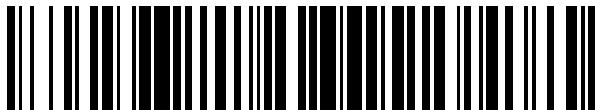


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 942 890**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2018 PCT/US2018/049772**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2019 WO19051100**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2018 E 18792572 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2023 EP 3678673**

(54) Título: **Composiciones y procedimientos para suministro, expresión y modulación dirigidos de ácidos ribonucleicos codificantes en tejidos**

(30) Prioridad:

**07.09.2017 GB 201714430
19.02.2018 US 201862632056 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2023

(73) Titular/es:

**COMBINED THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
251 Little Falls Drive
Wilmington, DE 19808, US**

(72) Inventor/es:

**MICOL, ROMAIN y
ANTOSZCZYK, SLAWOMIR**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 942 890 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para suministro, expresión y modulación dirigidos de ácidos ribonucleicos codificantes en tejidos

Campo

- 5 La presente invención se refiere a tecnologías de suministro de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), típicamente suministro basado en nanopartículas, y métodos para fabricar y usar estas tecnologías de suministro de ARNm en una variedad de indicaciones terapéuticas, de diagnóstico y profilácticas. Tales sistemas de suministro pueden usarse como intervenciones independientes o combinados con otros componentes terapéuticos.

Antecedentes

- 10 La terapia génica es el procedimiento de introducir polinucleótidos codificantes en las células de un paciente para tratar una enfermedad. Por ejemplo, un gen mutado y/o sin función puede reemplazarse en células diana por una copia intacta. La terapia génica a menudo se basa en vectores virales para introducir polinucleótidos codificantes en las células diana, pero existen otras técnicas para suministrar polinucleótidos a las células sin el uso de virus. Las ventajas de los virus incluyen tasas de transfección posibles relativamente altas, así como la capacidad de dirigir el virus a tipos de células particulares mediante el control de las proteínas de unión mediante las cuales los virus ingresan a una célula diana. Por el contrario, los métodos no virales de introducción de polinucleótidos codificantes en las células pueden tener problemas con las bajas tasas de transfección, además de tener opciones limitadas para dirigir la expresión a órganos y tipos de células particulares. Sin embargo, la naturaleza de la intervención viral conlleva riesgos de toxicidad e inflamación, pero también tiene un control limitado sobre la duración y el grado de expresión del factor introducido.
- 15 20 Las terapias tumorales basadas en enfoques biológicos tienen ventajas sobre la quimioterapia tradicional porque pueden emplear numerosos mecanismos diversos para atacar y destruir los cánceres con mayor precisión, p. ej., vía lisis celular directa, mecanismos efectores inmunológicos citotóxicos y colapso vascular entre otros. Como resultado, ha habido un aumento significativo en el número de estudios clínicos sobre el potencial de tales enfoques. Sin embargo, debido a la diversa gama de actividades terapéuticas, el estudio preclínico y clínico es complejo, ya que múltiples parámetros pueden afectar su potencial terapéutico y, por lo tanto, puede ser difícil definir las razones del fracaso del tratamiento o las metodologías que podrían mejorar la actividad terapéutica. El mantenimiento de las actividades en la diana, la especificidad del tumor y la reducción de los efectos secundarios también son un desafío importante para estas terapias experimentales y poderosas.
- 25 30 En contextos no clínicos, también, se desea con frecuencia la capacidad de inducir la expresión de un producto génico particular tal como un polipéptido en un tejido u órgano diana particular. En muchas situaciones, un tejido u órgano diana comprenderá más de un tipo de célula y, en tales casos, con frecuencia también se desea expresar el producto génico en diferentes grados en los diferentes tipos de células, es decir, proporcionar una expresión diferencial en los diferentes tipos de células. Si bien existen métodos para introducir polinucleótidos *in vitro* e *in vivo*, estos tienen las mismas limitaciones que se discutieron anteriormente.
- 35 40 45 50 55 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar más métodos y composiciones para el suministro de secuencias de polinucleótidos, tales como ARNm, a órganos y/o tejidos específicos, y métodos para modular la expresión de las secuencias de polinucleótidos suministradas en células específicas.

Compendio

- Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones y métodos que son capaces de suministrar ARN mensajero (ARNm) expresable a las células en un órgano diana, y usar el sistema celular de modulación de la expresión mediada por microARN para impulsar la expresión diferencial en diferentes células, tipos de células y/o tejidos dentro del órgano diana. Los sistemas de suministro a nanoescala que comprenden el ARNm se utilizan para permitir el suministro dentro de las células de un órgano diana. Al proporcionar ARNm, la invención permite la expresión exógena controlable y limitada del producto génico polipeptídico del ARNm proporcionado dentro de diferentes tipos de células, por ejemplo, células cancerosas, no cancerosas, enfermas o sanas.
- La invención se puede usar para mejorar o modular la función de varias terapias complementarias, administradas conjuntamente o administradas simultáneamente. Por ejemplo, la invención puede usarse junto con terapia viral oncolítica, quimioterapia, terapia con anticuerpos o radioterapia. En un ejemplo, el ARNm que codifica factores que aumentan la eficacia de un virus oncolítico administrado a un paciente puede expresarse selectivamente en células cancerosas, aumentando así la lisis viral de las células cancerosas mientras se preservan las células no cancerosas y/o sanas. Este enfoque se puede utilizar para que los virus oncolíticos atenuados se restablezcan a toda su potencia en las células cancerosas, pero no en las células sanas o no cancerosas vecinas. Una ventaja clave de este enfoque es que reduce los efectos inespecíficos y aumenta la potencia del efecto terapéutico, lo que conduce a reducciones en la dosis y los efectos secundarios asociados.
- En un primer aspecto de la invención, se proporciona una secuencia de ARNm aislada para expresar un polipéptido dentro de un órgano diana. La secuencia comprende al menos una secuencia codificante que codifica el polipéptido,

- al menos una primera secuencia de la región no traducida (UTR) y al menos tres secuencias de sitios de unión de micro-ARN (miARN) sustancialmente diferentes en donde las al menos tres secuencias de sitios de unión de miARN sustancialmente diferentes están ubicadas dentro, inmediatamente 5' con respecto a, o inmediatamente 3' con respecto a, la primera secuencia UTR. Las al menos tres secuencias de sitios de unión de miARN sustancialmente diferentes permiten la expresión diferencial de la secuencia codificante en diferentes tipos de células dentro del órgano diana. Se pretende que este aspecto pueda comprender adicionalmente cualquiera de las características discutidas con relación a la secuencia de ARNm de otras realizaciones de la invención.
- También se contempla una construcción de expresión de polinucleótidos que codifica esta secuencia de ARNm.
- De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición para expresar un polipéptido dentro de un órgano diana, comprendiendo la composición una partícula de suministro y al menos una primera secuencia de ARNm complejada, encapsulada o asociada de otro modo con la partícula de suministro. La secuencia de ARNm está de acuerdo con el aspecto descrito anteriormente. La secuencia de ARNm comprende una secuencia codificante que codifica el polipéptido, al menos una primera secuencia de la región no traducida (UTR) y al menos tres secuencias de sitios de unión de micro-ARN (miARN) sustancialmente diferentes, en donde las al menos tres secuencias de sitios de unión de miARN sustancialmente diferentes están ubicadas dentro, inmediatamente 5' con respecto a, o inmediatamente 3' con respecto a, la primera secuencia UTR. Las al menos tres secuencias de sitios de unión de miARN sustancialmente diferentes se seleccionan para proporcionar una expresión diferencial de la secuencia codificante entre el primer y el segundo tipo de células comprendidas dentro del órgano diana.
- De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona una composición para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto. La composición comprende una partícula de suministro; y al menos una secuencia de ARNm complejada, encapsulada o asociada de otro modo con la partícula de suministro. La secuencia de ARNm comprende una secuencia codificante que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido comprende un factor potenciador terapéutico, al menos una secuencia de la primera región no traducida (UTR) y al menos dos secuencias de sitios de unión de microARN (miARN). Las al menos dos secuencias de sitios de unión de miARN están ubicadas dentro, inmediatamente 5' con respecto a, o inmediatamente 3' con respecto a, la primera secuencia UTR. Las al menos dos secuencias de sitios de unión de miARN proporcionan la expresión diferencial de la secuencia codificante entre el primer y el segundo tipo de células comprendidas dentro del órgano diana. El método comprende adicionalmente administrar terapia viral oncolítica al sujeto.
- En realizaciones de la invención que comprenden partículas de suministro, la secuencia de ARNm puede encapsularse en la partícula de suministro. Las partículas de suministro pueden comprender lipidoídes de aminoalcohol. En algunas realizaciones, las partículas de suministro se dirigen hacia el órgano diana y pueden comprender adicionalmente uno o más agentes de direccionamiento seleccionados entre: proteínas, péptidos, carbohidratos, glicoproteínas, lípidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos, donde estos agentes de direccionamiento se asocian preferentemente con células en el órgano diana.
- En realizaciones según la invención, las secuencias de sitios de unión de miARN comprenden una pluralidad de secuencias de sitios de unión de miARN. Las secuencias de sitios de unión de miARN pueden comprender más de tres, típicamente más de cuatro secuencias de sitios de unión. La pluralidad de secuencias de sitios de unión de miARN puede ser sustancialmente la misma secuencia, o puede ser una o más secuencias sustancialmente diferentes. La pluralidad de secuencias de sitios de unión de miARN pueden ser diferentes variantes de secuencias que son dianas para la misma especie de miARN, o para diferentes variantes de la misma especie de miARN. En una realización de la invención, las secuencias de sitios de unión de miARN pueden comprender una o más secuencias de sitios de unión de miARN-122, incluidas variantes y homólogos de las mismas.
- Los diferentes tipos de células en el órgano diana pueden comprender células no neoplásicas, células neoplásicas (precancerosas o cancerosas) y combinaciones de las mismas. En particular, el primer y segundo tipos celulares pueden ser selecciones diferentes del grupo que comprende células no neoplásicas, un fenotipo de células transformadas; un fenotipo precanceroso; y un fenotipo neoplásico. Las células no neoplásicas pueden considerarse células sanas o, alternativamente, pueden incluir células no sanas (p. ej., cirróticas, inflamadas o infectadas), pero por lo demás no cancerosas.
- Según una realización de la invención, el órgano diana comprende al menos un primer fenotipo celular y al menos un segundo fenotipo celular; opcionalmente, el órgano diana comprende al menos un tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo fenotipos celulares; adecuadamente, el órgano diana comprende una pluralidad de fenotipos celulares. Cuando la invención se refiere a una realización que comprende una pluralidad de fenotipos celulares, la expresión diferencial se produce a niveles detectables en al menos uno de la pluralidad de fenotipos celulares, pero en menor medida o de manera no detectable en los otros fenotipos celulares.
- En realizaciones de la invención, el órgano diana comprende un primer y un segundo tipo de células que presentan diferentes patrones de expresión de miARN. El órgano diana puede seleccionarse entre hígado, cerebro, pulmón, mama o páncreas. El órgano diana puede ser el hígado, en cuya realización tanto la partícula como el ARNm están adaptados para facilitar la expresión diferencial de la secuencia codificante dentro de los tipos de células o tejidos comprendidos dentro del hígado de un sujeto, paciente o animal.

- La primera secuencia UTR puede ubicarse 3' con respecto a la secuencia codificante. En otras realizaciones, la primera secuencia UTR puede ubicarse en 5' con respecto a la secuencia codificante. En una realización de la invención, la secuencia de ARNm comprende adicionalmente una segunda secuencia UTR, que tiene al menos 90% de similitud con una secuencia UTR que se encuentra en al menos uno de los diferentes tipos de células dentro del órgano diana. Opcionalmente, la segunda secuencia UTR tiene al menos 90% de similitud con una secuencia UTR en al menos un tipo de célula no enferma dentro del órgano diana. Opcionalmente, la segunda secuencia UTR tiene al menos 90% de similitud con una secuencia UTR en al menos un tipo de célula enferma dentro del órgano diana.
- En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un factor potenciador terapéutico. El factor potenciador terapéutico puede seleccionarse entre: una proteína supresora de tumores, una proteína de muerte celular programada, un inhibidor de una vía de muerte celular programada, un anticuerpo monoclonal o un fragmento o derivado del mismo, una nucleasa específica de secuencia, un factor de virulencia viral oncolítico, una citocina, una quimiocina, una proteína marcadora fluorescente y combinaciones de los mismos. En una realización, el factor potenciador terapéutico es una molécula inmunomoduladora seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) citocinas implicadas en la respuesta inmunitaria y la inflamación seleccionadas entre uno o más de: TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFNgamma, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, CCL 2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL 9 y CXCL10;
 - (ii) activadores de células dendríticas seleccionados entre uno o más de: GM-CSF, TLR7 y TLR9;
 - (iii) moléculas dirigidas a los siguientes receptores celulares y sus ligandos seleccionados entre uno o más de: CD40, CD40L, CD160, 2B4, Tim-3, GP-2, B7H3 y B7H4;
 - (iv) inhibidores de TGF β ;
 - (v) inhibidores de la proteína 3 de la membrana de las células T;
 - (vi) inhibidores de muerte programada 1 (PD1), ligando de muerte programada 1 (PDL1), ligando de muerte programada 2 (PDL2), antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4) y gen de activación de linfocitos 3 (LAG3); y
 - (vii) inhibidores de NF- κ B.
- En una realización, la composición según la invención puede comprender adicionalmente un virus oncolítico. Adecuadamente, el virus se selecciona entre uno cualquiera de los Grupos I - VII de la clasificación de virus de Baltimore. Opcionalmente, el virus oncolítico se selecciona del grupo que comprende uno o más de: Virus de la Estomatitis Vesicular, virus Maraba, virus de la Polio, Reovirus, virus del Sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Coxsackie A21, Parvovirus, Virus del Herpes Simple Tipo 1 y Adenovirus.
- También se describe en el presente documento un método para el tratamiento, la prevención, el retraso del inicio o la progresión del cáncer o el alivio de un síntoma asociado con el cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una composición como se describe de acuerdo con los aspectos y realizaciones anteriores. El polipéptido, en ciertas realizaciones, puede codificar un factor potenciador terapéutico, tal como una molécula inmunomoduladora u otros factores como se describió previamente.
- En otra realización de la invención, el ARNm comprende una pluralidad de secuencias codificantes, que pueden codificar polipéptidos iguales o diferentes.
- También se describe en el presente documento una construcción de vector de expresión de polinucleótidos que codifica la secuencia de ARNm descrita. Adecuadamente, el vector de expresión de polinucleótidos comprende un plásmido de ADN.
- En realizaciones de la invención, el sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano. El cáncer puede seleccionarse entre cáncer de hígado, cerebro, pulmón, mama o páncreas. El cáncer puede ser cáncer de hígado, que puede ser adecuadamente hepatocarcinoma o cáncer de hígado metastásico. El cáncer de hígado puede ser un cáncer primario, tal como un hepatocarcinoma o un hepatoblastoma, o un cáncer de hígado secundario/metastásico. El cáncer metastásico puede provenir de un tumor sólido primario conocido o desconocido. Los métodos pueden comprender adicionalmente la administración de una terapia o agente terapéutico al sujeto tal como quimioterapia, un virus oncolítico, radioterapia, un tratamiento biológico, un virus oncolítico, un fármaco de molécula pequeña, una terapia celular adoptiva (tal como la terapia celular CAR-T, terapia CAR-NK), y combinaciones de los mismos.
- En un aspecto de la invención, las composiciones y compuestos discutidos de acuerdo con los aspectos y realizaciones anteriores son para uso en medicina, adecuadamente para el tratamiento del cáncer. El cáncer puede ser cáncer de hígado, que puede ser adecuadamente un cáncer primario, tal como un hepatocarcinoma; un hepatoblastoma; un colangiocarcinoma; un angiosarcoma, o cáncer secundario/metastásico en el hígado.
- También se describe en el presente documento un procedimiento para fabricar una composición que comprende una pluralidad de partículas de suministro como se describe en el presente documento, comprendiendo el procedimiento:

- (i) proporcionar una composición de encapsulación;
 - (ii) proporcionar una solución que comprende una secuencia de ARNm, en donde la secuencia de ARNm es para expresar un polipéptido dentro de un órgano diana, comprendiendo la secuencia de ARNm:
 - al menos una secuencia codificante que codifica el polipéptido;
 - 5 al menos una secuencia de la primera región no traducida (UTR);
 - al menos una secuencia del sitio de unión de micro-ARN (miARN);
 - 10 en donde la secuencia del sitio de unión de miARN está ubicada dentro, inmediatamente 5' con respecto a o inmediatamente 3' con respecto a la primera secuencia UTR; y en donde la secuencia del sitio de unión de miARN permite la expresión diferencial de la secuencia codificante en diferentes tipos de células dentro del órgano diana;
 - (iii) combinar la composición de encapsulación con la solución que comprende la secuencia de ARNm para formar un complejo entre la composición de encapsulación y la secuencia de ARNm; y
 - (iv) dispersar el complejo de (iii) para crear una pluralidad de partículas de suministro.
- 15 Adecuadamente, la composición de encapsulación comprende un lípidoide de aminoalcohol, opcionalmente una solución etanólica que comprende lípidoides de aminoalcohol C12-200. Típicamente, la pluralidad de partículas de suministro comprende partículas de suministro que tienen un diámetro medio de al menos aproximadamente 1 nanómetro (nm), adecuadamente al menos aproximadamente 30 nm, opcionalmente al menos aproximadamente 50 nm y como máximo aproximadamente 150 nm.
- 20 También se describe en el presente documento un método para el tratamiento, la prevención, el retraso del inicio o la progresión del cáncer o el alivio de un síntoma asociado con el cáncer, comprendiendo el método proporcionar una composición como se describe de acuerdo con los aspectos y realizaciones anteriores, y administrar la composición combinada o simultáneamente con un virus oncolítico a un sujeto que lo necesita.
- 25 En una realización, la secuencia de ARNm codifica un agente terapéutico que aumenta la eficacia del virus oncolítico. El virus oncolítico puede haberse atenuado mediante la delección de uno o más genes de virulencia, y la secuencia de ARNm puede codificar uno o más genes de virulencia, o un equivalente de los mismos.
- 30 En algunas realizaciones, el virus oncolítico se selecciona entre cualquiera de los Grupos I - VII de la clasificación de virus de Baltimore. El virus oncolítico puede seleccionarse del grupo que comprende uno o más de: Virus de la Estomatitis Vesicular, Virus Maraba, Virus de la Polio, Reovirus, Virus del Sarampión, Virus de la Enfermedad de Newcastle, Virus Coxsackie A21, Parvovirus, Virus del Herpes Simple Tipo 1 y Adenovirus. En una realización, el virus oncolítico es un Virus del Herpes Simple y la secuencia de ARNm codifica US3 y puede comprender SEQ ID NO: 4. En otra realización, el virus oncolítico es un Virus del Herpes Simple y la secuencia de ARNm codifica ICP6, y puede comprender SEQ ID NO: 5.
- Dibujos**
- La invención se ilustra adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos en los que:
- 35 La Figura 1 muestra un esquema de un método de administración de una composición de ARNm encapsulado en lípidoide según una realización de la invención.
- La Figura 2 muestra un ejemplo de un método de clonación para producir vectores de síntesis de ADN, cuyos vectores se usaron para producir las construcciones de ARNm de acuerdo con las realizaciones de la invención.
- 40 La Figura 3 muestra tres variantes de construcciones de ARNm, ilustradas en la Figura 4, y posibles opciones para el punto de inserción de un par de secuencias de unión de miARN (aquí, secuencias que se unen a miR-122) dentro o junto a una secuencia UTR ubicada 3' con respecto a la secuencia codificante.
- La Figura 4 muestra ejemplos de plásmidos de ADN, plásmidos molde y vectores de síntesis para producir las construcciones de ARNm representadas en la Figura 3.
- 45 Las Figuras 5, 6 y 7 muestran ejemplos de métodos que pueden usarse para producir un vector de síntesis para producir las variantes de construcción de ARNm como se muestra en la Figura 3.
- La Figura 8 muestra las fórmulas químicas de ejemplos de compuestos constitutivos que se pueden usar en la preparación de partículas de suministro según una realización de la invención.
- La Figura 9A muestra un método de preparación de una nanoformulación de partículas de suministro que comprende ARNm según una realización de la invención.

La Figura 9B muestra la estructura de una sección transversal de una partícula de suministro que comprende ARNm de acuerdo con una realización de la invención y que comprende adicionalmente los compuestos constitutivos de encapsulación representados en la Figura 8.

5 La Figura 10A muestra imágenes de microscopía fluorescente que indican los resultados de un experimento en el que se transfecaron células de cultivo de hepatocitos humanos sanos (Human Plateable Hepatocytes, HCPP5), células de hepatocarcinoma humano (Hep3B) y hepatoblastoma humano (HepG2) *in vitro* con composiciones como se describe en el presente documento. Se administraron dos partículas de suministro: una que contenía un ARNm que codificaba la proteína fluorescente mcherry (ARNm-mCh-DMP^{CTx}) y uno que contenía un ARNm que codificaba la proteína fluorescente mcherry pero donde la expresión diferencial estaba controlada por el contenido de miARN-122 en las células diana (ARNm-mCh-122-DMP^{CTx}).

10 15 La Figura 10B muestra una cuantificación de la intensidad de fluorescencia después de 48 horas de células transfecadas según el experimento de la Figura 10A. Los resultados se muestran como medias ± DT. La significación estadística se determinó utilizando la prueba *t*. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de ARNm-mCherry, ARNm-mCherry-122 en células transfecadas (****p < 0,0001, ***p < 0,001).

20 25 La Figura 11 muestra un gráfico de los resultados de un experimento en el que se transfecaron hepatocitos humanos (HCPP5) varias veces (MPT) o individualmente (ST) con las partículas de suministro utilizadas en la Figura 10A. La expresión de mCherry está determinada por el nivel de intensidad de fluorescencia medido a las 24, 28, 72, 96 y 144 horas después de la transfección. Los resultados se muestran como medias ± DT. La significación estadística se determinó utilizando la prueba *t*. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de ARNm-mCherry, ARNm-mCherry-122 en células transfecadas (*p < 0,01, **p < 0,05).

30 35 La Figura 12A muestra imágenes de microscopía fluorescente que indican los resultados de un experimento en el que se transfecaron hepatocitos de ratones sanos (línea celular AML12) *in vitro* con las partículas de suministro utilizadas en la Figura 10A con los niveles de expresión relativos de mCherry mostrados 24 horas después de la transfección.

40 45 La Figura 12B muestra un gráfico que proporciona la cuantificación de la intensidad de fluorescencia como % de píxeles contados para los resultados de la Figura 12A, así como un punto de tiempo posterior a la transfección de 72 horas.

50 55 La Figura 13 muestra los resultados de una transferencia Western en dos experimentos (indicados como Ronda 1 y Ronda 2) en los que células de hepatocitos humanos (HCPP5), hepatoblastoma humano (HepG2) y hepatocarcinoma humano (Hep3B) se transfecaron con una composición como se describe en el presente documento que comprendía un ARNm que codificaba un polipéptido humano ilustrativo de 25 kDa de masa molecular bajo control de expresión diferencial de miARN.

La Figura 14 muestra el efecto de la variante R7041 del Virus del Herpes Simple sobre la viabilidad de células humanas de un modelo de hepatocarcinoma (Hep3B) y hepatoblastoma (HepG2). Se muestran los efectos de la aplicación viral sobre la viabilidad celular relativa.

40 45 La Figura 15 muestra un cronograma para un experimento *in vitro* en el que se trataron células humanas de un modelo de hepatocarcinoma con una composición y un método como se describe en el presente documento y a continuación, se probaron mediante un ensayo colorimétrico MTS.

Las Figuras 16A y 16B muestran los resultados de experimentos *in vitro* en los que se trataron células humanas de un modelo de hepatoblastoma (Figura 16 A) y hepatocarcinoma (Figura 16 B) con virus solo o combinado con una composición como se describe en el presente documento siguiendo el cronograma de la Figura 15. La composición es una partícula de suministro que comprende ARNm que codifica US3 (ARNm US3 DMP^{CTx}). Se muestran los efectos de los tratamientos sobre la viabilidad celular.

50 55 Las Figuras 17A y 17B muestran los resultados de experimentos *in vivo* utilizando un modelo de ratón de hepatocarcinoma humano. La Figura 17A muestra el crecimiento del tumor (las células Hep3B están marcadas con luciferasa). La Figura 17B muestra imágenes de microscopía de fluorescencia del hígado de un ratón sano utilizando ARNm que codifica mCherry; no se detectó fluorescencia cuando se utilizó la composición mCherry-DMP^{CTx}-miARN122.

La Figura 18 muestra el resultado de una micrografía inmunohistoquímica de un experimento *in vivo* usando el mismo modelo de ratón que se muestra en la Figura 17A. Se administra una partícula de suministro que comprende ARNm que codifica US3 (ARNm US3 DMP^{CTx} miARN-122) a través de la vena de la cola y proporciona una expresión diferencial entre los hepatocitos no enfermos y el tejido hepático tumoral, como lo demuestra la tinción más oscura de la proteína US3 en el tejido tumoral. El límite entre el tejido tumoral y el tejido no enfermo se muestra con una línea discontinua.

Descripción detallada

A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención emplea mecanismos convencionales de química, biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante y métodos químicos, que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Tales mecanismos también se explican en la bibliografía, por ejemplo,

- 5 MR Green, J. Sambrook, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, cuarta edición, libros 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (1995 y suplementos periódicos; Current Protocols in Molecular Biology, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques , John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridisation: Principles and Practice, Oxford University Press; MJ Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide 10 Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press.

Antes de exponer la invención, se proporcionan una serie de definiciones que ayudarán en la comprensión de la invención. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta 15 invención.

Como se emplea en el presente documento, el término "que comprende" significa que cualquiera de los elementos enumerados está necesariamente incluido y, opcionalmente, también pueden incluirse otros elementos. "Que consiste esencialmente en" significa que todos los elementos enumerados están necesariamente incluidos, los elementos que afectarían materialmente las características básicas y novedosas de los elementos enumerados están excluidos, y otros elementos pueden incluirse opcionalmente. "Que consiste en" significa que se excluyen todos los elementos distintos de los enumerados. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos están dentro del alcance de esta invención.

El término "aislado", cuando se aplica a una secuencia de polinucleótidos, indica que la secuencia ha sido retirada de su organismo natural de origen y, por lo tanto, está libre de secuencias codificantes o reguladoras foráneas o no deseadas.

25 La secuencia aislada es adecuada para su uso en procedimientos de ADN recombinante y dentro de sistemas de síntesis de proteínas modificadas genéticamente. Tales secuencias aisladas incluyen ADNc, ARNm y clones genómicos. Las secuencias aisladas pueden estar limitadas a una secuencia codificante de proteína solamente, o también pueden incluir secuencias reguladoras 5' y 3' tales como promotores y terminadores transcripcionales. Antes de seguir exponiendo la invención, se proporcionan una serie de definiciones que ayudarán a la comprensión de la invención.

