ratones con cáncer MC38 después de la administración de 1) ARNm de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos y un anticuerpo de control de isotipo; 2) un ARNm de control negativo y un anticuerpo de control de isotipo; o 3) un control de vehículo; en comparación con ratones con cáncer MC38 que se administraron con: 1) ARNm de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos y un anticuerpo anti-PD-1; 2) un ARNm de control negativo y un anticuerpo anti-PD-1; o 3) control del vehículo.

DEFINICIONES

Para que la presente invención se entienda más fácilmente, a continuación se definen primero ciertos términos. A lo largo de la memoria descriptiva se exponen definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos.

Animal: Como se usa en el presente documento, "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a seres humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal modificado genéticamente y/o un clon.

Aproximadamente o alrededor de: Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de", como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que entran dentro de aproximadamente el 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (superior a o inferior a) del valor de referencia establecido, a menos que se establezca lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto (excepto donde dicho número superara el 100 % de un posible valor).

Administración: Como se utiliza en el presente documento, el término "administración" abarca tanto administración local como sistémica. Por ejemplo, la administración de ARNm abarca situaciones en las que un ARNm se administra a un tejido diana y la proteína codificada se expresa y se mantiene dentro del tejido diana (también denominada "distribución local" o "administración local"), y situaciones en las que se administra un ARNm a un tejido diana y la proteína codificada se expresa y se secreta en el aparato circulatorio del paciente (por ejemplo, suero) y se distribuye y absorbe sistemáticamente por otros tejidos (también denominada "distribución sistémica" o "administración sistémica").

Encapsulación: Como se utiliza en el presente documento, el término "encapsulación", o equivalente gramatical, se refiere al proceso de confinar una molécula de ARNm individual dentro de una nanopartícula.

Expresión: Como se utiliza en el presente documento, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a la traducción de un ARNm en un polipéptido, ensamblaje de múltiples polipéptidos en una proteína intacta (por ejemplo, enzima) y/o modificación postraduccional de un polipéptido o proteína completamente ensamblada (por ejemplo, enzima). En esta solicitud, los términos "expresión" y "producción", y equivalentes gramaticales, se utilizan indistintamente.

Semivida: Como se utiliza en el presente documento, el término "semivida" es el tiempo requerido para que una cantidad tal como una concentración o actividad de ácido nucleico o proteína caiga a la mitad de su valor como se mide al comienzo de un período de tiempo.

Mejorar, aumentar o reducir: Como se utilizan en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición basal, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento, o una medición en un sujeto de control (o sujeto de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "sujeto de control" es un sujeto que sufre la misma forma de enfermedad que el sujeto que se está tratando, que tiene aproximadamente la misma edad que el sujeto que se está tratando.

In vitro: Como se utiliza en el presente documento, el término *"in vitro"* se refiere a eventos que ocurren en un ambiente artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

In vivo: Como se utiliza en el presente documento, el término *"in vivo"* se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo multicelular, tal como un ser humano y un animal no humano. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (a diferencia de, por ejemplo, sistemas *in vitro*).

Distribución o administración local: Como se utilizan en el presente documento, los términos "distribución local", "administración local", o equivalente gramatical, se refieren a la administración o distribución específica de tejido. Normalmente, la distribución o administración local requiere que una proteína (por ejemplo, enzima) codificada por ARNm se traduzca y se exprese intracelularmente o con secreción limitada que evite entrar en el aparato circulatorio del paciente.

ARN mensajero (ARNm): Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ARN mensajero (ARNm)" se refiere a un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido. El ARNm como se utiliza en el presente documento abarca tanto ARN modificado como no modificado. El ARNm puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes. El ARNm se puede purificar a partir de fuentes naturales, producirse utilizando sistemas de expresión recombinantes y opcionalmente purificado, sintetizado químicamente, etc. Cuando corresponda, por ejemplo, en el caso de moléculas químicamente sintetizadas, el ARNm puede comprender análogos de nucleósidos, tales como análogos que tienen bases o azúcares modificados químicamente, modificaciones de la estructura principal, etc. Una secuencia de ARNm se presenta en la dirección 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. En algunas realizaciones, un ARNm es o comprende nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, guanosina, citidina, uridina); análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-iodoridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina); bases químicamente modificadas; bases biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (por ejemplo, enlaces fosforotioato y 5'-N-fosforamidita).

Paciente: Como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier organismo al que se pueda administrar una composición proporcionada, por ejemplo, para fines experimentales, diagnósticos, profilácticos, cosméticos y/o terapéuticos. Los pacientes típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y/o seres humanos). En algunas realizaciones, un paciente es un ser humano. Un ser humano incluye formas prenatales y postnatales.

Farmacéuticamente aceptable: La frase "farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en el presente documento se refiere a sustancias que, dentro del juicio médico razonable, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y los animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Sujeto: Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un ser humano o cualquier animal no humano *(por ejemplo*, ratón, rata, conejo, perro, gato, vacuno, porcino, ovino, caballo o primate). Un ser humano incluye formas prenatales y postnatales. En algunas realizaciones, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un ser humano que se presenta a un profesional médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se utiliza en el presente documento indistintamente con "individuo" o "paciente". Un sujeto puede estar afectado o es susceptible a una enfermedad o trastorno, pero puede o no puede mostrar síntomas de la enfermedad o trastorno.

Sustancialmente: Como se utiliza en el presente documento, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de presentar una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las artes biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, si es que alguna vez, llegan a su finalización y/o proceden a su integridad o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se utiliza en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

Distribución o administración sistémica: Como se utilizan en el presente documento, los términos "distribución sistémica", "administración sistémica" o equivalente gramatical se refieren a un mecanismo o enfoque de administración o distribución que afecta a todo el cuerpo o a todo un organismo. Normalmente, la distribución o administración sistémica se logra a través del aparato circulatorio del cuerpo, por ejemplo, la circulación sanguínea. En comparación con la definición de "distribución o administración local".

Tejidos diana: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido que se vea afectado por una enfermedad que se va a tratar. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que muestran patología, síntoma o característica asociada a la enfermedad.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. Los expertos en la técnica apreciarán que una cantidad terapéuticamente eficaz normalmente se administra a través de una pauta posológica que comprende al menos una dosis unitaria.

Tratando: Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar", "tratamiento" o "que trata" se refiere a cualquier método utilizado para aliviar, mejorar, mitigar, inhibir, evitar, retrasar la aparición, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad y/o presenta solo signos tempranos de la enfermedad con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona terapéuticos de ARNm mejorados para el tratamiento del cáncer como se establece en las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende dos o más ARNm que codifican cada uno una proteína o un péptido encapsulado dentro de una o más nanopartículas lipídicas para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende administrar la composición a un sujeto que lo necesite, en donde dos de los dos o más ARNm codifican STING e IL-12, respectivamente, y en donde cada una de la una o más nanopartículas lipídicas comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1:15, respectivamente. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más ARNm que codifican cada uno una proteína o un péptido encapsulado dentro de una o más nanopartículas lipídicas para tratar el cáncer, en donde dos de los dos o más ARNm codifican IL-12 y STING, respectivamente, en donde la una o más nanopartículas lipídicas comprenden cada uno un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1-15, respectivamente, y al menos una de las una o más nanopartículas lipídicas comprende cKK-E12, OF-00, OF-01, OF-02 o OF-03 como un lípido catiónico. Dichas composiciones son eficaces para reducir o disminuir el tamaño, la masa y/o el volumen de un tumor o inhibir o retrasar el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesite cuando se administra, a una dosis eficaz y un intervalo de administración. La administración de dichas composiciones puede aumentar la supervivencia.

Varios aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones.

Cáncer

Las células cancerosas expresan antígenos que no se expresan comúnmente en células o tejidos no cancerosos. Estos antígenos de cáncer no se presentan por células presentadoras de antígeno (APC) de una manera similar a los antígenos víricos, es decir, en asociación con la molécula MHC-1 que clasifica el antígeno como exógeno, pero los linfocitos T citotóxicos son capaces de diferenciar e identificar autoantígenos mutados y poseen una propiedad inherente para buscar y destruir células que portan los antígenos mutados. Por lo tanto, un objetivo de la inmunoterapia contra el cáncer es lograr la activación óptima de linfocitos T citotóxicos dirigidos contra los antígenos mutados. Las composiciones de la presente invención son eficaces para inducir a los propios linfocitos T citotóxicos de un sujeto para generar la respuesta inmunitaria necesaria para destruir células tumorales.

La homeostasis tisular normal es un proceso de proliferación celular y muerte celular altamente regulado. Un desequilibrio de la proliferación celular o de la muerte celular puede convertirse en un estado canceroso (Solyanik *et al.* , 1995; Stokke *et al.* , 1997; Mumbyand Walter, 1991; Natoli *et al.* , 1998; Magi-Galluzzi *et al.,* 1998). Por ejemplo, cáncer de cuello uterino, riñón, pulmón, páncreas, colorrectal y cerebro son solo algunos ejemplos de los muchos cánceres que pueden resultar (Erlandsson, 1998; Kölmel, 1998; Mangrayand King, 1998; Gertig y Hunter, 1997; Mougin *et al.,* 1998). De hecho, la incidencia de cáncer es tan alta que más de 500.000 muertes por año se atribuyen al cáncer en los Estados Unidos.

El mantenimiento de la proliferación celular y la muerte celular está regulado al menos parcialmente por proto-oncogenes. El proto-oncogén puede codificar proteínas que inducen proliferación celular (por ejemplo, *sis, erbB, src, ras* y *myc)*, proteínas que inhiben la proliferación celular (por ejemplo, *Rb, p53, NF1* y *WT1)* o proteínas que regulan la muerte celular programada (por ejemplo, *bcl* - 2) (Ochi et al., 1998; Johnson y Hamdy, 1998; Liebermann et al., 1998). Sin embargo, los reordenamientos genéticos o mutaciones en estos proto-oncogenes dan como resultado la conversión de un protooncogén en un potente oncogén causante de cáncer. A menudo, una mutación de un solo punto es suficiente para transformar un proto-oncogén en un oncogén. Por ejemplo, una mutación en el codón 12 o 13 en el gen K-ras puede convertir el proto-oncogén en un oncogén.

Actualmente, hay pocas opciones eficaces para tratar muchas opciones de cánceres comunes. El ciclo de tratamiento para un individuo determinado depende del diagnóstico, el estadio en el que se ha desarrollado la enfermedad y factores tales como la edad, el sexo y la salud general del paciente. Las opciones más convencionales de tratamiento del cáncer son cirugía, radioterapia y quimioterapia. La cirugía desempeña un papel clave en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Normalmente, se requiere un enfoque quirúrgico para la biopsia y para eliminar el crecimiento canceroso. Sin embargo, si el cáncer ha metastatizado y está muy extendido, es poco probable que la cirugía dé como resultado una cura y debe tomarse un enfoque alternativo. La radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia son alternativas al tratamiento quirúrgico del cáncer (Mayer, 1998; Ohara, 1998; Ho *et al.,* 1998). La radioterapia implica un direccionamiento preciso de la radiación de alta energía para destruir el cáncer y, al igual que las células quirúrgicas, es eficaz principalmente en el tratamiento de células cancerosas localizadas, no metastatizadas. Los efectos secundarios de la radioterapia incluyen irritación cutánea, dificultad para tragar, boca seca, náuseas, diarrea, pérdida de cabello y pérdida de energía (Curran, 1998; Brizel, 1998).

La quimioterapia, el tratamiento contra el cáncer con fármacos antineoplásicos, es otro modo de terapia contra el cáncer. La eficacia de la terapia con fármacos antineoplásicos a menudo es limitada debido a la dificultad de lograr la administración de fármacos en todos los tumores sólidos (el-Kareh y Secomb, 1997). Las estrategias quimioterapéuticas se basan en el crecimiento de un tumor sólido, en donde el fármaco antineoplásico seleccionado como células cancerosas diana se está dividiendo rápidamente. La mayoría de los enfoques de quimioterapia incluyen la combinación de más de un fármaco anticanceroso, que se ha demostrado que aumenta la tasa de respuesta de una amplia variedad de cánceres. Un efecto secundario importante de los fármacos de quimioterapia es que también afectan a las células de tejido normales, con más probabilidades de que las células se vean afectadas dividiéndose rápidamente (por ejemplo, médula ósea, tubo gastrointestinal, aparato reproductor y folículos pilosos). Otros efectos secundarios de los fármacos de quimioterapia son llagas en la boca, dificultad para tragar, boca seca, náuseas, diarrea, vómitos, fatiga, hemorragia, caída del cabello e infección. Se pueden usar otras formas de quimioterapia para tratar trastornos hiperproliferativos no cancerosos. Estos incluyen el uso de quimioterapéuticos convencionales, tales como metotrexato y ciclofosfamida para enfermedades hiperproliferativas tales como artritis reumatoide y psoriasis. Las enfermedades hiperproliferativas de quimioterapia también pueden incluir agentes inmunosupresores tales como esteroides, azatioprina, ciclosporina y agentes inmunomoduladores tales como derivados de ácido fumárico.

La inmunoterapia, área de rápida evolución en la investigación del cáncer, es otra opción más para tratar ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, el sistema inmunitario identifica células tumorales como extrañas y, por lo tanto, se seleccionan como diana para la destrucción por el sistema inmunitario. Desafortunadamente, la respuesta normalmente no es suficiente para prevenir la mayoría de los crecimientos tumorales. Sin embargo, recientemente ha habido un enfoque en el área de inmunoterapia para desarrollar métodos que aumenten o complementen los mecanismos de defensa naturales del sistema inmunitario.

Como se mencionó anteriormente, los protooncogenes desempeñan un papel importante en la biología del cáncer. Por ejemplo, los supresores tumorales Rb, p53, NF1 y WT1 son esenciales para el mantenimiento del fenotipo no tumorigénico de células (revisado por Soddu y Sacchi, 1998). Se ha encontrado que aproximadamente el 50 % de

todos los cánceres están asociados con mutaciones del gen p53, lo que da como resultado la pérdida de las propiedades como supresor de tumores p53 (Levine et al., 1991; Vogelstein y Kinzler, 1992; Hartmann et al, 1996a; Hartmann et al., 1996b). La alta incidencia de mutaciones del gen p53 en el cáncer ha llevado a muchos grupos de investigación a investigar p53 como una vía de tratamiento del cáncer mediante transferencia o reemplazo de genes. El protooncogén sis, erbB, src, ras y myc, proteínas codificantes que inducen la proliferación celular, y los proto-oncogenes de la familia Bcl-2 que regulan la muerte celular programada también desempeñan papeles importantes en el fenotipo no tumorigénico de células.

En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de hígado, leucemia, glioma, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer testicular, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, un carcinoma ductal de glándulas mamarias, carcinoma infiltrante de mama de tipo lobular, carcinoma intraductal de mama, carcinoma mucinoso de mama, leucemia promileocítica en sangre periférica, un adenocarcinoma de ovario, un adenocarcinoma de ovario que ha migrado a la cavidad abdominal, un adenocarcinoma de próstata, un carcinoma de células transicionales de la vejiga, un carcinoma epiteliode en un conducto pancreático, un adenocarcinoma en un conducto pancreático, un adenocarcinoma en el epitelio cervical, cáncer cervical, cáncer gastrointestinal, cáncer urogenital, cáncer cerebral, mesotelioma, cáncer de células renales, cáncer ginecológico o cáncer de endometrio.

Tratamiento del cáncer

La presente invención proporciona composiciones para tratar el cáncer. Las composiciones son eficaces para reducir o disminuir el tamaño, la masa y/o el volumen de un tumor o inhibir o retrasar el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesite cuando se administra, a una dosis eficaz y un intervalo de administración. Las composiciones también pueden ser eficaces para aumentar la supervivencia de un sujeto. Por ejemplo, las composiciones pueden aumentar la supervivencia de un sujeto que padece cáncer entre aproximadamente 1 mes y 12 meses; 1 año y 5 años; 5 años y 10 años; 10 años y 15 años.

Tamaño del tumor

Las composiciones pueden ser eficaces para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto que lo necesite en comparación con un control. El control puede ser un sujeto no tratado con el mismo estado de enfermedad. El control puede ser el sujeto antes de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 5 % a un 99 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 5 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 10 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 15 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 20 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 25 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 30 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 35 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 40 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 45 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 50 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 60 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 70 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 80 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 85 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 90 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 95 % en comparación con un control. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor en al menos un 99 % en comparación con un control. La administración de la composición puede dar lugar a la desaparición de un tumor.

La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 1 día después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 2 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 4 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 5 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 7 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 10 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 12 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 15 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 18 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 20 días después de la administración. La

administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 25 días después de la administración. La administración de la composición puede reducir el tamaño de un tumor 30 días después de la administración.

La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante todo el período de tratamiento. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 5 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 7 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 10 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 15 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 20 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 25 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 30 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 35 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 40 días. La administración de la composición puede dar como resultado un tamaño tumoral reducido en comparación con el control durante 45 días.

Inhibición del crecimiento tumoral

Las composiciones para tratar el cáncer pueden ser eficaces para inhibir o retrasar el crecimiento del tumor. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral se calcula de la siguiente manera: (Media(C)-media(T))/media(C) * 100 %, en donde T es el volumen tumoral del grupo de prueba y C es el volumen tumoral del grupo de control, en donde el control es el sujeto sin tratamiento. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 5 % al 99 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 5 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 10 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 15 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 20 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 25 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 30 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 35 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 40 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 45 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 50 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 60 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 70 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 75 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 80 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 85 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 90 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 95 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral mayor del 99 % con respecto a un control.

