



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 333 282**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98920077 .9**

(96) Fecha de presentación : **30.04.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0986372**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2000**

(54) Título: **Complejos vesiculares y métodos para la preparación y utilización de los mismos.**

(30) Prioridad: **30.04.1997 US 45122**

(73) Titular/es: **Wyeth
Five Giralta Farms
Madison, New Jersey 07940-0874, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.02.2010

(72) Inventor/es: **Ciccarelli, Richard, B.;
Satishchandran, C. y
Pachuk, Catherine, J.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.02.2010

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Complejos vesiculares y métodos para la preparación y utilización de los mismos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una composición que comprende complejos moleculares que incluyen anestésicos locales, a composiciones farmacéuticas que los comprenden, y a métodos para usarlos.

10 Antecedentes de la invención

Los anestésicos locales son un gran grupo de compuestos que incluyen varias clases de compuestos. Los compuestos químicos o biológicos naturales o sintéticos, fisiológicamente activos, y sus derivados, actúan en las membranas celulares y/o sobre moléculas receptoras específicas en las membranas celulares *in vivo* o *in vitro*. Los anestésicos locales se describen en De-Paula, E. y S. Schreier (1996) *Braz. J. Med. Res.* 29:877-894 y Ritchie, J.M. y N.M. Greene "Local Anesthetics", Capítulo 15 302-321, que se incorporan aquí como referencia, y describen anestésicos locales y sus usos.

20 Además, en la patente US nº 5.593.972, expedida el 14 de enero de 1997 a Weiner *et al.*, y en la solicitud PCT PCT/US94/00899, las cuales se incorporan aquí como referencia, se describe el uso de anestésicos locales en combinación con moléculas de ácidos nucleicos para la transferencia génica *in vivo* de forma general, y en particular para protocolos de vacunación protectora y terapéutica así como para terapia génica y protocolos antisentido. Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional US 60/045.122 presentada el 30 de abril de 1997.

25 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para obtener una composición caracterizada en las reivindicaciones, que incluye complejos de un anestésico local y una molécula de ácido nucleico.

30 En algunas formas de realización, el anestésico local es bupivacaína, etidocaína, tetracaína, procainamida, cloroprocaina, ropivacaína, prilocaina, mepivacaína, lidocaína, procaína, carbocaína, metilbupivacaína o cocaína. En algunas formas de realización, el ácido nucleico es ADN. En algunas formas de realización, el ácido nucleico es ADN plasmídico. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en: lípidos catiónicos, lípidos neutros, lípidos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos neutros, tensioactivos aniónicos, detergentes catiónicos, detergentes neutros, y detergentes aniónicos. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos, péptidos, y fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos. En algunas formas de realización, el ácido nucleico es ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un inmunógeno.

40 En algunas formas de realización, los complejos se forman combinando 0,1-5% (p/v) de anestésico local con 500 µg/ml-1500 µg/ml de ácido nucleico en presencia de una concentración de sal mayor que 2M a un pH de 6-7,5, seguido de la eliminación de la sal hasta una cantidad por debajo de 500 mM. En algunas formas de realización, las proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos también se combinan con el anestésico local y el ácido nucleico para producir complejos que incluyen las proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos.

50 La presente invención se refiere además a un método para suministrar una proteína, que incluye polipéptidos y péptidos, a una célula de un individuo. El método comprende la etapa de administrar al individuo una composición que comprende complejos que comprenden un anestésico local y una molécula de ácido nucleico. Los complejos comprenden moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica la proteína enlazada operablemente a secuencias reguladoras. Las moléculas de ácidos nucleicos son captadas por las células del individuo y son expresadas para producir la proteína.

55 La presente invención se refiere además a un método para suministrar una proteína, polipéptido, péptido, fármaco/compuesto terapéutico no proteico, partícula vírica intacta o su fragmento, o microorganismo a una célula de un individuo. El método comprende la etapa de administrar al individuo una composición que comprende complejos que comprenden un anestésico local, una molécula de ácido nucleico y la proteína, polipéptido, péptido, o fármaco/compuesto terapéutico no proteico.