30 Un "polinucleótido" es una secuencia de nucleótidos conectada covalentemente de hebra sencilla o doble en la que los extremos 3' y 5' de cada nucleótido están unidos por enlaces fosfodiéster. El polinucleótido puede estar formado por bases de desoxirribonucleótidos o bases de ribonucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ADN y ARN, y pueden fabricarse sintéticamente in vitro o aislarse de fuentes naturales. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan típicamente como el número de pares de bases (pb) para los polinucleótidos de doble hebra o, en el caso de los

35 polinucleótidos de una sola hebra, como el número de nucleótidos (nt). Mil pb o nt equivalen a una kilobase (kb). Los polinucleótidos de menos de alrededor de 40 nucleótidos de longitud se denominan típicamente "oligonucleótidos". El término "secuencia de ácido nucleico" como se emplea en el presente documento, es una secuencia de nucleótidos conectada covalentemente de hebra sencilla o doble en la que los extremos 3' y 5' de cada nucleótido están unidos por enlaces fosfodiéster. El polinucleótido puede estar formado por bases de desoxirribonucleótidos o bases de

40 ribonucleótidos. Las secuencias de ácido nucleico pueden incluir ADN y ARN, y pueden fabricarse sintéticamente in vitro o aislarse de fuentes naturales. Los tamaños de las secuencias de ácidos nucleicos, también denominados en el presente documento "polinucleótidos", se expresan típicamente como el número de pares de bases (pb) para polinucleótidos de doble hebra o, en el caso de polinucleótidos de hebra sencilla, como el número de nucleótidos (nt). Mil pb o nt equivalen a una kilobase (kb). Los polinucleótidos de menos de alrededor de 40 nucleótidos de longitud se

45 denominan típicamente "oligonucleótidos" y pueden comprender cebadores para su uso en la manipulación de ADN, por ejemplo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El término "ácido nucleico" como se emplea en el presente documento, es una secuencia de nucleótidos conectada covalentemente de hebra sencilla o doble en la que los extremos 3' y 5' de cada nucleótido están unidos por enlaces fosfodiéster. El polinucleótido puede estar formado por bases de desoxirribonucleótidos o bases de ribonucleótidos.

50 Los ácidos nucleicos pueden incluir ADN y ARN, y pueden fabricarse sintéticamente in vitro o aislarse de fuentes naturales. Los ácidos nucleicos pueden incluir adicionalmente ADN o ARN modificado, por ejemplo, ADN o ARN que se ha metilado, o ARN que se ha sometido a una modificación postraduccional, por ejemplo, protección terminal en 5' con 7-metilguanosina, procesamiento en 3' como escisión y poliadenilación, y corte y empalme. Los ácidos nucleicos también pueden incluir ácidos nucleicos sintéticos (XNA), tales como ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de ciclohexeno (CeNA), ácido nucleico de treosa (TNA), ácido nucleico de glicerol (GNA), ácido nucleico bloqueado (LNA) y ácido peptidónucleico (PNA). Los tamaños de los ácidos nucleicos, también denominados en el presente documento "polinucleótidos", se expresan típicamente como el número de pares de bases (pb) para polinucleótidos de doble hebra, o en el caso de polinucleótidos de hebra sencilla como el número de nucleótidos (nt). Mil pb o nt equivalen a una kilobase (kb). Los polinucleótidos de menos de alrededor de 100 nucleótidos de longitud se denominan normalmente "oligonucleótidos" y pueden comprender cebadores para su uso en la manipulación de ADN, por ejemplo a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En realizaciones específicas de la presente invención, la

secuencia de ácido nucleico comprende ARN mensajero (ARNm).

De acuerdo con la presente invención, la homología con las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento no se limita simplemente a 100% de identidad de secuencia. Muchas secuencias de ácidos nucleicos pueden demostrar equivalencia bioquímica entre sí a pesar de tener una identidad de secuencia aparentemente baja.

5 En la presente invención, se considera que las secuencias de ácido nucleico homólogas son aquellas que hibridarán entre sí en condiciones de baja rigurosidad (Sambrook J. et al, más arriba).

El término 'conectado operativamente', cuando se aplica a secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, en una construcción de expresión, indica que las secuencias están dispuestas de manera que funcionen de forma cooperativa para lograr los fines previstos. A modo de ejemplo, en un vector de ADN, una secuencia promotora permite el inicio 10 de la transcripción que prosigue a través de una secuencia codificante conectada hasta una secuencia de terminación. En el caso de las secuencias de ARN, una o más regiones no traducidas (UTR) pueden disponerse con relación a una secuencia codificante de proteína conectada denominada marco de lectura abierto (ORF). Un ARNm dado puede comprender más de un ORF, el llamado ARN policistrónico. Una UTR puede estar ubicada 5' o 3' con relación a un 15 ORF de secuencia codificante conectada operativamente. Las UTR pueden comprender secuencias que típicamente se encuentran en secuencias de ARNm que se encuentran en la naturaleza, tales como secuencias consenso de Kozak, codones de iniciación, elementos reguladores que actúan en cis, colas poli-A, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), estructuras que regulan la longevidad del ARNm, secuencias que dirigen la localización del ARNm, y así sucesivamente. Un ARNm puede comprender múltiples UTR que son iguales o diferentes.

20 El término "que expresa un polipéptido" en el contexto de la presente invención se refiere a la producción de un polipéptido codificado por las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento. Típicamente, esto implica la traducción de la secuencia de ARNm proporcionada por la maquinaria ribosomal de la célula a la que se suministra la secuencia.

25 El término "partícula de suministro", como se emplea en el presente documento, se refiere a partículas que pueden comprender componentes terapéuticos mediante encapsulación, mantenimiento dentro de una matriz, formación de complejos o por otros medios, y suministran un componente terapéutico tal como una secuencia de ácido nucleico codificante a una célula diana. Las partículas de suministro pueden estar a microescala, pero en realizaciones específicas pueden estar normalmente a nanoescala, es decir, nanopartículas. Las nanopartículas tienen típicamente un tamaño de al menos 50 nm (nanómetros), adecuadamente al menos aproximadamente 100 nm y típicamente como máximo 150 nm, 200 nm, aunque opcionalmente hasta 300 nm de diámetro. En una realización de la invención, las nanopartículas tienen un diámetro medio de aproximadamente al menos 60 nm. Una ventaja de estos tamaños es que esto significa que las partículas están por debajo del umbral para la aclaramiento del sistema reticuloendotelial (sistema de fagocitos mononucleares), es decir, la partícula es lo suficientemente pequeña como para no ser destruida 30 por las células fagocíticas como parte del mecanismo de defensa del organismo. Esto facilita el uso de vías de suministro intravenoso para las composiciones de la invención.

35 Las posibilidades alternativas para la composición de las nanopartículas incluyen ácido poliláctico (PLA), ácido polí(láctico-co-glicólico) (PLGA), partículas basadas en lípidos o fosfolípidos tales como liposomas; partículas basadas en proteínas y/o glicoproteínas tales como colágeno, albúmina, gelatina, elastina, gliadina, queratina, legumina, zeína, proteínas de soya, proteínas de leche tales como caseína, y otras (Lohcharoenkal et al. BioMed Research Internacional; Volumen 2014 (2014)); y partículas basadas en metales o compuestos metálicos tales como óxidos de 40 oro, plata, aluminio, cobre, etc.

En particular, se han investigado polímeros que comprenden polietilenimina (PEI) para el suministro de ácidos nucleicos. También se ha demostrado que los vectores de nanopartículas compuestos por poli(β-aminoésteres) (PBAE) son adecuados para el suministro de ácidos nucleicos, especialmente en formulación conjunta con polietilenglicol (PEG) (Kaczmarek JC et al., Angew Chem Int Ed Engl. 2016; 55(44): 13808-13812). Se han usado 45 partículas de tales formulaciones conjuntas para suministrar ARNm al pulmón.

También se consideran partículas basadas en polisacáridos y sus derivados, tales como celulosa, quitina y quitosano. El quitosano es un polisacárido lineal catiónico obtenido por desacetilación parcial de la quitina, las nanopartículas que componen esta sustancia poseen propiedades prometedoras para el suministro de fármacos, tales como biocompatibilidad, baja toxicidad y tamaño pequeño. Felt et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, Volumen 50 24, 1998 - Número 11). Se prevé que puedan usarse combinaciones entre los constituyentes anteriores.

Los documentos US2010/0331234, US2011/0293703 y US2015/0203439 describen la producción de lipidoides de aminoalcohol al hacer reaccionar una amina con un compuesto terminado en epóxido. Con estos lipidoides se pueden preparar complejos, micelas, liposomas y partículas, incluidas nanopartículas, y su estructura química los hace particularmente adecuados para suministro de una "carga", - p. ej., ácidos nucleicos tales como ARNm codificante - a tipos de células diana dentro del organismo de un sujeto humano o animal. Las plataformas de suministro que comprenden compuestos lipidoides de aminoalcohol son particularmente adecuadas para su uso en el suministro de moléculas de carga de carga negativa neta dadas las aminas terciarias disponibles para la protonación formando así un radical catiónico. Por ejemplo, los compuestos lipidoides de aminoalcohol se pueden usar en la preparación de composiciones en partículas para el suministro de ADN, ARN u otras cargas de polinucleótidos a un sujeto o a una célula 55

o tejido diana. Las partículas adecuadas pueden estar en forma de micropartículas, nanopartículas, liposomas o micelas.

Las partículas de suministro basadas en lipidoides de aminoalcohol poseen aminas terciarias que están disponibles para interactuar con una carga de polinucleótidos, tal como un ARNm codificante. Los polinucleótidos, o derivados de los mismos, se ponen en contacto con los compuestos lipidoides de aminoalcohol en condiciones adecuadas para formar complejos de polinucleótido/lipidoide. El lipidoide está preferiblemente al menos parcialmente protonado para formar un complejo con el polinucleótido cargado negativamente. De esta forma, los complejos de polinucleótido/lipidoide forman partículas que son útiles en el suministro de polinucleótidos de carga a células y tejidos. En ciertas realizaciones, se pueden asociar múltiples moléculas lipidoides de aminoalcohol con una molécula de polinucleótido. El complejo puede incluir al menos 1, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, o adecuadamente al menos 100 moléculas lipidoides de aminoalcohol. El complejo puede incluir como máximo 10.000, como máximo 5.000, como máximo 2.000, como máximo 1.000, como máximo 500, o típicamente como máximo 100 moléculas lipidoides de aminoalcohol.

Los expertos en la técnica apreciarán que una población de partículas sigue los principios de distribución del tamaño de las partículas. Los métodos ampliamente utilizados y reconocidos en la técnica para describir las distribuciones de tamaño de partículas incluyen, por ejemplo, diámetros promedio y valores D, tales como el valor D50, que se usa comúnmente para representar el diámetro medio del rango de tamaños de partícula de una muestra determinada. En ciertas realizaciones, el diámetro de las partículas de las nanopartículas oscila entre 10 y 500 nm, más adecuadamente el diámetro de las partículas oscila entre 10 y 1.200 nm y, en particular, entre 50 y 150 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen diámetros promedio de al menos aproximadamente 10 nm, adecuadamente al menos aproximadamente 30 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen diámetros promedio inferiores a aproximadamente 150 nm de diámetro promedio y superiores a 50 nm de promedio.

Las partículas pueden asociarse adicionalmente con un agente de direccionamiento para facilitar la unión de la partícula de suministro a un tipo de célula diana. El término "dirigido" como se emplea en el presente documento se refiere a un objeto, o composición tal como una partícula de suministro, que están destinados a asociarse con, y facilitar la transfección de células dentro de un órgano, tejido o tipo de célula particular dentro del organismo. En una realización particular, una partícula de suministro, tal como una nanopartícula de suministro, puede dirigirse para suministrar su carga solo a un determinado órgano, tejido o tipo de célula. El direccionamiento puede ser geográfico, por ejemplo mediante suministro del objeto dirigido directamente a un tejido particular, o puede estar mediado químicamente, a través de agentes de direccionamiento o radicales de unión que se asocian preferentemente con células o tejidos diana.

Se conoce en la técnica una variedad de agentes de direccionamiento que dirigen composiciones farmacéuticas a células particulares (véanse, por ejemplo, Cotten et al. Methods Enzym. 217:618, 1993; Wagner et al. Advanced Drug Delivery Reviews, volumen 14, Número 1, abril-mayo de 1994, 113-135; Fiume et al. Advanced Drug Delivery Reviews, volumen 14, Número 1, abril-mayo de 1994, 51-65). Los agentes de direccionamiento pueden estar incluidos en toda la partícula o pueden estar localizados solo en la superficie. El agente de direccionamiento puede ser una proteína, péptido, carbohidrato, glicoproteína, lípido, molécula pequeña, ácidos nucleicos, etc. El agente de direccionamiento puede usarse para dirigirse a células o tejidos específicos o puede usarse para promover la endocitosis o la fagocitosis de la partícula. Los ejemplos de agentes de direccionamiento incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL), transferrina, asialoglicoproteínas, proteína de la cubierta gp120 del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), carbohidratos, ligandos de receptores, ácido siálico, aptámeros, etc. Si el agente de direccionamiento se distribuye por toda la partícula, el agente de direccionamiento puede incluirse en la mezcla o material compuesto que se usa para formar las partículas. Si el agente de direccionamiento solo se encuentra en la superficie, el agente de direccionamiento se puede asociar con las partículas formadas utilizando técnicas químicas convencionales, p. ej., por unión covalente, hidrófoba, enlace de hidrógeno, van der Waals, conexión biotina-avidina u otras interacciones.

Las composiciones de partículas de ciertas realizaciones de la invención pueden administrar adecuadamente la carga de ARNm encapsulado durante un período de tiempo que puede controlarse mediante la elección o formulación particular del polímero no tóxico biodegradable encapsulante o material biocompatible. Por ejemplo, las composiciones en partículas pueden liberar la carga de ARNm encapsulado durante al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 6 horas, al menos 12 horas o al menos 1 día. Las composiciones de partículas pueden liberar la carga de ARNm encapsulado durante un máximo de 2 días, un máximo de 3 días o un máximo de 7 días.

El término "enfermo" como se emplea en el presente documento, como en "células enfermas" y/o "tejido enfermo" indica tejidos y órganos (o partes de los mismos) y células que exhiben una patología aberrante, no saludable o de enfermedad. Por ejemplo, las células enfermas pueden infectarse con un virus, una bacteria, un prion o un parásito eucariótico; pueden comprender mutaciones perjudiciales; y/o pueden ser cancerosas, precancerosas, tumorales o neoplásicas. Las células enfermas pueden comprender un entorno de miARN intracelular alterado en comparación con las células normales o las denominadas sanas. En ciertos casos, las células enfermas pueden ser patológicamente normales, pero comprenden un entorno de miARN intracelular alterado que representa un estado precursor de la enfermedad. Los tejidos enfermos pueden comprender tejidos sanos que han sido infiltrados por células enfermas de otro órgano o sistema de órganos. A modo de ejemplo, muchas enfermedades inflamatorias comprenden patologías en las que los órganos sanos se someten a la infiltración de células inmunitarias tales como células T y neutrófilos. A

modo de ejemplo adicional, los órganos y tejidos sujetos a lesiones estenóticas o cirróticas pueden comprender tanto células sanas como enfermas en estrecha proximidad.

El término "cáncer" como se emplea en el presente documento se refiere a neoplasias en el tejido, incluidos los tumores malignos que pueden ser un cáncer primario que comienza en un tejido particular o un cáncer secundario que se ha diseminado por metástasis desde otro lugar. Los términos cáncer, neoplasia y tumores malignos se utilizan en el presente documento de forma indistinta. El cáncer puede denotar un tejido o una célula ubicados dentro de una neoplasia o con propiedades asociadas con una neoplasia. Las neoplasias típicamente poseen características que las diferencian del tejido normal y de las células normales. Entre tales características se incluyen, pero no se limitan a: un grado de anaplasia, cambios en la morfología, irregularidad de la forma, reducción de la adhesividad celular, capacidad de metástasis y aumento de la proliferación celular. Los términos relacionados y a menudo sinónimos de "cáncer" incluyen sarcoma, carcinoma, tumor maligno, epiteloma, leucemia, linfoma, transformación, neoplasia y similares. Como se emplea en el presente documento, el término "cáncer" incluye tumores premalignos y/o precancerosos, así como cánceres malignos.

El término "sano" como se emplea en el presente documento, como en "células sanas" y/o "tejido sano" indica tejidos y órganos (o partes de los mismos) y células que no están enfermos y se aproximan a un fenotipo de funcionamiento normal típico. Puede apreciarse que en el contexto de la invención el término "sano" es relativo, ya que, por ejemplo, las células no neoplásicas en un tejido afectado por tumores bien pueden no ser completamente sanas en un sentido absoluto. Por lo tanto, "células no sanas" se utiliza para referirse a células que no son en sí mismas neoplásicas, cancerosas o precancerosas, pero que pueden estar cirróticas, inflamadas o infectadas, o enfermas de otro modo, por ejemplo. Del mismo modo, 'tejido sano o no sano' se utiliza para significar tejido, o partes del mismo, sin tumores, células neoplásicas, cancerosas o precancerosas; u otras enfermedades como las mencionadas anteriormente; independientemente de la salud general. Por ejemplo, en el contexto de un órgano que comprende tejido canceroso y fibrótico, las células comprendidas dentro del tejido fibrótico pueden considerarse relativamente "sanas" en comparación con el tejido canceroso.

En una realización alternativa, el estado de salud de una célula, tipo de célula, tejido y/u órgano se determina mediante la cuantificación de la expresión del miARN. En ciertos tipos de enfermedades, tales como el cáncer, la expresión de especies particulares de miARN se ve afectada y puede regularse por incremento o disminución en comparación con las células no afectadas. Esta diferencia en el transcriptoma de miARN se puede utilizar para identificar estados de salud relativos y/o para rastrear la progresión de células sanas, tipos de células, tejidos y/u órganos hacia un estado patológico. El estado patológico puede incluir las diversas etapas de transformación en una célula neoplásica. En realizaciones de la presente invención, las variaciones diferenciales en el transcriptoma de miARN de los tipos de células comprendidos dentro de un órgano o sistema de órganos determinados se aprovechan para controlar la expresión de proteínas en los diferentes tipos de células.

Como se emplea en el presente documento, el término "órgano" es sinónimo de un "sistema de órganos" y se refiere a una combinación de tejidos y/o tipos de células que pueden compartimentarse dentro del organismo de un sujeto para proporcionar una función biológica, tal como una fisiológica, función anatómica, homeostática o endocrina. Adecuadamente, los órganos o sistemas de órganos pueden significar un órgano interno vascularizado, tal como un hígado o un páncreas. Típicamente, los órganos comprenden al menos dos tipos de tejido y/o una pluralidad de tipos de células que exhiben un fenotipo característico del órgano.

El término "virus terapéutico" como se emplea en el presente documento se refiere a un virus que es capaz de infectar y destruir células cancerosas, a veces por lisis viral directa (oncólisis), pero también incluye destrucción indirecta por estimulación de respuestas antitumorales del anfitrión. Los virus oncolíticos se caracterizan frecuentemente por tener una mayor actividad en las células enfermas, incluidas las células cancerosas, en comparación con las células sanas.

Los ejemplos de virus oncolíticos incluyen los proporcionados en la Tabla 1 y los subtipos de los mismos.

45

Tabla 1

Virus oncolítico	Tipo
Virus de la Estomatitis Vesicular	ARN con envoltura
Virus Maraba	Rabdovirus con envoltura
Virus de la Polio	ARN sin envoltura
Reovirus	ARN sin envoltura
Virus del Sarampión	ARN con envoltura
Virus de la Enfermedad de Newcastle	ARN con envoltura
Virus Coxsackie A21	ARN sin envoltura
Parvovirus	ADN sin envoltura

Virus oncolítico	Tipo
Virus del Herpes Simple Tipo 1	ADN con envoltura
Adenovirus	ADN sin envoltura

En realizaciones de la invención, los virus pueden seleccionarse entre uno cualquiera de los Grupos I - VII de la clasificación de virus de Baltimore (Baltimore D (1971). "Expression of animal virus genomes". Bacteriol Rev. 35 (3): 235-41). En realizaciones específicas de la invención, los virus adecuados pueden seleccionarse del Grupo I de Baltimore, que se caracterizan por tener genomas virales de ADN de doble hebra; Grupo IV, que tienen genomas de ARN positivo de hebra sencilla; y el Grupo V, que tienen genomas de ARN negativos de hebra sencilla.

Los términos "gen de virulencia" o "factor de virulencia", como se emplean en el presente documento, se refieren a un gen o producto génico que ayudan a la replicación de un virus terapéutico tal como un virus oncolítico o a la lisis de las células que infecta. El término "factor de replicación" se emplea en el presente documento como sinónimo. Los factores de virulencia típicamente pueden ser genes virales codificados por el genoma viral. Los factores de virulencia pueden estar involucrados en funciones tales como la supresión y evasión del sistema inmunitario intracelular, la replicación del genoma viral, la propagación o transmisión de viriones, la producción o ensamblaje de proteínas estructurales de la cubierta, la activación de virus en estado latente, la prevención de la latencia viral, y la toma de control de los procedimientos de la célula anfitriona. Varios factores de virulencia tienen equivalentes celulares o de otro tipo que pueden compensar la función de estos genes si faltan en el genoma del virus. Algunos virus pueden modificarse con genes de virulencia exógenos que aumentan su capacidad para replicarse, lisar células y propagarse.

En realizaciones específicas de la presente invención, las composiciones potencian o mantienen la potencia oncolítica de un virus en un tumor ubicado dentro de un órgano a través de la expresión diferencial de la proteína o polipéptido que potencian la replicación del virión preferentemente en el tumor. En realizaciones adicionales de la invención, las composiciones pueden codificar un producto génico que controla la interacción entre las células inmunitarias del anfitrión y el virus oncolítico dentro de un tumor. En otra realización más, las composiciones de la invención se pueden usar para producir productos génicos que modulan patrones diferenciales de actividad de virus oncolíticos, así como la expresión de moléculas coestimuladoras inmunitarias que se administran a través del virión, de forma exógena o a través de una partícula de suministro de la invención.

El término "polipéptido" como se emplea en el presente documento es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos de forma natural o in vitro por medios sintéticos. Los polipéptidos de menos de alrededor de 12 restos de aminoácidos de longitud se denominan típicamente "péptidos" y los que tienen entre aproximadamente 12 y aproximadamente 30 restos de aminoácidos de longitud pueden denominarse "oligopéptidos". El término "polipéptido", como se emplea en el presente documento, indica el producto de un polipéptido, una forma precursora o una proproteína de origen natural. Los polipéptidos también pueden sufrir procedimientos de maduración o modificación postraduccional que pueden incluir, entre otros: glicosilación, escisión proteolítica, lipidización, escisión de péptido señal, escisión de propéptido, fosforilación y similares. El término "proteína" se emplea en el presente documento para referirse a una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas.

El término "producto génico", como se emplea en el presente documento, se refiere al producto de la secuencia codificante u ORF comprendido dentro de una construcción de ARNm como se describe en el presente documento. El producto génico puede comprender un polipéptido o una proteína. Una construcción de ARNm policistrónico puede dar como resultado la producción de múltiples productos génicos.

El suministro de ARNm directamente a las células permite la traducción directa y controlable de los productos génicos deseados, tales como polipéptidos y/o proteínas en las células. La provisión de ARNm permite específicamente no solo el uso de mecanismos de modulación de la expresión celular, tales como el control mediado por miARN (como se detalla en las realizaciones específicas a continuación), sino que también representa un suministro finito y agotable del producto, en lugar del cambio potencialmente permanente en el transcriptoma de una célula diana que podría proporcionar un vector de ADN episomal o insertado genómicamente.

En realizaciones de la presente invención, se proporciona una secuencia de ARNm que comprende una secuencia que codifica al menos un polipéptido en combinación operativa con una o más regiones no traducidas (UTR) que pueden conferir especificidad tisular y estabilidad a la secuencia de ácido nucleico como un todo. Por "especificidad de tejido" se entiende que la traducción del producto proteico codificado por el ARNm se modula según la presencia de la UTR. La modulación puede incluir permitir, reducir o incluso bloquear la traducción detectable del ARNm a un producto proteico. Las UTR se pueden conectar directamente al ARNm en cis, es decir, en la misma hebra de polinucleótido. En una realización alternativa, se proporciona una primera secuencia que codifica un producto génico y una segunda secuencia adicional, que hibrida con una parte de la primera secuencia, que comprende una o más UTR que confieren especificidad de tejido a la secuencia de ácido nucleico como un todo. En esta última realización, la UTR está conectada operativamente a la secuencia que codifica el producto génico en trans.

De acuerdo con realizaciones específicas de la invención, se proporciona un ARNm que comprende tales secuencias de ácido nucleico conectadas operativamente al mismo según sea necesario para prevenir o reducir la expresión de

un producto génico en tejido hepático no enfermo, p. ej., en hepatocitos sanos. Como tal, se proporciona una construcción de ARNm, o transcripto, que comprende una protección terminal en 5' y las UTR necesarias para el reclutamiento ribosomal y la expresión específica de tejido (típicamente, pero no exclusivamente, posicionados en 3' con respecto al ORF), así como codones de inicio y parada que respectivamente definen el ORF. Cuando la construcción se introduce en un hígado no enfermo, se previene o reduce la expresión del producto génico. Por el contrario, las células neoplásicas comprendidas en el hígado típicamente no se ajustan a los patrones de expresión normales de las células hepáticas no enfermas, ya que poseen un transcriptoma de miARN bastante diferente. El producto del gen se traduce específicamente en estas células cancerosas, pero no en los hepatocitos sanos vecinos. El suministro de la construcción de ARNm al tejido hepático puede lograrse a través de una plataforma de suministro de partículas como se describe en el presente documento. La expresión específica del tipo de célula puede estar mediada por mecanismos de modulación de microARN tales como los que se describen con más detalle a continuación.

Un "componente terapéutico" o un "agente terapéutico" como se definen en el presente documento se refieren a una molécula, sustancia, célula u organismo que, cuando se administra a un individuo humano u otro animal como parte de una intervención terapéutica, contribuye a un efecto terapéutico sobre ese individuo humano u otro animal. El efecto terapéutico puede ser causado por el propio componente terapéutico o por otro componente de la intervención terapéutica. El componente terapéutico puede ser un componente de ácido nucleico codificante, en particular un ARNm. El componente de ácido nucleico codificante puede codificar un factor potenciador terapéutico, como se define a continuación. Un componente terapéutico también puede comprender un fármaco, opcionalmente un fármaco quimioterapéutico tal como una molécula pequeña o un anticuerpo monoclonal (o un fragmento del mismo). En algunas realizaciones, un componente terapéutico puede comprender una célula, tal como una célula efectora inmunitaria modificada de forma recombinante, p. ej., una célula CAR-T. En otras realizaciones de la invención, el agente terapéutico comprende un virus terapéutico, tal como un virus oncolítico o un vector viral.

El término "efecto terapéutico" se refiere a un efecto local o sistémico en un sujeto animal, típicamente un ser humano, causado por un agente farmacológico o terapéuticamente activo que comprende una sustancia, molécula, composición, célula u organismo que se ha administrado al sujeto, y el término "intervención terapéutica" se refiere a la administración de tal sustancia, molécula, composición, célula u organismo. Por tanto, el término significa cualquier agente destinado a ser utilizado en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades o en la mejora del desarrollo y las condiciones físicas o mentales deseables en un sujeto animal o humano. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de tal agente que produce un efecto local o sistémico deseado en una proporción razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento. En determinadas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente dependerá de su índice terapéutico, solubilidad y similares. Por ejemplo, ciertos agentes terapéuticos de la presente invención pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a tal tratamiento. En el contexto específico del tratamiento del cáncer, un "efecto terapéutico" puede manifestarse por varios medios, incluidos, pero sin limitarse a, una disminución del volumen del tumor sólido, una disminución del número de células cancerosas, una disminución del número de metástasis observado, un aumento en la esperanza de vida, disminución en la proliferación de células cancerosas, disminución en la supervivencia de células cancerosas, una disminución en la expresión de marcadores de células tumorales y/o mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa.