La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 1 día después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 3 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 5 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 7 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 10 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 15 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 20 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 25 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral 30 días después de la administración de una dosis inicial.

La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control durante todo el período de tratamiento. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del

crecimiento tumoral en comparación con un control 1 día. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 5 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 7 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 10 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 15 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 20 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 25 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 30 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 35 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 40 días. La administración de la composición puede dar lugar a la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un control 45 días.

La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 50 % con respecto a un control 5 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 50 % con respecto a un control 7 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 60 % con respecto a un control 5 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 60 % con respecto a un control 7 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 50 % con respecto a un control 10 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 70 % con respecto a un control 5 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 70 % con respecto a un control 7 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 70 % con respecto a un control 10 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 80 % con respecto a un control 5 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 80 % con respecto a un control 7 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 80 % con respecto a un control 10 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 80 % con respecto a un control 15 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 80 % con respecto a un control 20 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 80 % con respecto a un control 25 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 85 % con respecto a un control 7 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 85 % con respecto a un control 15 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 85 % con respecto a un control 20 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 85 % con respecto a un control 25 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 90 % con respecto a un control 7 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 90 % con respecto a un control 15 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 90 % con respecto a un control 20 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 90 % con respecto a un control 25 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 95 % con respecto a un control 7 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 95 % con respecto a un control 15 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 95 % con respecto a un control 20 días después de la administración de una dosis inicial. La administración de la composición puede dar como resultado un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral superior al 95 % con respecto a un control 25 días después de la administración de una dosis inicial.

La administración de la composición puede inducir la proliferación de linfocitos T, inducir la infiltración de linfocitos T en un tumor, inducir una respuesta de linfocitos T de memoria, aumentar el número de linfocitos T, etc. La administración de las composiciones puede activar linfocitos T en el sujeto. La activación de linfocitos T se puede

caracterizar de cualquier manera conocida en la técnica. Los linfocitos T activados pueden expresar CD4. Los linfocitos T activados pueden expresar CD8. Los linfocitos T activados pueden expresar CD4 y CD8. Los linfocitos T activados pueden comprender linfocitos T $CD4^+$, linfocitos T $CD8^+$, o tanto linfocitos T $CD4^+$ como linfocitos T $CD8^+$. La activación de linfocitos T puede comprender aumentar el número de linfocitos T infiltrantes de tumor. El número de linfocitos T que se infiltran en el tumor puede aumentar al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces, en comparación con el número de linfocitos T tumorales que se infiltran en el tumor antes de la administración de la composición.

Cambio de peso corporal

La pérdida de peso es común entre sujetos con cáncer. El alivio de los efectos secundarios, incluida la pérdida de peso, es una parte importante del cuidado y el tratamiento del cáncer. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 60 % al 1 % con respecto a un control. En algunas realizaciones, el control es un peso corporal del sujeto antes de la administración de la composición. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 60 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 50 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 40 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 30 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 25 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 20 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 15 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 10 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 5 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar a un cambio porcentual del peso corporal en el sujeto de menos del 1 % con respecto a un control. La administración de la composición puede dar lugar sustancialmente a ningún cambio del peso corporal en el sujeto con respecto a un control.

Respuesta completa

En el tratamiento del cáncer, la eficacia a largo plazo es otro factor importante. La administración de la composición puede dar lugar a remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable, respuesta parcial o respuesta completa. La respuesta completa significa que los signos del cáncer han desaparecido o que se ha mantenido la inhibición del crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, respuesta parcial se refiere a un grado de daño de múltiples tumores que se ha reducido en respuesta al tratamiento. La tasa de respuesta completa es el porcentaje de sujetos que presentan una respuesta completa después de la administración de la composición. La tasa de respuesta completa es superior al 50 %. La tasa de respuesta completa es superior al 60 %. La tasa de respuesta completa es superior al 70 %. La tasa de respuesta completa es superior al 80 %. La tasa de respuesta completa es superior al 85 %. La tasa de respuesta completa es superior al 90 %. La tasa de respuesta completa es superior al 95 %. La tasa de respuesta completa es superior al 99 %.

Intervalo de dosis y administración

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se basa en gran medida en la cantidad total del ARNm contenido en las composiciones de la presente invención. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, inhibir la prevención y/o retrasar el cáncer o sus síntomas). Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado. Generalmente, la cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína o un péptido) administrada a un sujeto que lo necesita dependerá de las características del sujeto. Dichas características incluyen la afección, gravedad de la enfermedad, salud general, edad, sexo y peso corporal del sujeto. Un experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente dosis adecuadas dependiendo de estos y otros factores relacionados. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos tanto objetivos como subjetivos para identificar intervalos de dosis óptimos.

Un vehículo de administración que comprende ARNm se puede administrar y dosificar según la práctica médica actual, teniendo en cuenta la condición clínica del sujeto, el sitio y el método de administración (por ejemplo, local y sistémico, incluyendo intratumoral, intravenoso y mediante inyección), la programación de la administración, la edad del sujeto, el sexo, el peso corporal y otros factores relevantes para los médicos con conocimientos normales en la materia. La "cantidad eficaz" para los fines del presente documento puede determinarse mediante dichas consideraciones relevantes que son conocidas por los expertos en investigación clínica experimental, artes farmacológicas, clínicas y médicas. La cantidad administrada puede ser eficaz para lograr al menos cierta estabilización, mejora o eliminación

de los síntomas (por ejemplo, reducción del tamaño del tumor y/o inhibición del crecimiento tumoral) y otros indicadores seleccionados como medidas apropiadas del progreso, regresión o mejora del cáncer por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la administración de la composición comprende inyectar una dosis única. En algunas realizaciones, la administración de la composición comprende inyectar múltiples dosis periódicamente.

En algunas realizaciones, una dosis adecuada varía de 0,1 µg - 100 mg de ARNm. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 50 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 25 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 10 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 1 µg - 1 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o las dosis múltiples varían de 1 µg - 100 µg de ARNm. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 0,1 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 0,3 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 0,5 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 1 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 5 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 7,5 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 10 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 15 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 20 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 25 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 30 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 40 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 50 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 100 µg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 1 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 5 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 7,5 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 10 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 20 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 30 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 50 mg. En algunas realizaciones, la dosis única o la dosis múltiple es 100 mg.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 500 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 400 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 300 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 200 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 90 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 80 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 70 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 60 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 40 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 30 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 15 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 1,0 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 70 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 90 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 150 mg/kg de peso

corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 450 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de la composición es mayor que aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es 1,0 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz de 1,0 mg/kg de peso corporal se administra por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la presente invención puede administrarse en una sola, así como en múltiples administraciones. La composición se puede administrar a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, gravedad y extensión de la afección del sujeto, tal como el tamaño del tumor, el progreso de la metástasis o el estadio del cáncer. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención puede administrarse periódicamente a intervalos regulares (por ejemplo, diariamente, dos veces a la semana, una vez cada cuatro días, semanalmente, una vez cada 10 días, quincenalmente, mensualmente, bimensualmente, dos veces al mes, una vez cada 30 días, una vez cada 28 días o de forma continua.

En algunas realizaciones, los liposomas y/o las composiciones proporcionados se formulan de manera que sean adecuados para la liberación prolongada del ARNm contenido en los mismos. Dichas composiciones de liberación prolongada pueden administrarse convenientemente a un sujeto a intervalos de administración prolongados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces al día. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto dos veces al día. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto diariamente. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto cada dos días. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto dos veces por semana. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez a la semana. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada 7 días. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada 10 días. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada 14 días. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada 28 días. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada 30 días. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada tres semanas. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada cuatro semanas. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez al mes. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto dos veces al mes. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada seis semanas. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada ocho semanas. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada dos meses. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada tres meses. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada cuatro meses. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada seis meses. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada ocho meses. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto una vez cada nueve meses. En algunas realizaciones, la composición se administra a un sujeto anualmente. También se contemplan composiciones y liposomas que se formulan para la administración de depósito (por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, intravítrea) para suministrar o liberar ARNm durante períodos prolongados de tiempo. Preferiblemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones realizadas en el ARNm para mejorar la estabilidad.

Comúnmente se administra una cantidad terapéuticamente eficaz en una pauta posológica que puede comprender múltiples dosis unitarias. Una cantidad terapéuticamente eficaz y un intervalo de administración (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de una pauta posológica eficaz) pueden variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Por lo tanto, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente de vacuna específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares como se conoce bien en las artes médicas.

En algunas realizaciones, una dosis inicial y la dosis o dosis posteriores son de la misma cantidad. En algunas realizaciones, una dosis inicial y la dosis o dosis posteriores son de cantidad diferente. En algunas realizaciones, una dosis inicial es mayor que la dosis o dosis posteriores. En algunas realizaciones, una dosis inicial es menor que la dosis o dosis posteriores. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples comprende la misma cantidad de dosis de ARNm. En algunas realizaciones, cada una de las dosis múltiples comprende una cantidad de dosis diferente de ARNm.

Composición de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende dos o más ARNm que codifican cada uno una proteína o un péptido encapsulado dentro de una o más nanopartículas lipídicas para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende administrar la composición a un sujeto que lo necesite, en donde dos de los dos o más ARNm codifican STING e IL-12, respectivamente, y en donde cada una de la una o más nanopartículas lipídicas comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1:15, respectivamente. En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más ARNm que codifican cada uno una proteína o un péptido encapsulado dentro de una o más nanopartículas lipídicas para tratar el cáncer, en donde dos de los dos o más ARNm codifican IL-12 y STING, respectivamente, en donde la una o más nanopartículas lipídicas comprenden cada uno un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1-15, respectivamente, y al menos una de las una o más nanopartículas lipídicas comprende cKK-E12, OF-00, OF-01, OF-02 o OF-03 como un lípido catiónico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además dos o más ARNm que codifican uno o más inhibidores del punto de control.

ARNm

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican proteínas o péptidos inmunomoduladores adicionales que son útiles en inmunooncología (IO). Las proteínas o péptidos inmunomoduladores adicionales incluyen interleucina (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-13, IL-15/15R, IL-18, IL-21, IL-27, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-Iβ, MIP-Ia, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, MCP-3, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), RANTES (CCL5), interferón (IFN)-γ, factor de necrosis tumoral (TNF)-α, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), cúmulo de diferenciación (CD) 80, CD86, EFNα, IFNp, IFN, ligando de tirosina cinasa 3 similar a FMS (FLT3L), 1 que contiene dominio de pirina de la familia NLR (NLRP1), NLRP3, ausente en melanoma 2 (AIM2), pirina, proteína 16 inducible por IFN (IFI16) y OX40L.

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm están optimizados con codones. En algunas realizaciones, la proteína o el péptido codificado por los ARNm son naturales. En algunas realizaciones, la proteína o el péptido codificado por los ARNm contienen una mutación o modificación. En algunas realizaciones, STING contiene una mutación R293M. En algunas realizaciones, NLRP3 contiene una mutación D301N.

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican STING, IL-12 y GM-CSF. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican STING, IL-12, FLT-3L y GM-CSF. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican STING, IL-12, NLRP3 y GM-CSF. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican STING, IL-12, IL-2 y GM-CSF.

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm codifican adicionalmente una enzima inmunomoduladora y/o un inhibidor del punto de control. En algunas realizaciones, un inhibidor del punto de control inhibe PD1, PD-L1, CTLA-4, B7, BTLA, HVEM, TIM-3, GAL-9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe PD1. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe CTLA-4. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe B7. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe BTLA. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe HVEM. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe TIM-3. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe GAL-9. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe LAG3. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe VISTA. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe KIR. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe 2B4. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe CD160. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe CGEN-15049. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe CHK1. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe CHK2. En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control adecuado inhibe A2aR. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control es un antagonista contra PD1, PD-L1, CTLA-4, B7, BTLA, HVEM, TIM-3, GAL-9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento del mismo está humanizado. En algunas realizaciones, la composición comprende un inhibidor del punto de control.

Síntesis de ARNm

Los ARNm se pueden sintetizar según cualquiera de una variedad de métodos conocidos. Por ejemplo, los ARNm se pueden sintetizar mediante transcripción *in vitro* (IVT). Resumiendo, la IVT se realiza normalmente con un molde de ADN lineal o circular que contiene un promotor, un grupo de trifosfatos de ribonucleótidos, un sistema tampón que puede incluir DTT e iones de magnesio, y un inhibidor de ARN polimerasa apropiado (por ejemplo, ARN polimerasa T3, T7 o SP6), DNAsa I, pirofosfatasa y/o ARNasa. Las condiciones exactas variarán según la aplicación específica.

Diseño de construcciones a modo de ejemplo de ARNm

Diseño de construcciones:

X - *región codificante de ARNm* - **Y**

Secuencias 5' y 3' UTR:

X (secuencia 5' UTR) =

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACA
CCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC
CCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (**SEQ ID NO: 1**)

Y (secuencia 3' UTR) =

CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAAGUUG
CCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU
(**SEQ ID NO: 2**)

O

GGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAAGUUGC
CACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAAGCU
(**SEQ ID NO: 3**)

En algunas realizaciones, para la preparación de ARNm, se transcribe un molde de ADN *in vitro.* Un molde de ADN adecuado normalmente tiene un promotor, por ejemplo, un promotor T3, T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, seguido de la secuencia de nucleótidos deseada para el ARNm deseado y una señal de terminación.

Síntesis de ARNm utilizando ARN polimerasa SP6

El ARNm se puede producir utilizando ARN polimerasa SP6. La ARN polimerasa SP6 es una ARN polimerasa dependiente de ADN con alta especificidad de secuencia para secuencias promotoras de SP6. La polimerasa SP6 cataliza la síntesis *in vitro* 5'→3' de ARN en ADN monocatenario o ADN bicatenario aguas abajo de su promotor; incorpora ribonucleótidos nativos y/o ribonucleótidos modificados y/o ribonucleótidos marcados en el transcrito polimerizado. Los ejemplos de dichos ribonucleótidos marcados incluyen nucleótidos marcados con biotina, fluoresceína, digoxigenina, aminoalilo e isótopos.

Se describió inicialmente la secuencia de ARN polimerasa SP6 de bacteriófago (GenBank: Y00105.1) que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQDLHAIQLQLEEEMFNGGIRRFEADQQRQIAAGSESDTAWNRRLLSELIAPMAEGI
QAYKEEYEGKKGRAPRALAFLQCVENEVAAYITMKVVMDMLNTDATLQAIAMSV
AERIEDQVRFSKLEGHAAKYFEKVKKSLKASRTKSYRHAHNVAVVAEKSVAEKDA
DFDRWEAWPKETQLQIGTTLLEILEGSVFYNGEPVFMRAMRTYGGKTIYYLQTSESV
GQWISAFKEHVAQLSPAYAPCVIPPRPWRTPFNGGFHTEKVASRIRLVKGNREHVRK
LTQKQMPKVYKAINALQNTQWQINKDVLAVIEEVIRLDLGYGVPSFKPLIDKENKPA
NPVPVEFQHLRGRELKEMLSPEQWQQFINWKGECARLYTAETKRGSKSAAVVRMV
GQARKYSAFESIYFVYAMDSRSRVYVQSSTLSPQSNDLGKALLRFTEGRPVNGVEAL
KWFCINGANLWGWDKKTFDVRVSNVLDEEFQDMCRDIAADPLTFTQWAKADAPY
EFLAWCFEYAQYLDLVDEGRADEFRTHLPVHQDGSCSGIQHYSAMLRDEVGAKAV
NLKPSDAPQDIYGAVAQVVIKKNALYMDADDATTFTSGSVTLSGTELRAMASAWDS
IGITRSLTKKPVMTLPYGSTRLTCRESVIDYIVDLEEKEAQKAVAEGRTANKVHPFED
DRQDYLTPGAAYNYMTALIWPSISEVVKAPIVAMKMIRQLARFAAKRNEGLMYTLP
TGFILEQKIMATEMLRVRTCLMGDIKMSLQVETDIVDEAAMMGAAAPNFVHGHDAS
HLILTVCELVDKGVTSIAVIHDSFGTHADNTLTLRVALKGQMVAMYIDGNALQKLLE
EHEVRWMVDTGIEVPEQGEFDLNEIMDSEYVFA (**SEQ ID NO: 4**).

Una ARN polimerasa SP6 puede ser cualquier enzima que tenga sustancialmente la misma actividad polimerasa que la ARN polimerasa SP6 de bacteriófago. Por lo tanto, la ARN polimerasa SP6 puede modificarse a partir de SEQ ID NO: 4. Por ejemplo, una ARN polimerasa SP6 adecuada puede contener una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos. Una ARN polimerasa SP6 adecuada puede ser una secuencia de aminoácidos aproximadamente el 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % o 60 % idéntica u homóloga a SEQ ID NO: 4. Una ARN polimerasa SP6 adecuada puede ser una proteína truncada (del extremo N, del extremo C o internamente), pero conservar la actividad polimerasa. Una ARN polimerasa SP6 adecuada puede ser una proteína de fusión.

Una ARN polimerasa SP6 puede ser un producto disponible comercialmente, por ejemplo, de Aldevron, Ambion, New England Biolabs (NEB), Promega y Roche. La SP6 puede ordenarse y/o diseñarse a medida a partir de una fuente comercial o una fuente no comercial según la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una variante de SEQ ID NO: 4 como se describe en el presente documento. La SP6 puede ser una polimerasa de fidelidad estándar o puede ser de una alta fidelidad/alta eficiencia/alta capacidad que se ha modificado para promover actividades de ARN polimerasa, por ejemplo, mutaciones en el gen de ARN polimerasa SP6 o modificaciones postraduccionales de la propia ARN polimerasa SP6. Los ejemplos de dicha SP6 modificada incluyen SP6 RNA Polymerase-Plus™ de Ambion, HiScribe SP6 de NEB y RiboMAX™ y Riboprobe® Systems de Promega.