60 La presente invención se refiere además a un método para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo. El método comprende la etapa de administrar al individuo una composición que comprende complejos que comprenden un anestésico local y una molécula de ácido nucleico. Los complejos comprenden moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un inmunógeno enlazada operablemente a secuencias reguladoras. Las moléculas de ácidos nucleicos son captadas por las células del individuo, son expresadas para producir el inmunógeno, y se genera una respuesta inmunitaria frente al inmunógeno por el individuo. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además una proteína o péptido inmunogénico. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además una proteína fisiológicamente activa.

La presente invención se refiere además a un método para suministrar una molécula de ácido nucleico a una célula de un individuo. El método comprende la etapa de administrar al individuo una composición que comprende complejos que comprenden un anestésico local y una molécula de ácido nucleico. Los complejos comprenden moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica dicha proteína enlazada operablemente a 5 secuencias reguladoras, un oligonucleótido antisentido, una ribozima o una molécula de ácido nucleico que forma un tríplex.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona complejos que comprenden anestésicos locales y moléculas de ácidos nucleicos. Tales complejos se forman espontáneamente cuando disoluciones de anestésicos locales y moléculas de ácidos nucleicos se combinan en proporciones específicas en condiciones químicas específicas. Los complejos pueden incluir compuestos adicionales conocidos por sus propiedades formadoras de membranas, tales como lípidos, tensioactivos 15 y detergentes. Además, dentro de los complejos se pueden encapsular compuestos adicionales tales como proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos.

20 Los complejos de la invención son útiles para suministrar materiales a las células *in vitro* e *in vivo*. Tales materiales incluyen moléculas de ácidos nucleicos así como proteínas, polipéptidos, péptidos, y fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos. Según algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para suministrar ácidos nucleicos y/o proteínas, polipéptidos, péptidos, y/o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos a células de 25 un individuo.

25 Según algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para suministrar moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas a células de un individuo, en los que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de las moléculas de ácidos nucleicos se expresa a fin de suministrar la proteína a tales células *in vivo*.

30 Según algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para suministrar moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas inmunogénicas a células de un individuo, en los que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína inmunogénica de las moléculas de ácidos nucleicos se expresa a fin de suministrar la proteína inmunogénica a tales células, en los que se induce en el individuo una respuesta inmunitaria frente 35 a la proteína inmunogénica. En algunas formas de realización, las moléculas de ácidos nucleicos también codifican proteínas inmunomoduladoras, en las que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas inmunomoduladoras se expresa a fin de suministrar las proteínas inmunomoduladoras al individuo y efectuar, potenciar o de otro modo modular la respuesta inmunitaria inducida frente a la proteína inmunogénica. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además una o más proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos inmunomoduladores, a fin de suministrar las proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos inmunomoduladores al individuo a fin de efectuar, potenciar o de otro modo modular la 40 respuesta inmunitaria inducida frente a la proteína inmunogénica. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además una o más proteínas y/o péptidos inmunogénicos a fin de suministrar las proteínas o péptidos inmunogénicos al individuo para proporcionar dianas adicionales frente a las cuales se puede inducir una respuesta inmunitaria. En algunas formas de realización, la proteína o péptido inmunogénico es idéntico o está relacionado con la proteína inmunogénica codificada por las moléculas de ácidos nucleicos.

45 Según algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para suministrar moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas no inmunogénicas terapéuticamente eficaces a células de un individuo, en los que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína no inmunogénica terapéuticamente eficaz de las moléculas de ácidos nucleicos se expresa a fin de suministrar a tales células la proteína no inmunogénica terapéuticamente eficaz, en los que la proteína no inmunogénica terapéuticamente eficaz proporciona un efecto fisiológico deseado en el individuo. En algunas formas de realización, las moléculas de ácidos nucleicos codifican proteínas inmunomoduladoras como se describe anteriormente. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además una o más proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos a fin de suministrar las proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos al individuo conjuntamente con el suministro de la proteína codificada por la secuencia de ácidos nucleicos en las moléculas de ácidos nucleicos.

55 Según algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para suministrar moléculas de ácidos nucleicos que son moléculas de ácidos nucleicos antisentido, ribozimas o moléculas de ácidos nucleicos que forman tríplex.

Según algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para suministrar proteínas, polipéptidos, péptidos, y/o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos a células de un individuo, en los que los complejos se usan como un vehículo/portador para facilitar el suministro de tales proteínas, polipéptidos, péptidos, 60 y/o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos, y para proteger a los mismos de la degradación durante el proceso de suministro.