En una realización, el sujeto al que se administra la terapia es un mamífero (p. ej., ratón, rata, primate, mamífero no humano, animal doméstico o ganado, tal como perro, gato, vaca, caballo, oveja, cabra y similares), y es adecuadamente un ser humano. En una realización adicional, el sujeto es un modelo animal de cáncer. Por ejemplo, el modelo animal puede ser un modelo animal de xenoinjerto ortotópico de un cáncer de origen humano, adecuadamente cáncer de hígado.

En una realización específica de los métodos de la presente invención, el sujeto aún no se ha sometido a un tratamiento terapéutico, tal como terapia viral terapéutica, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida y/o terapia anti-punto de control inmunitario. En otra realización más, el sujeto ha sufrido un tratamiento terapéutico, tal como las terapias mencionadas anteriormente.

En realizaciones adicionales, el sujeto se ha sometido a cirugía para extirpar tejido canceroso o precanceroso. En otras realizaciones, el tejido canceroso no se ha eliminado, por ejemplo, el tejido canceroso puede estar ubicado en una región inoperable del cuerpo, tal como en un tejido que si se somete a una intervención quirúrgica puede comprometer la vida del sujeto, o en una región donde un procedimiento quirúrgico causaría un riesgo considerable de daño permanente.

En algunas realizaciones, el ARNm proporcionado puede codificar un "factor potenciador terapéutico". De acuerdo con la presente invención, los factores potenciadores terapéuticos son productos génicos o polipéptidos que pueden potenciar o facilitar la capacidad de otro agente terapéutico administrado conjuntamente para ejercer un efecto terapéutico sobre una célula diana, adecuadamente la célula diana. Cuando se introduce en la célula diana o en sus proximidades, la expresión del factor potenciador terapéutico puede cooperar con un agente terapéutico administrado conjuntamente, permitiendo o potenciando así la actividad terapéutica del agente. En algunas realizaciones, el factor potenciador terapéutico puede potenciar la capacidad de un virus oncolítico administrado conjuntamente para lisar células cancerosas. En otras realizaciones de la invención, el factor potenciador terapéutico puede efectuar una alteración de un microambiente tumoral para ayudar o reclutar la propia respuesta inmunitaria del sujeto. En esta

última realización, la alteración del microambiente tumoral puede ayudar a la administración conjunta de un virus oncolítico o un CAR-T u otra terapia basada en células adoptivas. En algunas realizaciones, el factor potenciador terapéutico puede permitir la conversión de un profármaco en una forma activa.

- 5 Se pueden combinar múltiples factores potenciadores terapéuticos en composiciones según realizaciones específicas de la presente invención. En tales realizaciones, las secuencias codificantes para cada factor potenciador terapéutico pueden estar presentes en moléculas de ARNm separadas. En algunas realizaciones, las secuencias para más de un factor potenciador terapéutico pueden estar presentes en la misma molécula de ARNm. En tales casos, la molécula de ARNm policistrónico comprende adicionalmente las secuencias necesarias para la expresión de todas las secuencias codificadas, tales como los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES).
- 10 En realizaciones donde múltiples moléculas de ARNm diferentes están comprendidas en una o más partículas de suministro, se contempla que cada partícula de suministro pueda comprender uno o más de un tipo de molécula de ARNm; es decir, no todas las partículas de suministro en una realización particular comprenderán necesariamente todas las moléculas de ARNm proporcionadas en dicha realización.
- 15 Las construcciones de ARNm de ciertas realizaciones de la invención pueden sintetizarse a partir de una construcción de expresión de polinucleótidos, que puede ser, por ejemplo, un plásmido de ADN. Esta construcción de expresión puede comprender cualquier secuencia promotora necesaria para el inicio de la transcripción y una secuencia de terminación correspondiente, de modo que pueda ocurrir la transcripción de la construcción de ARNm.
- El producto génico codificado por el ARNm suele ser un péptido, un polipéptido o una proteína. Cuando una proteína particular consta de más de una subunidad, el ARNm puede codificar una o más de una subunidad.
- 20 El producto génico codificado por el ARNm puede ser de cualquier tipo adecuado para producir un efecto terapéutico. En el contexto del tratamiento del cáncer, el producto génico codificado por el ARNm puede incluir adecuadamente genes que, cuando son expresados por una célula cancerosa, provocan o ayudan a la destrucción de la célula cancerosa.
- 25 Las construcciones de la invención pueden proporcionar genes supresores de tumores tales como p53. p53 juega un papel en los procedimientos celulares, incluida la apoptosis y la estabilidad genómica. Está involucrado en la activación del procedimiento de reparación del ADN en respuesta al daño genómico y puede detener el crecimiento y la reproducción celulares.
- 30 Las composiciones y construcciones de la invención también pueden proporcionar genes que promueven la muerte celular por apoptosis, los denominados genes suicidas, que cuando se expresan hacen que la célula active el procedimiento de apoptosis. Las células cancerosas a menudo poseen versiones mutadas y/o sin función de estos genes relacionados con la apoptosis y, por lo tanto, no pueden sufrir apoptosis en respuesta a señales externas. La terapia génica suicida también puede referirse a la introducción de genes que permiten la conversión de un compuesto o profármaco no tóxico en un fármaco letal (Duarte et al. Cancer Letters, 2012). De acuerdo con realizaciones de la invención, tales productos génicos pueden introducirse selectivamente en células enfermas, tales como células neoplásicas, marcándolas para su destrucción mediante apoptosis inducida o suministro de un compuesto o profármaco que de otro modo no sería tóxico.
- 35 En realizaciones específicas de la invención, el ARNm puede codificar inhibidores de la vía de muerte celular programada, tales como los inhibidores del receptor PD-1 (CD279) o sus ligandos PD-L1 (B7-H1; CD274) y PD-L2 (B7-CC; CD273). Por lo tanto, el ARNm puede codificar una proteína o un polipéptido que se unen a, o interfieren de otro modo en la función del eje PD-1/PDL-1 o PD-1/PDL-2 dentro de células enfermas o neoplásicas dentro de un órgano diana. Las proteínas o polipéptidos adecuados pueden incluir anticuerpos, que pueden ser monoclonales o policlonales, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, u otras microproteínas de unión a antígeno, que se unen al receptor de PD-1, PDL-1, PDL-2 o complejos de ligando y receptor. Este efecto también se puede observar mediante el uso de inhibidores de proteínas o polipéptidos de la vía del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4), otro llamado punto de control inmunitario. Se sabe que la inhibición de una o ambas vías da como resultado un cambio en la respuesta inmunitaria dentro del microambiente tumoral que puede beneficiar positivamente la salud del paciente. Además, al modular la respuesta inmunitaria en un sujeto, las composiciones de la presente invención pueden mostrar una utilidad particular en terapias combinatorias con otros enfoques terapéuticos contra el cáncer, tales como la radioterapia o la quimioterapia. Los inhibidores de la vía anti-PD1 aprobados por la FDA incluyen pembrolizumab y nivolumab. Los inhibidores anti-PDL-1 conocidos incluyen MPDL-3280A, BMS-936559 y atezolizumab. Los inhibidores terapéuticos anti-CTLA4 incluyen ipilimumab y tremelimumab. Las composiciones de la invención se pueden usar para suministrar tales inhibidores de la vía de muerte celular programada de forma selectiva a las células enfermas dentro de un órgano diana en un sujeto aprovechando el entorno de miARN diferencial en esas células.
- 40 Las células T receptoras de antígenos químéricos (células CAR-T) son células inmunitarias, típicamente linfocitos T, que se han modificado para expresar receptores que se dirigen a las células cancerosas.
- 45 Las células T receptoras de antígenos químéricos (células CAR-T) son células inmunitarias, típicamente linfocitos T, que se han modificado para expresar receptores que se dirigen a las células cancerosas.
- 50 La inmunoterapia adoptiva, que implica la transferencia de células T autólogas específicas de antígeno generadas ex vivo, es una estrategia prometedora para tratar infecciones virales y cáncer. Las células T utilizadas para la inmunoterapia adoptiva pueden generarse mediante la expansión de células T específicas de antígeno o la redirección de células T mediante ingeniería genética (véase, p. ej., Park, T.S., S.A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer

with genetically engineered T cells". Trends Biotechnol 29(11): 550-7).

Se han generado con éxito especificidades novedosas en las células T, también conocidas como células efectoras inmunitarias, mediante la transferencia genética de receptores de células T transgénicas o receptores de antígenos quiméricos (CAR) (véase, p. ej., Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-

5 specific chimeric antigen receptor". Blood 116(7): 1035-44). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en al menos tres partes: un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular (también conocido como ectodomínio), un dominio transmembrana y un dominio de activación de células T intracelular (también conocido como endodomínio). En algunas realizaciones, las células T modificadas genéticamente comprenden una clase específica de células T, tales como, por ejemplo, células T gamma delta, un subtipo de células T que se dirigen selectivamente a las células tumorales sin afectar a las sanas. Los CAR han permitido con éxito que las células T se redirijan contra los antígenos expresados en la superficie de las células tumorales de diversas neoplasias malignas que incluyen linfomas y tumores sólidos (Jena, Dotti et al. más arriba). En algunas realizaciones, las células T modificadas genéticamente comprenden al menos una población de células T autólogas en las que las células CAR-T están modificadas genéticamente para eliminar la expresión del receptor de células T $\alpha\beta$ endógeno (TCR) para prevenir una respuesta de injerto contra el anfitrión sin comprometer las funciones efectoras dependientes de CAR. En algunas realizaciones, las células T modificadas genéticamente comprenden al menos una población de células T alogénicas. En algunas realizaciones, las células T modificadas genéticamente comprenden al menos una población de células T autólogas y una población de células T alogénicas.

10 En general, el dominio de reconocimiento de antígeno extracelular es un radical de direccionamiento que está asociado con uno o más dominios de señalización en una sola molécula de fusión de un dominio de anticuerpo, receptor o ligando que se une a una diana específica, típicamente una diana asociada a un tumor. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno extracelular es o deriva de una variante de fragmento de cadena sencilla (scFv) de un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), que comprende los fragmentos variables ligeros y pesados de un anticuerpo monoclonal unidos por un conector flexible. En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno extracelular está conectado al dominio transmembrana por un conector, tal como, por ejemplo, un conector flexible tal como el conector de la bisagra de IgG1. En algunas realizaciones el dominio transmembrana es o deriva de un dominio transmembrana de CD28. En algunas realizaciones, el endodomínio incluye un dominio coestimulador diseñado para potenciar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, potenciando la supervivencia y aumentando la proliferación de células T modificadas con CAR, y un dominio interno de activación de células T diseñado para activar la célula T cuando se une a la diana deseada. En algunas realizaciones, el dominio coestimulador es o deriva de un dominio coestimulador CD28, un dominio coestimulador OX-40 (CD134), un dominio coestimulador ICOS, un dominio coestimulador 4-1BB (CD137), o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el dominio de activación de células T intracelular comprende el dominio CD3 zeta (CD3 ζ) o una porción biológicamente activa del mismo. En algunas realizaciones, la activación de las células T da como resultado la activación de las células inmunitarias en las que las células T liberan citocinas inflamatorias para promover una inflamación y/o una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la activación de las células T da como resultado una actividad citotóxica en la que las células T liberan citotoxinas para promover la apoptosis de las células cancerosas. En algunas realizaciones, la activación de las células T da como resultado una proliferación en la que las células T liberan interleucinas para promover el desarrollo y la división celulares. En algunas realizaciones, la activación de células T da como resultado una combinación de al menos dos de activación de células inmunitarias, actividad citotóxica y/o proliferación.

15 En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno extracelular se une específicamente a CD19. CD19 es una diana atractiva para la inmunoterapia porque la gran mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas B (B-ALL) expresan uniformemente CD19, mientras que la expresión está ausente en las células no hematopoyéticas, así como en las células mieloides, eritroides y T, y células madre en la médula ósea. Se están realizando ensayos clínicos dirigidos a CD19 en neoplasias malignas de células B con respuestas antitumorales alentadoras. Muchas de las terapias CAR-T actuales que se están evaluando en ensayos clínicos utilizan células T genéticamente modificadas para expresar un receptor de antígeno químico (CAR) con especificidad derivada de la región scFv de un anticuerpo monoclonal de ratón específico de CD19 FMC63 (véanse, p. ej., Nicholson, Lenton et al. (1997);, "Construction and characterization of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma". Mol Immunol. 1997 noviembre-diciembre; 34(16-17):1157-65; Cooper, Topp et al. (2003). "T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect". Blood. 15 de febrero de 2003; 101 (4): 1637-44; Cooper, Jena et al. (2012) (Solicitud Internacional: WO2013/126712).

20 En algunas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno extracelular se une específicamente a CD22. CD22 es una fosfoglicoproteína transmembrana que pertenece a la familia de lectinas Siglec y se une específicamente al ácido siálico con sus siete dominios de inmunoglobulina extracelular en el extremo N terminal. Actúa principalmente como un receptor inhibidor para la activación y señalización de las células B y regula la interacción de las células B con las células T y las células presentadoras de antígenos (APC). Similar a CD19, CD22 es un marcador de linaje restringido de células B, expresado explícitamente por células linfoides B desde la etapa pre-B hasta la de células B maduras. Sin embargo, se pierde durante la diferenciación a células plasmáticas. CD22 se expresa universalmente en la mayoría de las neoplasias malignas de células B, incluida la leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia linfocítica crónica (CLL) y varios subtipos de linfoma no Hodgkin (NHL), tales como el linfoma difuso de células B grandes. Los resultados positivos en ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales anti-CD22 (p. ej., epratuzumab)

e inmunotoxinas (p. ej., BL22, HA22) han confirmado que CD22 es una diana terapéutica atractiva para las neoplasias malignas de células B. Se ha demostrado que CD22 se expresa en células de ALL que perdieron la expresión de CD19 después del tratamiento con células CAR-T anti-CD19, lo que hace que las células CAR-T anti-CD22 sean adecuadas para la terapia combinada y/o de seguimiento de células CAR-T anti-CD19.

- 5 Sin embargo, aunque numerosos estudios clínicos han demostrado el potencial de la transferencia adoptiva de células CAR T para la terapia del cáncer, también han aumentado los riesgos asociados con el síndrome de liberación de citocinas (CRS) y el efecto "en la diana fuera del tumor".

Las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm proporcionadas en el presente documento son útiles para mejorar la seguridad y la eficacia de las células CAR-T. Por ejemplo, los sistemas de suministro de nanopartículas de ARNm de las realizaciones descritas en el presente documento pueden usarse para reclutar células inmunitarias específicas o subconjuntos modificados de células inmunitarias, tales como células CAR-T, al microambiente tumoral. Además, los sistemas de suministro de nanopartículas de ARNm se pueden usar para inhibir la expresión de receptores de células T endógenos (TCR) para evitar la enfermedad de injerto contra anfitrión y/o para eliminar selectivamente genes de puntos de control inmunitarios en estas células para fortalecer su actividad anticancerosa en el medio tumoral supresor. (Véase, por ejemplo, Moffett, Coon, et al. (2017) "Hit-and-run programming of therapeutic cytoreagents using mRNA nanocarriers". Nature Communications. 8:389.)

En algunas realizaciones, el ARNm codificante y las partículas de suministro se usan para atraer células CAR-T a un sitio particular en un sujeto. En algunas realizaciones, el ARNm codificante y las partículas de suministro se utilizan para superar la migración insuficiente de una célula inmunitaria al microambiente tumoral. En respuesta a quimiocinas específicas, diferentes subconjuntos de células inmunitarias migran al microambiente tumoral y regulan las respuestas inmunitarias tumorales de forma espaciotemporal. Además, las quimiocinas pueden dirigirse directamente a las células no inmunitarias, incluidas las células tumorales y las células endoteliales vasculares, en el microambiente tumoral, y se ha demostrado que regulan la proliferación de células tumorales, las propiedades de las células madre cancerosas, la invasividad del cáncer y la metástasis. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula T, una célula asesina natural (NK), una célula B, una célula presentadora de antígeno (APC) tal como un macrófago o una célula dendrítica, o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, el ARNm codificante y las partículas de suministro se utilizan para superar la migración insuficiente de células CAR T al microambiente tumoral. En algunas realizaciones, las partículas de suministro se dirigen específicamente al microambiente tumoral, y el ARNm codificante codifica un producto génico que atrae o recluta de otro modo células CAR-T al microambiente tumoral. En algunas realizaciones, el ARNm codificante expresa una quimiocina. A modo de ejemplo no limitante, el ARNm codificante puede codificar una quimiocina que atrae células T tales como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL22, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 y cualquier combinación de las mismas. En situaciones en las que se desea el efecto inverso, tal como en las enfermedades autoinmunitarias, el ARNm codificante puede expresar bloqueadores, antagonistas y/o inhibidores de los factores mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones, el ARNm codificante y las partículas de suministro se usan para expresar transitoriamente el ARNm codificante en el microambiente tumoral. En algunas realizaciones, el ARNm codificante codifica una citocina u otro producto génico implicado en la regulación de la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de células inmunitarias en la respuesta tumoral, tal como, por ejemplo, células T activadas y células NK. A modo de ejemplo no limitante, el ARNm codificante puede codificar una citocina tal como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-33, IL-35, TGF-beta y cualquier combinación de los mismos. Nuevamente, en situaciones en las que se desea el efecto inverso, tal como en la enfermedad autoinmunitaria, el ARNm codificante puede expresar bloqueadores, antagonistas y/o inhibidores de los factores mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones de la invención, el ARNm codificante y la partícula de suministro se utilizan junto con CAR-T u otra terapia celular adoptiva para proporcionar una expresión transitoria del ARNm codificante.

En algunas realizaciones, el sistema de suministro de nanopartículas de ARNm administra un ARNm que codifica un agente de edición de genes a una población de células diana. En algunas realizaciones, el ARNm codifica una nucleasa específica de secuencia que se dirige a un locus de gen e interrumpe la expresión de uno o más genes endógenos producidos en la población de células diana. En algunas realizaciones, el ARNm codifica una nucleasa específica de secuencia que se dirige a un locus génico relacionado con el receptor de células T (TCR), interrumpiendo así la expresión de uno o más dominios en el TCR.

En algunas realizaciones, las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm se pueden usar para suministrar un ARNm que codifica uno o más agentes que programan las células T modificadas genéticamente hacia un fenotipo deseado. En algunas realizaciones, las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm pueden usarse para inducir marcadores y patrones transcripcionales que son característicos de un fenotipo de células T deseado. En algunas realizaciones, las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm se pueden usar para promover el desarrollo de células T de memoria central CD26L+ (Tcm), que se ha demostrado que mejoran el tratamiento con CAR-T. (Véase, por ejemplo, Moffett, Coon, más arriba).

En algunas realizaciones, las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm incluyen un dominio de

direcciónamiento anclado a la superficie que es específico para un marcador de células T, tal como, por ejemplo, un antígeno de superficie que se encuentra en las células T. En algunas realizaciones, el dominio de direcciónamiento anclado a la superficie es específico para un antígeno que une selectivamente la nanopartícula a las células T e inicia la endocitosis inducida por el receptor para internalizar las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm.

5 En algunas realizaciones, el dominio de direcciónamiento anclado a la superficie se une selectivamente a CD3, CD8 o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el dominio de direcciónamiento anclado a la superficie es o deriva de un anticuerpo que se une selectivamente a CD3, CD8 o una combinación de los mismos.

Los microARN (miARN) son una clase de ARN no codificantes, cada uno de los cuales contiene alrededor de 20 a 25 nucleótidos, algunos de los cuales se cree que están involucrados en la regulación postranscripcional de la expresión génica al unirse a secuencias complementarias en las regiones no traducidas 3' (UTR 3') de los ARNm diana, lo que conduce a su silenciamiento. Estas secuencias también se denominan en el presente documento sitio de unión de miARN o secuencias de sitios de unión de miARN. Ciertos miARN son muy específicos de tejido en su expresión; por ejemplo, miR-122 y sus variantes son abundantes en el hígado y se expresan con poca frecuencia en otros tejidos (Lagos-Quintana (2002), Current Biology, Vol. 12, abr.).

10 15 Por lo tanto, el sistema de miARN proporciona una plataforma robusta mediante la cual los ácidos nucleicos introducidos en las células pueden silenciarse en tipos de células seleccionados en un tejido diana y expresarse en otros. Al incluir un sitio de unión para una secuencia de miARN dada en particular en una construcción de ARNm que se introducirá en las células diana, particularmente en o inmediatamente 5' o 3' con respecto a una UTR, la expresión de ciertos genes introducidos puede reducirse o eliminarse sustancialmente en algunos tipos de células, permaneciendo en otros (Brown y Naldini, Nature Reviews Genetics volumen 10, páginas 578-585 (2009)). Se entiende que el uso del término 'inmediatamente' es sinónimo de términos tales como 'muy próximo a' o 'muy cercano a'. Cuando se hace referencia al posicionamiento 5' o 3' con respecto a una secuencia UTR, abarca variantes en las que típicamente se pueden colocar hasta alrededor de veinte, adecuadamente no más de cincuenta, bases de nucleótidos intermedias entre la secuencia de unión de miARN y la UTR adyacente. Se contempla que una, o una pluralidad, de tales secuencias de sitios de unión de miARN puedan incluirse en la construcción de ARNm. Cuando está presente una pluralidad de secuencias de sitios de unión de miARN, esta pluralidad puede incluir, por ejemplo, más de dos, más de tres, típicamente más de cuatro secuencias de sitios de unión de miARN. Estas secuencias de sitios de unión de miARN pueden disponerse secuencialmente, en tandem o en ubicaciones predeterminadas dentro, 3' o 5' de una UTR específica dentro de las construcciones de ARNm.

20 25 30 35 miR-122, a pesar de su abundancia en el tejido hepático sano no enfermo, se reduce en la mayoría de los cánceres de hígado, así como en las células enfermas (Braconi et al. 2011, Semin Oncol; 38(6): 752-763, Brown y Naldini, Nature 2009;10 578). Mediante el método mencionado anteriormente, se ha encontrado que cuando el tejido diana es el hígado, la traducción de las secuencias de ARNm introducidas puede facilitarse en células hepáticas cancerosas y reducirse o eliminarse sustancialmente en células sanas transfectadas, al incluir sitios de unión de miARN-122. (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) en o junto a sus UTR 3'.

40 45 En el contexto de la expresión específica de la enfermedad de los polinucleótidos introducidos, las secuencias de unión para cualquier secuencia de miARN que esté interrumpida en una enfermedad particular, - es decir, regulada por incremento o regulada por disminución en las células enfermas (como las células tumorales) en comparación con las células no enfermas - son consideradas adecuadas para su uso en la invención. La Tabla 2 analiza ejemplos de secuencias de unión de miARN asociadas a tumores de este tipo que pueden usarse en realizaciones de la presente invención. Sin embargo, se apreciará que la presente invención no se limita únicamente a los casos en los que un miARN o una clase de miARN dados se regulan por disminución en un primer tipo celular frente a un segundo tipo celular dentro de un órgano o sistema de órganos dados. Por el contrario, simplemente se requiere que exista un patrón de expresión diferencial de un miARN regulador entre el primer y el segundo tipo de células comprendidas dentro del órgano o sistema de órganos. La expresión diferencial del miARN puede explotarse usando las composiciones y los métodos descritos en el presente documento para permitir la correspondiente traducción diferencial de los productos proteicos en esas células.

50 Los ejemplos de cánceres en los que se ha encontrado evidencia de una expresión diferencial de miARN similar entre células sanas y cancerosas incluyen mama (Nygaard et al., BMC Med Genomics, 9 de junio de 2009;2:35), ovario (Wyman et al., PloS One, 2009 ;4(4):e5311), próstata (Watahiki et al., PloS One, 2011; 6(9):e24950), y cánceres de cuello uterino (Lui et al. Cancer Research, 1 de julio de 2007;67(13):6031-43). El documento WO 2017/132552 A1 describe una amplia gama de miARN con diferentes niveles de expresión en varias células cancerosas.

Tabla 2

Tipo de tejido/cáncer	miARN implicado	Perfil de expresión	Referencia
Hígado	miARN-122	Reducido en células cancerosas	Braconi, 2011, Brown, 2009
Hígado	miARN-125	Reducido en hepatocarcinoma	Coppola N. Oncotarget, 2017. Vol 8
Cerebro	miARN-124a	Reducido en glioblastoma	Mazzacurati L. Moleculatherapy 23, 2015

Tipo de tejido/cáncer	miARN implicado	Perfil de expresión	Referencia
Pulmón, mama	Let-7	Reducido en células cancerosas	Edge RE et al. Mol Ther 2008;16:1437 Yu F. Cell 2007; 131(6):1109-23
Páncreas	miARN-375	Reducido en células cancerosas	Song S, Zhou J et al. Biomed Reports: 393-398, 2013

En el páncreas, se ha indicado que la expresión de miARN-375 es alta en las células normales del páncreas, pero significativamente menor en tejidos enfermos y/o cancerosos (Song, Zhou et al. 2013). Se ha demostrado que esta expresión se relaciona con la etapa del cáncer, reduciéndose aún más la expresión con el cáncer más avanzado. Se

5 cree que el miARN-375 está involucrado en la regulación de las respuestas biológicas inducidas por la glucosa en las células β pancreáticas, al dirigirse al ARNm de la proteína quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido (PDK1) y, por lo tanto, afectar a la cascada de PI 3-quinasa/PKB (El Ouaamari et al. *Diabetes* 57:2708-2717, 2008). Este supuesto modo de acción implica un efecto antiproliferativo de miARN-375, lo que puede explicar su regulación por disminución en las células cancerosas.

10 La UTR de las secuencias de ARNm proporcionadas por la presente invención se puede seleccionar para que tenga similitud, por ejemplo, más de 90% de similitud, con parte o la totalidad de una secuencia UTR expresada en uno de los tipos de células dentro del órgano diana. Ciertos tipos de células pueden tener genes cuya expresión está regulada por incremento o disminución, y la secuencia UTR puede mediar esta regulación, por ejemplo fomentando la estabilidad o degradación de las secuencias de ARNm relevantes.

15 Como ejemplo, las UTR asociadas con genes que se sabe que están regulados por incremento en las células cancerosas pueden tener una o más características, tales como secuencias de sitios de unión de miARN, que fomentan su estabilidad y traducción en estas células cancerosas. Mediante la incorporación de secuencias similares a secuencias de ARNm suministradas, la estabilidad y la traducción pueden mejorarse en células cancerosas pero no en células no cancerosas o sanas.