Una ARN polimerasa SP6 adecuada puede ser una proteína de fusión. Por ejemplo, una ARN polimerasa SP6 puede incluir uno o más marcadores para promover el aislamiento, la purificación o la solubilidad de la enzima. Un marcador adecuado puede ubicarse en el extremo N, el extremo C y/o internamente. Los ejemplos no limitantes de un marcador adecuado incluyen proteína de unión a calmodulina (CBP); antígeno de 8 kDa de Fasciola hepática (Fh8); péptido de etiqueta FLAG; glutatión-S-transferasa (GST); marcador de histidina (por ejemplo, marcador de hexahistidina (His6)); proteína de unión a maltosa (MBP); sustancia de utilización de N (NusA); marcador de fusión con modificador relacionado con ubiquitina pequeña (SUMO); péptido de unión a estreptavidina (STREP); purificación de afinidad en tándem (TAP); y tioredoxina (TrxA). Se pueden utilizar otros marcadores en la presente invención. Se han descrito estos y otros marcadores de fusión, por ejemplo, Costa et al. Frontiers in Microbiology 5 (2014): 63 y en el documento de patente PCT/US16/57044. Un marcador His puede estar ubicado en el extremo N del SP6.

Promotor SP6

Se puede utilizar cualquier promotor que pueda ser reconocido por una ARN polimerasa SP6. Normalmente, un promotor SP6 comprende 5' ATTTAGGTGACTATAG-3' (SEQ ID NO: 5). Se han descubierto y/o creado variantes del promotor SP6 para optimizar el reconocimiento y/o la unión de SP6 a su promotor. Las variantes no limitantes incluyen, pero no se limitan a: 5'-ATTTAGGGGACACTATAGAAGAG-3'; 5'-ATTTAGGGGACACTATAGAAGG-3'; 5'-ATTTAGGGGACACTATAGAAGGG-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3 ; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGA-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGAG-3 ; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGG-3'; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGGG-

3 ; 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAGNG-3'; y 5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 15).

Además, un promotor SP6 adecuado puede ser aproximadamente el 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 % o 70 % idéntico u homólogo a una cualquiera de SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 15. Además, un promotor SP6 puede incluir uno o más nucleótidos adicionales 5' y/o 3' a cualquiera de las secuencias promotoras descritas en el presente documento.

Molde de ADN

Normalmente, un molde de ADN es totalmente bicatenario o mayormente monocatenario con una secuencia promotora de SP6 bicatenaria.

El ADN plasmídico linealizado (linealizado a través de una o más enzimas de restricción), fragmentos de ADN genómico linealizados (a través de enzima de restricción y/o medios físicos), productos de PCR y/u oligonucleótidos de ADN sintético se pueden utilizar como moldes para la transcripción *in vitro* con SP6, siempre que contengan un promotor SP6 bicatenario aguas arriba (y en la orientación correcta) de la secuencia de ADN que se va a transcribir.

El molde de ADN linealizado puede tener un extremo romo.

La secuencia de ADN que se va a transcribir puede optimizarse para facilitar una transcripción y/o traducción más eficiente. Por ejemplo, la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto a elementos reguladores de cis (por ejemplo, caja TATA, señales de terminación y sitios de unión a proteínas), sitios de recombinación artificial, sitios chi, contenido de dinucleótidos CpG, islas CpG negativas, contenido de GC, sitios de deslizamiento de la polimerasa y/u otros elementos relevantes para la transcripción; la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto a sitios de empalme críptico, estructura secundaria de ARNm, energía libre estable de ARNm, secuencias repetitivas, motivo de inestabilidad de ARN y/u otros elementos relevantes para el procesamiento y la estabilidad de ARNm; la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto a sesgo de uso de codones, adaptabilidad de codones, sitios de chi internos, sitios de unión al ribosoma (por ejemplo, IRES), sitios de poliA prematuros, secuencias de Shine-Dalgarno (SD) y/u otros elementos relevantes para la traducción; y/o la secuencia de ADN puede optimizarse con respecto al contexto de codones, la interacción codón-anticodón, los sitios de pausa de traducción y/u otros elementos relevantes para el plegamiento de proteínas. En la presente invención se pueden utilizar métodos de optimización conocidos en la técnica, por ejemplo, GeneOptimizer de ThermoFisher y OptimumGene™, que se describen en el documento de patente US 20110081708.

El molde de ADN puede incluir una región no traducida en 5' y/o 3'. Una región no traducida en 5' puede incluir uno o más elementos que afectan a la estabilidad o traducción de un ARNm, por ejemplo, un elemento que responde al hierro. Una región no traducida en 5' puede tener entre aproximadamente 50 y 500 nucleótidos de longitud.

Una región no traducida en 3' puede incluir uno o más de una señal de poliadenilación, un sitio de unión para proteínas que afectan la estabilidad de un ARNm de ubicación en una célula, o uno o más sitios de unión para miARN. Una región no traducida en 3' puede tener entre 50 y 500 nucleótidos de longitud o más.

Las secuencias UTR 3' y/o 5' a modo de ejemplo pueden derivar de moléculas de ARNm que son estables (por ejemplo, globina, actina, GAPDH, tubulina, histona, o enzimas del ciclo del ácido cítrico) para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido. Por ejemplo, una secuencia 5' UTR puede incluir una secuencia parcial de un gen 1 inmediato-temprano de CMV (IE1), o un fragmento del mismo para mejorar la resistencia a nucleasas y/o mejorar la semivida del polinucleótido. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona del crecimiento humano (hGH), o un fragmento de esta en el extremo 3' o región no traducida del polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para estabilizar aún más el polinucleótido. Generalmente, estas modificaciones mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, la semivida) del polinucleótido con respecto a sus homólogos no modificados, e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar la resistencia de dichos polinucleótidos a la digestión de nucleasas *in vivo*.

Síntesis de ARNm a gran escala

Se pueden sintetizar al menos 100 mg, 150 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 5 g, 10 g, 25 g, 50 g, 75 g, 100 g, 250 g, 500 g, 750 g, 1 kg, 5 kg, 10 kg, 50 kg, 100 kg, 1000 kg o más en un único lote de ARNm. Como se utiliza en el presente documento, el término "lote" se refiere a una magnitud o cantidad de ARNm sintetizado a la vez, por ejemplo, producido según un único entorno de fabricación. Un lote puede referirse a una cantidad de ARNm sintetizada en una reacción que se produce a través de una única alícuota de enzima y/o una única alícuota de molde de ADN para la síntesis continua en un conjunto de condiciones. El ARNm sintetizado en un solo lote no incluiría el ARNm sintetizado en diferentes momentos que se combinan para lograr la cantidad deseada. Generalmente, una mezcla de reacción incluye ARN polimerasa SP6, un molde de ADN lineal y un tampón de reacción de ARN polimerasa (que puede incluir ribonucleótidos o puede requerir la adición de ribonucleótidos).

Se utilizan normalmente 1-100 mg de polimerasa SP6 por gramo (g) de ARNm producido. Se pueden utilizar aproximadamente 1-90 mg, 1-80 mg, 1-60 mg, 1-50 mg, 1-40 mg, se pueden utilizar 10-100 mg, 10-80 mg, 10-60 mg, 10-50 mg de polimerasa SP6 por gramo de ARNm producido. Se pueden utilizar aproximadamente 5-20 mg de polimerasa SP6 para producir aproximadamente 1 gramo de ARNm. Se pueden utilizar aproximadamente 0,5 a 2 gramos de polimerasa SP6 para producir aproximadamente 100 gramos de ARNm. Se pueden utilizar aproximadamente 5 a 20 gramos de polimerasa SP6 a aproximadamente 1 kilogramo de ARNm. Se pueden utilizar al menos 5 mg de polimerasa SP6 para producir al menos 1 gramo de ARNm. Se pueden utilizar al menos 500 mg de polimerasa SP6 para producir al menos 100 gramos de ARNm. Se pueden utilizar al menos 5 gramos de polimerasa SP6 para producir al menos 1 kilogramo de ARNm. Se pueden utilizar aproximadamente 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg o 100 mg de ADN plásmido por gramo de ARNm producido. Se pueden utilizar aproximadamente 10-30 mg de ADN plásmido para producir aproximadamente 1 gramo de ARNm. Se pueden utilizar aproximadamente de 1 a 3 gramos de ADN plásmido para producir aproximadamente 100 gramos de ARNm. Se pueden utilizar aproximadamente 10 a 30 gramos de ADN plásmido para producir aproximadamente 1 kilogramo de ARNm. Se pueden utilizar al menos 10 mg de ADN plásmido para producir al menos 1 gramo de ARNm. Se puede utilizar al menos 1 gramo de ADN plásmido para producir al menos 100 gramos de ARNm. Se pueden utilizar al menos 10 gramos de ADN plásmido para producir al menos 1 kilogramo de ARNm.

La concentración de la ARN polimerasa SP6 en la mezcla de reacción puede ser de aproximadamente 1 a 100 nM, 1 a 90 nM, 1 a 80 nM, 1 a 70 nM, 1 a 60 nM, 1 a 50 nM, 1 a 40 nM, 1 a 30 nM, 1 a 20 nM o de aproximadamente 1 a 10 nM. La concentración de la ARN polimerasa SP6 puede ser de aproximadamente 10 a 50 nM, de 20 a 50 nM o de 30 a 50 nM. Se puede utilizar una concentración de 100 a 10000 unidades/ml de ARN polimerasa SP6, como ejemplos, se pueden usar concentraciones de 100 a 9000 unidades/ml, 100 a 8000 unidades/ml, 100 a 7000 unidades/ml, 100 a 6000 unidades/ml, 100 a 5000 unidades/ml, 100 a 1000 unidades/ml, 200 a 2000 unidades/ml, 500 a 1000 unidades/ml, 500 a 2000 unidades/ml, 500 a 3000 unidades/ml, 500 a 4000 unidades/ml, 500 a 5000 unidades/ml, 500 a 6000 unidades/ml, 1000 a 7500 unidades/ml y 2500 a 5000 unidades/ml.

La concentración de cada ribonucleótido (por ejemplo, ATP, UTP, GTP y CTP) en una mezcla de reacción es de entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM, por ejemplo, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 10 mM, entre aproximadamente 3 mM y aproximadamente 10 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 8 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 6 mM, entre aproximadamente 3 mM y aproximadamente 10 mM, entre aproximadamente 3 mM y aproximadamente 8 mM, entre aproximadamente 3 mM y aproximadamente 6 mM, entre aproximadamente 4 mM y aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, cada ribonucleótido puede ser aproximadamente 5 mM en una mezcla de reacción. La concentración total de rNTP (por ejemplo, ATP, GTP, CTP y UTP combinados) utilizados en la reacción puede variar entre 1 mM y 40 mM. La concentración total de rNTP (por ejemplo, ATP, GTP, CTP y UTP combinados) utilizados en la reacción puede variar entre 1 mM y 30 mM, o entre 1 mM y 28 mM, o entre 1 mM y 25 mM, o entre 1 mM y 20 mM. La concentración total de rNTP puede ser inferior a 30 mM. La concentración total de rNTP puede ser inferior a 25 mM. La concentración total de rNTP puede ser inferior a 20 mM. La concentración total de rNTP puede ser inferior a 15 mM. La concentración total de rNTP puede ser inferior a 10 mM.

El tampón de reacción de ARN polimerasa normalmente incluye una sal/agente tamponante, *por ejemplo,* Tris, HEPES, sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, fosfato de potasio fosfato de sodio, cloruro de sodio y cloruro de magnesio.

El pH de la mezcla de reacción puede estar entre aproximadamente 6 y 8,5, de 6,5 a 8,0, de 7,0 a 7,5. El pH puede ser 7,5.

El molde de ADN lineal o linealizado (*por ejemplo*, como se ha descrito anteriormente y en una cantidad/concentración suficiente para proporcionar una cantidad deseada de ARN), el tampón de reacción de ARN polimerasa y la ARN polimerasa SP6 se pueden combinar para formar la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se puede incubar entre aproximadamente 37 °C y aproximadamente 42 °C durante treinta minutos a seis horas, por ejemplo, aproximadamente sesenta a aproximadamente noventa minutos.

Se pueden incubar aproximadamente NTP 5 mM, aproximadamente 0,05 mg/ml de polimerasa SP6 y aproximadamente 0,1 mg/ml de molde de ADN en un tampón de reacción de ARN polimerasa adecuado (pH de la mezcla de reacción final de aproximadamente 7,5) a aproximadamente 37 °C a aproximadamente 42 °C durante sesenta a noventa minutos.

Una mezcla de reacción puede contener un molde de ADN bicatenario linealizado con un promotor específico de la polimerasa SP6, ARN polimerasa SP6, inhibidor de la RNasa, pirofosfatasa, NTP 29 mM, DTT 10 mM y un tampón de reacción (cuando a 10x es HEPES 800 mM, espermidina 20 mM, $MgCl_2$ 250 mM, pH 7,7) y cantidad suficiente (QS) para un volumen de reacción deseado con agua libre de RNasa; esta mezcla de reacción puede incubarse a continuación a 37 °C durante 60 minutos. A continuación, la reacción de polimerasa se puede desactivar mediante la adición de DNasa I y un tampón de DNasa I (cuando a 10x es Tris-HCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM y $CaCl_2$ 25 mM, pH 7,6) para facilitar la digestión del molde de ADN bicatenario en preparación para la purificación. Se ha demostrado que este proceso es suficiente para producir 100 gramos de ARNm.

Una mezcla de reacción puede incluir NTP a una concentración que varía de 1-10 mM, molde de ADN a una concentración que varía de 0,01 - 0,5 mg/ml y ARN polimerasa SP6 a una concentración que varía de 0,01 - 0,1 mg/ml, *por ejemplo,* la mezcla de reacción puede comprender NTP a una concentración de 5 mM, el molde de ADN a una concentración de 0,1 mg/ml y la ARN polimerasa SP6 a una concentración de 0,05 mg/ml.

Nucleótidos

Se pueden utilizar diversos nucleósidos de origen natural o modificados para producir ARNm según la presente invención. Un ARNm es o comprende nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, guanosina, citidina, uridina); análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, pseudouridina (por ejemplo, N-1-metil-pseudouridina), 2-tiouridina y 2-tiocitidina); bases químicamente modificadas; bases biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces 5'-*N*-fosforamidita).

En algunas realizaciones, el ARNm comprende uno o más restos de nucleótidos no convencionales. Los restos de nucleótidos no convencionales pueden incluir, por ejemplo, 5-metilcitidina ("5mC"), pseudouridina ("ΨU") y/o 2-tiouridina ("2sU"). Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.278.036 o el documento de patente WO2011012316 para una discusión de dichos restos y su incorporación en ARNm. El ARNm puede ser ARN, que se define como ARN en el que el 25 % de los restos de U son 2-tiouridina y el 25 % de los restos de C son 5-metilcitidina. Las enseñanzas para el uso de ARN se divulgan la publicación de patente de EE. UU. US20120195936 y la publicación Internacional WO2011012316. La presencia de restos de nucleótidos no convencionales puede hacer que un ARNm sea más estable y/o menos inmunogénico que un ARNm de control con la misma secuencia pero que sólo contiene restos convencionales. En realizaciones adicionales, el ARNm puede comprender uno o más restos de nucleótidos no convencionales seleccionados entre isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina citosina, así como combinaciones de estas modificaciones y otras modificaciones de nucleobase. Algunas realizaciones pueden incluir además modificaciones adicionales al anillo de furanosa o nucleobase. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, modificaciones o sustituciones de azúcar (por ejemplo, una o más de una modificación 2'-O-alquilo, un ácido nucleico bloqueado (LNA)). En algunas realizaciones, los ARN pueden estar complejados o hibridados con polinucleótidos y/o polinucleótidos peptídicos (PNA) adicionales. En algunas realizaciones donde la modificación de azúcar es una modificación 2'-O-alquilo, dicha modificación puede incluir, pero sin limitación, una modificación 2'-desoxi-2'-fluoro, una modificación 2'-O-metilo, una modificación 2'-O-metoxietilo y una modificación 2'-desoxi. En algunas realizaciones, cualquiera de estas modificaciones puede estar presente en el 0-100% de los nucleótidos, por ejemplo, más del 0 %, 1 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los nucleótidos constituyentes individualmente o en combinación.

Procesamiento pos-síntesis

Normalmente, se puede añadir una caperuza en 5' y/o una cola en 3' después de la síntesis. La presencia de la caperuza es importante para proporcionar resistencia a nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. La presencia de una "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación de la exonucleasa.

Una caperuza en 5' se añade normalmente de la siguiente manera: primero, una fosfatasa terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos terminales; luego se añade trifosfato de guanosina (GTP) a los fosfatos terminales a través de una guaniltransferasa, produciendo un enlace 5'5'5-trifosfato; y luego una metiltransferasa metila el 7-nitrógeno de guanina. Los ejemplos de estructuras de caperuza incluyen, pero no se limitan a, m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G. Se describen estructuras de caperuza adicionales en la solicitud de EE. UU. publicada n.º US 2016/0032356 y la solicitud provisional de EE. UU. 62/464.327, presentada el 27 de febrero de 2017.