ES 2 333 282 T3

Según la presente invención, el uso de anestésicos locales en métodos de transferencia génica tales como los descritos en la patente US nº 5.593.972 y en el documento PCT/US94/00899 se mejora usando composiciones que comprenden complejos de anestésicos locales y moléculas de ácidos nucleicos. Las composiciones se forman cuando se combinan anestésicos locales y moléculas de ácidos nucleicos en condiciones que favorecen el ensamblaje de los

5 complejos. Las composiciones proporcionan una transferencia génica mejorada y, de este modo, métodos mejorados de inmunización, terapia génica y administración antisentido y de ribozimas. Además, los complejos se pueden usar y adaptar para cosuministrar proteínas, polipéptidos, péptidos, y/o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos junto con las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los genes a transferir. Como alternativa, las moléculas de 10 ácidos nucleicos se pueden usar exclusivamente como moléculas de ácidos nucleicos portadoras, es decir, moléculas de ácidos nucleicos que no transcriben ni traducen, para formar complejos que encapsulan y que se pueden usar como vehículos de suministro mejorados para proteínas, polipéptidos, péptidos, y/o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos. En consecuencia, también se pueden preparar y usar según la presente invención composiciones que comprenden complejos de anestésicos locales, moléculas de ácidos nucleicos y otros tipos de materiales terapéuticos o inmunogénicos tales como fármacos, hormonas e inmunógenos.

15 Los anestésicos locales son moléculas muy lipófilas/hidrófobas, que contienen típicamente, aunque no siempre, un nitrógeno terciario en un extremo de la molécula, el cual puede tener una carga positiva como especie protonada. Esto ocurre en disoluciones acuosas a o por debajo del pKa del nitrógeno (típicamente un intervalo de pKa = 7-9 para la mayoría de los anestésicos locales). Por lo tanto, los anestésicos locales tienen la propiedad de ser extremadamente hidrófobos como especies neutras (por encima del pKa), y de estar polarizados con carga (es decir, tener un extremo cargado positivamente y un extremo hidrófobo) a o por debajo del pKa. Como se usa aquí, la expresión "anestésico local" pretende referirse a aquellos anestésicos locales útiles para obtener complejos según la invención. De este modo, la expresión "anestésico local", como se usa aquí, se refiere a aquellos anestésicos locales que contienen un nitrógeno catiónico, tienen un pKa de aproximadamente 7-9, se unen al ADN, y contienen un grupo hidrófobo.

20 25 Los anestésicos locales tienen típicamente una unión amídica interna (anestésicos locales de tipo amida) o una unión de éster interna (anestésicos locales de tipo éster). Los ejemplos de anestésicos locales de tipo amida incluyen bupivacaína, lidocaína y etidocaína; los ejemplos de anestésicos locales de tipo éster incluyen procaína y tetracaína. La benzocaína es un ejemplo de un anestésico local de tipo éster que no tiene un extremo con nitrógeno terciario. 30 Los ejemplos de estructuras de anestésicos locales se exponen en: documento PCT/US94/00899; De-Paula, E. y S. Schreier, *más arriba*; Ritchie, J.M. y N.M. Greene, *más arriba*; y Strichartz *et al.* (1990), Anesth. Analg., 71:158-170.

35 Los anestésicos locales tienen la propiedad de pasar desde disoluciones acuosas a la fase orgánica como especies neutras o cargadas (Strichartz *et al.* *más arriba* y Schlieper P. y Steiner, R. (1983) Chemistry and Physics of Lipids, 34: 81-92, que se incorporan aquí como referencia). La bupivacaína es un ejemplo de un anestésico local que se puede repartir en n-octanol tanto como la especie cargada como neutra. Se ha dado a conocer que los anestésicos locales se reparten en lípidos, mezclas de lípidos, y en liposomas.

40 Los anestésicos locales de tipo amida, *in vivo*, tienen una semivida biológica más prolongada, puesto que no se degradan tan rápidamente en sangre como los anestésicos locales de tipo éster, y están asociados típicamente con proteínas del suero, particularmente alfa-1-glicoproteína, dando como resultado un efecto de depósito. Los anestésicos locales de tipo amida son degradados lentamente por el hígado. Los anestésicos locales de tipo éster son degradados rápidamente en la sangre o en el tejido mediante una esterasa sérica.