20 También se considera que el cáncer que debe ser tratado por la invención puede ser un cáncer secundario en el tejido diana, es decir, una metástasis de un cáncer en otro lugar que no sea el tejido diana. Por ejemplo, una metástasis hepática puede tener su origen en un cáncer de esófago, estómago, colon, recto, mama, riñón, piel, páncreas o pulmón, y puede ser un adenocarcinoma u otro tipo de cáncer. En estos casos, es posible que sea necesario seleccionar secuencias de miARN alternativas para proporcionar una expresión diferencial en células sanas, no cancerosas y/o cancerosas. De hecho, puede haber una mayor elección de secuencias de miARN candidatas en tales casos, debido al diferente origen del tejido de las células metastatizadas.

25 En ciertas situaciones, es posible que exista más de un candidato para una secuencia de miARN que muestre una expresión diferencial en diferentes tipos de células en un tejido diana. En tales casos, puede ser ventajoso que se incluya una pluralidad de secuencias de sitios de unión de miARN en la construcción de ARNm, y que estas secuencias puedan ser secuencias sustancialmente diferentes. Sin embargo, también se prevé que cada una de la pluralidad de secuencias de sitios de unión de miARN pueda ser sustancialmente la misma secuencia.

Terapias combinadas

Virus oncolíticos

30 Como se mencionó anteriormente, la terapia viral oncolítica es el procedimiento de utilización de virus para infectar y destruir células cancerosas, a veces mediante lisis viral directa, pero también incluye la destrucción indirecta mediante la estimulación de las respuestas antitumorales del anfitrión. Si bien los virus oncolíticos se caracterizan con frecuencia por tener una mayor actividad en las células cancerosas en comparación con las células sanas, se han documentado efectos fuera de la diana causados por el daño a las células sanas (Russel et al. *Nature Biotechnology*, 2012).

35 Para aumentar la seguridad y disminuir los efectos fuera de la diana, los virus oncolíticos pueden modificarse o seleccionarse para reducir su virulencia, por ejemplo, mediante la eliminación de factores de virulencia o genes implicados en funciones tales como la supresión y evasión del sistema inmunitario intracelular, la replicación del genoma viral, y la toma de control de los procedimientos de la célula anfitriona. La producción histórica de formas seguras de virus vivos para uso en vacunación es otra fuente de virus atenuados. En otros casos, se ha visto que mutaciones particulares o incluso genes adicionales mejoran la actividad oncolítica en virus oncolíticos particulares.

40 En la Tabla 3 se pueden encontrar ejemplos no exhaustivos de los genes de virulencia comúnmente añadidos, mutados o suprimidos en virus oncolíticos.

45

Tabla 3

virus oncolítico	Mutación	Referencia
Virus de la Estomatitis Vesicular, virus Maraba	Proteína G (mutación Q242R)	Brun et al 2010, Mol Ther.; 18(8): 1440-1449.
	Proteína M (mutación L123W)	
Virus del sarampión	Gen NIS - Simportador de yoduro tiroideo humano	Aref et al 2016, Viruses, 8, 294
Virus de la Enfermedad de Newcastle	Sitio de escisión de la proteína de fusión (F)	Vigil et al 2007 Cancer Res; 67: (17).
Parvovirus	Proteína NS NS1	Marchini et al 2015 Virology Journal 12:6
Virus del Herpes Simple Tipo 1 (VHS-1)	Inactivación de la ribonucleótido reductasa viral (ICP6); inactivación de serina/treonina-proteína quinasa (US3); Inactivación de ICP34.5 e ICP47 (Neurovirulencia y evasión del sistema inmunológico); inactivación de UL43 (fusión celular) inactivación; inactivación de UL49.5 (evasión de células T) inactivación; UL55 y UL56	Liu et al (2003) Gene Therapy volumen 10, 292-303; Goldsmith et al 1998 J Exp Med. 187(3): 341-348;
Adenovirus	E1B-55, E3, promotor E1a, E3 gp19kD, E1A 924pb), E1A, delección en E3 y E4, delección casi total de E3, región químérica ad3/Ad11p E2B, E3-6.7K + gp19K E1A	Baker et al 2018, Cancers, 10, 201

La atenuación o modificación de los virus oncolíticos de esta manera puede desempeñar un papel en la selectividad de los virus oncolíticos hacia las células cancerosas: dado que el procedimiento de carcinogénesis a menudo implica

5 la inactivación de genes que desempeñan funciones protectoras contra el cáncer (por ejemplo, regulando la división celular o apoptosis), y la infección viral, los virus oncolíticos que se atenúan como se describe pueden conservar su virulencia en las células cancerosas, debido a la ausencia de los genes antivirales habituales en estas células. Por lo tanto, en las células sanas, el virus atenuado no puede defenderse de las respuestas antivirales normales y se elimina, mientras que en las células cancerosas esta respuesta está ausente y el virus puede lisar las células. Sin embargo,

10 10 este enfoque rara vez es completamente efectivo, ya que, en primer lugar, la inactivación parcial de las respuestas antivirales en las células cancerosas es más común que la falta total de actividad antiviral. Haralambieva et al, Mol. Ther., 2007), lo que significa que aún se puede reducir la virulencia en estas células y, en segundo lugar, aún se puede producir la infección de células sanas.

15 De manera similar, dado que los virus suelen utilizar la maquinaria celular de la célula anfitriona para replicar sus genomas, pero esta maquinaria suele estar regulada por disminución en células sanas, quiescentes, que no se replican y que no replican sus propios genomas, muchos virus poseen genes que reactivan o compensar la maquinaria del anfitrión. Por ejemplo, las enzimas ribonucleótido reductasa son necesarias para la producción de

20 desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos; estas enzimas suelen estar reguladas por disminución en las células anfitrionas quiescentes, y varios virus poseen genes para su propia enzima de este tipo, a fin de tener una fuente de desoxirribonucleótidos. Dado que las células cancerosas en replicación pueden reactivar estas enzimas, un virus oncolítico atenuado con su propio gen de la enzima ribonucleótido reductasa eliminado aún puede replicarse en las células cancerosas. Sin embargo, por razones similares a las anteriores, este enfoque puede no ser completamente efectivo, ya sea para proteger las células sanas de la infección o para restaurar la virulencia en las células cancerosas. Por ejemplo, no todas las células de un tumor se replican en un momento dado y, como tal, es posible que no haya suficientes desoxirribonucleótidos disponibles para la replicación viral en la mayoría de las células cancerosas.

25 Siguiendo lo anterior, cuando una composición o método de acuerdo con la presente invención se usa junto con la terapia viral oncolítica, el factor potenciador terapéutico proporcionado por las construcciones de la invención puede ser un factor que aumenta la eficacia del virus oncolítico en las células cancerosas, por ejemplo, potenciando la replicación del virus, o la capacidad del virus para lisar las células en las que reside. En particular, cuando el virus oncolítico ha sido modificado para atenuar su función, por ejemplo mediante la delección de uno o más genes de factores de virulencia, el factor terapéutico puede reemplazar el gen suprimido con ARNm de un producto génico que sea una copia del producto génico viral, o un producto génico con una homología sustancial con el gen suprimido, o que de otro modo compense la delección del gen. En tales realizaciones, mediante la expresión diferencial en células sanas y cancerosas que es posible gracias a la invención, el producto del gen de reemplazo puede expresarse solo en células cancerosas, mejorando la actividad viral y la lisis en estas células, en lugar de en células sanas, donde la expresión del ARNm proporcionado es inhibida por la presencia de los sitios de unión de miARN.

30 35 Por medios similares, el ARNm que codifica factores que aumentan la resistencia de las células a los virus oncolíticos puede expresarse preferentemente en células sanas, promoviendo nuevamente la actividad viral en células cancerosas en comparación con las células sanas.

40 Una ventaja de este enfoque es que, a diferencia de las terapias anteriores que utilizan virus oncolíticos, no se basa en qué genes y procedimientos celulares antivirales pueden desactivarse debido a la carcinogénesis, ni en los

- procedimientos de replicación celular que pueden activarse en algunas células cancerosas pero no en otras. Como resultado, se permite un mayor alcance de los genes de virulencia que se pueden eliminar de los virus oncolíticos. Por lo tanto, los virus oncolíticos pueden modificarse para que carezcan por completo de capacidad replicativa en células sanas y, en células cancerosas en las que la función de los genes de virulencia suprimidos se reemplaza por medio de la invención, el virus puede restaurarse a su potencia completa. Como resultado, se pueden reducir los efectos secundarios y aumentar la eficacia. Del mismo modo, dado que la expresión diferencial del ARNm proporcionado se basa en las diferencias de expresión de miARN entre las células cancerosas y las sanas, la virulencia se puede restaurar en todas las células cancerosas transfectadas, y no solo en aquellas que, por ejemplo, se están replicando en el momento de la administración.
- 5 10 En una realización particular, el virus oncolítico es HSV-1, parte de la familia de los herpesvirus. Las versiones atenuadas de HSV pueden modificarse genéticamente o seleccionarse para que tengan deficiencia de ICP6, que codifica una ribonucleótido reductasa viral (Aghi et al., *Oncogene*. 2008) y/o US3, que codifica una serina/treonina-proteína quinasa y desempeña varias funciones en el ciclo de vida del virus, incluido el bloqueo de la apoptosis de la célula anfitriona (Kasuya et al, *Cancer Gene Therapy*, 2007).
- 15 **Citocinas**
- Se contempla que las composiciones y los métodos descritos en el presente documento puedan actuar para inducir una respuesta inmunitaria contra la enfermedad. En particular, pueden inducirse respuestas inmunitarias contra células cancerosas. El procedimiento de carcinogénesis implica con frecuencia formas en que las células cancerosas intentan evadir el sistema inmunitario, lo que implica cambios en los antígenos producidos y presentados por estas células.
- 20 25 En algunas realizaciones, el ARNm proporcionado por la invención comprende al menos un polinucleótido que codifica una proteína que es un acoplador de células T biespecífico (BiTE), una proteína antiinmunosupresora o un antígeno inmunogénico. El término "proteína antiinmunosupresora", como se emplea en el presente documento, es una proteína que inhibe una vía inmunosupresora.
- 25 30 La invención abarca composiciones que suministran ARNm que codifica una proteína antiinmunosupresora que es una proteína de células T antirreguladoras (Treg) o una proteína anti-células supresoras derivadas de mieloide (MDSC). En algunas realizaciones, la proteína antiinmunosupresora es un bloqueador derivado de VHH o un BiTE derivado de VHH.
- 30 35 El término "antígeno inmunogénico", como se emplea en el presente documento, se refiere a una proteína que aumenta una respuesta inmunitaria inflamatoria o inmunogénica. En realizaciones particulares, los antígenos inmunosupresores e inmunogénicos inducen una respuesta inmunitaria antitumoral. Los ejemplos de tales proteínas incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos que se unen e inhiben los receptores de puntos de control inmunitarios (p. ej., CTLA4, LAG3, PD1, PDL1 y otros), citocinas proinflamatorias (p. ej., IFNy, IFN α , IPN β , TNF α , IL-12, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF y otros), o proteínas que se unen y activan un receptor activador (p. ej., Fc γ RI, Fc γ IIa, Fc γ IIIa, receptores coestimuladores y otros). En realizaciones particulares, la proteína se selecciona entre EpCAM, folato, IFN β , anti-CTLA-4, anti-PD1, A2A, anti-FGF2, anti-FGFR/FGFR2b, anti-SEMA4D, CCL5, CD137, CD200, CD38, CD44, CSF-1R, CXCL10, CXCL13, Receptor de endotelina B, IL-12, IL-15, IL-2, IL-21, IL-35, ISRE7, LFA-1, NG2 (también conocido como SPEG4), SMAD, STING, TGF β y VCAM1.
- 40 45 La invención abarca composiciones que suministran ARNm que codifica macromoléculas funcionales para poblaciones de células diana utilizadas en terapias basadas en células. En algunas realizaciones, la población de células diana es una población de células T modificadas genéticamente. En algunas realizaciones, la población de células diana es una población de células T receptoras de antígenos químéricos (células CAR-T).
- 45 50 El ARNm codificante y las partículas de suministro pueden usarse para atraer una población de células inmunitarias o una combinación de poblaciones de células inmunitarias a un sitio particular en un sujeto. En algunas realizaciones, el ARNm codificante y las partículas de suministro se utilizan para atraer células inmunitarias al microambiente tumoral. En algunas realizaciones, el ARNm codificante y las partículas de suministro se utilizan para superar la migración insuficiente de una célula inmunitaria al microambiente tumoral. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria es una célula T, una célula asesina natural (NK), una célula B, una célula presentadora de antígeno (APC) tal como un macrófago o una célula dendrítica, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el ARNm codificante y las partículas de suministro se usan para atraer células CAR-T al microambiente tumoral.
- 50 55 El ARNm codificante y las partículas de suministro pueden usarse para superar la migración insuficiente de células CAR T al microambiente tumoral. En algunas realizaciones, las partículas de suministro se dirigen específicamente al microambiente tumoral, y el ARNm codificante codifica un producto génico que atrae o recluta células CAR-T al microambiente tumoral. En algunas realizaciones, el ARNm codificante expresa una quimiocina. A modo de ejemplo no limitante, el ARNm codificante puede codificar una quimiocina que atrae células T tal como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL22, CCL28, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, XCL1 y cualquier combinación de las mismas. En situaciones en las que se desea el efecto inverso, tales como en las enfermedades autoinmunitarias, el ARNm codificante puede expresar bloqueadores, antagonistas y/o inhibidores de los factores mencionados anteriormente.
- El ARNm codificante y las partículas de suministro pueden usarse para expresar transitoriamente el ARNm codificante

- en el microambiente tumoral. En algunas realizaciones, el ARNm codificante codifica una citocina u otro producto génico implicado en la regulación de la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de células inmunitarias en la respuesta tumoral, tales como, por ejemplo, células T activadas y células NK. A modo de ejemplo no limitante, el ARNm codificante puede codificar una citocina tal como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-33, IL-35, 5 TGF-beta y cualquier combinación de las mismas. Nuevamente, en situaciones en las que se desea el efecto inverso, tal como en las enfermedades autoinmunitarias, el ARNm codificante puede expresar bloqueadores, antagonistas y/o inhibidores de los factores mencionados anteriormente.
- Las composiciones que suministran ARNm pueden diseñarse para dirigirse a subtipos celulares particulares y, al 10 unirse a ellos, estimular la endocitosis mediada por receptor, introduciendo así el ARNm sintético que portan en las células, que ahora pueden expresar el ARNm sintético. Debido a que no se requiere el transporte nuclear ni la transcripción del transgén, este procedimiento es rápido y eficiente.
- En algunas realizaciones, el sistema de suministro de nanopartículas de ARNm suministra un ARNm que codifica un 15 agente de edición de genes a una población de células diana. En algunas realizaciones, el ARNm codifica una nucleasa específica de secuencia que se dirige a un locus de gen e interrumpe la expresión de uno o más genes endógenos producidos en la población de células diana. En algunas realizaciones, el ARNm codifica una nucleasa específica de secuencia que se dirige a un locus génico relacionado con el receptor de células T (TCR), interrumpiendo así la expresión de uno o más dominios en el TCR.
- En algunas realizaciones, las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm se pueden usar para 20 suministrar un ARNm que codifica uno o más agentes que programan las células T modificadas genéticamente hacia un fenotipo deseado. En algunas realizaciones, las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm pueden usarse para inducir marcadores y patrones transcripcionales que son característicos de un fenotipo de células T deseado. En algunas realizaciones, las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm se pueden usar para promover el desarrollo de células T de memoria central CD26L+ (Tcm), que se ha demostrado que mejoran el tratamiento con CAR-T. (Véase, p. ej., Moffett, Coon más arriba). En algunas realizaciones, las composiciones 25 suministran ARNm que codifica uno o más factores de transcripción para controlar la diferenciación celular en una población de células diana. En algunas realizaciones, el factor de transcripción es Foxo1, que controla la transición en células T CD8 de efectoras-a-memoria en el desarrollo.
- En algunas realizaciones, las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm incluyen un dominio de 30 dirección anclado a la superficie que es específico para un marcador de células T, tal como, por ejemplo, un antígeno de superficie que se encuentra en las células T. En algunas realizaciones, el dominio de dirección anclado a la superficie es específico para un antígeno que une selectivamente la nanopartícula a las células T e inicia la endocitosis inducida por el receptor para internalizar las composiciones de suministro de nanopartículas de ARNm. En algunas realizaciones, el dominio de dirección anclado a la superficie se une selectivamente a CD3, CD8 35 o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el dominio de dirección anclado a la superficie es o deriva de un anticuerpo que se une selectivamente a CD3, CD8 o una combinación de los mismos.
- Mediante la invención, se puede lograr la expresión diferencial de los productos génicos mencionados anteriormente en diferentes tipos de células, por ejemplo, en células sanas, no enfermas, enfermas y cancerosas. Mediante este método, se puede desencadenar una respuesta inmunitaria dirigida a las células enfermas sin afectar a las células sanas o no enfermas.
- 40 La introducción de secuencias de nucleótidos codificantes en una célula diana requiere muy a menudo el uso de un agente de suministro para transferir la sustancia deseada desde el espacio extracelular al entorno intracelular. Con frecuencia, tales agentes de suministro están en forma de partículas de suministro, que pueden sufrir fagocitosis y/o fusionarse con una célula diana. Las partículas de suministro pueden contener la sustancia deseada mediante encapsulación o incluyendo la sustancia dentro de una matriz o estructura.
- 45 Las partículas de suministro de la presente invención pueden dirigirse a las células del tejido diana. Este dirección puede estar mediado por un agente de dirección en la superficie de las partículas de suministro, que puede ser una proteína, péptido, carbohidrato, glicoproteína, lípido, molécula pequeña, ácido nucleico, etc. El agente de dirección puede usarse para dirigirse a células o tejidos específicos o puede usarse para promover la endocitosis o la fagocitosis de la partícula. Los ejemplos de agentes de dirección incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad (LDL), transferrina, 50 asialoglicoproteínas, proteína de la envoltura gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), carbohidratos, ligandos de receptores, ácido siálico, aptámeros, etc.
- Típicamente, las partículas de suministro comprenden lipidoides de aminoalcohol. Estos compuestos se pueden usar en la formación de partículas que incluyen nanopartículas, liposomas y micelas, que son particularmente adecuadas para el suministro de ácidos nucleicos. Un ejemplo ilustrativo para la producción de nanoformulaciones que comprenden partículas según algunas realizaciones de la invención se puede encontrar en los Ejemplos.
- Cuando se administra a un sujeto, un componente terapéutico se administra adecuadamente como parte de una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticos aceptables pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales

como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Cuando se administran a un sujeto, los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferiblemente estériles. El agua es un vehículo adecuado cuando el compuesto de la invención se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las composiciones farmacéuticas, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores.

Los medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden presentarse en forma de líquidos, soluciones, suspensiones, geles, formulaciones de liberación modificada (tales como las de liberación lenta o sostenida), emulsiones, cápsulas (por ejemplo, cápsulas que contienen líquidos o geles), liposomas, micropartículas, nanopartículas o cualquier otra formulación adecuada conocida en la técnica. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Alfonso R. Gennaro ed., Mack Publishing Co. Easton, Pensilvania, 19^a ed., 1995, véanse, por ejemplo, las páginas 1447-1676.

Para cualquier compuesto o composición descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular *in vitro*. Las concentraciones diana serán aquellas concentraciones de componentes activos que sean capaces de lograr los métodos descritos en el presente documento, medidos usando los métodos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

Como es bien sabido en la técnica, las cantidades terapéuticamente eficaces para uso en sujetos humanos también pueden determinarse a partir de modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis para seres humanos para lograr una concentración que se haya encontrado que es eficaz en animales. La dosificación en seres humanos se puede ajustar controlando la eficacia de los compuestos y ajustando la dosificación hacia arriba o hacia abajo, como se describió anteriormente. Ajustar la dosis para lograr la máxima eficacia en seres humanos basándose en los métodos descritos anteriormente y otros métodos está dentro de las capacidades del experto normal en la técnica.

Se contempla que las realizaciones de la invención pueden incluir composiciones formuladas para uso en medicina. Como tal, la composición de la invención se puede suspender en una solución biocompatible para formar una composición que se puede dirigir a una ubicación en una célula, dentro de un tejido o dentro del organismo de un paciente o animal (es decir, la composición se puede usar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). Adecuadamente, la solución biocompatible puede ser una solución salina tamponada con fosfato o cualquier otra solución portadora farmacéuticamente aceptable. Se pueden combinar uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales (tales como diluyentes, coadyuvantes, excipientes o vehículos) con la composición de la invención en una composición farmacéutica. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la invención se formulan para ajustarse a las normas reglamentarias y se pueden administrar por vía oral, intravenosa, tópica, intratumoral o subcutánea, o a través de otras vías convencionales. La administración puede ser sistémica o local o intranasal o intratecal.

Adicionalmente, se desean realizaciones en las que la composición de algunas realizaciones de la invención se administra por separado o combinada con componentes terapéuticos antitumorales o anticancerosos alternativos. Estos componentes pueden incluir virus oncolíticos, fármacos de molécula pequeña, agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos o agentes biológicos. Los componentes se pueden administrar simultáneamente con la composición de la invención y se pueden incluir dentro de las partículas de suministro, o se pueden administrar por separado, antes o después de la administración de la composición de la invención, por cualquier medio adecuado.

También se contempla que la composición de algunas realizaciones de la invención pueda usarse en métodos *in vitro* y/o *ex-vivo*, por ejemplo, en un entorno de laboratorio. Un ejemplo de un método *in vivo* es aquel en el que una composición que comprende una partícula de suministro y una secuencia de ARNm como se describe en el presente documento se administra a las células diana *in vitro* y las secuencias de sitios de unión de miARN comprendidas en la secuencia de ARNm permiten la expresión diferencial de la secuencia codificante del ARNm en diferentes tipos de células dentro de las células diana *in vitro*. De manera similar, se contempla un método en donde se administra a una muestra diana *ex-vivo* tomada de un animal una composición que comprende una partícula de suministro y una secuencia de ARNm como se describe en el presente documento, y las secuencias de sitios de unión de miARN comprendidas en la secuencia de ARNm permiten la expresión diferencial de la secuencia codificante del ARNm en diferentes tipos de células dentro de la muestra diana.

El dispositivo de la invención se ilustra mediante, pero de ningún modo se limita a, los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

Protocolos generales

Líneas celulares

- 5 Se adquirieron células de hepatocarcinoma de hígado humano (CHC) HepG2 (ATCC® HB-8065™) y de Hep3B (ATCC® HB-8064™) de la ATCC. Las células se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (Cellgro, EE. UU.), FBS al 10% (HyClone, EE. UU.), estreptomicina (100 µg/ml) y penicilina (100 U/ml⁻¹) (Cellgro) como monocapas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células HepG2 se hicieron crecer en placas recubiertas de colágeno (Gibco, EE. UU.) a una concentración de colágeno de 5 µg/cm².
- 10 Se adquirieron HMCPP5 (hepatocitos humanos en placas agrupados; una mezcla de hepatocitos primarios en placas producidos mediante la combinación de células de 5 donantes individuales) de ThermoFisher Scientific, EE. UU. Las células se cultivaron en placa en medio de Williams E (WEM), complementado con FBS al 5%, dexametasona 1 µM y Cóctel A (Penicilina/Estreptomicina, Insulina Recombinante Humana, GlutaMax y HEPES, pH 7,4). A las 24 horas de la siembra, el medio WEM/Cóctel A se cambió a medio WEM de mantenimiento/incubación complementado con dexametasona 0,1 µM y Cóctel B (Penicilina/Estreptomicina, ITS (Insulina Recombinante Humana, Transferrina humana, ácido selenoso, BSA, ácido linoleico), GlutaMax y HEPES, pH 7,4) como monocapas a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%. Durante todos los experimentos, las células se cultivaron en medio WEM/Cóctel B, excepto durante la transfección con ARNm nanoformulado. El medio WEM/Cóctel B se cambió por medio de nueva aportación cada 3 días. Las células HMCPP5 se cultivaron en placas recubiertas de colágeno (Gibco) a una concentración de proteína de 5 µg/cm².
- 15 20 Se adquirieron Aml12 (hepatocitos sanos de ratón) de ATCC, EE. UU. Las células se sembraron en una placa de 12 pocillos a una densidad de 1 × 10⁵/pocillo.

Construcciones de vectores

Construcción del molde de pMRNA-CTx-mRNA

25 Las matrices que forman el molde del plásmido pMRNA-CTx-mRNA para la síntesis in vitro de todos los ARNm utilizados en los experimentos se construyeron de acuerdo con el Kit de Síntesis de ARNm ARNmExpress comercialmente disponible™ (SBI, EE. UU.). Todos los plásmidos se propagaron en *E. coli* (Invitrogen, EE. UU.) y se purificaron utilizando Qiagen Mini o Maxi Kit (Qiagen, EE. UU.). Los mapas de restricción de todos los plásmidos se generaron utilizando el soporte lógico pDRAW32 (www.acaclone.com).

Método de clonación 1 - endonucleasa de restricción

- 30 Como se muestra en la Figura 2, la secuencia de uno o más genes, flanqueada por la secuencia de Kozak para una traducción óptima directamente antes del codón ATG en el extremo 5' o un codón de parada (TAA, TAG, TGA) en el extremo 3' de gen, se sintetizó por la empresa GeneArt (sin optimización de codones) y se suministró como ADN plasmídico (denominado plásmido o vector de ADN), que se muestra en la Figura 2 como pMA-T-CTx-Gene. Las regiones UTR 5' y 3' patentadas que flanquean la secuencia codificante se incluyeron en todas las secuencias sintetizadas (no mostradas en las secuencias adjuntas). La UTR 5' es sintética y contiene la secuencia de Kozak, y la UTR 3' se basa en una UTR de globina alfa de ratón y también comprende una cola de poli A de 120 bases. Para generar el vector de síntesis que se muestra en la Figura 2 como pMRNA-CTx-mRNA, se cortó un fragmento de nucleótido que contenía el gen o los genes del plásmido de ADN usando endonucleasas de restricción, aquí EcoRI y Nhel, y se subclonó en sitios de restricción EcoRI/Nhel en el plásmido molde pMRNA, comprendiendo este plásmido molde el promotor T7 reconocido por la ARN polimerasa de T7, UTR 5' y 3', y una secuencia de poliA.

Método de clonación 2 - fusión en frío

45 La secuencia de uno o más genes, flanqueada como en el Método de Clonación 1 con una secuencia de Kozak y un codón de parada (TAA, TAG, TGA), fue sintetizada por la empresa GeneArt (sin optimización de codones) y suministrada como un ADN plasmídico pMA-T-CTx-Gene, siendo la cadena principal de este plásmido igual a la descrita anteriormente. Para construir el vector de molde pMRNA-CTx-mRNA, se implementó el kit de clonación Cold Fusion (SBI, EE. UU.). Brevemente, la secuencia génica del plásmido de ADN se amplificó mediante PCR con cebadores específicos, añadiendo los cebadores una extensión de 14 bases de homología a cada extremo de la secuencia génica. Estas 14 bases se diseñaron para que fueran homólogas a los extremos del vector linealizado producido por digestión del plásmido molde con un corte de endonucleasa de restricción en el sitio de multiclónación ubicado entre las UTR 5' y 3'. Para producir el vector de síntesis, el producto de PCR predicho se purificó mediante el kit de purificación de PCR (Qiagen, EE. UU.) y se incorporó al plásmido molde pMRNA después de una reacción de Cold Fusion (recombinación de homología) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Construcción de un molde que contiene secuencias de sitios de unión de miARN

50 Para la producción de secuencias de ARNm que comprenden secuencias de sitios de unión de miARN, para las cuales

se muestran ejemplos que usan miR-122 en la Figura 3, se analizan a continuación métodos ilustrativos para crear tres variantes. En la variante 1, se incluyen dos copias de la secuencia del sitio de unión de miARN entre el codón de parada y la posición +1 de la UTR 3'. En la variante 2, se incluyen dos copias de la secuencia del sitio de unión de miARN al principio o en el extremo 5' de la UTR 3', y en la variante 3, se incluyen dos copias de la secuencia del sitio de unión de miARN al final o en el extremo 3' de la UTR de 3'.