Normalmente, una estructura de cola incluye una cola de poli(A) y/o poli(C). Una cola de poli-A o poli-C en el extremo 3' del ARNm incluye normalmente al menos 50 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 150 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 200 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 250 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 300 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 350 nucleótidos de adenosina o citosina, o al menos 400 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 450 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 500 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 550 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 600 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 650 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 700 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 750 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 800 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 850 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 900 nucleótidos de citosina o citosina, al menos 950 nucleótidos de adenosina, o citosina, o al menos 1 kb de nucleótidos de citosina o citosina, respectivamente. En algunas realizaciones, una cola de poli A o poli C puede ser de aproximadamente 10 a 800 nucleótidos de adenosina

o citosina (por ejemplo, aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 10 a 300 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 10 a 400 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 10 a 500 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 10 a 550 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 10 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 50 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 100 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 150 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 200 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 250 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 300 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 350 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 400 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 450 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 500 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de adenosina o citosina, aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de adenosina o citosina, o aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de adenosina o citosina), respectivamente. En algunas realizaciones, una estructura de cola incluye una combinación de colas de poli (A) y poli (C) con varias longitudes descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, una estructura de cola incluye al menos 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de nucleótidos de adenosina. En algunas realizaciones, una estructura de cola incluye al menos 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de nucleótidos de citosina.

Como se describe en el presente documento, la adición de la caperuza en 5' y/o la cola en 3' facilita la detección de transcritos abortivos generados durante la síntesis *in vitro* porque sin la caperuza y/o la cola, el tamaño de esos transcritos de ARNm abortados prematuramente puede ser demasiado pequeño para ser detectado. Por lo tanto, la caperuza en 5' y/o la cola en 3' se pueden añadir al ARNm sintetizado antes de que el ARNm se pruebe para la pureza (por ejemplo, el nivel de transcritos abortivos presentes en el ARNm). La caperuza 5' y/o la cola 3' se pueden añadir al ARNm sintetizado antes de que el ARNm se purifique como se describe en el presente documento. La caperuza 5' y/o la cola 3' se pueden añadir al ARNm sintetizado después de que el ARNm se purifique como se describe en el presente documento.

El ARNm sintetizado como se describe en el presente documento se puede utilizar sin purificación adicional. En particular, dicho ARNm se puede utilizar sin una etapa de eliminación de cebadores oligonucleotídicos cortos. Como alternativa, el ARNm sintetizado puede purificarse adicionalmente. Se pueden utilizar diversos métodos para purificar el ARNm sintetizado. Por ejemplo, la purificación de ARNm se puede realizar utilizando métodos de centrifugación, filtración y/o cromatográficos. El ARNm sintetizado puede purificarse mediante precipitación con etanol o filtración o cromatografía, o purificación en gel o cualquier otro medio adecuado. El ARNm puede purificarse mediante HPLC. El ARNm se puede extraer en una disolución normal de fenol : cloroformo: alcohol isoamílico, bien conocida por un experto en la técnica. El ARNm se puede purificar utilizando filtración de flujo tangencial. Los métodos de purificación adecuados incluyen los descritos en los documentos de patente US 2016/0040154, US 2015/0376220, la solicitud PCT PCT/US18/19954 titulada "METHODS FOR PURIFICATION OF MESSENGER RNA" presentada el 27 de febrero de 2018 y la solicitud PCT/US18/19978 titulada "METHODS FOR PURIFICATION OF MESSENGER RNA" presentada el 27 de febrero de 2018, todos los cuales se pueden utilizar cuando se pone en práctica la invención como se reivindica.

El ARNm se puede purificar antes de añadir la caperuza y la cola. El ARNm se puede purificar después de añadir la caperuza y la cola. El ARNm se puede purificar tanto antes como después de añadir la caperuza y la cola.

El ARNm se puede purificar antes o después o tanto antes como después de añadir la caperuza y la cola, mediante centrifugación.

El ARNm se puede purificar antes o después o tanto antes como después de añadir la caperuza y la cola, mediante filtración.

El ARNm se puede purificar antes o después o tanto antes como después de añadir la caperuza y la cola, mediante filtración de flujo tangencial (TFF).

El ARNm se puede purificar antes o después o tanto antes como después de añadir la caperuza y la cola mediante cromatografía.

Caracterización del ARNm

Los transcritos abortivos o de longitud completa de ARNm se pueden detectar y cuantificar utilizando cualquier método disponible en la técnica. Las moléculas de ARNm sintetizadas se pueden detectar usando la transferencia, electroforesis capilar, cromatografía, fluorescencia, electroforesis en gel, HPLC, tinción de plata, espectroscopía, ultravioleta (UV) o UPLC, o una combinación de los mismos, u otros métodos de detección conocidos en la técnica. Las moléculas de ARNm sintetizadas se pueden detectar utilizando espectroscopía de absorción UV con separación por electroforesis capilar. El ARNm puede desnaturalizarse primero mediante un colorante de glioxal antes de la electroforesis en gel ("electroforesis en gel con glioxal"). El ARNm sintetizado se puede caracterizar antes de añadir la caperuza y la cola. El ARNm sintetizado se puede caracterizar después de añadir la caperuza y la cola.

El ARNm generado mediante un método divulgado en el presente documento puede comprender menos del 10 %, menos del 9 %, menos del 8 %, menos del 7 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 %, menos del 0,5 %, menos del 0,1 % de impurezas distintas del ARNm de longitud completa. Las impurezas pueden incluir contaminantes de IVT, por ejemplo, proteínas, enzimas, nucleótidos libres y/o cebadores oligonucleotídicos cortos.

El ARNm producido como se describe en el presente documento puede estar sustancialmente libre de cebadores oligonucleotídicos cortos o transcritos abortivos. En particular, dicho ARNm puede contener niveles de cebadores oligonucleotídicos cortos o transcritos abortivos indetectables mediante electroforesis capilar o electroforesis en gel con glioxal. Como se utiliza en el presente documento, el término "cebadores oligonucleotídicos cortos" o "transcritos abortivos" se refiere a cualquier transcripción que tenga menos de longitud completa. Los "cebadores oligonucleotídicos cortos" o "transcritos abortivos" pueden tener menos de 100 nucleótidos de longitud, menos de 90, menos de 80, menos de 70, menos de 60, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20 o menos de 10 nucleótidos de longitud. Los cebadores oligonucleotídicos cortos se pueden detectar o cuantificar después de añadir una caperuza en 5' y/o una cola de poli A en 3'.

Vehículos de administración

Los dos o más ARNm están encapsulados dentro de una o más nanopartículas lipídicas que comprenden cada una un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1:15, respectivamente. Como se utiliza en el presente documento, los términos "vehículo de administración", "vehículo de transferencia", "nanopartícula lipídica" o equivalentes gramaticales, se utilizan indistintamente.

Los vehículos de administración se pueden formular en combinación con uno o más ácidos nucleicos, vehículos, ligandos de direccionamiento o reactivos estabilizantes adicionales, o en composiciones farmacológicas donde se mezclan con excipientes adecuados. Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición. Un vehículo de administración particular se selecciona en función de su capacidad para facilitar la transfección de un ácido nucleico a una célula diana.

En algunas realizaciones, un vehículo de administración que comprende los dos o más ARNm se administra por administración intravenosa, intratumoral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, epidural, intratecal o pulmonar, por ejemplo, que comprende nebulización. El ARNm puede expresarse en el tejido en el que se administró el vehículo de administración. Se describen enseñanzas adicionales de administración pulmonar y nebulización en la solicitud internacional relacionada PCT/US17/61 100 presentada el 10 de noviembre de 2017 por el solicitante titulada "NOVEL ICE-BASED LIPID NANOPARTICLE FORMULATION FOR DELIVERY OF MRNA", y la solicitud provisional de EE. UU. USSN 62/507.061.

En algunas realizaciones, los dos o más ARNm se encapsulan dentro de las mismas nanopartículas lipídicas. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm se encapsulan dentro de nanopartículas lipídicas separadas.

Vehículos de administración liposómica

Como se utiliza en el presente documento, los vehículos de administración liposómica/nanopartículas lipídicas se caracterizan generalmente como vesículas microscópicas que tienen un espacio de agua interior secuestrado de un medio externo por una membrana de una o más bicapas. Las membranas bicapa de los liposomas están formadas normalmente por moléculas anfífilas, tales como lípidos de origen sintético o natural que comprenden dominios hidrófilos e hidrófobos separados espacialmente (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Las membranas bicapa de los liposomas también pueden estar formadas por polímeros anfífilos y tensioactivos (por ejemplo, polimerosomas, niosomas, etc.). En el contexto de la presente invención, un vehículo de administración liposómica normalmente sirve para transportar un ARNm deseado a una célula o tejido diana. En algunas realizaciones, el vehículo de administración de nanopartículas lipídicas es un liposoma.

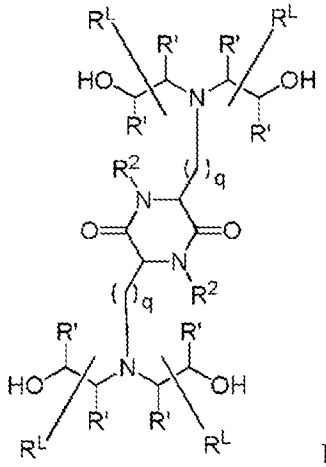
Lípidos catiónicos

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que tienen una carga positiva neta a un pH seleccionado, tal como pH fisiológico. En la bibliografía se han descrito varios lípidos catiónicos, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Un ejemplo de lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluye los descritos en las publicaciones internacionales de patentes WO 2010/053572 (por ejemplo, CI 2-200 descrito en el párrafo [00225]) y WO 2012/170930. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención emplean nanopartículas lipídicas que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la solicitud de patente provisional de EE. UU. 61/617.468, presentada el 29 de marzo de 2012, tal como, por ejemplo, (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-il)tetracosa-15,18-dien-1-amina (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-

4,15,18-trien-1-amina (HGT5001) y (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-5,15,18-trien-1-amina (HGT5002).

En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados incluyen un lípido catiónico descrito en el documento de patente WO 2013/063468 y en la solicitud provisional de EE. UU. titulada "Lipid Formulations for Delivery of Messenger RNA" presentada simultáneamente con la presente solicitud en fecha par.

En algunas realizaciones, un lípido catiónico comprende un compuesto de fórmula **I-c1-a**:



I-c1-a,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:
cada R^2 es independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-3};
cada q es independientemente 2 a 6;
cada R' es independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-3};
y cada R^L es independientemente alquilo C_{8-12}.

En algunas realizaciones, cada R^2 es independientemente hidrógeno, metilo o etilo. En algunas realizaciones, cada R^2 es independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, R^2 es hidrógeno.

En algunas realizaciones, cada q es independientemente 3 a 6. En algunas realizaciones, cada q es independientemente 3 a 5. En algunas realizaciones, cada q es 4.

En algunas realizaciones, cada R' es independientemente hidrógeno, metilo o etilo. En algunas realizaciones, cada R' es independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, cada R' es independientemente hidrógeno.

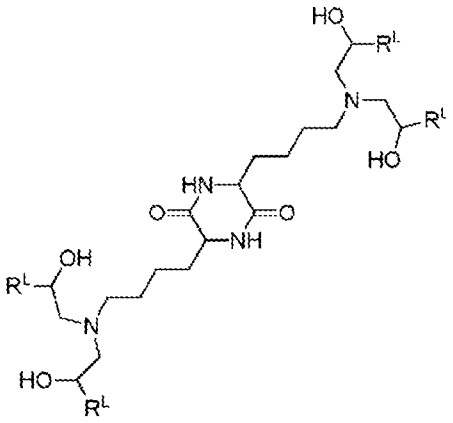
En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente alquilo C_{8-12}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente *n*-alquilo C_{8-12}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente alquilo C_{9-11}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente *n*-alquilo C_{9-11}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente alquilo C_{10}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente *n*-alquilo C_{10}.

En algunas realizaciones, cada R^2 es independientemente hidrógeno o metilo; cada q independientemente es de 3 a 5; cada R' independientemente es hidrógeno o metilo; y cada R^L es independientemente alquilo C_{8-12}.

En algunas realizaciones, cada R^2 es hidrógeno; cada q es independientemente 3 a 5; cada R' es hidrógeno; y cada R^L es independientemente alquilo C_{8-12}.

En algunas realizaciones, cada R^2 es hidrógeno; cada q es 4; cada R' es hidrógeno; y cada R^L es independientemente alquilo C_{8-12}.

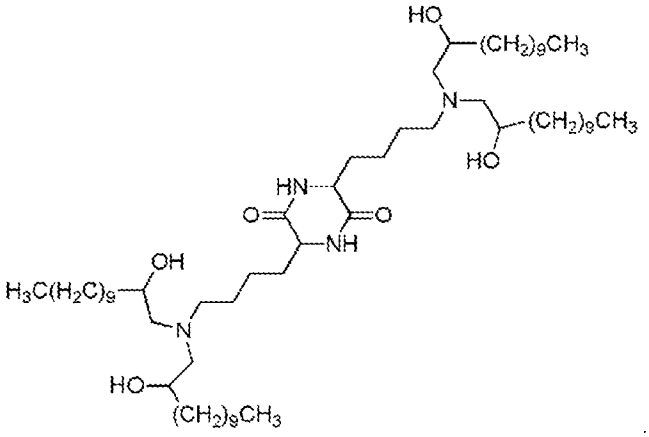
En algunas realizaciones, un lípido catiónico comprende un compuesto de fórmula I-g:



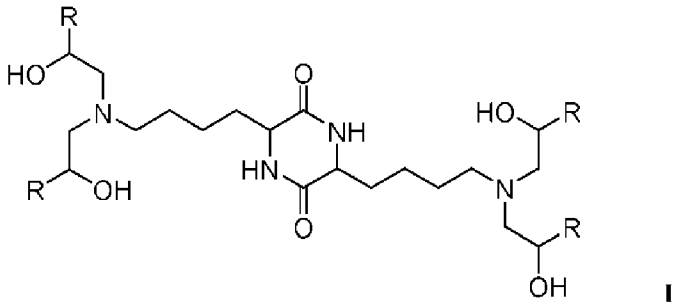
I-g,

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde cada R^L es independientemente alquilo C_{8-12}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente *n*-alquilo C_{8-12}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente alquilo C_{9-11}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente *n*-alquilo C_{9-11}. En algunas realizaciones, cada R^L es independientemente alquilo C_{10}. En algunas realizaciones, cada R^L es *n*-alquilo C_{10}.

En realizaciones particulares, los liposomas proporcionados incluyen un lípido catiónico cKK-E12 o (3,6-bis(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)piperazin-2,5-diona). La estructura de cKK-E12 se muestra a continuación:

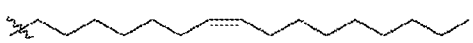


Los lípidos catiónicos a modo de ejemplo adicionales incluyen los de fórmula I:



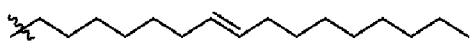
I

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,
en donde:
R es



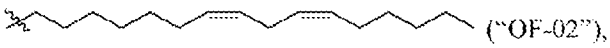
("OF-00"),

R es



("OF-01"),

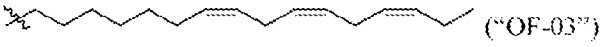
R es



("OF-02"),

o

R es



("OF-03")

(véase, por ejemplo, Fenton, Owen S., et al. "Bioinspired Alkenyl Amino Alcohol Ionizable Lipid Materials for Highly Potent In Vivo mRNA Delivery." Advanced materials (2016)).

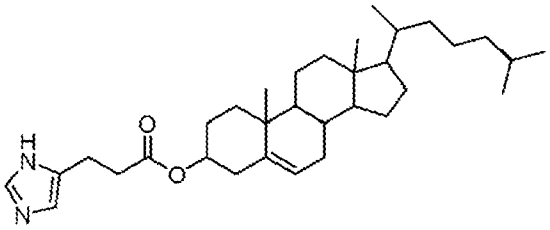
En algunas realizaciones, el lípido catiónico puede ser cloruro de N-[1-(2,3-dioliloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio o "DOTMA" (Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); patente de EE. UU. n.º 4.897.355). DOTMA se puede combinar con el lípido neutro, dioleoilfosfatidil-etanolamina o "DOPE" u otros lípidos no catiónicos en un vehículo de transferencia liposómica o una nanopartícula lipídica, y dichos liposomas se pueden utilizar para mejorar la administración de ácidos nucleicos a las células diana. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, 5-carboxiespermilglicinadioctadecilamida o "DOGS", 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio o "DOSPA" (Behr et al. Proc. Nat.'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); patente de EE. UU. n.º 5.171.678; patente de EE. UU. n.º 5.334.761), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano o "DODAP", 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano o "DOTAP".

Los lípidos catiónicos a modo de ejemplo adicionales también incluyen 1,2-diestеariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLenDMA", cloruro de N-dioleil-N,N-dimetilamonio o "DODAC", bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio o "DDAB", bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1-2'-octadecadienoxi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-dilinoleoiloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-dilinoleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-dilinoleoilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano o "DLin- -DMA", 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA" y 2-(2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)-1,3-dioxolan-4-il)-N,N-dimetiletanamina (DLin-KC2-DMA)) (véase el documento de patente WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), o mezclas de los mismos. (Heyes, J., et al., J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); publicación PCT WO2005/121348A1). En algunas realizaciones, el lípido catiónico comprende al menos uno de un resto de imidazol, dialquilamino o guanidinio.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico se puede elegir de XTC (2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano), MC3 (4-(dimetilamino)butanoato de ((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo), ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina)), NC98-5 (4,7,13-tris(3-oxo-3-(undecilamino)propil)-N1,N16-diundecil-4,7,10,13-tetraazahexadecano-1,16-diamida), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), HGT4003 (documento de patente WO 2012/170889), ICE (documento de patente WO 2011/068810), HGT5000 (solicitud provisional de patente de EE. UU. n.º 61/617.468) o HGT5001 (cis o trans) (solicitud provisional de patente n.º 61/617.468), lipidoides de aminoalcohol tales como los divulgados en el documento de patente WO2010/053572, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287), DLin-KC2-DMA (Semple, S.C. et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" Nature Biotech. 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, K.T. et al. "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" PNAS 2010, 107, 1864-1869).