45 El extremo cargado catiónicamente del anestésico local se une a grupos aniónicos en moléculas de ácidos nucleicos a un pH por debajo del pKa de la amina, por ejemplo a pH fisiológico. El complejo de anestésico local-ácido nucleico tiene una carga más neutra, se hace más hidrófobo y lipófilo en estas condiciones, y se puede repartir en/a través de la membrana lipídica de las células, suministrando el ácido nucleico a la célula. Se ha demostrado que los anestésicos locales tienen mayores coeficientes de reparto lipídico como especie neutra.

50 55 Los complejos de algunas formas de realización de la invención incluyen uno o más anestésicos locales seleccionados del grupo que consiste en: bupivacaína, etidocaína, tetracaína, procainamida, cloroprocaína, ropivacaína, prilocaina, mepivacaína, lidocaína, procaína, carbocaína, metilbupivacaína y cocaína. En algunas formas de realización, los complejos incluyen una sola especie de anestésico local, incluyendo mezclas racémicas e isómeros puros del mismo. En algunas formas de realización, los complejos incluyen dos o más especies diferentes de anestésico local.

60 En algunas formas de realización preferidas de la invención, uno o más anestésicos locales hidrófobos catiónicos diferentes forman complejos al complejarse con moléculas de ácidos nucleicos. Los complejos formados mediante el anestésico local o los anestésicos locales pueden incluir moléculas anfifílicas lipídicas, detergentes y/o tensioactivas como "coagentes". Los complejos pueden además, en algunas formas de realización, atrapar "otros agentes" o "agentes activos" que se asocian con el complejo vesicular formando compuestos. Tales otros agentes activos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos. Debido a la naturaleza altamente apolar de los anestésicos locales anfifílicos catiónicos, los anestésicos locales solos o en combinación con otros 65 compuestos tales como lípidos, anfifílicos, compuestos lipófilos/hidrófobos, tensioactivos, detergentes, y/o vitaminas solubles en lípidos, tales como vitaminas A, D y K (denominados aquí como "coagentes"), pueden formar estructuras de autoensamblaje que incluyen láminas en forma de laminillas y vesículas cuando se combinan con moléculas de ácidos nucleicos. Radler, J.O. *et al.* (1997) Science 275, 810-814, que se incorpora aquí como referencia, explica

estructuras de autoensamblaje lipídicas. Tales estructuras se pueden estabilizar adicionalmente mediante interacciones de tipo apilable hidrófobas intramoleculares fuertes, por ejemplo entre los grupos aromáticos. En algunas formas de realización de la presente invención, los anestésicos locales se usan junto con uno o más lípidos, anfífilos, compuestos lipófilos/hidrófobos, tensioactivos, y/o detergentes, particularmente lípidos catiónicos o neutros, anfífilos catiónicos o neutros, compuestos lipófilos/hidrófobos catiónicos o neutros, tensioactivos catiónicos o neutros, y/o detergentes catiónicos o neutros, para formar complejos que incluyen moléculas de ácidos nucleicos.

Debido a la naturaleza apolar de las especies de anestésicos locales catiónicos, se usan mezclas de anestésicos locales con los coagentes para formar estructuras de autoensamblaje más grandes en combinación con moléculas de ácidos nucleicos. Las mezclas de anestésicos locales individuales o combinaciones de anestésicos locales se mezclan con lípidos catiónicos, neutros o aniónicos, y con moléculas de ácidos nucleicos para formar estructuras similares a liposomas. Los complejos se pueden formar usando uno o más anestésicos locales con una combinación de uno o más compuestos seleccionados de lípidos catiónicos, neutros o aniónicos, anfífilos catiónicos, neutros o aniónicos, compuestos lipófilos/hidrófobos catiónicos, neutros o aniónicos, tensioactivos catiónicos, neutros o aniónicos, y/o detergentes catiónicos, neutros o aniónicos. En una forma de realización, un anestésico local catiónico, tal como bupivacaína, se combina con un anfífilo catiónico diferente, tal como un compuesto sintético como DOTMA; o con un compuesto sintético neutro tal como DOPE y/o un lípido natural tal como colesterol. En otra forma de realización, un anestésico local catiónico se combina con lípidos aniónicos y/o neutros.