La Figura 4 muestra ejemplos de vectores de síntesis que comprenden estas tres variantes, utilizando como ejemplo la Proteína B, un gen de aproximadamente 1.400 pares de bases.

Variante 1

Como se muestra en la Figura 5, la secuencia de uno o más genes, flanqueada como en los métodos anteriores con una secuencia de Kozak y un codón de parada (TAA, TAG, TGA), y que además comprende dos copias de una secuencia del sitio de unión de miARN después del codón de parada, fue sintetizada por la empresa GeneArt (sin optimización de codones) y suministrada como un ADN plasmídico (ilustrado aquí nuevamente con Proteína A) pMAT- CTx-Gene, siendo la cadena principal de este plásmido igual a la descrita anteriormente. A continuación, esta secuencia se clonó en el plásmido molde para crear un vector de síntesis mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Variantes 2 y 3

La secuencia de uno o más genes, flanqueada como en los métodos anteriores con una secuencia de Kozak y un codón de parada (TAA, TAG, TGA), y que además comprende una UTR 3', que incluye dos copias de una secuencia del sitio de unión de miARN en el principio/extremo 5' de esta región (variante 2, como se muestra en la Figura 6) o al final/extremo 3' de esta región (variante 3, como se muestra en la Figura 7), fue sintetizada por la empresa GeneArt (sin optimización de codones) y suministrada como un ADN plasmídico pMAT-CTx-Gene, siendo la cadena principal de este plásmido igual a la descrita anteriormente. A continuación, esta secuencia se clonó en un plásmido molde para crear un vector de síntesis mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, modificado en el sentido de que se eligieron enzimas de restricción (aquí EcoRI y NotI) para eliminar la UTR 3' del vector molde, de modo que la UTR 3' de la secuencia de ADN suministrada estaría presente en el vector de síntesis final, ya que contenía las secuencias de sitios de unión de miARN.

Transcripción in vitro (IVT) de ARNm con síntesis de ARNm in vitro

Para realizar la IVT de ARNm con o sin UTR 3' modificadas con miARN, se utilizó el Kit de Síntesis de ARNm mRNAExpress™ disponible comercialmente. Los moldes de ADN para los vectores IVT se construyeron como se describe en los protocolos establecidos anteriormente. El procedimiento de síntesis de ARNm in vitro se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se añadió una cola de poliA a la secuencia de ADN mediante una reacción de PCR con cebadores 5' y 3' específicos (suministrados con el kit). Durante la transcripción in vitro, el ARNm sintetizado sobre el molde de ADN se protegió terminalmente con nucleótidos modificados (5-metilcitidina-5'-trifosfato) con análogos anti-protección terminal inversa (ARCA). Se incorporaron análogos de protección terminal, pseudouridina-5'-trifosfato y cola de poli-A a los ARNm transcritos in vitro para mejorar la estabilidad y reducir la respuesta inmunitaria de las células anfitrionas.

Síntesis de DMP^{CTX} y formulación de ARNm

La plataforma de suministro y modulación de Combined Therapeutics Formulation (DMP^{CTX}) es una nanopartícula multicomponente de mezcla de material ionizable tipo lípido C12-200, fosfolípido DOPE, colesterol y polietilenenglicol anclado a lípido C14-PEG-DSPE2000. Esta composición particular de DMP^{CTX} y razón de peso específico (10:1) de C12-200:ARNm y composición molar [%] de material tipo lípido, fosfolípido, colesterol y PEG (**Tabla 4**) fue optimizada y ha revelado una alta eficiencia de la formulación in vivo (Kauffman K.J., Nano Letter. 2015, 15, 7300-7306). Las estructuras químicas de estos componentes ilustrativos se muestran en la Figura 8.

Para sintetizar DMP^{CTX}, se preparó una solución etanólica (Mezcla A) de C12-200 (WuXi, China), como se muestra en la Figura 9A, fosfolípido DOPE (1,2-dioleil-snglicero-3-fosfoetanolamina) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EE. UU.), colesterol (Sigma, EE. UU.) y C14-PEG-DSPE2000 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EE. UU.) y se preparó una solución acuosa tamponada de ARNm (Mezcla B) en (citrato 10 mM, pH 4,5). Se mezclaron/combinaron tanto la Mezcla A etanólica como la Mezcla B acuosa a una razón de 3:1 utilizando bombas de jeringa y un dispositivo de chip microfluídico (Chen D, et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134 (16), 6948-6951). La solución alcohólica de ARNm nanoformulado del chip microfluídico se recogió en tubos de 1,5 ml.

Tabla 4

Compuesto	Razón en peso	Formulación Composición molar [%]
C12-200:ARNm	10:1	n/a
C12:200	n/a	35
DOPE		16
Colesterol		46,5
C14-PEG-DSPE200		2,5

Para eliminar el alcohol después de la formulación, la mezcla de DMP^{CTX}-ARNm se transfirió al Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer® G2 y se sometió a diálisis en PBS a temperatura ambiente sobre el agitador magnético durante 4 horas.

5 Posteriormente, el ARNm formulado utilizando una jeringa con agujas biseladas de 1 pulgada de calibre 18 se transfirió a nuevos tubos de 1,5 ml y se preparó para la caracterización.

10 Para calcular la eficacia de la encapsulación de ARNm, se utilizó el ensayo de ARN RiboGreen (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo de fabricación. La polidispersidad (PDI) y el tamaño de las nanopartículas lipídicas se midieron mediante dispersión de luz dinámica (ZetaPALS, Brookhaven, Instruments). La carga superficial de DMP^{CTX} (potencial zeta) se midió usando el mismo aparato. Se prepararon soluciones de secuencias de ARNm con y sin dos copias de una secuencia de miR-122 conectadas por un conector (SEQ ID NO: 2) e insertadas después del codón de parada de la secuencia codificante de ARNm a partir de una provisión de partida de 1,05 y 1 mg/ml, respectivamente. En la Tabla 5 se muestran ejemplos de parámetros después de la encapsulación de secuencias de ARNm que comprenden la secuencia mCherry (mCh), la secuencia de proteína A, una proteína humana de aproximadamente 25 kDa, incluido el tamaño, la eficacia de encapsulación y la polidispersidad de la plataforma de suministro y modulación de Combined Therapeutics (DMP^{CTX}). Se puede observar un diagrama ilustrativo de una partícula de suministro según DMP^{CTX} en la figura 9B.

Tabla 5

ARNm	Formulación	Conc. (ug/mL)	Eficacia de encapsulación (%)	Tamaño (nm)	Polidispersidad
Proteína A - 022	C12-200	202	78	93	0,12
US3 - 052		172	78	93	0,12
mCherry - 062		120	76	96	0,12

20 Expresión diferencial de construcciones de ARNm suministradas in vitro

Para investigar el potencial de la presente invención para transfectar con éxito células diana con ARNm de construcción y, posteriormente, impulsar la expresión diferencial en diferentes tipos de células, se utilizó la plataforma de ARNm DMP^{CTX}, modificada con sitios de unión de miARN-122, en un modelo de hepatocarcinoma de hígado.

Transfección de líneas celulares

25 Generación de imágenes por fluorescencia y cuantificación

Las transfecciones individuales de las líneas celulares de hepatocarcinoma de hígado humano HepG2 y Hep3B se realizaron de la siguiente manera: un día antes de la transfección, las células HepG2 y Hep3B se sembraron por separado en una placa de 12 pocillos a una densidad de $2,7 \times 10^5$ /pocillo, y 2×10^5 /pocillo (EMEM/FCS al 10%), respectivamente. Al día siguiente, las células se transfecaron con un control de vehículo de PBS solo, con 0,5 µg/pocillo de ARNm-mCherry-DMP^{CTX}, o con 0,5 µg/pocillo de ARNm-mCherry-122-DMP^{CTX} (la secuencia que comprende SEQ ID NO: 3). La transfección se llevó a cabo mediante la adición directa de ARNm-DMP^{CTX} al medio de cultivo en el pocillo, con una mezcla suave de las células cultivadas según fuera necesario.

35 Se realizaron transfecciones individuales de HMCPP5 (hepatocitos humanos en placas agrupados) de la siguiente manera: un día antes de la transfección, se sembraron células HMCPP5 en una placa de 12 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ /pocillo (WEM/Cóctel B). Al día siguiente, las células se transfecaron con un control de vehículo de DMP^{CTX} (PBS), con 0,5 µg/pocillo de ARNm-mCherry-DMP^{CTX}, o con 0,5 µg/pocillo de ARNm-mCherry-122-DMP^{CTX}. La transfección se llevó a cabo mediante la adición directa de ARNm-DMP^{CTX} al medio de cultivo en el pocillo, con una mezcla suave de las células cultivadas según fuera necesario. Durante la transfección de HMCPP5, el medio WEM/Cóctel B se complementó con FBS al 5%. La transfección se llevó a cabo de la manera descrita anteriormente para las células de cáncer de hígado. A las 24 horas de la transfección, el medio se cambió nuevamente a WEM/Cóctel B.

Para evaluar la actividad constitutiva y la expresión de miARN-122 en hepatocitos humanos sanos, se realizaron múltiples transfecciones de células HMCPP5 de la siguiente manera: las células HMCPP5 se sembraron y cultivaron como se indicó anteriormente y se transfecaron con ARNm-mCherry-DMP^{CTX}, o ARNm-mCherry-122-DMP^{CTX}, tres veces (MPT) en total, con un intervalo de 48 horas entre cada transfección. La transfección se llevó a cabo de la misma manera descrita para transfecciones individuales de HMCPP5, como se describe anteriormente.

Se realizaron transfecciones individuales de hepatocitos sanos de ratón (Aml12, ATCC, EE. UU.) de la siguiente manera: un día antes de la transfección, se sembraron células Aml12 en una placa de 12 pocillos a una densidad de 1×10^5 /pocillo. Al día siguiente, las células se transfecaron con un control de vehículo de DMP^{CTX} (PBS), con 0,5 µg/pocillo de ARNm-mCherry-DMP^{CTX}, o con 0,5 µg/pocillo de ARNm-mCherry-122-DMP^{CTX}. La transfección se llevó a cabo mediante la adición directa de ARNm-DMP^{CTX} al medio de cultivo en el pocillo, con una mezcla suave de las células cultivadas según fuera necesario.

Después de la transfección, se detectó la expresión de mCherry en las líneas celulares anteriores utilizando un sistema de generación de imágenes por fluorescencia (aplicación de EVOS® FL Imaging Systems). Se tomaron fotografías que mostraban la fluorescencia de mCherry 16, 24, 48, 72, 96 y 144 horas después de la transfección.

La cuantificación de la señal de fluorescencia de mCherry se realizó mediante soporte lógico de ImageJ (NIH, EE. UU.) de 3 campos aleatorios en placas de cultivo (ARNm-mCherry, ARNm-mCherry-122). Las Figuras 10B, 11 y 12B muestran los resultados de tales cuantificaciones. El recuento de píxeles de los pocillos transfectados con mCherry se fijó a 100% (fluorescencia de mCherry). La significación estadística se determinó utilizando la prueba *t* de Student. Los resultados se muestran como medias ± DT. La diferencia significativa se definió con un valor de *p* < 0,05. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre la fluorescencia de mCherry en células transfectadas con ARNm-mCherry, en comparación con las células transfectadas con ARNm-mCherry-122 (****, *p* < 0,0001, ***p* < 0,001, ***p* < 0,01, **p* < 0,05).

Ejemplo 1: Expresión génica específica de tumor mediante la regulación de miARN-122

El miARN-122 es un miARN abundante, específico del hígado, cuya expresión está significativamente disminuida en el hepatocarcinoma primario humano (HCC) y en líneas celulares derivadas de HCC, tales como Hep3B y HepG2. El objetivo de este estudio fue demostrar que la modificación de la región no traducida 3' (UTR) de una secuencia de ARNm mediante la inserción de secuencias dirigidas de miARN-122 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, como se ilustra en la variante 1, parte superior de la Figura 3) puede dar lugar a la represión de la traducción y/o a la desadenilación, seguida de la desprotección terminal del ARNm exógeno en los hepatocitos normales, pero no en las líneas celulares HCC sometidas a prueba.

Para examinar la actividad de miARN-122 endógeno en hepatocitos sanos, se transfecaron células HMCPP5 (hepatocitos humanos en placas agrupados, que son una mezcla de hepatocitos primarios en placas producidos al combinar células de 5 donantes individuales) con ARNm-mCherry o ARNm-mCherry-122 preparado según los protocolos generales anteriores, usando mCherry (proteína fluorescente roja) como gen de interés introducido y seguido de la expresión de mCherry (proteína fluorescente roja) a lo largo del tiempo. Como se ilustra en la Figura 10A, la expresión de mCherry (mCh) se analizó mediante microscopía de fluorescencia 48 horas después de la transfección. Durante todo el tiempo posterior a la transfección, se observó expresión de mCherry en células HMCPP5 transfecadas con ARNm-mCherry (es decir, sin la modificación UTR 3' para introducir una secuencia miR-122), lo que indica una transfección y traducción satisfactorias. Por el contrario, en los hepatocitos sanos, que se sabe que son positivos para miARN-122, la expresión de ARNm-mCherry-122 se reguló por disminución a niveles prácticamente indetectables comparables a los observados en las células de control no transfecadas, incluso 3 días después de la transfección. Esto indicó que la presencia de una secuencia dirigida de miARN-122 en ARNm-mCherry-122 insertada en 3' UTR (variante 1) impide la traducción del ARNm, muy probablemente debido a la represión de la traducción en las células receptoras.

La cuantificación de la señal de fluorescencia exhibida por estas células confirmó lo anterior. Como se muestra en la Figura 10B, la intensidad de la fluorescencia se redujo drásticamente en las células sanas transfecadas con ARNm-mCherry-122, en comparación con las transfecadas con ARNm-mCherry.

El resultado obtenido en el experimento anterior mostró que la expresión nativa de miARN-122 y la localización conjunta con una secuencia dirigida de miARN-122 (Variante 1) podría regular eficazmente la expresión de proteínas en hepatocitos sanos, aumentando así significativamente la expresión génica específica del tumor. En el siguiente experimento, se evaluó la expresión constitutiva y la actividad de miARN-122 en células HMCPP5. Las células HMCPP5 se transfecaron con ARNm-mCherry o ARNm-mCherry-122 tres veces en total, con un intervalo de 48 h cada vez. Seis días después de la primera transfección (es decir, 48 horas después de la última transfección) se determinó la expresión de mCherry mediante microscopía de fluorescencia. Como antes, mientras que las células transfecadas con la construcción ARNm-mCherry exhibieron una fluorescencia roja clara, las transfecadas con la construcción ARNm-mCherry-122 no lo hicieron. En la Figura 11, las comparaciones entre las células transfecadas con ARNm-mCherry-122 y aquellas transfecadas con ARNm-mCherry se muestran durante un período de cinco días después de la transfección final, tanto para células transfecadas individualmente (ST) como de forma múltiple (MPT). Se puede observar que las células transfecadas de forma múltiple exhiben la misma reducción drástica en la

intensidad de la fluorescencia cuando se transfecan con ARNm-mCherry-122 que las células transfectadas individualmente, durando el efecto más después de transfecciones múltiples. Como era de esperar, esto indica que el efecto de expresión diferencial impulsado por el mecanismo de control de miARN es resistente a los eventos de transfección repetidos, y que la cantidad de miARN-122 disponible dentro de las células para impulsar este mecanismo no se agota en estos períodos de tiempo.

Para examinar el efecto de la actividad de miARN-122 endógeno utilizando las líneas celulares de hepatocarcinoma Hep3B y hepatoblastoma HepG2 de hígado humano, se llevó a cabo un experimento similar al anterior. Las células se transfecaron con la secuencia de ARNm ARNm-mCherry, ARNm-mCherry-122 (Variante 1) o se sometieron a una transfección de control. Como anteriormente, después de 48 horas, se utilizó microscopía de fluorescencia para determinar la expresión de mCherry en las células Hep3B y HepG2 transfectadas, como se muestra en **Figura 10A**. En las células Hep3B (Figura 10A, columna central), la fluorescencia de mCherry se observó claramente en las líneas transfectadas con ARNm-mCherry y ARNm-mCherry-122, lo que indica que la represión de la traducción mediada por miARN-122 no está activa en estas células. En las células HepG2, la fluorescencia de mCherry se observó claramente en la línea transfectada con ARNm-mCherry, pero, aunque era evidente algo de fluorescencia en las células transfectadas con ARNm-mCherry-122, parecía estar solo parcialmente reducida y era significativamente mayor que la observada en los hepatocitos normales. Más evidencia de esto se muestra en **Figura 10B**, donde la cuantificación de la fluorescencia de mCherry en líneas transfectadas con ARNm-mCherry-122 indica que no se muestra reducción de la fluorescencia en las células Hep3B, pero se observa una reducción de alrededor de 50% en las células HepG2.

La regulación por disminución parcial observada en las células HepG2 implica adicionalmente efectos mediados por miARN-122 sobre la traducción, ya que se ha demostrado que las células de esta línea retienen la actividad residual de miARN-122 (Demonstration of the Presence of the "deleted" MIR122 gene in HepG2 Cells, PLoS One. 2015; 10(3)).

El miARN-122 está fuertemente conservado entre las especies de vertebrados y, como en el ser humano, un nivel reducido de miARN-122 está asociado con el carcinoma hepatocelular en ratones (Kutay et al, 2006). Por lo tanto, se examinó el efecto endógeno de la actividad de miARN-122, utilizando la línea celular Aml12 de hepatocitos sanos de ratón.

También se transfectaron hepatocitos de ratones sanos con las secuencias de ARNm-Cherry descritas anteriormente, es decir, ARNm-mCherry o ARNm-mCherry-122, encapsuladas en DMP^{CTx}. Se observó un impacto similar de la inserción de la secuencia del sitio de unión de miARN-122 sobre la fluorescencia de mCherry a las 24 y 72 horas de la transfección.

Como se muestra en la Figura 12A, se observó fluorescencia después de la transfección con ARNm-mCherry. Se mostró una marcada reducción en la fluorescencia después de la transfección con ARNm-mCherry-122, aunque todavía se podía ver alguna señal.

La cuantificación de la fluorescencia de mCherry 24 y 72 h después de la transfección se realizó a partir de 3 campos aleatorios en placas de cultivo de cada grupo de tratamiento (Figura 12B) y mostró que cuando se transfeció con ARNm-mCherry-122, se observaba más de 70% de represión de la traducción.

Como conclusión preliminar, el Ejemplo anterior muestra que las características de doble direccionamiento del sistema de suministro de nanopartículas y la inclusión de la secuencia diana de miARN-122 en la construcción de ARNm son suficientes para obtener una expresión diferencial bastante significativa de un producto proteico en células de hepatocarcinoma y hepatoblastoma en comparación con los hepatocitos sanos. La observación de expresión diferencial fue evidente tanto en líneas celulares humanas como de ratón.

Ejemplo 2: Nivel de expresión de proteína después de la expresión génica específica de tumor

En otro experimento, se empleó la transferencia Western para determinar el nivel de expresión de proteína mostrado finalmente después de la transfección de la siguiente manera.

Transfección de líneas celulares e inmunotransferencia - proteína A

Para evaluar el nivel de expresión específico del tumor de una proteína humana ilustrativa de 25 kDa (denominada "proteína A"), se sembraron células de cáncer de hígado (HepG2 y Hep3B) y hepatocitos sanos (HMCPP5) en placas de 12 pocillos y se transfectaron con 0,5 µg/pocillo de ARNm nanoformulado que expresa proteína A humana, 25 kDa (ARNm-A-DMP^{CTx}) o ARNm que expresa proteína A humana (una proteína humana de aproximadamente 25 kDa) que comprende dos secuencias de unión de miARN122 en la UTR 3' (SEQ ID NO: 2), Variante 1 (ARNm-A-miARN122-DMP^{CTx}), como se describe anteriormente en el Ejemplo 1 para la transfección de mCherry. A las 24 horas de la transfección, se realizó inmunotransferencia después de la extracción de proteína total.

Para la inmunotransferencia, se retiraron los medios de cultivo, las células se lavaron con PBS frío (Cellgro) y los sedimentos celulares se lisaron en tampón RIPA (ensayo de radioinmunoprecipitación) (Boston Bioproducts) con un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma). La concentración de proteína se determinó por ensayo colorimétrico de Bradford. Se separó un total de 10 mg de proteína por medio de mini geles Novex™ (ThermoFisher Scientific) al 4-12% y se transfirieron a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) mediante electrotransferencia (iBlot® 2 Gel

Transfer Device, Invitrogen). Despues del bloqueo con leche desnatada en polvo al 5% en TBS-Tween 20 (Boston Bioproducts), las membranas se incubaron a 4°C durante la noche con anticuerpos anti-proteína A (1:2000, Abcam) o β-actina (Cell Signaling), seguido de incubación con anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo conjugados con HRP (peroxidasa de rábano picante) apropiados (1:10000; Abcam) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos de proteína-anticuerpo se visualizaron y se generaron imágenes utilizando Clarity™ Western ECL Substrate (Bio Rad) y LI-COR® System (LI-COR), respectivamente.

Los resultados de lo anterior se pueden observar en la Figura 13, mostrándose las siguientes construcciones de transfección encapsuladas en DMP^{CTx}:

Calles 1, 4 y 7 de la Figura 13: vehículo (tratado simulado, solo PBS),

10 Calles 2, 5 y 8 de la Figura 13: ARNm-A (ARNm que comprende la secuencia de la proteína A), y

Calles 3, 6 y 9 de la Figura 13: construcciones ARNm-A-122 (que comprenden la secuencia para la proteína A y miARN122, insertadas en la posición de la variante 1, como se ilustra en la Figura 3).

La transfección se llevó a cabo en hepatocitos sanos (HMCPP5) en las calles 1-3, modelo de hepatocarcinoma Hep3B en las calles 7 a 9 y células del modelo de hepatoblastoma HepG2 en las calles 4 a 6 como se describe anteriormente, utilizando 0,5 µg de ARNm-DMP^{CTx} por pocillo. La proteína se extrajo de cada línea celular 24 horas después de la transfección. Se cargaron 10 µg de proteína en cada calle y se tomaron datos de dos experimentos independientes. La proteína A se detectó en todas las líneas celulares probadas cuando se transfecaron con ARNm-A, lo que indica que se logró una transfección satisfactoria. Mientras se transfecaba con ARNm-A-122, la represión de la traducción se observó solo en hepatocitos sanos, pero no en células Hep3B y HepG2 (calles 3, 6 y 9), lo que indica que el miARN-122 no cumple su función en las células de cáncer de hígado probadas. Sin embargo, para las células HepG2 transfecadas con ARNm-A-122, la expresión de la proteína A se reguló ligeramente por disminución en comparación con las células transfecadas con ARNm-A, similar al patrón observado previamente para la expresión de mCherry, en el Ejemplo 1. Esto se puede observar claramente en las Fotografías de exposición mejorada (abajo) que muestran una regulación por disminución incompleta en las células HepG2. La regulación por disminución parcial observada en las células HepG2 implica adicionalmente los efectos mediados por miARN-122 sobre la traducción, ya que se ha demostrado que las células de esta línea retienen la actividad residual de miARN-122 (Demonstration of the Presence of the "deleted" MIR122 gene in HepG2 Cells, PLoS One. 2015; 10(3)).

En resumen, la modificación del ARNm de la UTR 3' mediante la inserción de la secuencia diana de miARN-122 específica de hígado puede confinar significativamente la traducción del ARNm en hepatocarcinoma Hep3B y en hepatoblastoma HepG2, pero no en hepatocitos humanos normales.

Ejemplo 3: Terapia combinada viral oncolítica *in vitro*

En el presente documento se describe que la expresión diferencial de las construcciones de ARNm proporcionadas permitidas por el método de la invención, y que se muestra en los Ejemplos anteriores, puede usarse combinada con la terapia viral oncolítica. En particular, cuando los virus oncolíticos se han modificado para eliminar genes de virulencia, atenuando su capacidad de replicación en células sanas, la invención puede usarse para restaurar la función de esos genes, o equivalentes de los mismos, en células enfermas tales como las células cancerosas. Para investigar esta posibilidad, se utilizó la combinación del virus oncolítico HSV-1 (R7041), con deficiencia de US3 (véase Leopardi et al, 1997, PNAS 94; 7891-7896), y la plataforma DMP^{CTx}, que proporciona una construcción de ARNm que codifica US3, y se modificó con sitios de unión de miARN-122, en un modelo de hepatocarcinoma de hígado (SEQ ID NO: 4).

40 Protocolos Generales:

Cultivo celular

Se cultivaron células HepG2 y Hep3B de hepatocarcinoma de hígado humano (HCC) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Cellgro, EE. UU.), FBS al 10%, estreptomicina (100 µg/mL) y penicilina (100 U/mL-1) como monocapas, a 37°C y en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células HepG2 se hicieron crecer sobre placas recubiertas de colágeno a una concentración de colágeno de 5 µg/cm².

Preparación de virus

El virus R7041 congelado se descongeló en un baño de agua a 37°C y se sometió a sonicación durante 30 segundos usando un sonicador de baño (Sonicador Q500, Qsonica, EE. UU.), a continuación, se transfirió a hielo, listo para su uso.

Toxicidad de R7041 solo contra HCC humano

50 Se cree que el virus mutante US3 R7041 es prácticamente apatógeno para las células sanas (Leopardi et al. 1997) e incluso ha demostrado una buena seguridad en ratones inmunodeficientes y atípicos (Liu et al. 2007, Clin Cancer Res 2007;13(19)). Para establecer una línea de base de la eficacia del virus R7041 contra las células de hepatocarcinoma de hígado, las líneas celulares modelo se trataron solo con virus oncolítico. Se sembraron células de las líneas Hep3B y HepG2, por triplicado, en placas de 96 pocillos, a razón de 15.000 y 17.000 por pocillo, respectivamente.

A las 24 horas, las células se infectaron con diluciones en serie 1:3 de virus, de MOI 0,37 a 0,0001694. A las 96 horas de la infección, se midió la viabilidad de las líneas celulares probadas mediante el ensayo MTS de acuerdo con las instrucciones del proveedor (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, EE. UU.). La absorbancia se midió a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos (BioTek, Cytation 3, EE. UU.). Las curvas dosis-5 respuesta y los valores de dosis eficaz al 50% (DE_{50}) se obtuvieron usando GraphPad Prism, 7.03.

Como se muestra en la Figura 14, las líneas celulares Hep3B y HepG2 exhibieron una susceptibilidad similar a R7041, con $DE_{50}=0,01$ y MOI de 0,02, respectivamente. Sin embargo, se observó que las líneas celulares Hep3B eran ligeramente más susceptibles a R7041 que las células HepG2.