Lípidos catiónicos de esterol

En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos basados en esteroles son lípidos catiónicos basados en esteroles que contienen dialquilamino, imidazol y guanidinio. Por ejemplo, determinadas realizaciones se refieren a una composición que comprende un lípido catiónico basado en esterol que comprende un imidazol, por ejemplo, el éster de colesterol de imidazol o lípido "ICE" 3-(1H-imidazol-4-il)propanoato de (3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo, como se representa por la estructura (II) a continuación. En determinadas realizaciones, una nanopartícula lipídica para la administración de ARN (por ejemplo, ARNm) puede comprender un lípido catiónico basado en imidazol, por ejemplo, el éster de colesterol de imidazol o lípido "ICE" (3-(1H-imidazol-4-il)propanoato de (3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptano-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo, representado por la estructura (II).



(II)

En algunas realizaciones, el porcentaje de lípido catiónico en un liposoma puede ser superior al 30 %, superior al 40 % o superior al 50 %. En algunas realizaciones, el lípido catiónico constituye aproximadamente 30-50 % (por ejemplo, aproximadamente 30-45 %, aproximadamente 30-40 %, aproximadamente 35-50 %, aproximadamente 35-45 %, o aproximadamente 35-40 %) del liposoma en peso. En algunas realizaciones, el lípido catiónico (por ejemplo, lípido ICE) constituye aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 % o aproximadamente 50 % del liposoma en relación molar.

Lípidos no catiónicos / auxiliares

Los liposomas proporcionados contienen un lípido no catiónico ("auxiliar"). Como se utiliza en el presente documento, la expresión "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, de ion bipolar o aniónico. Como se usa en el presente documento, la expresión "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que llevan una carga negativa neta a un pH seleccionado, tal como a pH fisiológico. Los lípidos no catiónicos incluyen, pero no se limitan a, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoil fosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), fosfatidilserina, esfingolípidos, cerebrósidos, gangliósidos, 16-O-monometil PE, 16-0-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), o una mezcla de los mismos.

Lípidos basados en colesterol

Los liposomas proporcionados comprenden un lípido basado en colesterol. Por ejemplo, los lípidos catiónicos basados en colesterol adecuados incluyen, por ejemplo, DC-Choi (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilamino-propil)piperazina (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); patente de EE. UU. n.º 5.744.335), o ICE. En algunas realizaciones, el lípido basado en colesterol puede estar en una relación molar del 30 % o el 20 % del lípido total presente en un liposoma.

Lípidos modificados con PEG

Los fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y los lípidos derivatizados, tales como ceramidas derivatizadas (PEG-CER), incluyendo N-octanoil-esfingosina-1-[succinil(metoxi polietilenglicol)-2000] (ceramida C8 PEG-2000) se incluyen en combinación con los otros lípidos en el vehículo de transferencia (es decir, la nanopartícula lipídica). Los lípidos modificados con PEG contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo longitud C_6-C_{20}. La adición de dichos componentes puede prevenir la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la vida útil en la circulación y aumentar la administración de la composición de ácido nucleico-lípido a los tejidos diana, (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), o pueden seleccionarse para intercambiarse rápidamente fuera de la formulación *in vivo* (véase la patente de EE. UU. n.º 5.885.613). Los lípidos intercambiables particularmente útiles son las PEG-ceramidas que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo, C14 o C18). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivatizados de la presente invención pueden comprender una relación molar de aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 %, o aproximadamente 2 % del lípido total presente en el vehículo de transferencia liposómica.

La selección de los lípidos catiónicos, no catiónicos y modificados con PEG que están comprendidos en la nanopartícula lipídica, así como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa en las características del lípido o lípidos seleccionados y la naturaleza de las células diana previstas. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena de alquilo, así como el tamaño, la carga, el pH, el pKa, la fusogenicidad y la toxicidad del lípido o lípidos seleccionados. Por lo tanto, las relaciones molares pueden ajustarse en consecuencia.

Como ejemplos no limitantes, una formulación liposómica adecuada puede incluir una combinación seleccionada de cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; o ICE, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K.

En diversas realizaciones, el lípido catiónico (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE o HGT4003) constituye aproximadamente 30-60 % (*por ejemplo,* aproximadamente 30-55 %, aproximadamente 30-50 %, aproximadamente 30-45 %, aproximadamente 30-40 %, aproximadamente 35-50 %, aproximadamente 35-45 %, o aproximadamente 35-40 %) del liposoma en relación molar. En algunas realizaciones, el porcentaje del lípido catiónico (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE o HGT4003) es o superior a aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 % del liposoma en relación molar.

En algunas realizaciones, la relación entre lípido catiónico con respecto a lípido no catiónico con respecto a lípido basado en colesterol con respecto a lípido modificado con PEG es de aproximadamente 40:30:20:10, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación entre lípido catiónico con respecto a lípido no catiónico con respecto a lípido basado en colesterol con respecto a lípido modificado con PEG es de aproximadamente 40:30:25:5, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación entre lípido catiónico con respecto a lípido no catiónico con respecto a lípido basado en colesterol con respecto a lípido modificado con PEG es de aproximadamente 40:32:25:3, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación entre lípido catiónico con respecto a lípido no catiónico con respecto a lípido basado en colesterol con respecto a lípido modificado con PEG es de aproximadamente 50:25:20:5.

Formación de liposomas que encapsulan ARNm

Los vehículos de transferencia liposómica para su uso en las composiciones de la invención se pueden preparar mediante diversas técnicas que se conocen actualmente en la técnica Los liposomas para su uso en las composiciones proporcionadas se pueden preparar mediante diversas técnicas que se conocen actualmente en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar vesículas multilaminares (MLV) según técnicas convencionales, tales como depositando un lípido seleccionado en la pared interior de un envase o recipiente adecuado disolviendo el lípido en un disolvente apropiado y luego evaporando el disolvente para dejar una película delgada en el interior del recipiente o secando por pulverización. A continuación, se puede añadir una fase acuosa al recipiente con un movimiento de vórtice que da como resultado la formación de MLV. A continuación, se pueden formar vesículas unilaminares (ULV) mediante homogeneización, sonicación o extrusión de las vesículas multilaminares. Además, las vesículas unilaminares se pueden formar mediante técnicas de eliminación de detergentes.

En determinadas realizaciones, las composiciones proporcionadas comprenden un liposoma en donde el ARNm está asociado tanto en la superficie del liposoma como encapsulado dentro del mismo liposoma. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los liposomas catiónicos se pueden asociar con el ARNm a través de interacciones electrostáticas. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los liposomas catiónicos se pueden asociar con el ARNm a través de interacciones electrostáticas.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden los dos o más ARNm encapsulados en un liposoma. En algunas realizaciones, las dos o más especies de ARNm se pueden encapsular en el mismo liposoma. En algunas realizaciones, las dos o más especies de ARNm se pueden encapsular en liposomas diferentes. En algunas realizaciones, los dos o más ARNm se encapsulan en uno o más liposomas, que difieren en su composición lipídica, relación molar de componentes lipídicos, tamaño, carga (potencial de zeta), ligandos de direccionamiento y/o combinaciones de los mismos.

El proceso de incorporación de un ARNm deseado en un liposoma se denomina normalmente "carga". Se describen métodos a modo de ejemplo en Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992. Los ácidos nucleicos incorporados en el liposoma pueden estar total o parcialmente ubicados en el espacio interior del liposoma, dentro de la membrana bicapa del liposoma, o asociados con la superficie exterior de la membrana del liposoma. La incorporación de un ácido nucleico en liposomas también se denomina en el presente documento "encapsulación", en donde el ácido nucleico está completamente contenido dentro del espacio interior del liposoma. El propósito de incorporar un ARNm en un vehículo de transferencia, tal como un liposoma, es normalmente proteger el ácido nucleico de un entorno que puede contener enzimas o productos químicos que degradan ácidos nucleicos y/o sistemas o receptores que causan la rápida excreción de los ácidos nucleicos. Un vehículo de administración adecuado es capaz de mejorar la estabilidad del ARNm contenido en el mismo y/o facilitar la administración de ARNm a la célula o tejido diana.

Se pueden fabricar liposomas adecuados en varios tamaños. En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados pueden hacerse más pequeños que los liposomas que encapsulan ARNm conocidos anteriormente. En algunas realizaciones, la disminución del tamaño de los liposomas se asocia con una administración más eficiente de ARNm. La selección de un tamaño de liposoma adecuado puede tener en cuenta el sitio de la célula o tejido diana y, en cierta medida, la aplicación para la que se está haciendo el liposoma.

En algunas realizaciones, se selecciona un tamaño adecuado de liposoma para facilitar la distribución sistémica de anticuerpo codificado por el ARNm. En algunas realizaciones, puede ser deseable limitar la transfección del ARNm a determinadas células o tejidos. Por ejemplo, para dirigirse a hepatocitos, un liposoma puede dimensionarse de tal manera que sus dimensiones sean más pequeñas que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos en el hígado; en tales casos, el liposoma podría penetrar fácilmente dichas fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos diana.

Alternativa o adicionalmente, un liposoma puede dimensionarse de tal manera que las dimensiones del liposoma sean de un diámetro suficiente para limitar o evitar expresamente la distribución en determinadas células o tejidos.

Se dispone de una variedad de métodos alternativos conocidos en la técnica para dimensionar una población de liposomas. Uno de dichos métodos de dimensionamiento se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas ya sea por baño o sonicación con sonda produce una reducción progresiva del tamaño hasta ULV pequeño inferior a aproximadamente 0,05 micras de diámetro. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las MLV se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, normalmente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micras. El tamaño de los liposomas se puede determinar mediante dispersión de luz cuasi eléctrica (QELS) como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-150 (1981). El diámetro medio del liposoma se puede reducir mediante sonicación de liposomas formados. Los ciclos de sonicación intermitentes se pueden alternar con la evaluación de QELS para guiar la síntesis eficiente de liposomas.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven únicamente para ilustrar las composiciones de la invención y no pretenden limitarlas.

Ejemplo 1. Formulación de LNP cargadas con ARNm para el tratamiento del cáncer

Este ejemplo proporciona nanopartículas lipídicas cargadas de ARNm (LNP) a modo de ejemplo utilizadas en el estudio de eficacia *in vivo* del tratamiento del cáncer.

ARN mensajeros que codifican IL-2, IL-12, STING, GM-CSF, FLT-3L, NLRP3, con codones optimizados, naturales o mutados, o una combinación de los mismos, como se muestra en la **Tabla 1,** se prepararon y se encapsularon dentro de LNP que comprenden cKK-E12. Como control negativo, el ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) se encapsuló dentro de LNP.

Tabla 1. Construcciones de ARNm utilizadas en el estudio *in vivo*

ARNm	Estructura	Tamaño (incluida la cola/Cap1) bp	Cap1 (%)
1.	CO-mscIL-12	2284.	-
2.	H9 IL-2 quimérico	1054.	100.
3.	CO-mSTING (R283M)	1578.	100.
4.	mGM-CSF	828.	100.
5.	CO-mFLT3L	1142.	100.
6.	CO-mNLRP3 (D301N)	4000.	100.
*CO: optimizado con codones; msc: células madre mesenquimatosas; m: ratón; entre paréntesis: mutación			

Ejemplo 2. Diseño del estudio de eficacia in vivo de ARNm-LNP en el modelo de ratón MC38

Este ejemplo describe un diseño de estudio para evaluar preclínicamente la eficacia terapéutica *in vivo* de ARNm-LNP en el tratamiento del modelo singénico de ratón de cáncer de colon murino MC38 subcutáneo.

Los tumores MC-38 (línea celular de cáncer colorrectal de ratón) se implantaron por vía subcutánea en ratones inmunocompetentes. Se recogió suero 3-4 días antes de la inoculación tumoral y en el sacrificio. Cuando los tumores implantados crecieron hasta un tamaño de 60-80 (mm^3) (día 1; d1), se inyectaron ratones por vía intratumoral con diversos ARNm-LNP preparados como se describe en el Ejemplo 1. Las inyecciones tardaron seis veces durante el período de 20 días en un intervalo de 4 días como se muestra en la **Tabla 2.** Los Grupos B y C recibieron un agente único, mientras que los Grupos D-H recibieron una combinación de fármacos. El Grupo A e I recibieron solución salina y FFL ARNm-LNP, respectivamente, como controles negativos. Se monitorizó a los ratones y se midió el volumen tumoral durante todo el estudio hasta el día 46 o hasta que el tamaño tumoral superó los 3000 mm^3.

Tabla 2. Diseño del estudio del modelo de ratón de cáncer colorrectal MC-38

Grupo	Dianas	Número de ratones	Cantidad de dosis (µg)	Frecuencia	Disolución madre
A	Solución salina (control negativo)	10.	0.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	-

Grupo	Dianas	Número de ratones	Cantidad de dosis (µg)	Frecuencia	Disolución madre
B	IL-12sc	10.	7,5.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	250 µg/ml
C	IL-2f	10.	7,5.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	250 µg/ml
D	STING*/IL-12sc	10.	7,5.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	250 µg/ml
E	STING*/IL-12sc/GM-CSF	10.	7,5.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	250 µg/ml
F	STING*/IL-12sc/FLT-3L/GM-CSF	10.	7,5.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	250 µg/ml
G	STING*/IL-12sc/ NLRP3#/GM-CSF	10.	7,5.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	250 µg/ml
H	STING*/IL-12sc/ IL-2†/GM-CSF	10.	7,5.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	250 µg/ml
I	FFL (control negativo)	10.	7,5.	d1, d4, d8, d12, d16, d20	250 µg/ml
**: constitutivamente activo; †: H9 quimérico; #: mutación D301N*					

Ejemplo 3. Eficacia antitumoral in vivo de ARNm-LNP en el modelo de ratón MC38

Este ejemplo demuestra una eficacia *in vivo* de ARNm-LNP preparados según la presente invención en la disminución del tamaño tumoral e inhibición del crecimiento tumoral.

El volumen tumoral se midió en los momentos de tiempo indicados como se muestra en la **FIG. 1** y la **Tabla 3.** Los criterios de valoración en el estudio fueron la muerte del animal o un volumen tumoral que alcanzó los 3000 mm^3.

La **FIG. 1** muestra que el volumen tumoral medio de los ratones en los Grupos B-H fue significativamente más pequeño que el de los ratones en los Grupos A o I. La mayoría de los ratones en los Grupos A e I murieron o tuvieron un volumen tumoral superior a 3000 mm^3 antes de que se completara el estudio. Al final del estudio (d46), la tasa de respuesta completa (CR) fue del 100 % para el Grupo B, del 30 % para el Grupo C, del 90 % para el Grupo D, del 80 % para el Grupo E, del 90 % para el Grupo F, del 70 % para el Grupo G y del 70 % para el Grupo H (véase la **FIG. 5B-5G**). En particular, el crecimiento tumoral se retrasó significativamente en ratones del Grupo B-H en comparación con los controles negativos. Véanse las **Tablas 3-6**. Además, el cambio porcentual en el peso corporal del Grupo B-H, en comparación con el Grupo A o I, fue significativamente menor **(FIG. 6)**.

Tabla 3. Volumen tumoral medio (mm3) de cada grupo medido en diferentes momentos de tiempo

Día	Grupo								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1.	68,76.	68,72.	68,72.	68,80.	68,74.	68,72.	68,74.	68,75.	68,73.
4.	149,9.	146,28.	187,63.	153,80.	177,07.	145,19.	160,79.	165,43.	160,83.
8.	448,33.	203,08.	257,51.	197,30.	214,51.	186,82.	208,48.	225,63.	301,69.
11.	752,58.	214,76.	304,03.	222,88.	239,47.	217,33.	252,60.	251,26.	384,94.
15.	1684,07.	240,17.	342,13.	243,75.	260,22.	234,69.	270,32.	268,23.	616,28.
18.	1839,65.	260,04.	388,33.	260,99.	277,24.	254,63.	285,44.	291,09.	1000,56.
22.	3405,32.	278,20.	428,29.	270,65.	288,31.	280,27.	299,24.	300,27.	1592,15.
25.	-	288,30.	484,10.	292,17.	296,94.	301,04.	313,14.	319,13.	2632,27.
29.	-	299,96.	643,20.	301,42.	305,93.	320,11.	321,49.	331,63.	3830,06.
32.	-	295,75.	689,31.	313,28.	312,87.	329,47.	315,87.	338,34.	-
36.	-	253,02.	800,21.	311,35.	228,34.	188,95.	183,35.	219,10.	-
39.	-	142,56.	663,73.	368,06.	180,43.	156,69.	162,95.	160,06.	-

Día	Grupo								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
43.	-	83,82.	952,53.	119,75.	213,11.	124,22.	73,88.	162,78.	-
46.	-	80,70.	1332,76.	75,13.	28,18.	143,05.	34,82.	154,08.	-

El volumen tumoral medio en cada grupo se comparó con un grupo de control (Grupo A). Específicamente, el volumen tumoral en el grupo de prueba (T) se dividió por el grupo de control (C) en cada momento de tiempo y su porcentaje se representó como se muestra en la **FIG. 2**. Además, se calculó el % de inhibición del volumen tumoral para cada grupo de la siguiente manera: (Media(C)-media (T))/media(C)) × 100 % y representado como se muestra en la **FIG. 3** y la **Tabla 4**. El volumen tumoral de cada ratón en los Grupos B-H medido el día 46 se representó como se muestra en la **FIG. 4**. Se indica un valor medio de cada grupo.