Los complejos según la invención se pueden usar para encapsular agentes activos para el suministro a tejidos y células. Los agentes terapéuticos y/o inmunogénicos y/o formadores de imágenes (denominados aquí como "agentes activos"), incluyendo compuestos proteicos así como no proteicos, se pueden asociar con, o encapsular en, estos complejos para el suministro *in vitro* o *in vivo* en tejidos y células. Las moléculas de agentes activos incluyen proteínas, polipéptidos y péptidos terapéuticos y/o inmunogénicos, así como fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos terapéuticos y/o inmunogénicos. Otras moléculas se pueden asociar con estas estructuras para reducir su inmunogenicidad (tales como PEG) o para mejorar su capacidad para fusionarse a células o destruir endosomas dentro de las células tras su captación (lípidos, péptidos, polímeros fusógenos).

En algunas formas de realización de la invención, las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser constructos genéticos de ADN plasmídico que son vacunas de ADN o constructos de terapia génica que codifican inmunógenos o proteínas biológicamente activas, terapéuticamente deseables, en los que las secuencias codificantes están enlazadas operablemente a elementos reguladores necesarios para la expresión en células en el individuo al que se administran los complejos (es decir, el ADN codifica de forma operable la proteína que se expresa). Los constructos de ADN se describen en la patente U.S. número 5.593.972, expedida el 14 de enero de 1997 a Weiner *et al.*, y en la Solicitud PCT/PCT/US94/00899. De forma importante, si se va a transcribir y traducir una secuencia codificante, debe de estar enlazada operablemente a elementos reguladores que funcionen en las células en las que se suministra la molécula de ADN.

Algunos aspectos de la presente invención se refieren a métodos para introducir material genético en las células de un individuo a fin de inducir respuestas inmunitarias frente a proteínas y péptidos que son codificados por el material genético. Los métodos comprenden las etapas de administrar al tejido de dicho individuo complejos que comprenden anestésico local y una única especie de molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica uno o más péptidos o proteínas deseados que incluyen al menos un péptido o proteína inmunogénica. Adicionalmente, en algunas formas de realización, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una o más proteínas inmunomoduladoras. La molécula o moléculas de ácidos nucleicos se pueden proporcionar como ADN plasmídico. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además una o más proteínas, polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos inmunomoduladores, y/o una o más proteínas o péptidos inmunogénicos.

Según algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos que inmunizan profiláctica y/o terapéuticamente a un individuo frente a un alérgeno, patógeno o célula anormal relacionada con una enfermedad. El material genético que codifica un inmunógeno que puede inducir una respuesta inmunitaria en el individuo frente a un alérgeno, patógeno o células anormales.

El material genético es expresado por las células del individuo y sirve como una diana inmunogénica frente a la cual se provoca una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria resultante es de amplia base: además de una respuesta inmunitaria humoral, se provocan los dos brazos de la respuesta inmunitaria celular. Los métodos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y terapéutica. De este modo, un método de inmunización incluye tanto métodos de inmunización frente a inmunógenos, y de este modo, por ejemplo, de protección de un individuo frente a la exposición a patógenos, o aparición o proliferación de células específicas, así como métodos para tratar un individuo que sufre una infección patógena, enfermedad proliferativa o enfermedad auto-inmunitaria.

Como se usa aquí, las expresiones "inmunógeno" y "proteína diana" se refieren a péptidos o proteínas codificados por constructos génicos de la presente invención que actúan como proteínas diana para una respuesta inmunitaria. Las expresiones "proteína diana" e "inmunógeno" se usan de forma intercambiable, y se refieren a una proteína frente a la cual se puede provocar una respuesta inmunitaria. La proteína diana es una proteína inmunogénica que comparte al menos un epítopo con un alérgeno o una proteína procedente del patógeno o tipo celular indeseable tal como una célula

ES 2 333 282 T3

cancerígena o una célula implicada en una enfermedad autoinmunitaria frente a la cual se requiere la inmunización. La respuesta inmunitaria dirigida contra la proteína diana protegerá al individuo y tratará al individuo frente a la infección o enfermedad específica con la que está asociada la proteína diana.