Efecto combinatorio de R7041 y de ARNm-DMP^{CTx} sobre la viabilidad de HCC humano

10 Antes de la evaluación del efecto combinatorio del virus R7041 y ARNm-US3-DMP^{CTx} sobre células de hepatocarcinoma humano, los autores de la presente invención verificaron que la transfección de células Hep3B y HepG2 con ARNm-US3-DMP^{CTx} a 0,04 µg/mL de ARNm-US3 no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad celular, según lo medido por el ensayo MTS.

15 Se sembraron células Hep3B y HepG2 por triplicado en placas de 96 pocillos a razón de 15.000 y 17.000 por pocillo, respectivamente. A las 24 horas, las células se infectaron con diluciones en serie 1:3 de virus, comenzando desde MOI 0,37 hasta 0,0001694. Ambas líneas celulares probadas se transfecaron dos veces con una dosis fija de 0,04 µg/mL de ARNm-US3-DMP^{CTx}, 24 y 48 horas después de la infección con R7041, de acuerdo con la línea de tiempo del experimento como se muestra en la Figura 15. Tres días después de la transfección, se midió la viabilidad de las líneas celulares probadas mediante el ensayo MTS como se describe anteriormente. Para ambos HCC humanos probados, la combinación de dos compuestos diferentes: un R7041 oncolítico y una dosis no tóxica de ARNm-US3-DMP^{CTx} (0,04 µg/mL) mejoró significativamente la destrucción tumoral a títulos virales más bajos, como se muestra en la Figura 16. En esta figura, se muestra el efecto sobre la viabilidad para ARNm-US3-DMP^{CTx} solo a 0,04 µg/mL (cruce del eje y), para R7041 solo a varias diluciones (triángulos/rombos de color gris) y para la combinación (círculos de color negro).

20 Los Ejemplos anteriores indican que la combinación de un virus oncolítico atenuado con genes de virulencia suprimidos y un suministro de reemplazos expresados diferencialmente para los genes suprimidos puede aumentar significativamente la eficacia de la terapia viral oncolítica *in vitro*. En particular, se observaron mayores efectos a títulos virales más bajos cuando se combinaron con la composición proporcionada.

Ejemplo 4: Expresión de construcciones de ARNm de mCherry de proteína fluorescente suministradas in vivo

30 Con el fin de determinar la aplicabilidad de la invención para enfoques *in vivo*, se utilizó un modelo de ratón de carcinoma hepatocelular humano ortotópico. Se ha demostrado anteriormente que la expresión diferencial impulsada por los sitios de unión de miARN-122 (véase el Ejemplo 1) es aplicable en células hepáticas Aml12 de ratón sanas *in vitro*.

Modelo ortotópico de carcinoma hepatocelular humano (CHC)

Animales

35 Se adquirieron ratones hembra (CB17/lcs-PrkdcSCID/lcrIcoCrl) Fox Chase SCID de 6-8 semanas de edad en Charles River, Reino Unido. Todos los procedimientos *in vivo* fueron aprobados por el Subcomité de Cuidado de Animales de Investigación, en CrownBio en el Reino Unido.

Células

40 Para generar un modelo de HCC ortotópico, se utilizó una variante bioluminiscente de la línea celular humana Hep3B que expresa luciferasa de luciérnaga (Hep3B-cLuX). Las células se cultivaron en medio EMEM (Sigma, Reino Unido) complementado con FBS inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM, NEAA al 1%; las células se trataron semanalmente con 2 µg/ml de puromicina (Sigma).

Inyección intrahepática y control del crecimiento tumoral

45 Bajo anestesia, se inyectaron células humanas Hep3B-cLuX (2×10^6) suspendidas en 20 µL de PBS:Matrikel™ 1:1 en el lóbulo superior izquierdo del hígado con una aguja 29G. El lugar de la inyección se cubrió con una esponja de gelatina absorbible (AGS), el hígado se volvió a colocar en la cavidad abdominal sin perturbar la AGS y la piel se cerró con suturas. El crecimiento tumoral se comprobó dos veces por semana mediante imágenes bioluminiscentes (BLI).

50 Brevemente, los ratones se anestesiaron y se inyectaron 150 mg/kg de D-luciferina por vía subcutánea 15 minutos antes de la generación de imágenes. La imagen BLI se capturó y procesó con el soporte lógico Living Image 4.3.1 (Caliper LS, EE. UU.). Los ratones se pesaron tres veces por semana o una vez por semana antes de la dosificación. En los días indicados, los ratones fueron sacrificados y los hígados fueron fijados con solución de paraformaldehído (PFA) al 2 o 4%, antes de ser congelados en OCT (compuesto de temperatura de corte óptima - medio de inclusión) para su posterior análisis histopatológico.

Formulación de ARNm y evaluación de la eficacia del direccionamiento tumoral

Las secuencias de ARNm que comprendían la secuencia de mCherry y la secuencia de mCherry que comprende miARN-122 (SEQ ID NO: 3) se formularon como se describe anteriormente en el párrafo 'Síntesis de DMP^{CTX} y formulación de ARNm', y en la Tabla 4. Para evaluar el direccionamiento selectivo de tumores y la conservación de células hepáticas no enfermas, se inyectó ARNm formulado en la vena de la cola de ratones portadores de cáncer de hígado ortotópico. Brevemente, se inyectaron 2×10^6 células Hep3B-cLuX humanas suspendidas en 20 µL de PBS:Matrigel™ 1:1 en el lóbulo superior izquierdo del hígado como se describió anteriormente. A continuación, se controló el crecimiento del tumor mediante generación de imágenes BLI, también como anteriormente. Ocho días después, cuando se estableció el tumor ($BLI \geq 6 \times 10^6$), se inyectaron 20 µg de ARNm-mCherry-DMP^{CTX}, ARNm-mCherry-122-DMP^{CTX} o ARNm-A-122-DMP^{CTX} formulados por ratón a través de la vena de la cola, lo que llevó a que las partículas de suministro fueran llevadas al hígado mediante el flujo sanguíneo de retorno. Veinticuatro horas después, se realizó la última BLI, se sacrificaron los ratones y se extirparon los hígados y se generaron imágenes mediante BLI *ex-vivo* en las lesiones hepáticas localizadas.

Histología

Brevemente, después de la generación de imágenes *ex vivo*, se extirparon los lóbulos hepáticos izquierdos con tumor, se fijaron con PFA al 2%, se sumergieron en solución de sacarosa al 30% (en PBS; pH 7,4) a 4°C, se incluyeron en OCT y se congelaron en isopentano preenfriado con baño de hielo seco, y a continuación, se almacenaron a -80°C. Secciones congeladas de 5 µm (Leica CM300, EE. UU.) se sometieron a tinción de contraste nuclear con DAPI (VECTASHIELD, Vector Laboratories, EE. UU.) o tinción H&E (hematoxilina y eosina). El direccionamiento al tumor se evaluó mediante la determinación del nivel de expresión de mCherry frente a mCherry-122 en el tumor y en el hígado sano mediante microscopía de fluorescencia y/o soporte lógico. El tejido tumoral y sano se determinó mediante tinción con H&E.

Un ejemplo de crecimiento tumoral controlado por generación de imágenes por BLI en ratones tratados de manera simulada y con ARNm-mCherry-DMP^{CTX} y ARNm-mCherry-122-DMP^{CTX}. A los animales se les inyectó por vía subcutánea D-luciferina y se tomaron imágenes 15 minutos después. La señal estaba presente en la sección media de los animales solo como se muestra en la Figura 17 (A) (panel superior), los animales que se muestran son antes del tratamiento con las composiciones. Se diseccionaron todos los animales con intensidades similares en la sección media y se tomaron imágenes de los hígados *ex-vivo*, Figura 17 (A) (panel inferior). El lóbulo izquierdo del hígado con tumor se seccionó y se sometió a tinción de contraste con DAPI. Se usó microscopía de fluorescencia para determinar la expresión de mCherry en células hepáticas sanas y en células tumorales hepáticas, 24 horas después de la inyección de ARNm formulado, como se muestra en la Figura 17 (B). La fluorescencia de mCherry se detectó en hepatocitos sanos cuando los ratones fueron tratados con ARNm-mCherry-DMP^{CTX} (Figura 17B, panel central). Cuando se trata con ARNm-mCherry-122-DMP^{CTX} (Variante 1), se observó represión de la traducción (Figura 17B, panel izquierdo). La Figura 17B muestra células hepáticas sanas (de izquierda a derecha), de ratones tratados de forma simulada, con ARNm-mCherry-DMP^{CTX} y ARNm-mCherry-122-DMP^{CTX}.

En conclusión, las composiciones de la invención se pueden administrar *in vivo* y pueden transfectar con éxito células hepáticas elegidas como diana. Cuando se modifica con sitios de unión de miARN, se puede lograr una expresión diferencial en células tumorales y no enfermas.

Ejemplo 5: Expresión diferencial de la construcción de ARNm de US3 suministrada *in vivo* entre tejido no enfermo y enfermo en el hígado

El modelo de ratón *in vivo* descrito en el Ejemplo 4 se aplicó a la administración de una composición de partículas de suministro que comprendía una construcción de ARNm de US3 DMP^{CTX} miARN-122. La expresión diferencial de US3 en los hígados de ratones que contenían cáncer humano Hep3B se analizó usando inmunohistoquímica con un anticuerpo polyclonal anti US3. Los resultados se muestran en la Figura 18, donde se puede ver que hay una diferencia visible en los niveles de proteína US3 entre el tumor (tinción más oscura) y las células no enfermas (tinción más clara). La expresión diferencial rastrea el límite del tumor, verificado de forma independiente por un patólogo. Se puede concluir, por lo tanto, que las composiciones de la invención pueden impulsar con éxito la expresión diferencial de un potencial factor potenciador terapéutico *in vivo* en un sujeto mamífero.

Inmunohistoquímica

Se cortaron secciones congeladas de nueva aportación a 5 µm (micras) y se secaron al aire durante aproximadamente una hora antes de la fijación con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente (RT) durante 15 minutos. Las secciones se lavaron con agua corriente del grifo y se transfirieron a PBS-Tween al 0,1%. Las secciones se incubaron con suero de caballo normal al 2,5% (listo para su uso, kit de detección de polímero, peroxidasa anti-IgG de conejo con HRP ImmPRESS, Vector MP-7401) durante 20 minutos. Los portaobjetos se drenaron y se incubaron con anticuerpo primario contra US3 diluido 1:400 (Acris AP55266SU-N). Los anticuerpos se diluyeron con PBS-Tween al 0,1% y se incluyeron controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario y los portaobjetos se incubaron con el diluyente de anticuerpos PBS-Tween al 0,1% durante una hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con PBS-Tween al 0,1% y la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 0,3% diluido con agua de Elga durante 10 minutos. Los portaobjetos se lavaron con PBS-Tween al 0,1% y se incubaron con reactivo

5 ImmPress anti-IgG de conejo (listo para su uso, kit de detección de polímero, peroxidasa anti-IgG de conejo con HRP ImmPRESS, Vector MP-7401) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con PBS-Tween al 0,1% y se incubaron durante 5 minutos con el cromógeno ImmPACT DAB (ImmPACT DAB Peroxidase (HRP) Substrate, Vector SK-4105), a continuación, se lavaron con agua de Elga y se sometieron a tinción de contraste según correspondiera con hematoxilina de Mayer. Se llevó a cabo un lavado adicional en agua de Elga brevemente y azul en agua corriente del grifo durante 5 minutos. Los portaobjetos se deshidrataron, aclararon y montaron (IMS al 95%, IMS al 99%x2 y xileno x2) y a continuación, se cubrieron con un cubreobjetos.

10 Aunque en el presente documento se han divulgado en detalle realizaciones particulares de la invención, esto se ha hecho a modo de ejemplo y únicamente con fines ilustrativos. No se pretende que las realizaciones antes mencionadas sean limitantes con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas, que siguen. Los autores de la presente invención contemplan que se pueden realizar diversas sustituciones, alteraciones y modificaciones en la invención sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ARNm aislada para la expresión de polipéptidos dentro de un órgano diana, comprendiendo la secuencia:

- al menos una secuencia codificante que codifica el polipéptido;
- 5 al menos una secuencia de la primera región no traducida (UTR);
- al menos tres secuencias de sitios de unión de micro-ARN (miARN) diferentes

en donde las al menos tres secuencias de sitios de unión de miARN diferentes están ubicadas dentro, inmediatamente 5' con respecto a, o inmediatamente 3' con respecto a, la primera secuencia UTR; y

10 en donde las al menos tres secuencias del sitios de unión de miARN diferentes permiten la expresión diferencial de la secuencia codificante en diferentes tipos de células dentro del órgano diana; en donde el polipéptido comprende un factor de virulencia viral oncolítico.

2. Una secuencia de ARNm aislada según la reivindicación 1, en donde la secuencia de ARNm:

- i) comprende más de tres, típicamente más de cuatro secuencias de sitios de unión; y/o
- ii) el ARNm comprende una pluralidad de secuencias codificantes.

15 3. Una secuencia de ARNm aislada según la reivindicación 1 o 2, en donde:

- i) el primer y segundo tipos de células son selecciones diferentes del grupo que comprende células no neoplásicas, un fenotipo de células transformadas; un fenotipo precanceroso; y un fenotipo neoplásico; y/o
- ii) el órgano diana comprende un primer y un segundo tipo de células que presentan diferentes patrones de expresión de miARN; y/o

20 iii) el órgano diana se selecciona del grupo que consiste en: hígado; cerebro; pulmón; mama; y páncreas.

4. Una composición de ARNm aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las secuencias de sitios de unión de micro-ARN (miARN) comprenden una o más secuencias de sitios de unión de miARN-122.

5. Una composición para la expresión de polipéptidos dentro de un órgano diana, comprendiendo la composición:

una partícula de suministro; y

25 6. Una composición según la reivindicación 5:

- i) en donde la partícula de suministro comprende lipidoides de aminoalcohol; y/o
- ii) en donde la secuencia de ARNm está encapsulada por la partícula de suministro.

30 7. Una composición según la reivindicación 4 o 5, en donde la partícula de suministro se dirige hacia el órgano diana, preferiblemente en donde:

la partícula de suministro comprende un agente de direccionamiento seleccionado entre: proteínas, péptidos, carbohidratos, glicoproteínas, lípidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos; y

en donde los agentes de direccionamiento se asocian preferentemente con células en el órgano diana.

35 8. Una composición para su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto;

comprendiendo la composición:

una partícula de suministro; y

al menos una secuencia de ARNm complejada, encapsulada o asociada de otro modo con la partícula de suministro, comprendiendo la secuencia de ARNm:

40 una secuencia codificante que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido comprende un factor potenciador terapéutico;

al menos una secuencia de la primera región no traducida (UTR);

- al menos dos secuencias de sitios de unión de micro-ARN (miARN);
- en donde las al menos dos secuencias de sitios de unión de miARN están ubicadas dentro, inmediatamente 5' con respecto a, o inmediatamente 3' con respecto a, la primera secuencia UTR; y
- 5 en donde al menos dos secuencias de sitios de unión de miARN proporcionan expresión diferencial de la secuencia codificante entre el primer y el segundo tipo de células comprendidas dentro del órgano diana
- en donde el método comprende adicionalmente administrar terapia viral oncolítica al sujeto.
- 10 9. Una composición para su uso según la reivindicación 8, en donde la partícula de suministro comprende: compuestos lipidoides de aminoalcohol, ácido poliláctico (PLA), ácido polí(láctico-co-glicólico) (PLGA), una partícula basada en lípidos o fosfolípidos; proteínas y/o glicoproteínas seleccionadas entre colágeno, albúmina, gelatina, elastina, gliadina, queratina, legumina, zeína, proteínas de soja o proteínas de leche; una partícula basada en metales o compuestos metálicos tales como óxidos de oro, plata, aluminio o cobre; un polímero que comprende polietilenimina; o celulosa, quitina o quitosano.
- 15 10. Una composición para su uso según la reivindicación 8 o 9, en donde:
- i) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hígado, cerebro, pulmón, mama o páncreas;
 - ii) el cáncer es cáncer de hígado;
 - iii) el cáncer es un cáncer de hígado primario;
 - iv) el cáncer es un cáncer de hígado secundario;
 - v) el cáncer es un cáncer de hígado primario seleccionado del grupo que consiste en: un hepatocarcinoma; un hepatoblastoma; un colangiocarcinoma; y un angiosarcoma.
- 20 vi) el cáncer es un cáncer de hígado metastásico secundario de un tumor sólido primario conocido o desconocido.
11. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde:
- i) la secuencia de ARNm codifica un agente terapéutico que aumenta la eficacia del virus oncolítico; y/o
 - ii) el virus oncolítico ha sido atenuado por mutación de uno o más genes de virulencia, preferiblemente en donde la secuencia de ARNm codifica uno o más genes de virulencia, o un equivalente u homólogo de los mismos; y/o
 - 25 iii) el virus oncolítico se selecciona entre cualquiera de los Grupos I - VII de la clasificación de virus de Baltimore; y/o
 - iv) el virus oncolítico se selecciona del grupo que comprende uno o más de: Virus de la Estomatitis Vesicular, virus Maraba, virus de la Polio, Reovirus, virus del Sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Coxsackie A21, Parvovirus, Virus del Herpes Simple Tipo 1 y Adenovirus.
- 30 12. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde:
- i) el virus oncolítico es un Virus del Herpes Simple, preferiblemente en donde la secuencia codificante codifica US3, más preferiblemente en donde la secuencia de ARNm comprende SEQ ID NO: 4; y/o
 - ii) el virus oncolítico es un Virus del Herpes Simple, preferiblemente en donde la secuencia codificante codifica ICP6, más preferiblemente en donde la secuencia de ARNm comprende SEQ ID NO: 5.