Tabla 4. Porcentaje medio de inhibición del volumen tumoral (%) de cada grupo medido en diferentes momentos de tiempo

Grupo	Día de estudio						
	1.	4.	8.	11.	15.	18.	22.
B	0,07.	2,41.	54,70.	71,46.	85,74.	85,86.	91,83.
C	0,06.	-25,17.	42,56.	59,60.	79,68.	78,89.	87,42.
D	-0,06.	-2,61.	55,99.	70,38.	85,53.	85,81.	92,05.
E	0,03.	-18,13.	52,15.	68,18.	84,55.	84,93.	91,53.
F	0,06.	3,14.	58,33.	71,12.	86,06.	86,16.	91,77.
G	0,03.	-7,27.	53,50.	66,44.	83,95.	84,48.	91,21.
H	0,02.	-10,36.	49,67.	66,61.	84,07.	84,18.	91,18.
I	0,05.	-7,30.	32,71.	48,85.	63,41.	45,61.	53,25.

$$\% \text{ medio de inhibición} = (\text{media (C)} - \text{media (T)}) / \text{media (C)} * 100\ \%$$

Tabla 5. % Δt/ΔC, volumen tumoral de cada grupo medido en diferentes momentos de tiempo

Grupo	Día de estudio						
	1.	4.	8.	11.	15.	18.	22.
B	100,00.	95,60.	35,40.	21,36.	10,61.	10,80.	6,28.
C	100,00.	146,56.	49,74.	34,41.	16,93.	18,05.	10,78.
D	100,00.	104,76.	33,85.	22,53.	10,83.	10,85.	6,05.
E	100,00.	133,52.	38,40.	24,97.	11,85.	11,77.	6,58.
F	100,00.	94,24.	31,11.	21,73.	10,27.	10,50.	6,34.
G	100,00.	113,45.	36,81.	26,89.	12,48.	12,24.	6,91.
H	100,00.	119,16.	41,33.	26,69.	12,35.	12,56.	6,94.
I	100,00.	113,53.	61,38.	46,24.	33,90.	52,62.	45,66.

$$\% \Delta T/C = (\text{media (T)} - \text{media (T0)}) / (\text{media (C)} - \text{media (C0)}) * 100\ \%$$

T0 - Valor inicial del grupo de prueba
C0 - Valor inicial del grupo control

Tabla 6. % de inhibición media Δt/ΔC, volumen tumoral de cada grupo medido en diferentes momentos de tiempo

Grupo	Día de estudio					
	4.	8.	11.	15.	18.	22.
B	4,40.	64,60.	78,64.	89,39.	89,20.	93,72.
C	-46,56.	50,26.	65,59.	83,07.	81,95.	89,22.
D	-4,76.	66,15.	77,47.	89,17.	89,15.	93,95.
E	-33,52.	61,60.	75,03.	88,15.	88,23.	93,42.
F	5,76.	68,89.	78,27.	89,73.	89,50.	93,66.
G	-13,45.	63,19.	73,11.	87,52.	87,76.	93,09.
H	-19,16.	58,67.	73,31.	87,65.	87,44.	93,06.
I	-13,53.	38,62.	53,76.	66,10.	47,38.	54,34.

% medio *ΔInhibición = ((media (C)-media (C0)) - (media (T)-media (TO))) / (media (C)-media (C0)) * 100 %*

En general, este ejemplo demuestra que los ARNm-LNP preparados según la presente invención fueron eficaces para la actividad antitumoral *in vivo* y el tratamiento del cáncer.

μμ

Ejemplo 4. La administración de ARNm de STING constitutivamente activo encapsulado en nanopartículas lipídicas retrasa el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia en modelos animales

Se evaluó el efecto de administrar ARNm de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos sobre el crecimiento tumoral y el animal. Para estos estudios, se inocularon modelos de ratón (N=10) con células tumorales MC38 y se permitió que las células se propagaran formando un tumor en el modelo animal. Posteriormente, a los modelos animales se les administró ARNm encapsulado en lípidos que comprende STING constitutivamente activo optimizado con codones. Las nanopartículas lipídicas se formularon con un lípido catiónico de fórmula I (mostrado en la descripción anterior) y PEG al 1,5 %. Los animales recibieron una dosis intratumoral cada cuatro días de 5 μg del ARNm encapsulado en lípidos. Los datos de estos estudios se muestran en la **FIG. 7.** Como se muestra en la FIG. 7, los animales que recibieron ARNm de STING constitutivamente activo tuvieron menos crecimiento tumoral en comparación con un control solo de vehículo y en comparación con un control negativo adicional. Estos datos muestran que la administración de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos da como resultado un menor crecimiento tumoral y un perfil de crecimiento tumoral retardado. Estos datos muestran además que el ARNm encapsulado en lípidos que codifica STING constitutivamente activo es un agente terapéutico independiente prometedor para el tratamiento del cáncer.

Se realizaron estudios adicionales utilizando el modelo de tumor de ratón MC38 descrito anteriormente para evaluar la supervivencia de los modelos animales después de la administración de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos a los animales. Para estos estudios, los grupos de estudio incluyeron lo siguiente: a un grupo de animales se les administró ARNm de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos y a otro grupo de ratones se le administró ARNm de STING constitutivamente activo en combinación con un anticuerpo monoclonal PD-1. Los datos de estos estudios mostraron que la administración de ARNm de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos mejoró la supervivencia de los modelos animales sin la adición de anticuerpo monoclonal PD-1 **(FIG. 8)**. Tomados en conjunto, estos datos muestran que la administración de ARNm de STING constitutivamente activo encapsulado en lípidos reduce y retrasa el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende dos o más ARNm que codifican cada uno una proteína o un péptido encapsulado dentro de una o más nanopartículas lipídicas para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende administrar la composición a un sujeto que lo necesite, en donde dos de los dos o más ARNm codifican STING e IL-12, respectivamente, y en donde cada una de la una o más nanopartículas lipídicas comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1:15, respectivamente.

2. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde:
a. los dos o más ARNm comprenden un primer ARNm que codifica una primera proteína o péptido encapsulado dentro de una primera nanopartícula lipídica y un segundo ARNm que codifica una segunda proteína o péptido encapsulado con una segunda nanopartícula lipídica; o
b. una primera nanopartícula lipídica comprende un primer lípido catiónico y una segunda nanopartícula lipídica comprende un segundo lípido catiónico, en donde el primer lípido catiónico es diferente del segundo lípido catiónico.

3. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
a. los dos o más ARNm comprenden al menos tres ARNm que codifican STING, IL-12 y GM-CSF, respectivamente; o
b. los dos o más ARNm comprenden al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, FLT-3L y GM-CSF, respectivamente; o
c. los dos o más ARNm comprenden al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, NLRP3 y GM-CSF, respectivamente; o
d. los dos o más ARNm comprenden al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, IL-2 y GM-CSF, respectivamente;
opcionalmente en donde STING es una forma mutante de STING, opcionalmente en donde la forma mutante permite que STING sea constitutivamente activo.

4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la una o más nanopartículas lipídicas comprenden al menos una nanopartícula lipídica que comprende un lípido catiónico seleccionado de cKK-E12, OF-00, OF-01, OF-02 y OF-03.

5. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
a. la composición se administra por vía intratumoral, y/o
b. la composición se administra por vía subcutánea, y/o
c. la composición se administra por vía intradérmica, y/o
d. la composición se administra por vía intravenosa, y/o
e. la composición se administra mediante administración pulmonar, y/o
f. la composición se administra mediante nebulización.

6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método comprende inyectar una dosis única o inyectar múltiples dosis periódicamente, opcionalmente en donde:
a. la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 100 mg de ARNm, o
b. la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,1 µg - 50 mg, 0,1 µg - 25 mg, 0,1 µg - 10 mg, 1 µg - 1 mg o 1 µg - 100 µg de ARNm, o
c. la dosis única o las dosis múltiples se seleccionan de 0,1 µg, 0,3 µg, 0,5 µg, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 25 µg, 50 µg o 100 µg, o
d. la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,01 µg de ARNm/kg de peso corporal - 10 mg de ARNm/kg de peso corporal, o
e. la dosis única o las dosis múltiples varían de 0,01 µg de ARNm/kg de peso corporal - 8 mg de ARNm/kg de peso corporal, 0,01 µg de ARNm/kg de peso corporal - 6 mg de ARNm/kg de peso corporal, 0,01 µg de ARNm/kg de peso corporal - 5 mg de ARNm/kg de peso corporal, 0,1 µg de ARNm/kg de peso corporal - 5 mg de ARNm/kg de peso corporal, 0,1 µg de ARNm/kg de peso corporal - 1 mg de ARNm/kg de peso corporal o 0,1 µg de ARNm/kg de peso corporal - 0,5 mg de ARNm/kg de peso corporal, y/o
en donde cada una de las dosis múltiples comprenden la misma cantidad posológica de ARNm, y/o
en donde cada una de las dosis múltiples comprenden una cantidad posológica diferente de ARNm, y/o
en donde cada una de las dosis múltiples se inyectan 1 día a 3 semanas de diferencia, y/o
en donde cada una de las dosis múltiples se inyectan semanalmente.

7. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
a. el ARNm comprende uno o más nucleótidos modificados, y/o
b. el ARNm comprende una región no traducida en 5' (5' UTR) y/o una región no traducida en 3' (3' UTR).

8. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
a. el método comprende además administrar al sujeto una composición que comprende un inhibidor del punto de control, opcionalmente en donde el inhibidor del punto de control inhibe PD1, PD-L1, CTLA-4, B7, BTLA, HVEM, TIM-3, GAL-9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, o una combinación de los mismos; o

b. el método no comprende administrar al sujeto una composición que comprende un inhibidor del punto de control.

9. Una composición farmacéutica que comprende dos o más ARNm que codifican cada uno una proteína o un péptido encapsulado dentro de una o más nanopartículas lipídicas para tratar el cáncer, en donde dos de los dos o más ARNm codifican IL-12 y STING, respectivamente, en donde la una o más nanopartículas lipídicas comprenden cada uno un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido basado en colesterol y un lípido modificado con PEG en una relación molar de 30-60:25-35:20-30:1-15, respectivamente, y al menos una de las una o más nanopartículas lipídicas comprende cKK-E12, OF-00, OF-01, OF-02 o OF-03 como un lípido catiónico.

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en donde la composición comprende además un ARNm adicional que codifica un inhibidor del punto de control, opcionalmente en donde el inhibidor del punto de control inhibe PD1, PD-L1, CTLA-4, B7, BTLA, HVEM, TIM-3, GAL-9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR o una combinación de los mismos.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9 o 10, en donde los dos o más ARNm comprenden:
a. al menos tres ARNm que codifican STING, IL-12 y GM-CSF, respectivamente, o
b. al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, FLT-3L y GM-CSF, respectivamente.
c. al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, NLRP3 y GM-CSF, respectivamente, o
d. al menos cuatro ARNm que codifican STING, IL-12, IL-2 y GM-CSF, respectivamente;
opcionalmente en donde STING es una forma mutante de STING, opcionalmente en donde la forma mutante permite que STING sea constitutivamente activo.

12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, que comprende además una segunda nanopartícula lipídica que no comprende cKK-E12, OF-00, OF-01, OF-02 o OF-03 y que comprende un lípido catiónico seleccionado del grupo que consiste en C12-200, MC3, DLinDMA, DLinkC2DMA, ICE (basado en imidazol), HGT5000, HGT5001, HGT4003, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA and DMDMA, DODAC, DLenDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, 3-(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)-6-(4-((2-hidroxidodecil)(2-hidroxiundecil)amino)butil)-1,4-dioxano-2,5-diona (Diana 23), 3-(5-(bis(2-hidroxidodecil)amino)pentan-2-il)-6-(5-((2-hidroxidodecil)(2-hidroxiundecil)amino)pentan-2-il)-1,4-dioxano-2,5-diona (Diana 24), y combinaciones de los mismos.

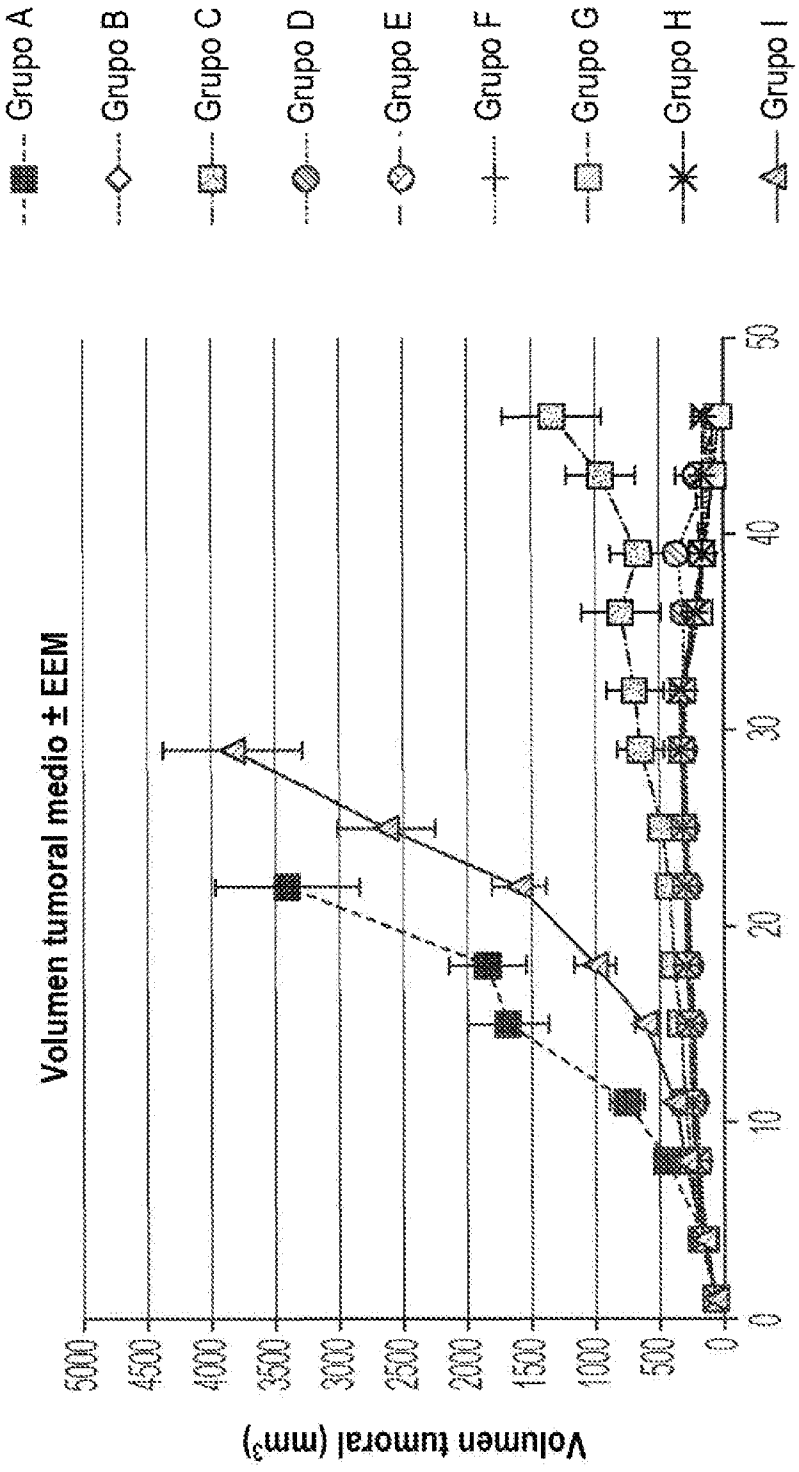

Grupo A
Grupo B
Grupo C
Grupo D
Grupo E
Grupo F
Grupo G
Grupo H
Grupo I
Volumen tumoral medio ± EEM
Volumen tumoral (mm³)
Días de estudio
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50