5 La presente invención es útil para provocar respuestas inmunitarias amplias frente a una proteína diana, es decir, proteínas asociadas específicamente con patógenos, alérgenos o las células “anormales” propias del individuo. La presente invención es útil para inmunizar a individuos frente a agentes patógenos y organismos, de forma que una respuesta inmunitaria frente a una proteína patógena proporcione una inmunidad protectora frente al patógeno. La presente invención es útil para combatir enfermedades hiperproliferativas y trastornos tales como cáncer provocando una respuesta inmunitaria frente a una proteína diana que está asociada específicamente con las células hiperproliferativas.
10 La presente invención es útil para combatir enfermedades y trastornos autoinmunitarios provocando una respuesta inmunitaria frente a una proteína diana que está asociada específicamente con células implicadas en la afección autoinmunitaria.

15 Algunos aspectos de la presente invención se refieren a métodos para introducir material genético en las células de un individuo a fin de suministrar al individuo una proteína o péptido no inmunogénico que es codificado por el material genético. Los métodos comprenden las etapas de administrar al tejido de dicho individuo complejos que comprenden anestésico local y una única especie de molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica uno o más péptidos, polipéptidos o proteínas no inmunogénicos deseados, biológicamente activos, que tienen un efecto fisiológico no inmunogénico sobre el individuo. Como se usa aquí, la expresión “proteína fisiológicamente activa” se refiere a péptidos, polipéptidos o proteínas biológicamente activos que tienen un efecto fisiológico no inmunogénico sobre el individuo. En algunas formas de realización, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: citocinas, factores de coagulación de la sangre, quimiocinas, factores coestimulantes, factores de transcripción, 20 hormonas, factores de crecimiento y genes de sustitución. Los ejemplos de citocinas incluyen IL-12, GM-CSF, y eritropoyetina. Los ejemplos de factores de coagulación de la sangre incluyen el Factor XIII y el Factor IX. Los ejemplos de genes de sustitución incluyen distrofina (útil para tratar distrofia muscular) y CFPR (útil para tratar fibrosis cística). Los ejemplos de hormonas incluyen leptina. La molécula o moléculas de ácidos nucleicos se pueden proporcionar como ADN plasmídico. En algunas formas de realización, los complejos comprenden además una o más proteínas, 25 polipéptidos, péptidos, o fármacos/compuestos terapéuticos no proteicos.
30

Según la invención, el ADN o ARN que codifica un inmunógeno o una proteína fisiológicamente activa es introducido en las células del tejido de un individuo donde es expresado, produciendo así el inmunógeno o proteína fisiológicamente activa. Las secuencias de ADN o ARN que codifican el inmunógeno o la proteína fisiológicamente activa están enlazadas a elementos reguladores necesarios para la expresión en las células del individuo. Los elementos reguladores para la expresión del ADN incluyen un promotor y una señal de poliadenilación. Además, también se pueden incluir en el constructo genético otros elementos, tales como una región de Kozak.

Como se usa aquí, la expresión “constructo genético” se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica el inmunógeno o proteína fisiológicamente activa, y que incluye señales de iniciación y terminación enlazadas operablemente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células del individuo. En algunas formas de realización, en la misma molécula de ácido nucleico que es suministrada al individuo se encuentran formas expresables de secuencias que codifican uno o más inmunógenos y/o una o más proteínas fisiológicamente activas. En algunas formas de realización, los complejos incluyen dos o más especies diferentes de moléculas de ácidos nucleicos que incluyen formas expresables de secuencias que codifican uno o más inmunógenos diferentes y/o una o más proteínas fisiológicamente activas diferentes a suministrar al individuo.
45

Como se usa aquí, la expresión “forma expresable” se refiere a constructos génicos que contienen los elementos reguladores necesarios enlazados operablemente a una secuencia codificante que codifica un inmunógeno o proteína fisiológicamente activa, de forma que, cuando están presentes en la célula del individuo, se expresará la secuencia codificante.
50