Figura 1

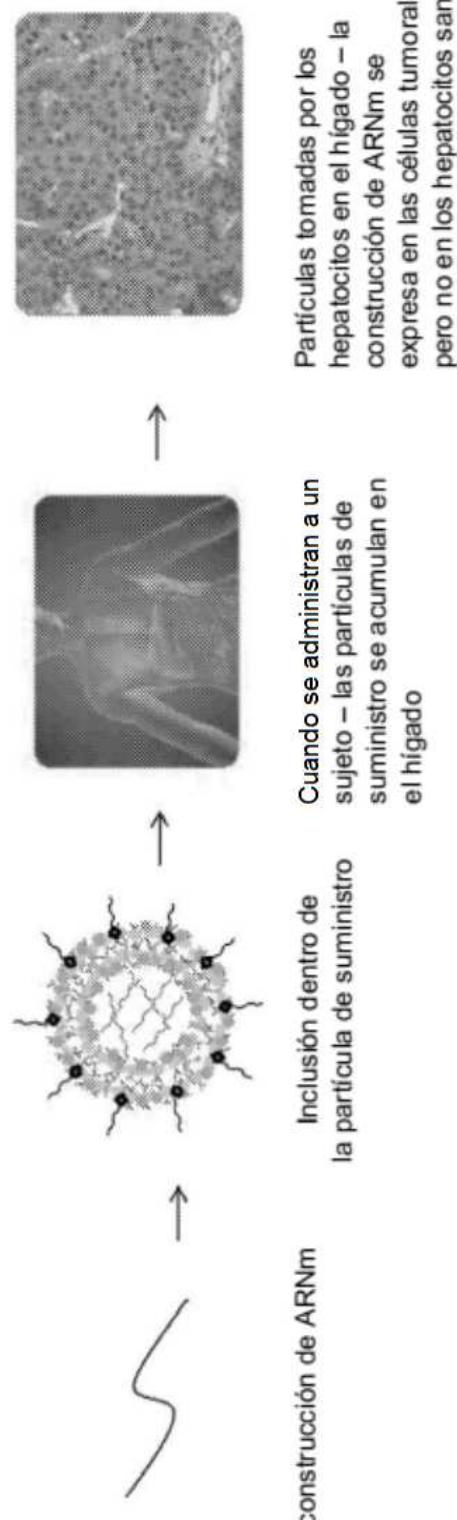


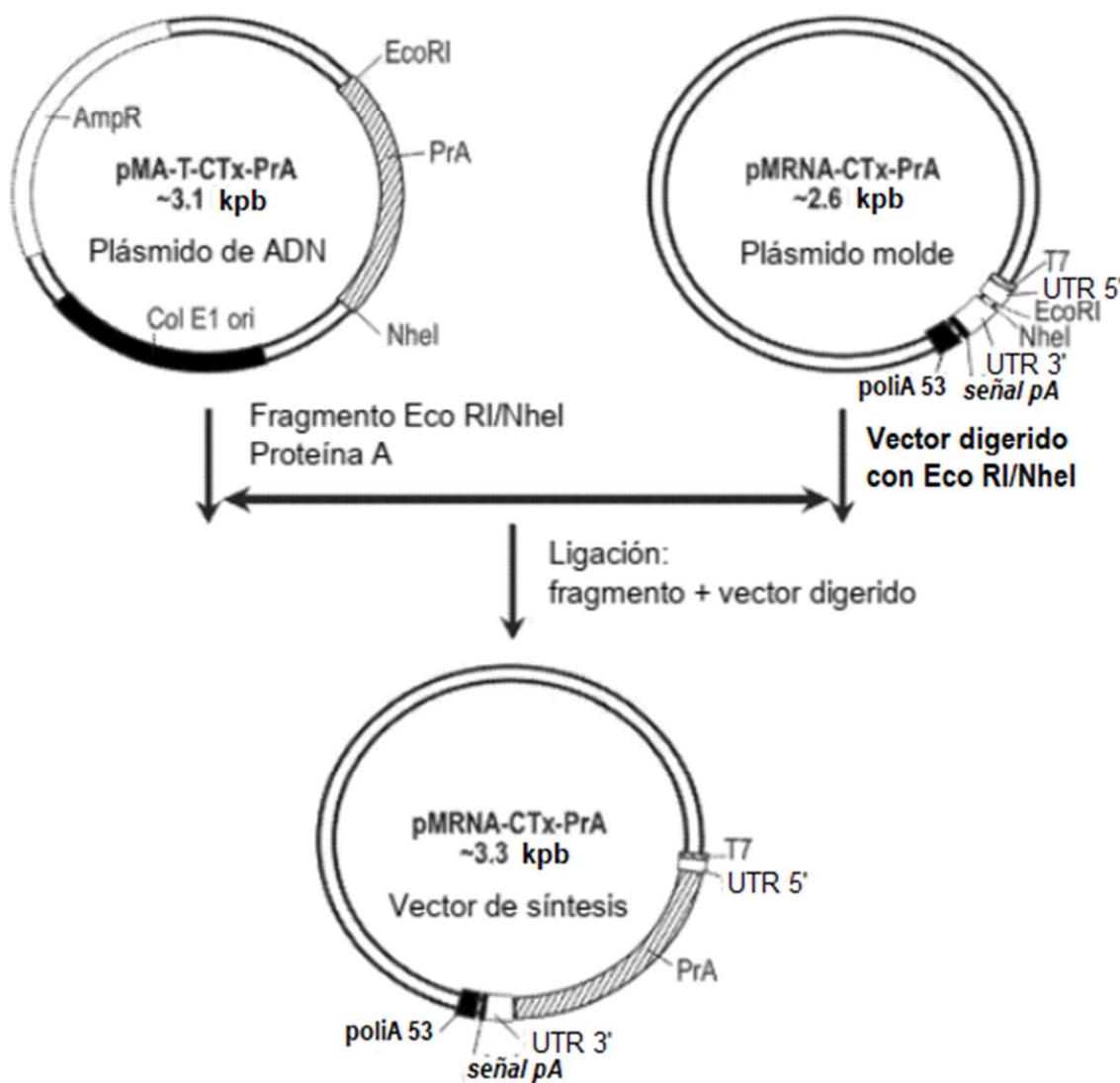
Figura 2

Figura 3

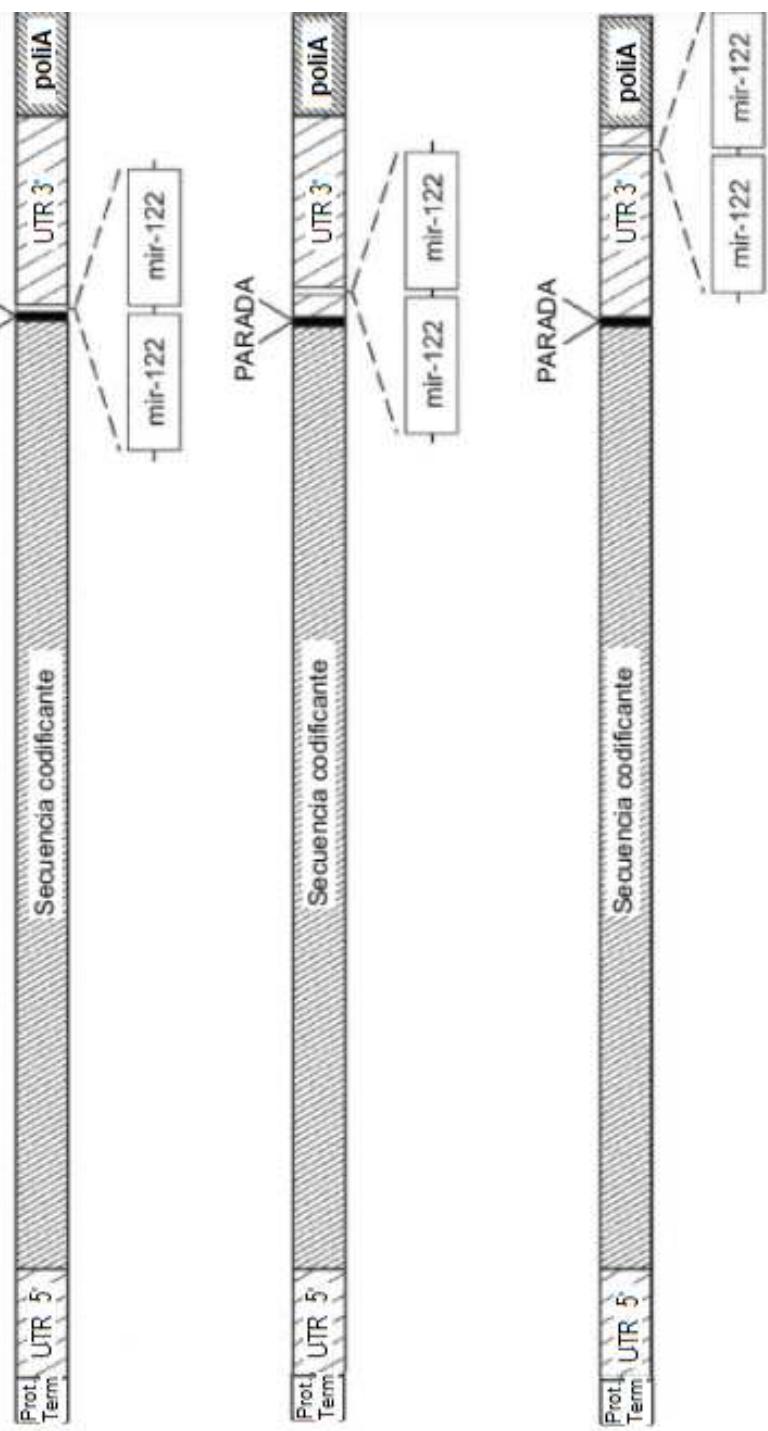


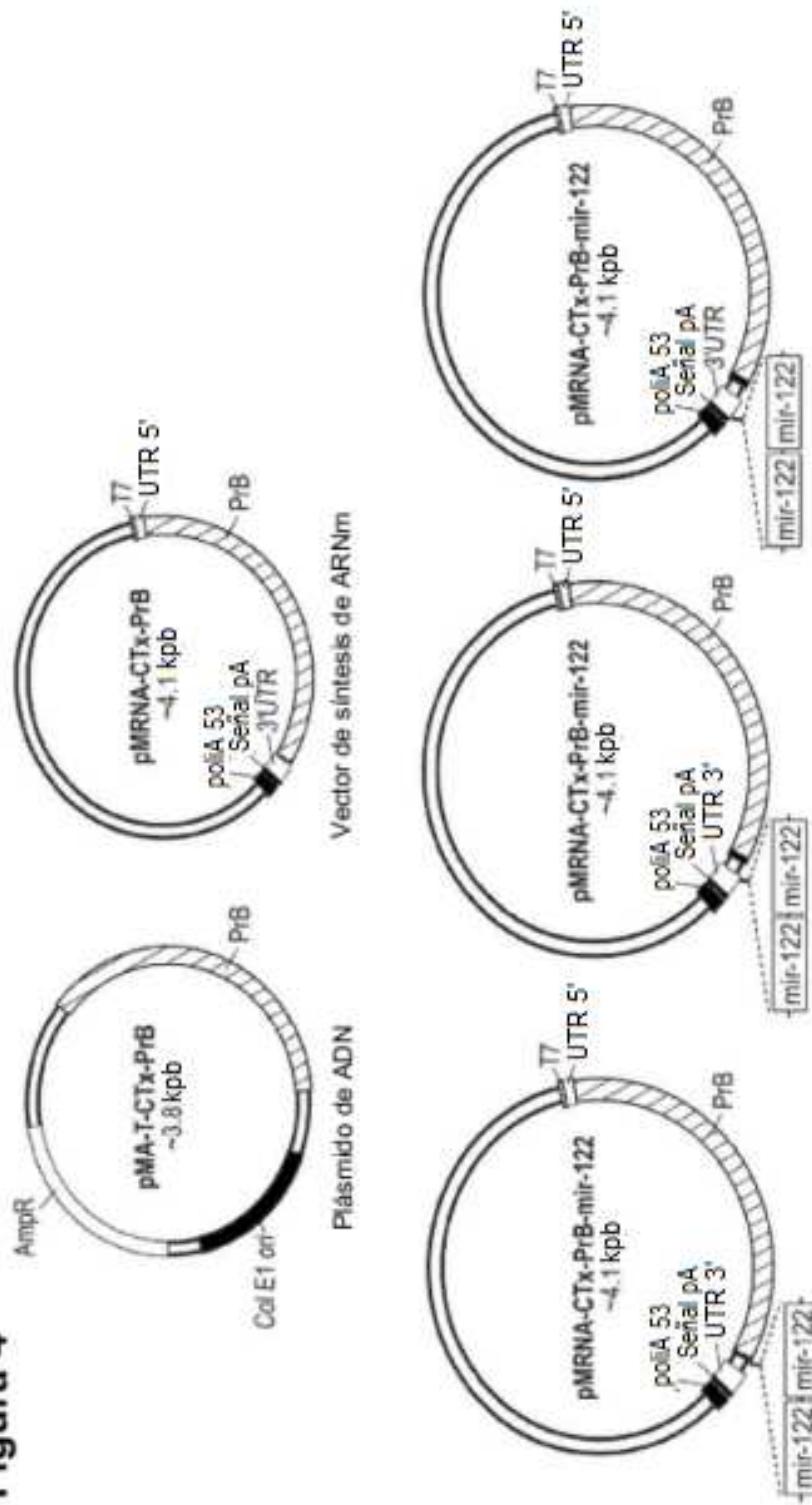
Figura 4

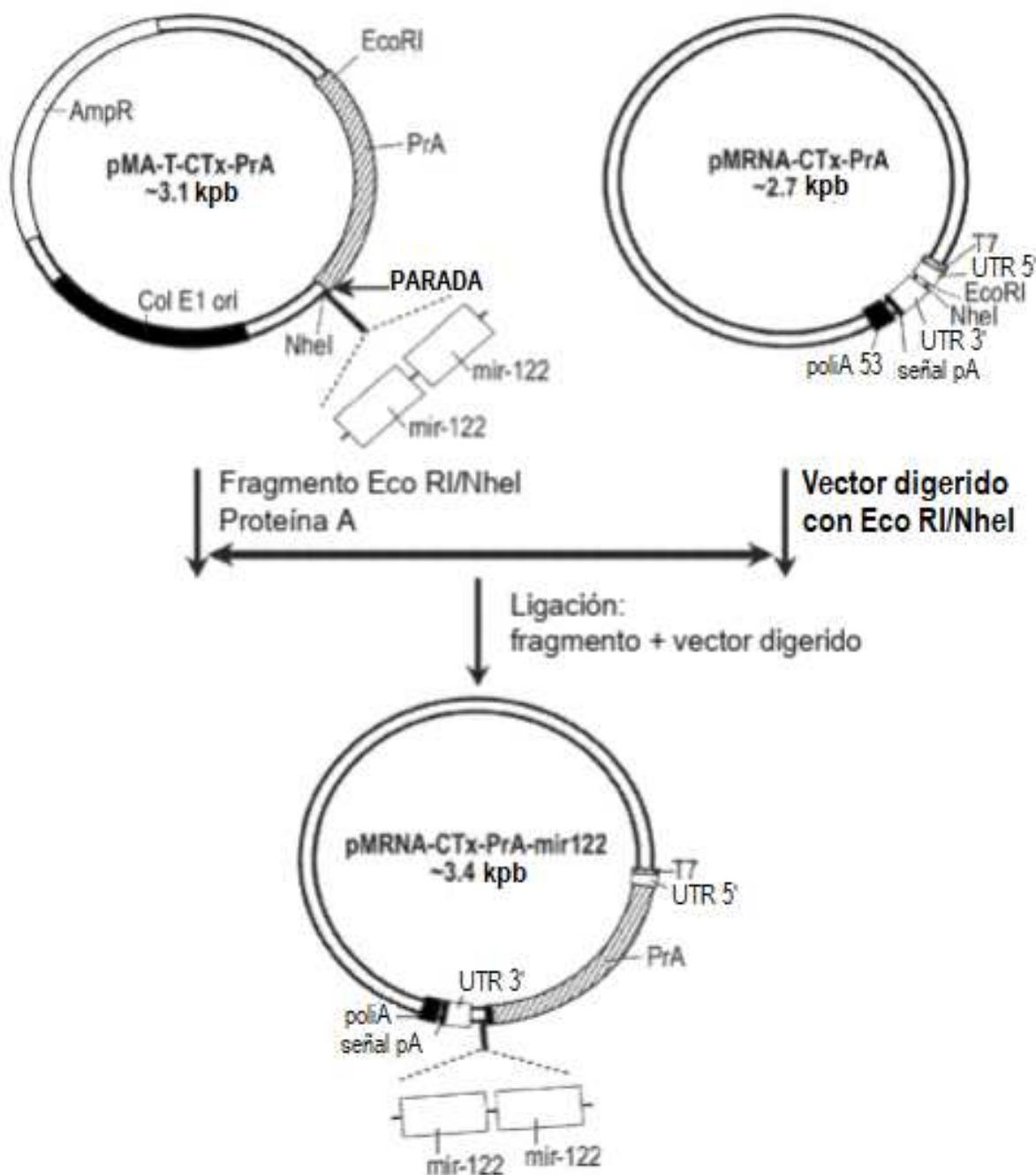
Figura 5

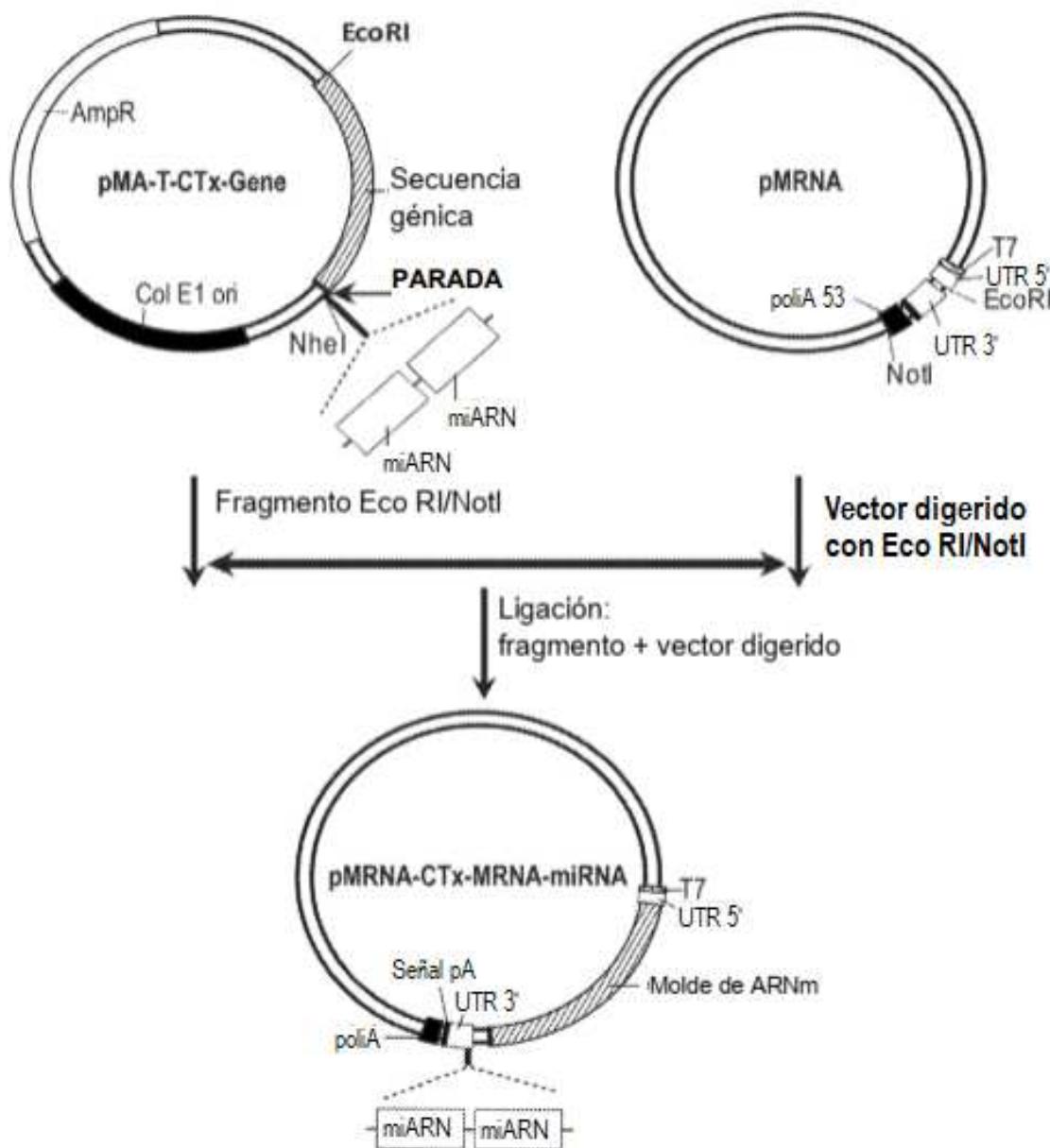
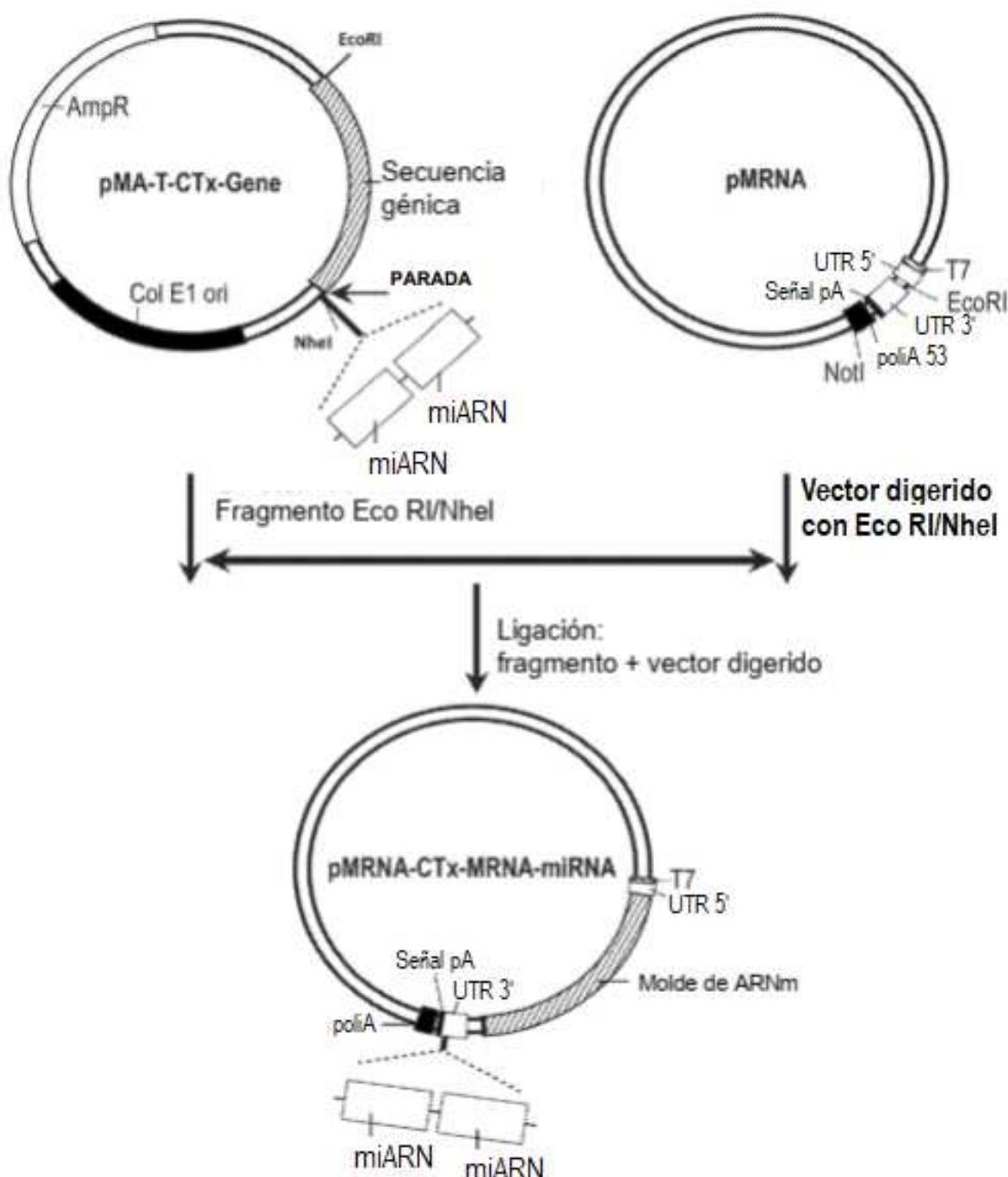
Figura 6

Figura 7

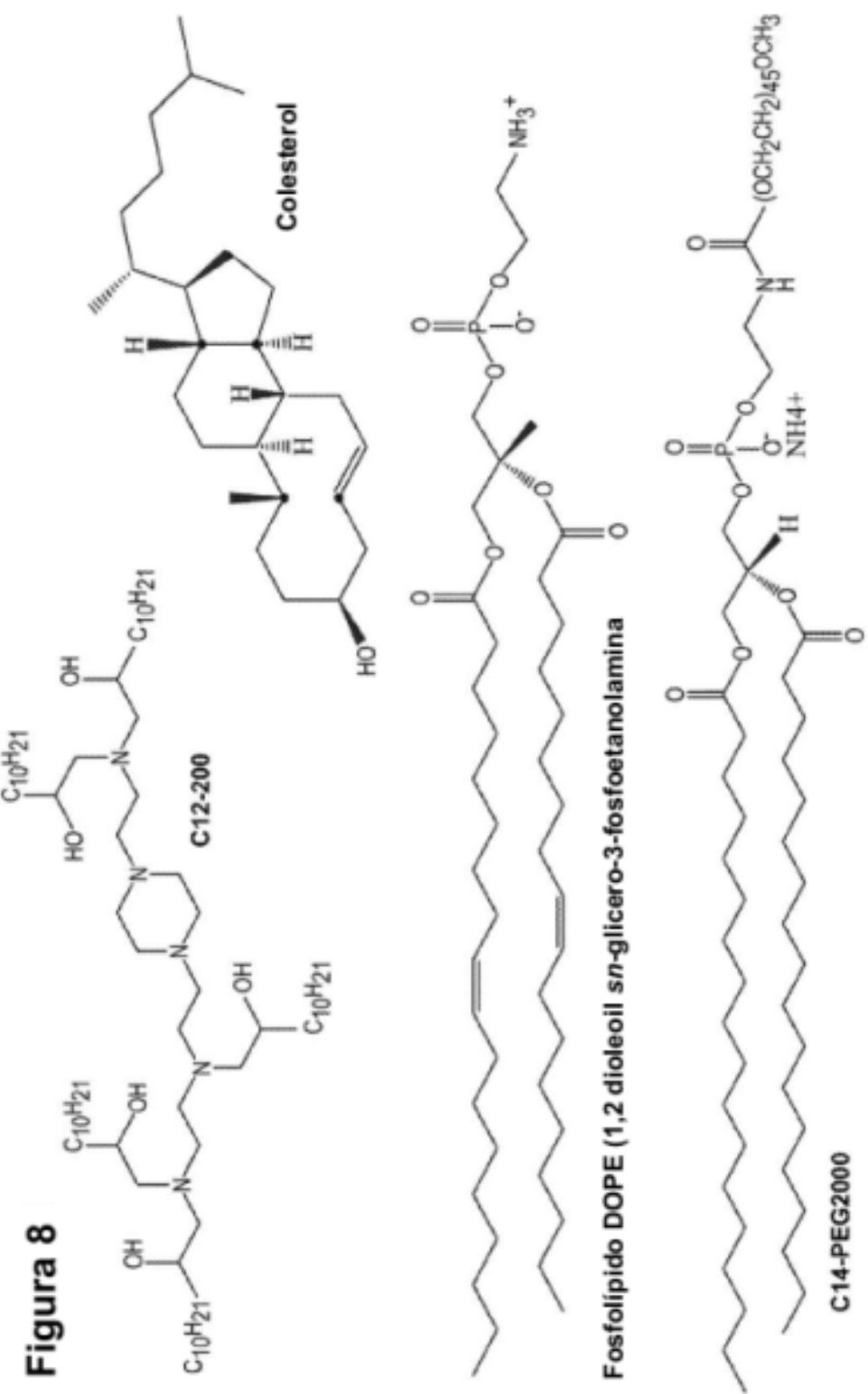


Figura 9A

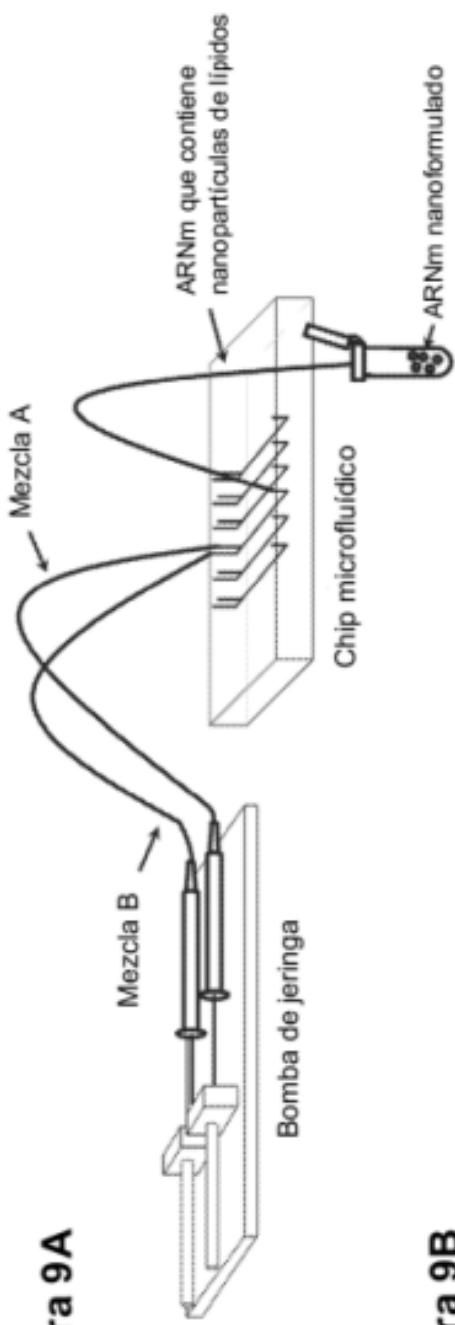
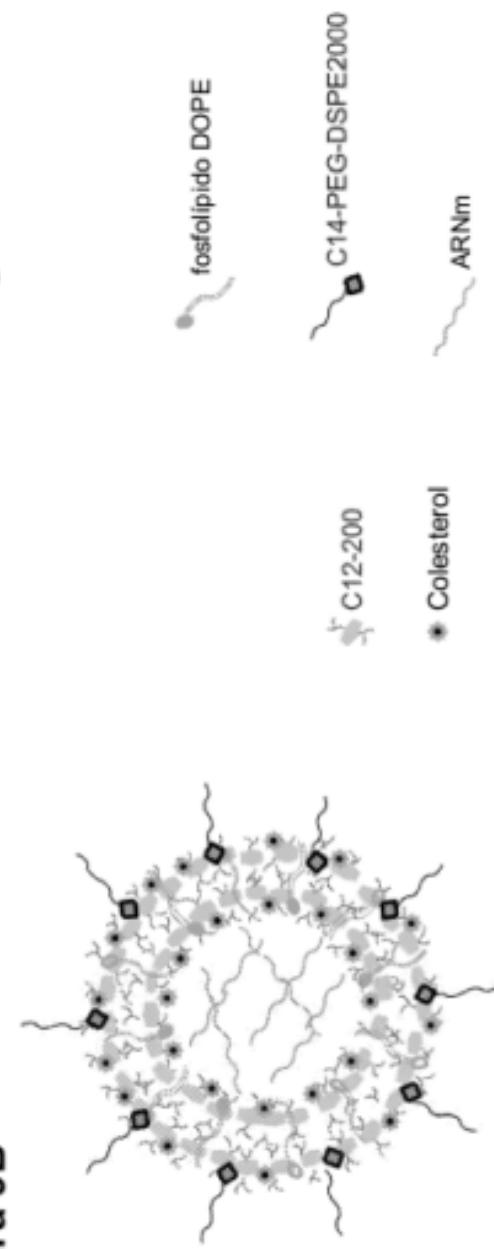