FIG. 1

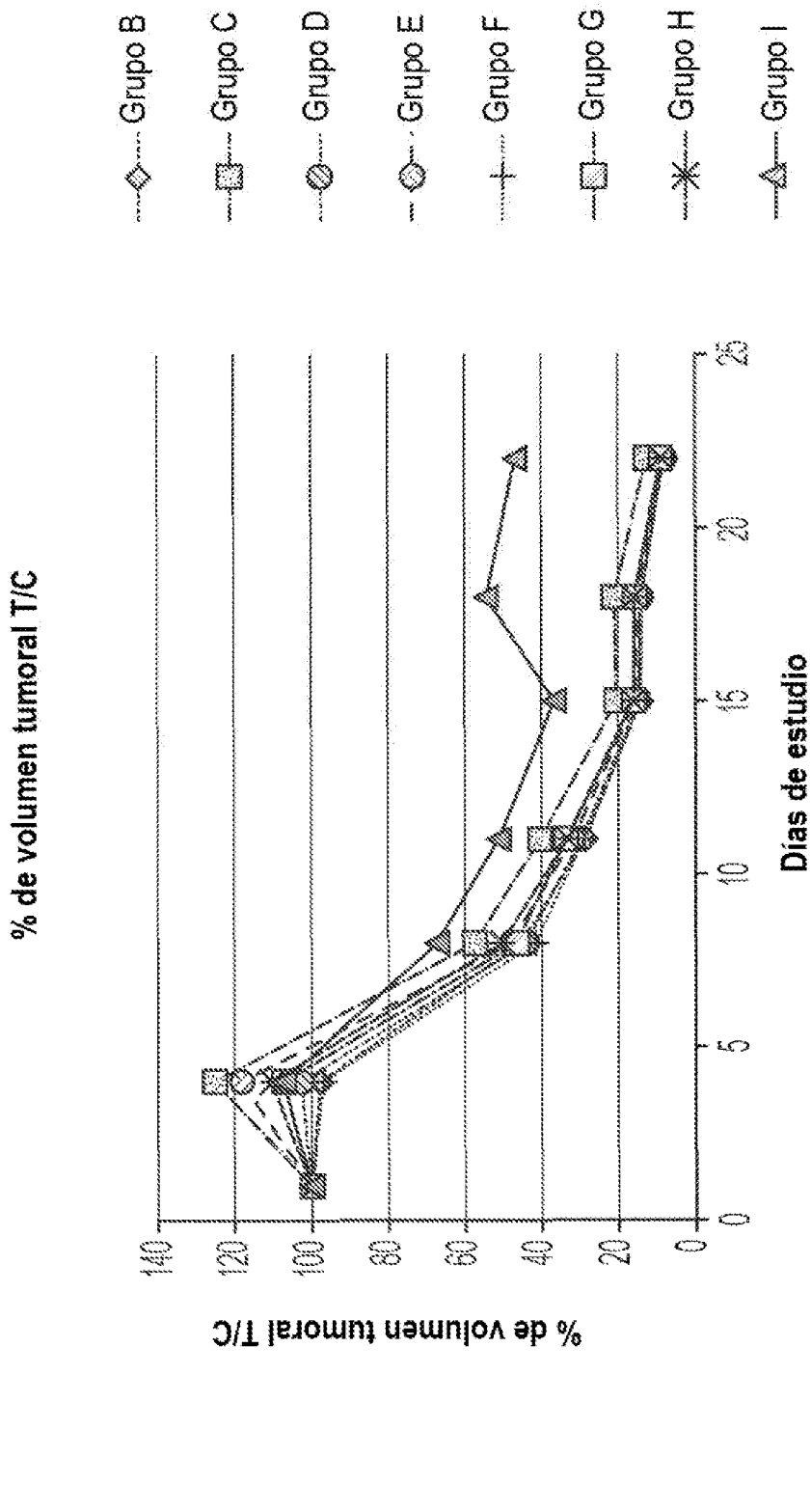
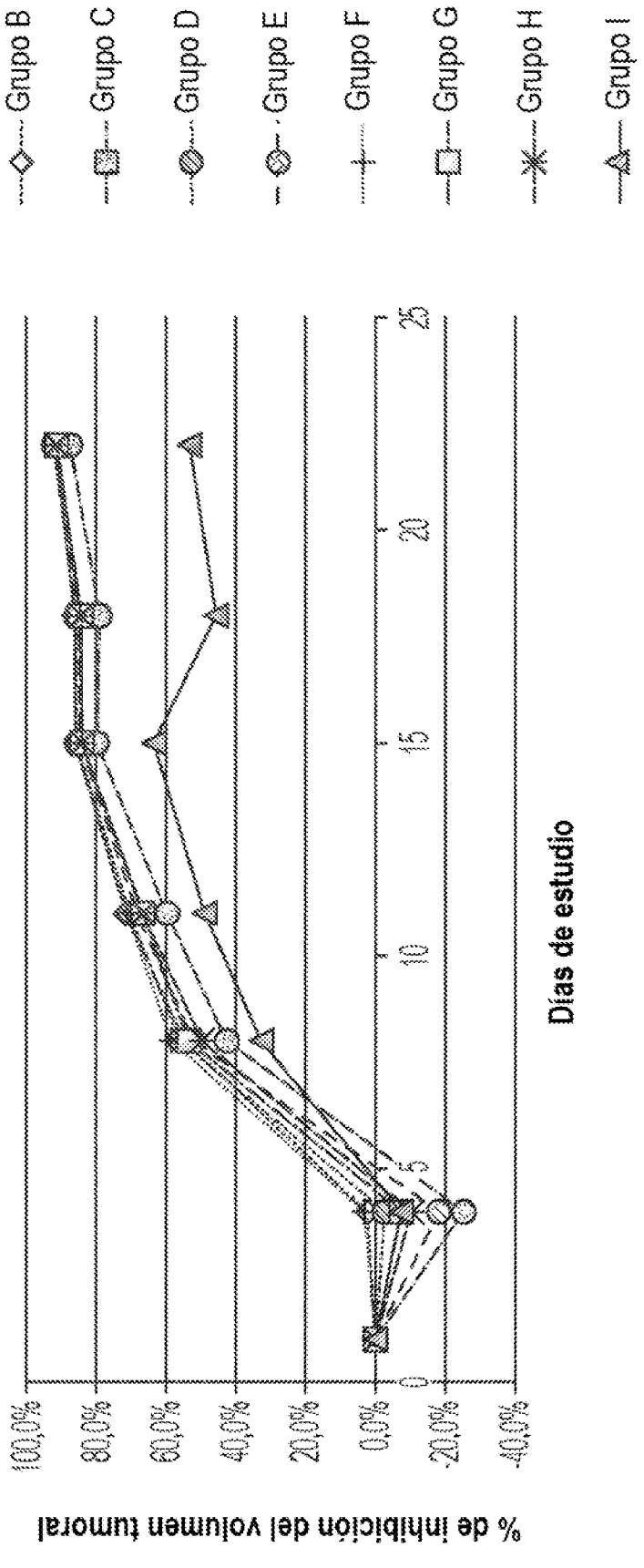

% de volumen tumoral T/C
Grupo B
Grupo C
Grupo D
Grupo E
Grupo F
Grupo G
Grupo H
Grupo I
% de volumen tumoral T/C
140
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
Días de estudio
% T/C = media (T)/media (C) x 100
T = volumen tumoral del grupo de prueba
C = volumen tumoral del grupo de control

FIG. 2



*% medio de inhibición = (media (C)-media (T))/media (C) * 100 %*
T = volumen tumoral del grupo de prueba
C = volumen tumoral del grupo de control

FIG. 3

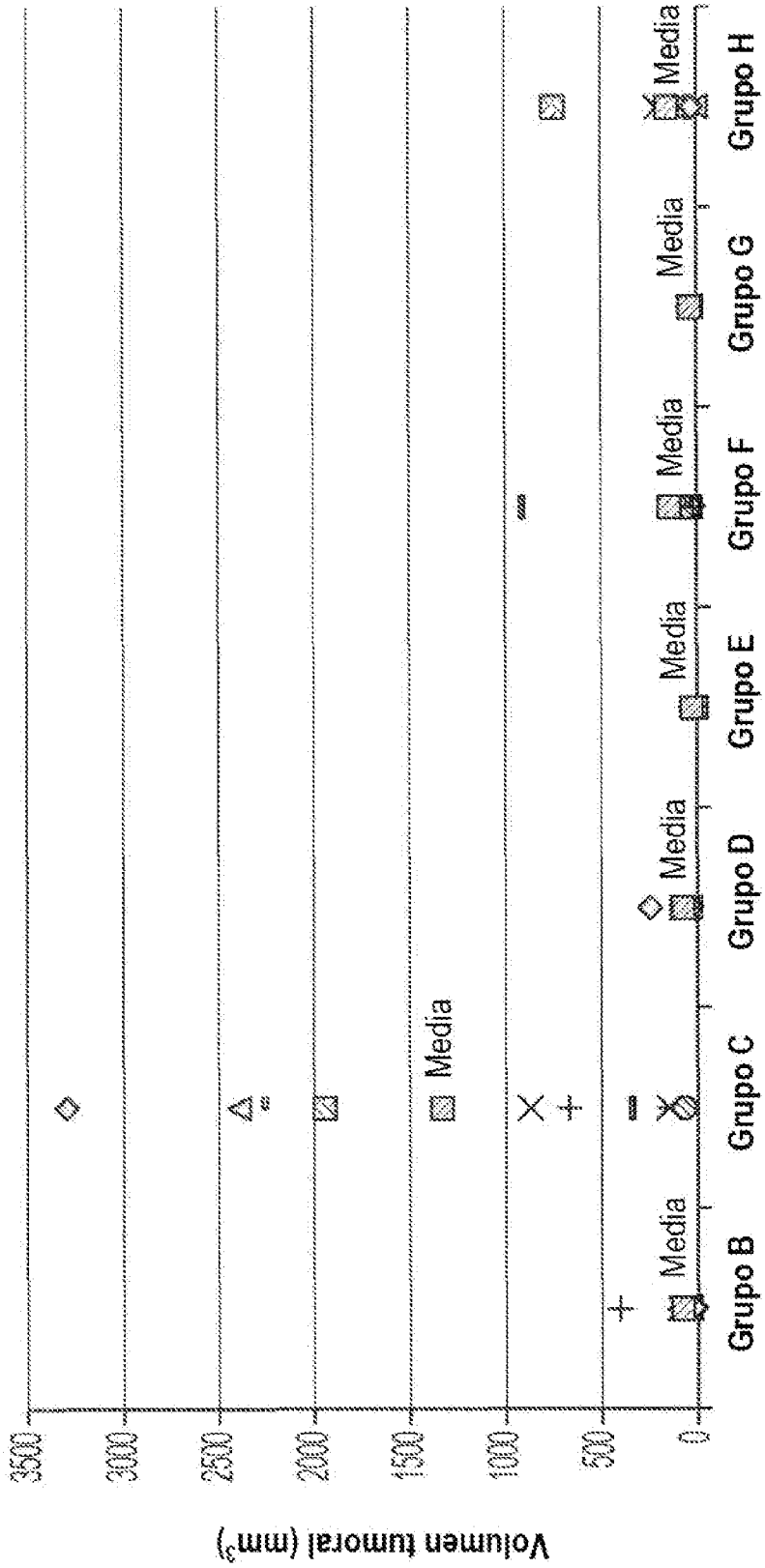

Volumen tumoral (mm3) en el dia 46
Volumen tumoral (mm3)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Media
Grupo B
Grupo C
Grupo D
Grupo E
Grupo F
Grupo G
Grupo H

FIG. 4

Volumen tumoral del Grupo A (solución salina; control negativo)							
	Día de estudio						
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22
1	61,86	183,87	834,01	1506,05	3202,99		
2	63,82	140,47	595,70	1115,60	3235,12		
3	68,22	113,56	167,21	260,56	545,90	822,29	1315,92
4	73,75	188,57	373,79	601,79	1405,16	2659,10	3773,03
5	74,00	156,52	600,80	1079,65	2444,43	2906,31	6026,12
6	71,30	108,64	469,85	627,38	1401,70	1778,14	3931,31
7	62,60	109,39	255,72	545,84	1087,02	1683,22	2680,82
8	66,02	85,20	172,75	311,38	485,06	789,07	1799,20
9	56,90	130,89	317,48	377,30	1012,37	1287,74	2679,10
10	89,15	281,85	695,94	1100,24	2020,95	2791,29	5037,08
Media	68,76	149,90	448,33	752,58	1684,07	1839,65	3405,32
Desv. est.	9,03	57,16	228,58	419,80	1005,69	860,77	1600,92

FIG. 5A

Volumen tumoral del Grupo B (IL-12)

	Día de estudio													
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	70,03	166,37	190,16	196,70	207,54	251,16	258,13	259,81	260,31	186,49	94,65	29,45	21,29	11,65
2	66,17	163,52	196,87	217,43	224,18	247,18	254,03	255,53	273,61	277,19	223,80	118,45	44,31	39,87
3	61,68	118,36	199,66	212,88	230,05	257,18	277,24	285,91	298,04	302,04	166,13	100,33	90,93	89,43
4	71,02	128,21	172,68	176,92	182,62	187,16	191,30	214,19	215,44	221,82	185,87	162,18	71,19	36,11
5	69,11	147,70	171,90	182,62	226,07	240,54	311,23	325,04	332,29	333,76	279,88	162,24	97,04	94,70
6	76,56	140,09	174,36	182,73	192,15	207,47	218,19	225,81	247,77	249,26	251,17	196,47	122,84	30,70
7	56,99	146,63	267,11	296,64	305,46	341,09	346,29	362,17	368,30	369,19	370,77	239,81	208,91	407,79
8	79,49	124,68	185,51	194,56	320,27	323,52	337,39	340,70	344,55	349,83	283,19	105,17	46,70	32,16
9	63,89	102,57	235,98	241,49	254,36	274,59	283,31	291,79	335,21	340,04	342,05	150,77	70,10	42,95
10	72,21	224,70	236,58	243,59	259,04	270,50	304,93	312,02	323,62	327,86	332,66	160,79	64,95	21,62
Media	68,72	146,28	203,08	214,76	240,17	260,04	278,20	288,30	299,96	295,75	253,02	142,56	83,82	89,70
Desv. est.	6,78	33,95	32,58	37,03	45,31	46,70	49,57	48,84	49,00	60,28	86,77	57,82	52,65	118,07

FIG. 5B

Volumen tumoral del Grupo C (IL-2)														
	Día de estudio													
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	64,11	190,33	284,66	315,74	357,14	451,13	492,85	585,96	1033,35	1232,77	1405,59	2151,34	2508,48	3294,45
2	81,90	228,62	287,83	312,63	378,79	448,73	591,12	643,11	752,98	833,90	864,50	1054,88	1383,02	1945,94
3	57,05	242,28	255,08	290,65	297,51	326,93	371,16	384,75	420,90	449,99	494,72	628,45	1435,17	2394,28
4	61,51	264,44	314,65	372,03	391,71	404,93	413,45	416,67	427,27	430,18	457,02	516,46	675,07	871,50
5	72,07	206,46	236,65	276,07	319,83	321,79	336,49	346,05	348,44	245,94	126,01	45,25	70,24	151,28
6	75,12	137,11	228,26	280,86	301,01	325,31	336,22	347,53	353,83	221,13	182,18	134,68	100,27	65,82
7	67,84	80,63	148,35	262,11	308,80	317,94	377,62	404,51	448,55	458,55	474,64	489,19	501,85	669,24
8	72,08	153,63	213,60	222,86	243,76	259,53	262,05	276,24	283,40	307,30	367,47	641,14	1563,60	2260,54
9	67,96	112,40	144,65	180,65	223,99	231,46	244,66	253,81	258,17	263,45	298,74	312,19	335,03	341,80
10	67,54	260,39	461,32	526,73	598,77	795,58	857,24	1182,38	2105,09	2449,94	3331,21			
Media	68,72	187,63	257,51	304,03	342,13	388,33	428,29	484,10	643,20	689,31	800,21	663,73	952,53	1332,76
Desv. est.	7,07	64,15	90,88	93,96	104,78	160,57	182,27	274,46	566,04	694,17	964,30	633,04	819,97	1164,47

FIG. 5C

Volumen tumoral del Grupo D (STING/IL-12)														
	Día de estudio													
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	74,06	120,97	131,67	142,33	164,52	169,64	177,38	237,27	239,61	299,25	233,68	174,55	100,67	59,50
2	65,26	170,84	207,39	235,71	254,08	258,91	266,92	280,01	283,83	300,66	317,30	325,94	204,44	80,22
3	71,00	120,12	178,13	185,84	212,17	258,10	266,11	285,66	297,10	261,28	131,15	114,40	102,06	36,51
4	57,78	130,59	153,41	182,69	217,81	229,54	245,54	251,46	258,56	208,61	175,35	139,03	83,40	68,03
5	92,81	229,84	289,21	323,60	341,54	348,94	357,24	379,45	390,71	325,74	222,18	205,66	75,30	58,84
6	63,32	186,52	312,91	333,62	354,00	369,25	382,21	387,48	391,78	393,85	217,35	107,41	78,69	47,50
7	60,98	128,96	157,98	198,12	210,23	218,12	223,96	236,84	241,20	243,49	142,54	123,84	75,63	30,80
8	73,82	175,48	193,09	211,92	221,52	250,59	265,70	324,15	354,84	364,38	263,06	141,29	118,28	48,24
9	65,16	140,67	181,98	230,38	265,04	302,72	308,70	318,74	331,46	507,75	1181,66	2112,23		
10	63,84	133,72	167,19	184,60	196,56	204,04	212,73	220,68	225,11	227,77	229,22	236,24	239,27	246,49
Media	68,80	153,80	197,30	222,88	243,75	260,99	270,65	292,17	301,42	313,28	311,35	368,06	119,75	75,13
Desv. est.	9,98	35,81	58,90	61,74	61,53	63,01	63,52	59,13	62,65	90,23	310,70	616,52	60,28	66,04