Los constructos genéticos pueden comprender una secuencia nucleotídica que codifica un inmunógeno o una proteína fisiológicamente activa enlazada operablemente a elementos reguladores necesarios para la expresión génica. Cuando es captado por una célula, el constructo o constructos genéticos pueden permanecer presentes en la célula como una molécula extracromosómica funcional y/o se pueden integrar en el ADN cromosómico de la célula. El ADN se puede introducir en células en las que permanece como un material genético separado en forma de un plásmido o plásmidos. Como alternativa, el ADN lineal, que se puede integrar en el cromosoma, se puede introducir en la célula. Cuando se introduce ADN en la célula, se pueden añadir reactivos que promuevan la integración del ADN en los cromosomas. También se pueden incluir en la molécula de ADN secuencias de ADN que son útiles para promover la integración. Como alternativa, se puede administrar ARN a la célula. También se contempla proporcionar el constructo genético como un minicromosoma lineal que incluye un centrómero, telómeros y un origen de replicación. Los constructos génicos pueden quedar como parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que viven en las células. Los constructos génicos pueden ser parte de genomas de vacunas víricas recombinantes en las que el material genético se integra en el cromosoma de la célula o permanece extracromosómicamente.
55
60
65

ES 2 333 282 T3

Los constructos genéticos incluyen elementos reguladores necesarios para la expresión génica de una molécula de ácido nucleico. Los elementos incluyen: un promotor, un codón de iniciación, un codón de parada y una señal de poliadenilación. Además, a menudo se requieren potenciadores para la expresión génica de la secuencia que codifica la proteína diana o la proteína inmunomoduladora. Es necesario que estos elementos estén enlazados operablemente a la secuencia que codifica las proteínas deseadas, y que los elementos reguladores sean operables en el individuo al que se administran.

Los codones de iniciación y un codón de parada se consideran generalmente como parte de una secuencia nucleotídica que codifica la proteína deseada. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en el individuo al que se administra el constructo genético. Los codones de iniciación y terminación deben de estar en el marco con la secuencia codificante.

Los promotores y las señales de poliadenilación usados deben de ser funcionales dentro de las células del individuo.

Los ejemplos de promotores útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen pero no se limitan a: promotores humanos, promotores víricos tales como los procedentes de un virus del herpes, un poxvirus, un virus del papiloma, un parvovirus o un virus de la hepatitis; promotores procedentes del virus de simio 40 (SV40), un promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del VIH, el virus de Moloney, ALV, citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato del CMV, el virus de Epstein Barr (EBV), el virus del sarcoma de Rous (RSV), así como promotores procedentes de genes humanos tales como el factor de alargamiento 1A humano, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano y metalotioneína humana.

Los ejemplos de señales de poliadenilación útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen pero no se limitan a señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, señales de poliadenilación del SV40, y señales de poliadenilación de la LTR. En particular, se usa la señal de poliadenilación del SV40, que está en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA), denominada como la señal de poliadenilación del SV40.

Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del ADN, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN. Tales elementos adicionales incluyen un elemento de transporte constitutivo procedente del virus del mono de Mason-Pfizer y/o potenciadores. El potenciador se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a: actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano, y potenciadores víricos tales como aquellos procedentes del CMV, RSV y EBV.

A fin de maximizar la producción proteínica, se pueden seleccionar secuencias reguladoras que son muy adecuadas para la expresión génica en las células en las que se administra el constructo. Además, se pueden seleccionar codones que son transcritos de forma muy eficiente en la célula. Un experto normal en la técnica puede producir constructos de ADN que son funcionales en las células.

La presente invención se puede usar para inmunizar a un individuo frente a todos los patógenos tales como virus, organismos procariotas y eucariotas patógenos tales como organismos patógenos unicelulares y parásitos multicelulares. La presente invención es particularmente útil para inmunizar a un individuo frente a aquellos patógenos que infectan células, tales como virus, y procariotas tales como gonorrea, listeria y shigella. Además, la presente invención también es útil para inmunizar a un individuo frente a patógenos protozoicos, que incluyen una etapa en el ciclo vital en la que son patógenos intracelulares. Como se usa aquí, la expresión "patógeno intracelular" se refiere a un organismo patógeno o virus que, durante al menos parte de su ciclo reproductor o vital, existe dentro de una célula hospedante y produce allí, o hace que se produzcan, proteínas patógenas. La Tabla 1 proporciona un listado de algunas de las familias víricas y géneros para los cuales se pueden obtener vacunas según la presente invención. Los constructos de ADN que comprenden secuencias de ADN que codifican los péptidos que comprenden al menos un epítopo idéntico o sustancialmente similar a un epítopo presentado en un antígeno patógeno, tal como los antígenos enumerados en las tablas, son útiles en vacunas. Además, la presente invención es útil también para inmunizar a un individuo frente a otros patógenos que incluyen patógenos protozoicos procariotas y eucariotas, así como también parásitos multicelulares tales como los enumerados en la Tabla 2.