Figura 9B



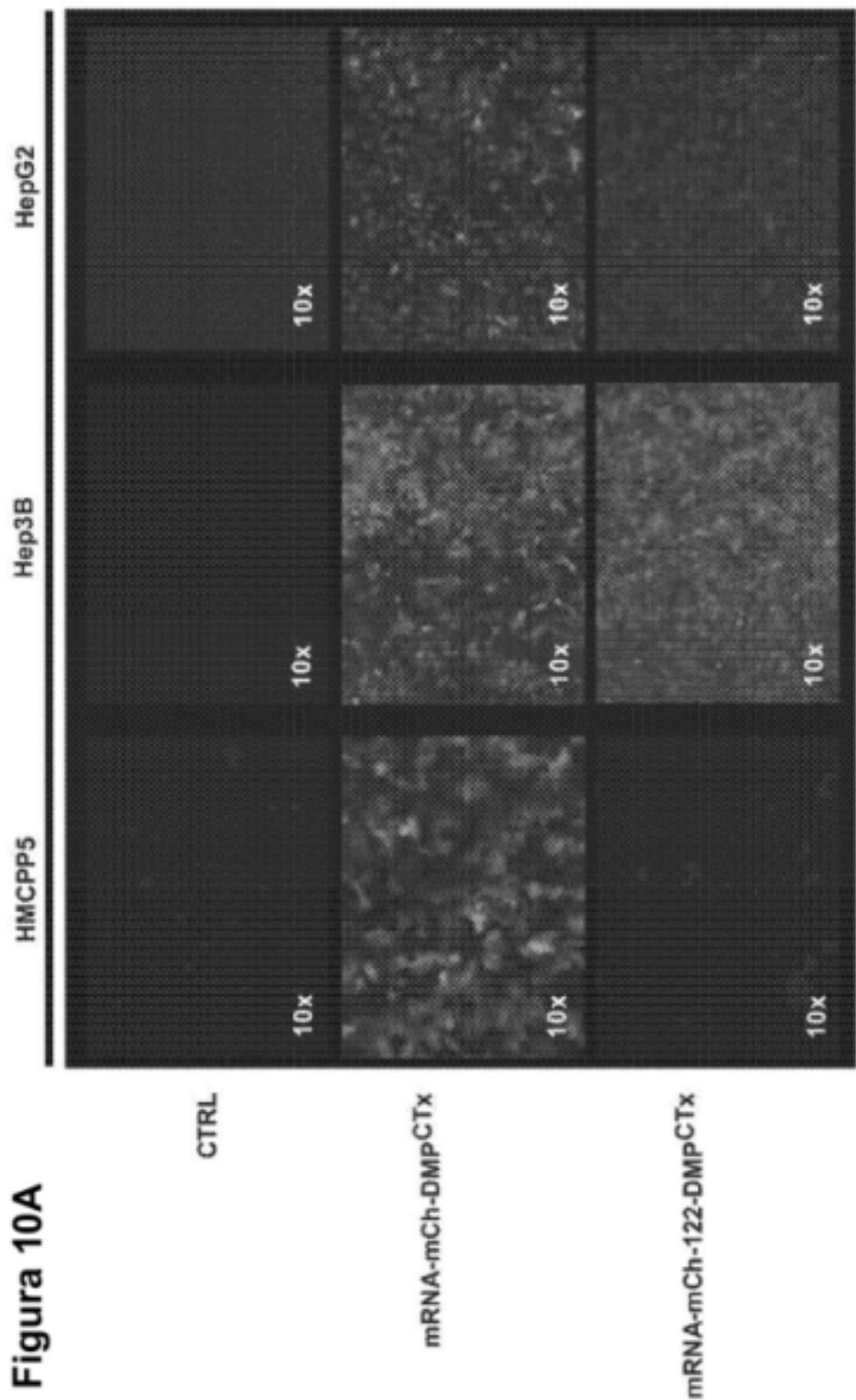


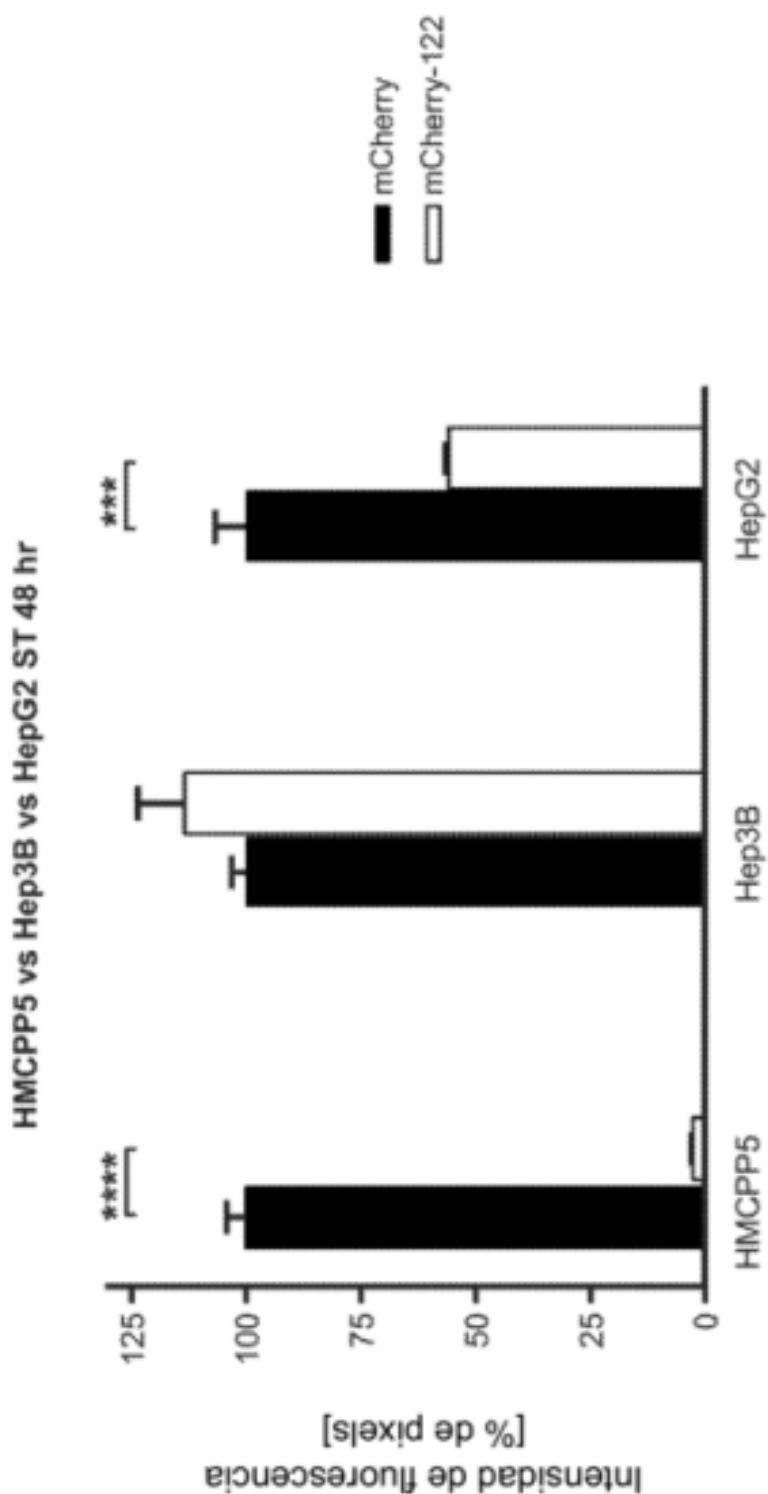
Figura 10B

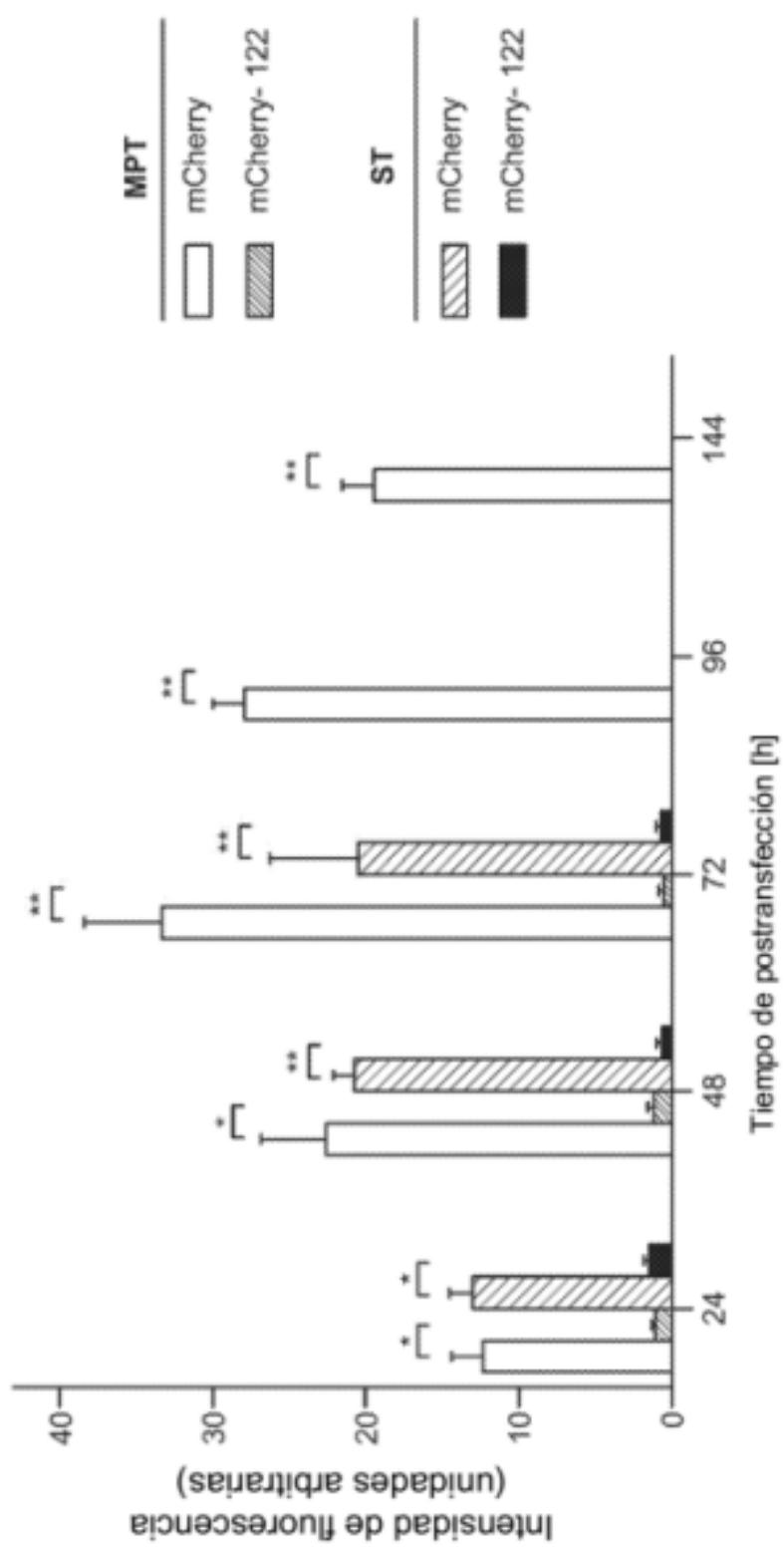
Figura 11

Figura 12A

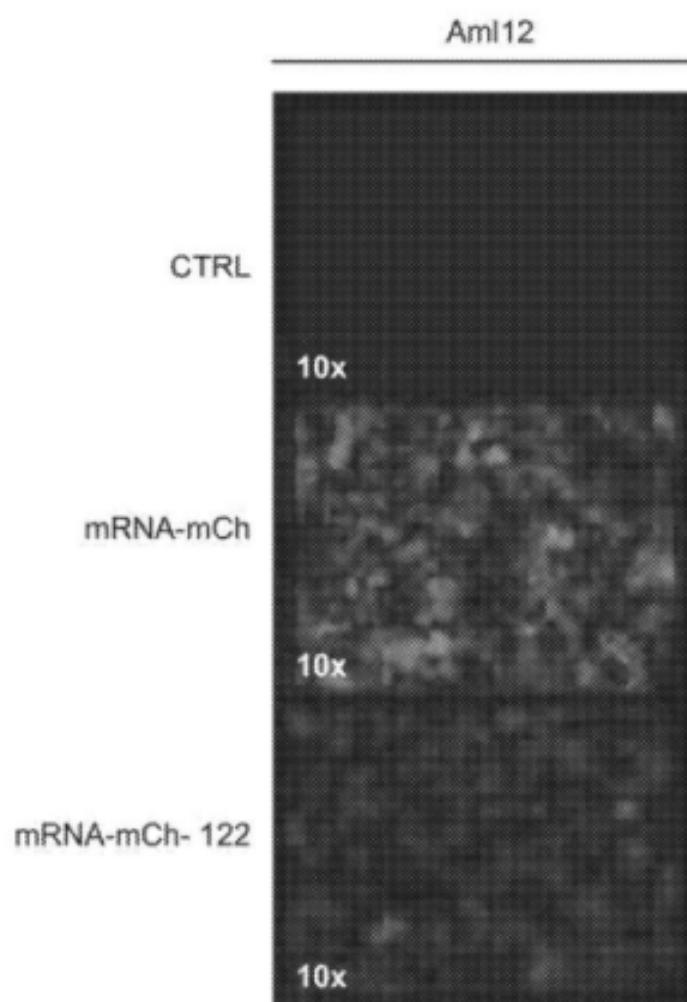


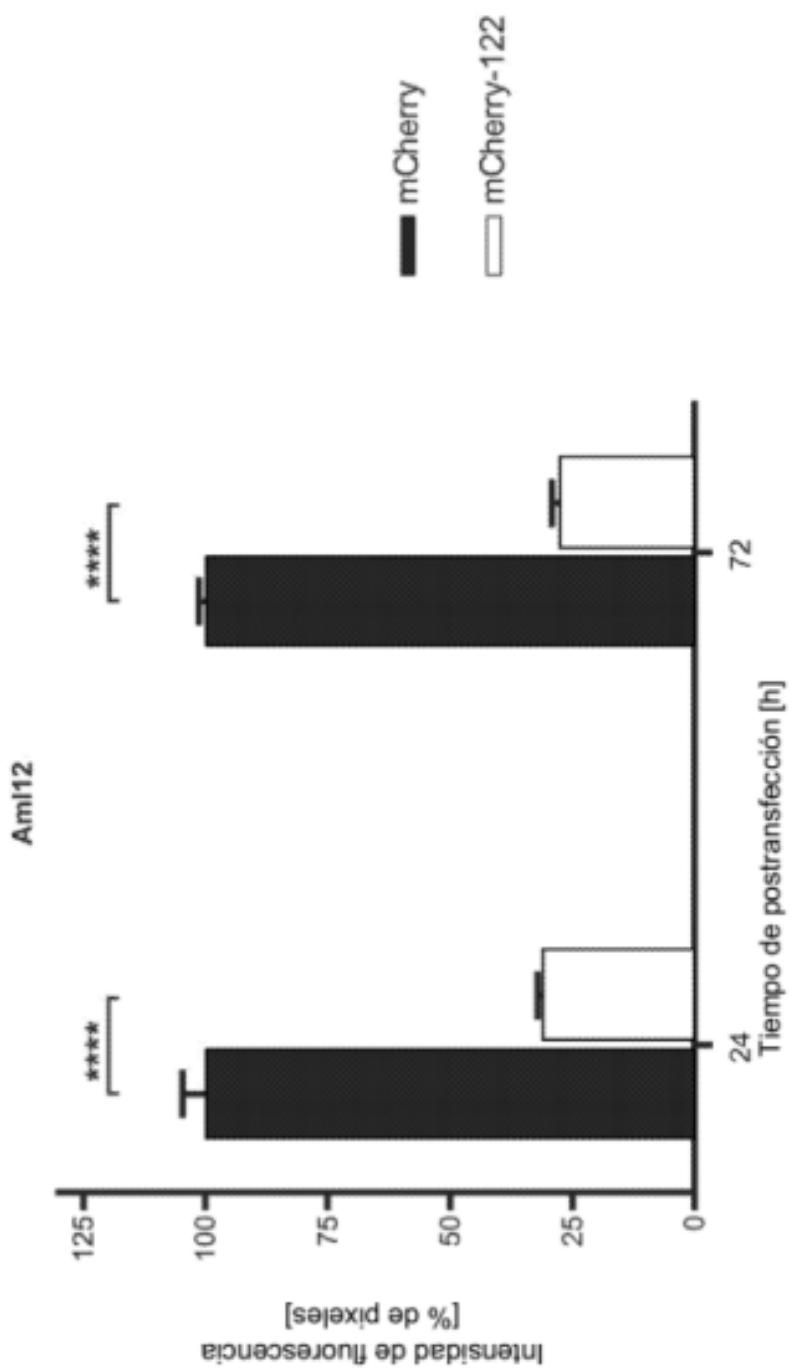
Figura 12B

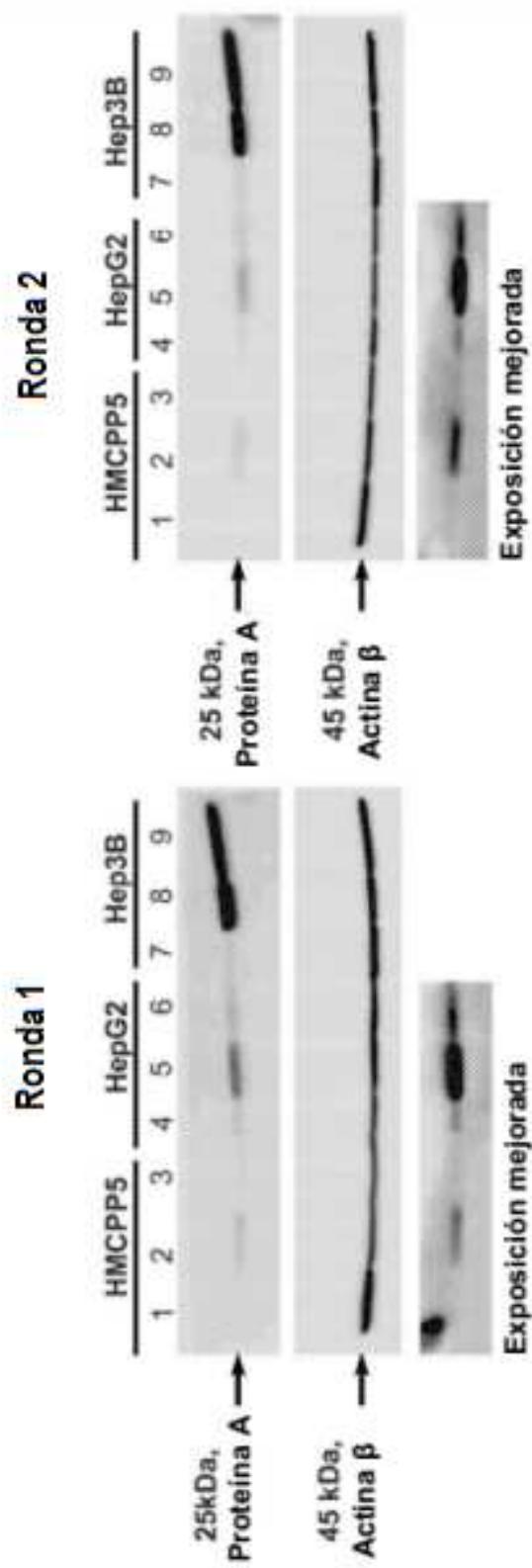
Figura 13

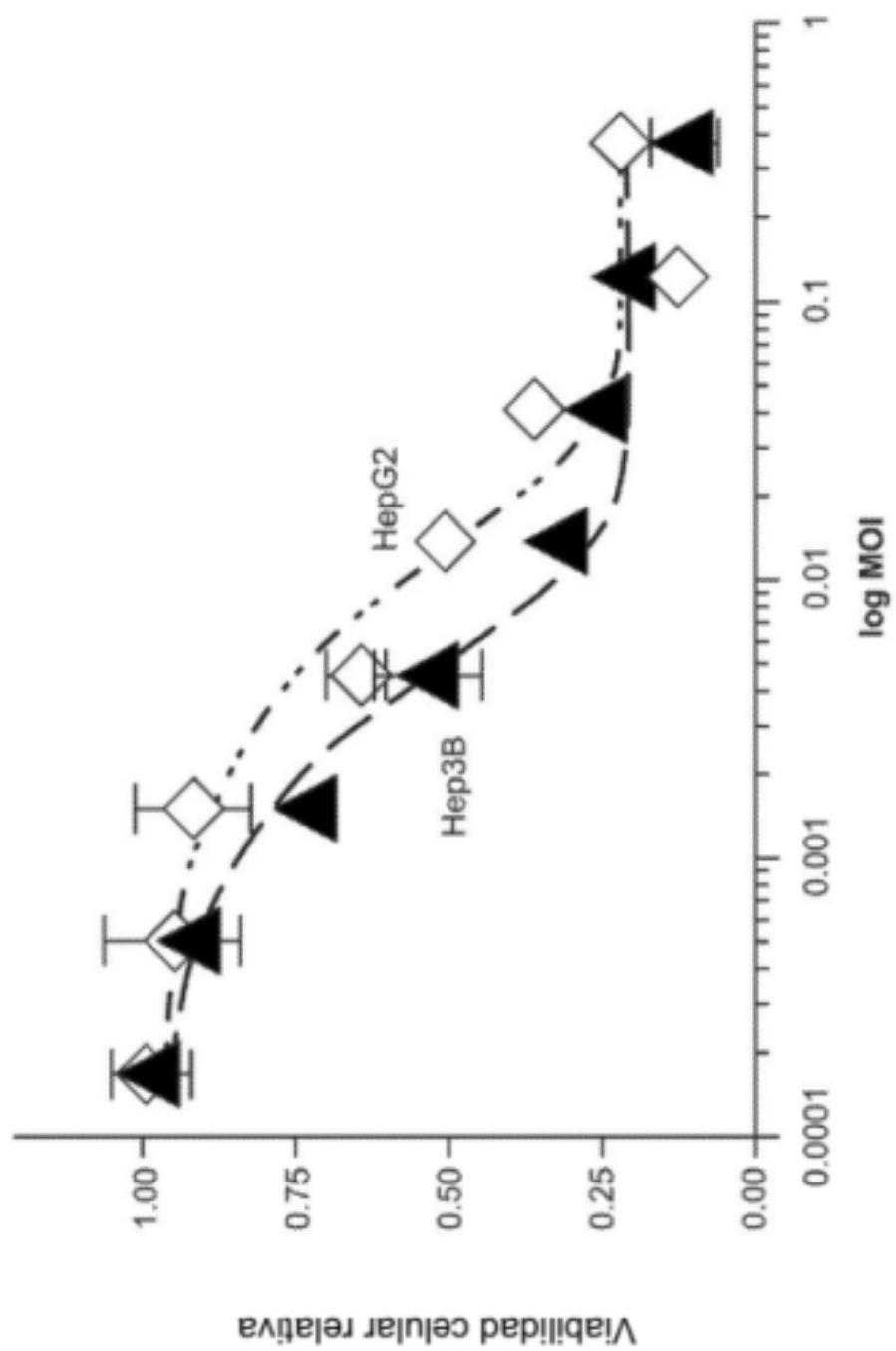
Figura 14

Figura 15

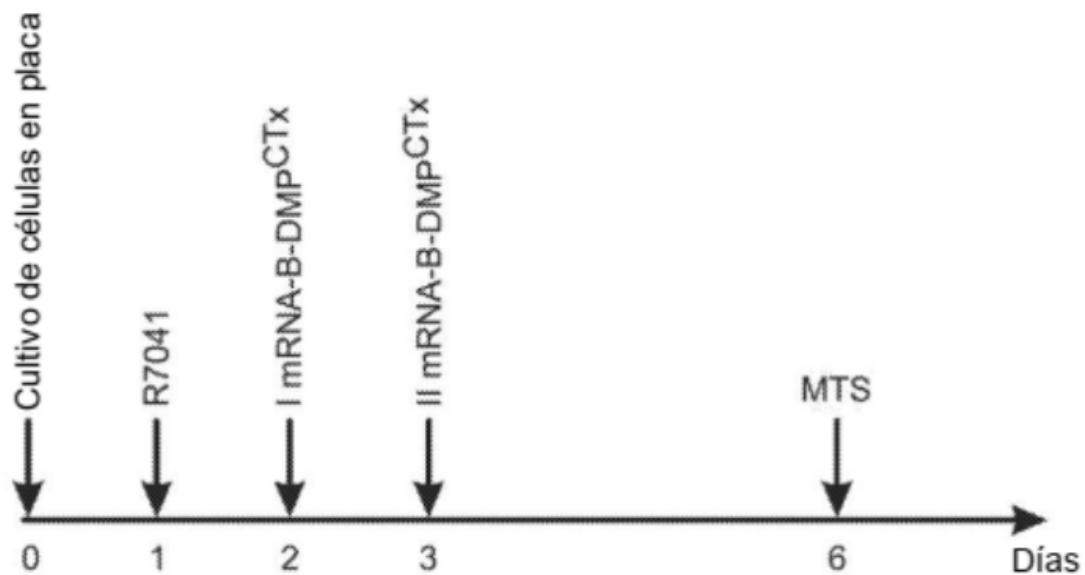
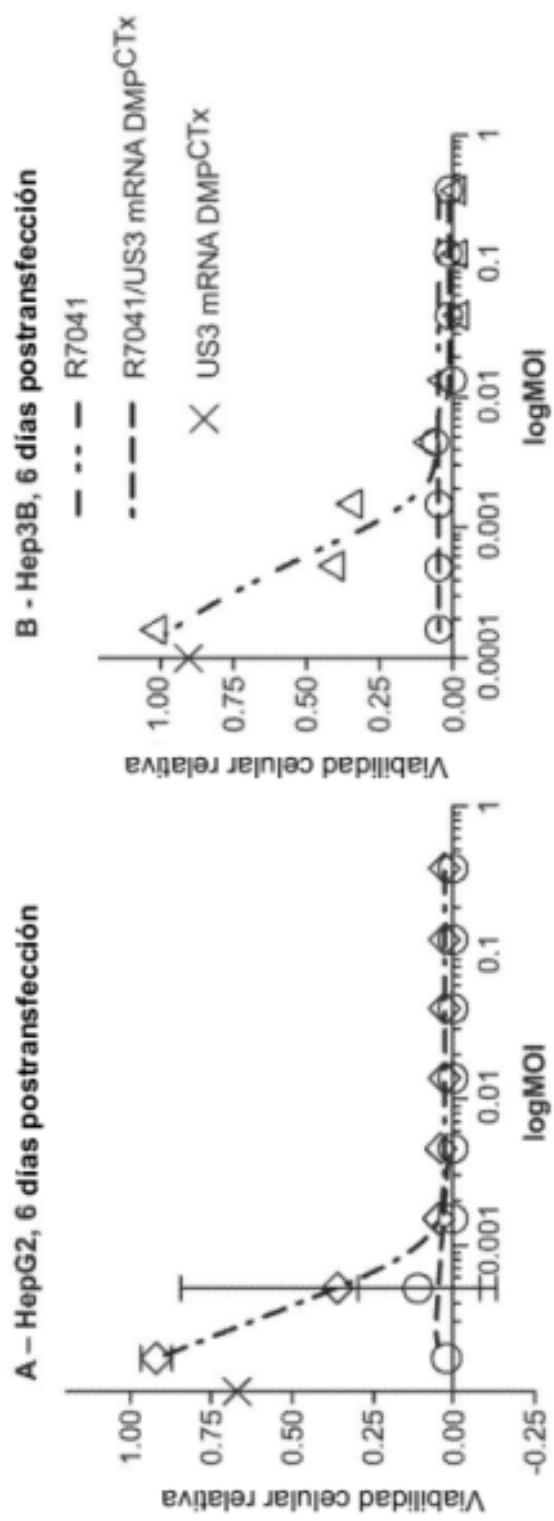


Figura 16A**Figura 16B**

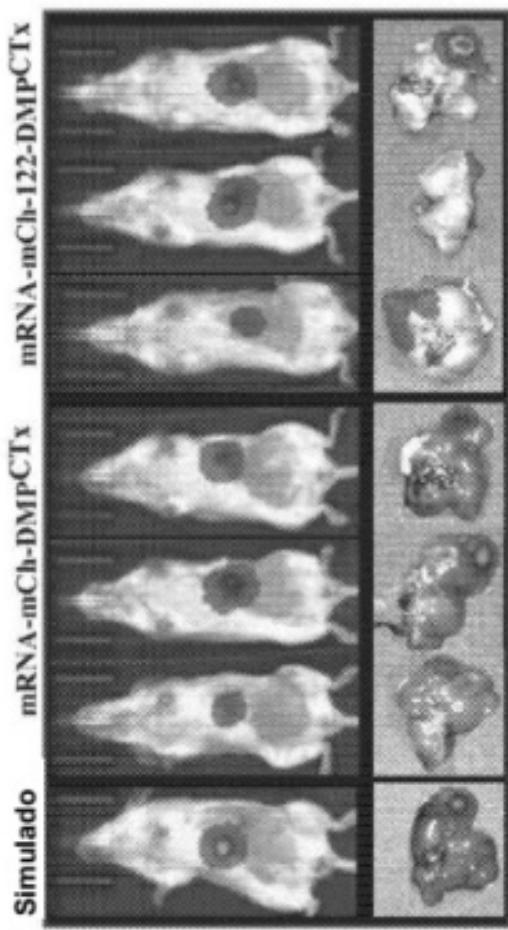


Figura 17A

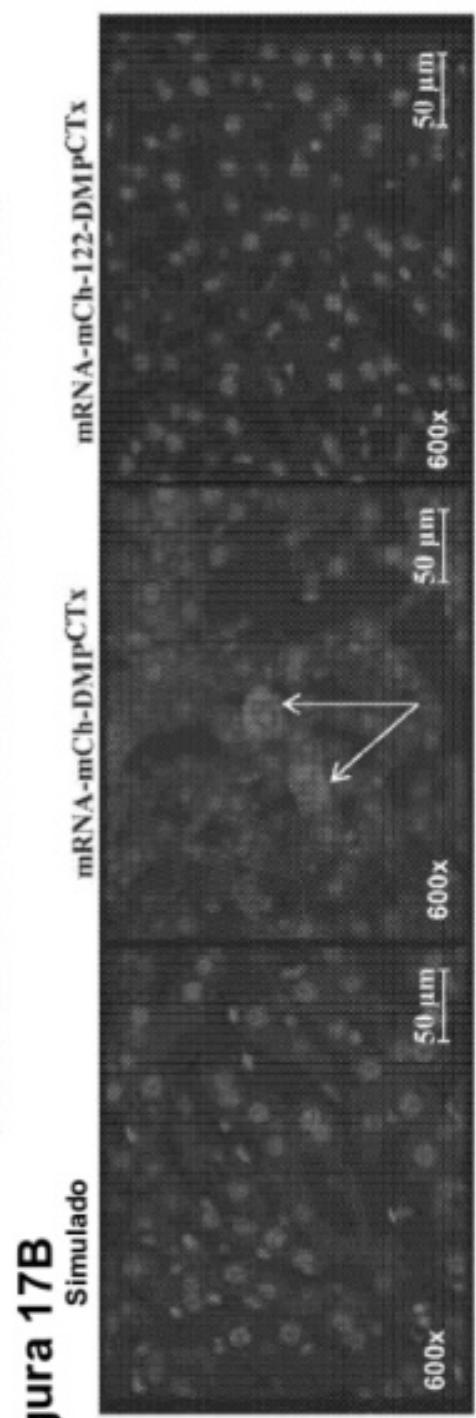


Figura 17B

Figura 18