FIG. 5D

Volumen tumoral del Grupo E (STING/IL-12/GM-CSF)														
	Día de estudio													
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	69,89	208,42	248,13	258,89	281,54	288,35	290,46	296,27	302,81	304,69	175,98	118,58	27,39	18,93
2	72,35	183,49	217,43	232,98	246,33	260,56	255,19	259,70	272,03	273,88	166,77	95,38	55,53	8,90
3	70,13	180,67	203,35	245,75	250,63	264,07	285,41	297,11	304,97	311,31	224,01	118,42	49,63	30,56
4	60,93	135,43	142,51	176,98	208,85	278,58	321,18	337,78	340,35	353,20	513,10	702,01	1499,48	
5	76,47	231,91	300,31	328,72	353,24	373,62	375,04	381,83	384,52	389,06	264,54	98,05	46,69	25,09
6	59,11	167,57	230,40	251,52	259,60	276,98	278,56	284,23	291,45	294,14	176,40			
7	77,24	133,61	185,35	196,26	201,93	265,77	211,11	222,50	233,05	237,46	118,36	90,22	46,01	26,71
8	67,21	170,98	187,02	212,92	261,27	276,06	277,91	286,28	315,55	317,16	191,23	118,41	87,84	41,56
9	64,52	189,23	239,78	251,03	264,09	272,20	281,16	286,30	295,38	302,77	215,92	124,40	47,17	42,26
10	67,58	169,18	190,80	239,67	274,67	286,23	307,08	315,37	319,22	344,99	237,06	158,36	58,22	31,44
Media	68,74	177,07	214,51	239,47	260,22	277,24	288,31	296,94	305,93	312,87	228,34	180,43	213,11	28,18
Desv. est.	6,31	29,79	43,29	41,07	41,71	41,52	42,53	42,81	40,03	42,44	108,19	196,64	482,65	11,10

FIG. 5E

Volumen tumoral del Grupo F (STING/IL-12/FLT-3L/GM-CSF)

	Día de estudio														
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	67,01	162,80	185,74	200,65	234,93	269,48	311,72	336,84	358,23	360,32	210,48	184,42	75,05	35,91
2	66,59	111,81	139,78	157,27	198,72	207,80	307,19	343,53	356,92	364,78	231,72	206,89	175,43	112,90
3	60,62	174,01	240,23	281,27	295,98	306,58	314,27	324,59	328,27	330,82	112,01	68,25	38,20	33,20
4	79,60	192,78	217,81	233,27	243,26	266,15	272,53	291,02	305,93	309,00	144,28	113,35	89,54	46,40
5	74,86	93,27	119,71	177,25	187,28	211,52	249,07	275,03	299,76	339,35	235,84	189,63	81,14	51,39
6	69,84	126,10	132,17	165,01	186,81	196,15	207,49	256,39	259,41	267,96	144,83	128,07	55,14	43,49
7	73,47	158,17	274,49	289,50	310,69	355,27	366,37	376,06	377,15	382,89	172,56	108,69	67,99	18,73
8	63,72	111,34	143,34	205,75	211,90	223,30	244,53	264,90	274,08	278,20	231,86	195,25	61,67	47,31
9	67,19	190,65	202,14	228,89	234,18	256,00	259,87	262,52	322,66	337,51	238,27	233,42	465,84	909,62
10	64,35	130,93	212,75	234,44	243,13	254,06	269,61	279,53	318,74	323,85	167,63	138,90	132,14	131,52
Media	68,72	145,19	186,82	217,33	234,69	254,63	280,27	301,04	320,11	329,47	188,95	156,69	124,22	143,05
Desv. est.	5,77	35,22	51,64	45,14	42,21	49,03	45,24	41,22	37,35	36,63	46,37	52,59	126,54	271,72

FIG. 5F

Volumen tumoral del Grupo G (STING/IL-12/NLRP3/GM-CSF)														
	Día de estudio													
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	69,27	120,85	158,09	203,61	235,28	250,05	257,80	286,49	299,73	312,72	317,05	386,74		
2	64,96	173,21	225,42	236,95	252,82	258,21	274,77	290,70	294,08	302,20	128,90	111,90	57,49	29,62
3	70,24	147,46	197,45	236,11	248,30	272,47	303,84	310,47	314,67	198,87	103,11	64,73	54,34	26,99
4	95,85	152,26	173,13	252,31	270,16	283,30	290,76	317,04	323,00	339,69	196,75	172,01	92,73	39,53
5	59,31	167,12	202,58	276,68	294,45	331,91	334,77	341,15	344,05	345,00				
6	60,57	228,38	292,01	305,62	329,88	339,29	345,13	355,20	369,88	376,21	192,61	164,40	92,27	41,32
7	59,90	118,13	144,77	198,09	199,72	205,04	216,66	232,12	236,65	243,75	157,41	125,46	57,20	41,27
8	62,77	190,01	200,00	278,73	299,50	317,05	338,86	343,53	347,74	348,96	198,05			
9	73,88	171,84	234,25	243,49	254,89	273,41	290,95	312,02	320,64	321,87	173,13	120,54	84,87	33,86
10	70,70	138,67	257,06	294,42	318,16	323,66	330,87	342,70	364,49	369,47	183,14	157,84	78,28	31,19
Media	68,74	160,79	208,48	252,60	270,32	285,44	299,24	313,14	321,49	315,87	183,35	162,95	73,88	34,82
Desv. est.	10,81	33,15	45,17	36,20	40,15	42,55	41,05	36,75	39,24	55,92	59,73	96,84	17,14	5,89

FIG. 5G

Volumen tumoral del Grupo H (STING/IL-12/IL-2/GM-CSF)														
	Día de estudio													
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	43	46
1	60,51	111,97	168,01	197,72	220,74	230,08	238,23	259,20	268,56	272,01	205,27	96,33	73,09	45,34
2	60,29	354,39	364,30	392,33	409,85	431,30	434,07	466,62	470,95	477,10	310,32	306,28	550,55	744,58
3	66,88	189,21	202,58	215,10	232,58	256,49	266,06	279,36	289,63	293,20	179,07	96,09	58,91	0,00
4	71,95	153,18	224,42	233,73	245,45	260,94	278,63	308,56	315,93	318,68	295,06	269,45	255,69	207,01
5	68,03	153,69	219,95	227,22	247,97	264,66	272,69	283,95	287,08	288,69	191,10	119,34	98,30	
6	72,09	132,09	203,93	268,16	283,50	294,86	307,77	329,21	339,79	341,33	257,34	225,24	186,81	105,36
7	76,52	158,48	205,38	226,03	245,80	310,93	319,70	332,17	388,16	414,14	208,41	172,19	150,16	63,27
8	64,39	126,62												
9	67,87	153,63	201,42	239,17	253,76	286,70	294,65	317,97	321,62	329,88	212,78	106,75	52,28	40,07
10	78,96	121,04	240,69	261,89	274,39	283,66	290,63	295,16	302,92	310,08	112,55	48,91	39,21	26,98
Media	68,75	165,43	225,63	251,26	268,23	291,09	300,27	319,13	331,63	338,34	219,10	160,06	162,78	154,08
Desv. est.	6,23	70,07	55,69	57,16	56,45	57,73	55,58	60,34	62,82	66,30	60,87	88,57	162,10	246,93

FIG. 5H

Volumen tumoral del Grupo I (FFL; control negativo)									
	Día de estudio								
Ratón n.º	1	4	8	11	15	18	22	25	29
1	74,02	127,84	203,52	272,21	598,29	1163,92	2231,68	3777,19	
2	60,39	179,69	282,22	290,51	368,68	406,25	727,81	1260,79	2400,43
3	72,23	178,55	345,94	475,10	1002,86	1794,28	2281,77		
4	68,33	105,68	418,83	592,46	956,21	1748,66	2376,03	4325,58	
5	78,55	171,01	281,98	301,73	345,60	485,74	781,52	1572,18	3561,89
6	60,41	138,07	228,61	269,84	417,28	616,47	1029,20	1660,45	3475,51
7	65,00	124,49	324,10	424,06	613,24	787,73	1352,63	2600,39	3968,86
8	62,02	147,49	310,65	370,08	544,69	833,21	1644,81	2775,43	5743,63
9	69,05	245,99	317,27	385,11	484,74	686,29	1147,61	1804,93	
10	77,27	189,33	294,77	468,31	831,24	1483,05	2348,47	3913,47	
Media	68,73	160,83	301,69	384,94	616,28	1000,56	1592,15	2932,27	3830,06
Desv. est.	6,73	40,79	60,71	106,29	237,61	514,99	670,82	1144,27	1216,81

FIG. 5I

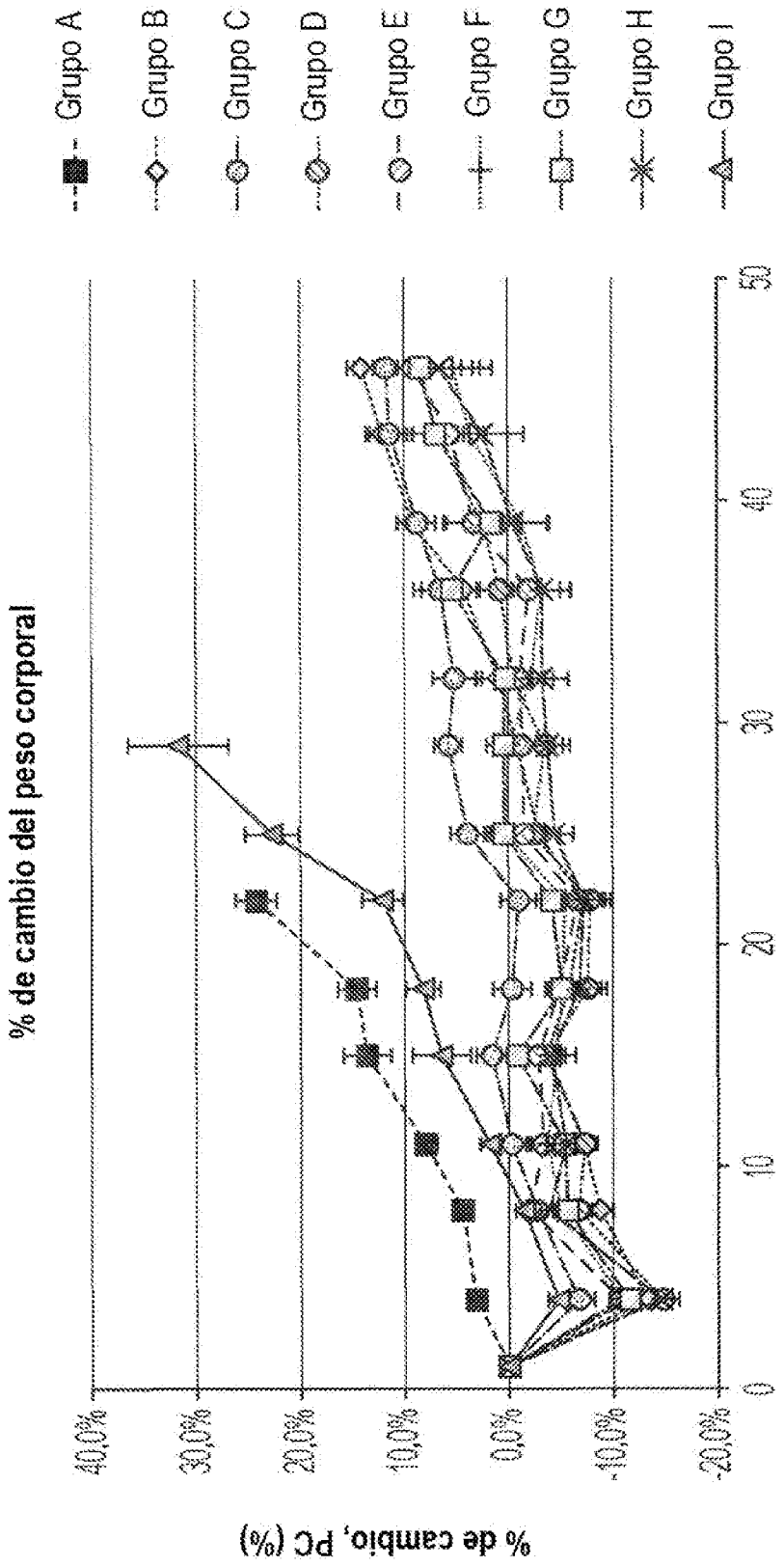

% de cambio del peso corporal
Grupo A
Grupo B
Grupo C
Grupo D
Grupo E
Grupo F
Grupo G
Grupo H
Grupo I
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
-10,0%
-20,0%
0
10
20
30
40
50
Días de estudio
% de cambio, PC (%)

FIG. 6

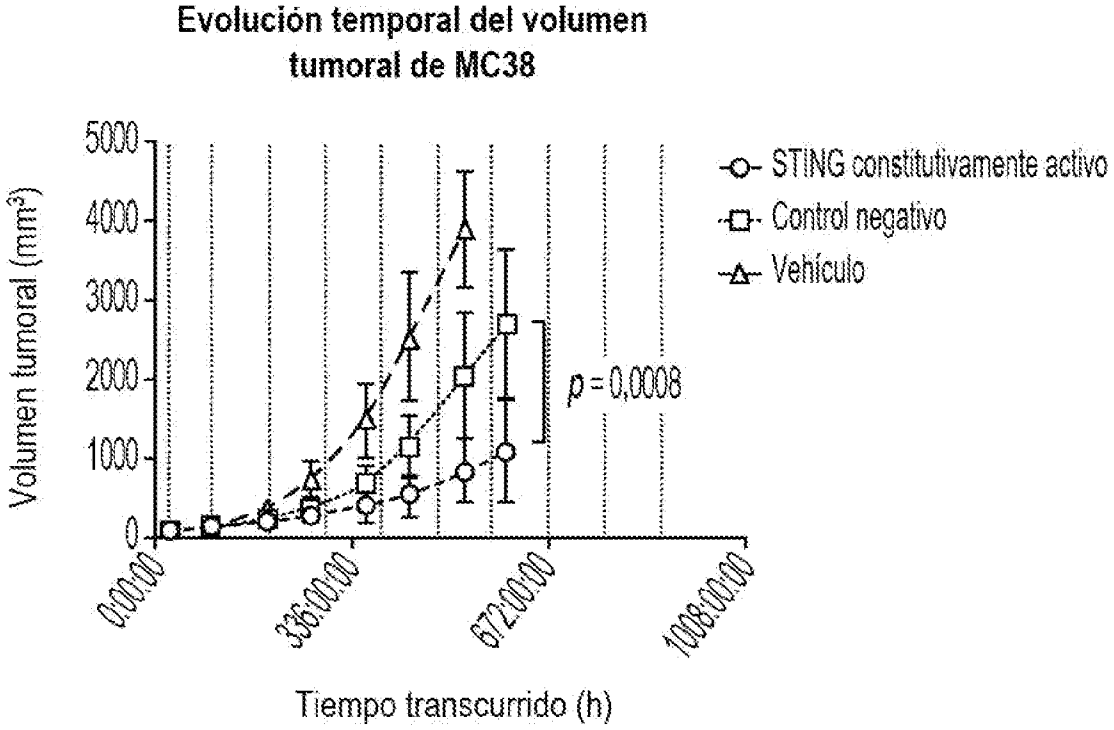

Evolución temporal del volumen tumoral de MC38
Volumen tumoral (mm³)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0:00:00
336:00:00
672:00:00
1008:00:00
Tiempo transcurrido (h)
p = 0,0008
STING constitutivamente activo
Control negativo
Vehículo

FIG. 7

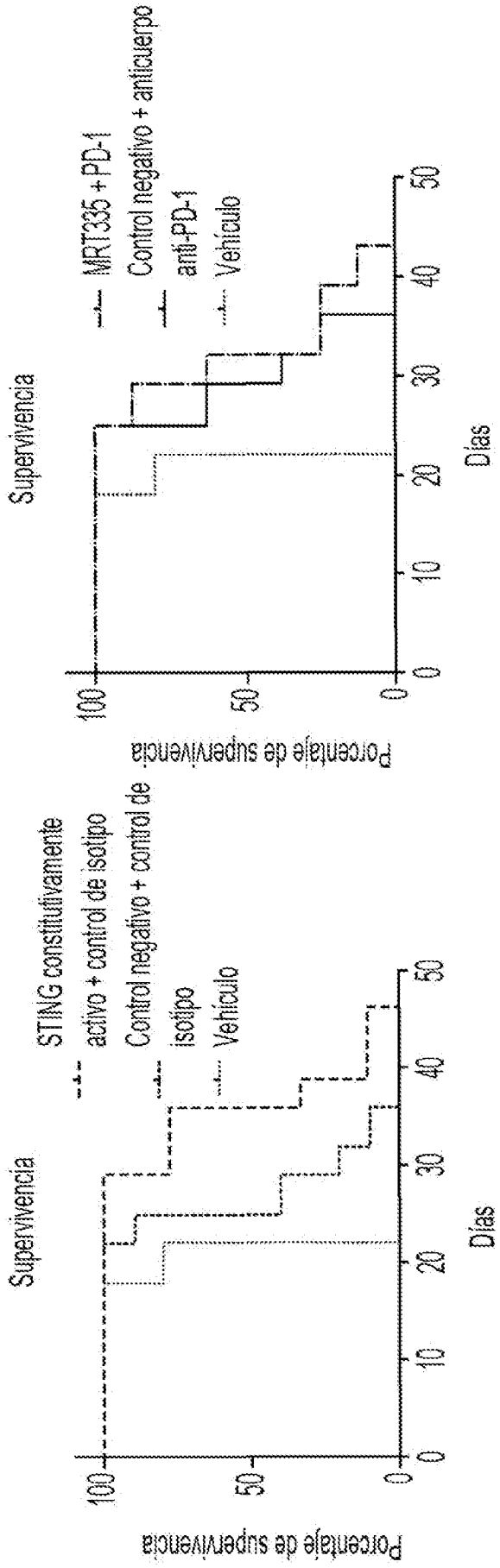

Supervivencia
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Días
MRT335 + PD-1
Control negativo + anticuerpo anti-PD-1
Vehículo
Supervivencia
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Días
STING constitutivamente activo + control de isotipo
Control negativo + control de isotipo
Vehículo

FIG. 8