A fin de producir una vacuna genética para proteger frente a una infección por patógenos, el material genético que codifica proteínas immunogénicas frente a las cuales se puede provocar una respuesta inmunitaria protectora se debe de incluir en un constructo genético como la secuencia codificante para la diana. Tanto si el patógeno infecta intracelularmente, para lo cual la presente invención es particularmente útil, o extracelularmente, es improbable que todos los antígenos patógenos provocarán una respuesta protectora. La presente invención permite la vacunación con múltiples antígenos patógenos. El constructo genético usado en la vacuna genética puede incluir material genético que codifica muchos antígenos patógenos. Por ejemplo, se pueden incluir en un solo constructo varios genes víricos, proporcionando de ese modo múltiples dianas. Como alternativa, se pueden incluir múltiples constructos, que contienen uno o más genes patógenos, en diferentes moléculas de ADN, que entonces se combinan y se usan para preparar los complejos. Tales complejos contienen dos o más moléculas de ADN diferentes con diferentes constructos génicos dentro de una sola estructura.

ES 2 333 282 T3

Las Tablas 1 y 2 incluyen listas de algunos de los agentes patógenos y organismos para los cuales se pueden preparar vacunas genéticas para proteger a un individuo de su infección. En algunas formas de realización preferidas, los métodos de inmunización de un individuo frente a un patógeno están dirigidos contra el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH; el virus de la leucemia de células T humana, HTLV; el virus de la gripe; el virus de la hepatitis A; el virus de la hepatitis B; el virus de la hepatitis C; el virus del papiloma humano, HPV; el virus del herpes simple 1, HSV1; el virus del herpes simple 2, HSV2; citomegalovirus, CMV; el virus de Epstein-Barr, EBR; rinovirus; coronavirus; rotavirus; y el virus sincitial respiratorio.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para conferir una respuesta inmunitaria protectora amplia frente a células hiperproliferantes que son características en enfermedades hiperproliferativas, y un método para tratar a individuos que sufren enfermedades hiperproliferativas. Como se usa aquí, la expresión “enfermedades hiperproliferativas” se refiere a aquellas enfermedades y trastornos caracterizados por la hiperproliferación de células. Los ejemplos de enfermedades hiperproliferativas incluyen todas las formas de cáncer, tales como linfoma o melanoma, y psoriasis.

Se ha descubierto que la introducción de un constructo genético que incluye una secuencia nucleotídica que codifica una proteína inmunogénica asociada con “células hiperproliferantes” en las células de un individuo da como resultado la producción de aquellas proteínas en las células vacunadas de un individuo. Como se usa aquí, la expresión “proteína asociada a enfermedad hiperproliferativa” se refiere a proteínas que están asociadas con una enfermedad hiperproliferativa. Para inmunizar frente a enfermedades hiperproliferativas, se administra a un individuo un constructo genético que incluye una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que está asociada con una enfermedad hiperproliferativa.

Aunque la presente invención se puede usar para inmunizar a un individuo frente a una o más de varias formas de cáncer, la presente invención es particularmente útil para inmunizar profilácticamente a un individuo que está predisposto a desarrollar un cáncer particular, o que ha tenido cáncer y por lo tanto es susceptible de recaer. Los desarrollos en genética y tecnología, así como en epidemiología, permiten la determinación de la probabilidad y evaluación del riesgo de desarrollar cáncer en un individuo. Usando detecciones genéticas y/o antecedentes familiares, es posible predecir la probabilidad que tiene un individuo particular de desarrollar uno cualquiera de varios tipos de cáncer.

De forma similar, aquellos individuos que ya han desarrollado cáncer y que han sido tratados para eliminar el cáncer o de otro modo está remitiendo son particularmente susceptibles a la recaída y reaparición. Como parte de un régimen de tratamiento, tales individuos se pueden inmunizar frente al cáncer que se les ha diagnosticado, a fin de combatir una recidiva. De este modo, una vez se sabe que un individuo ha tenido un tipo de cáncer y tiene riesgo de recaída, se puede inmunizar a fin de preparar su sistema inmunitario para combatir cualquier aparición futura del cáncer.

La presente invención proporciona un método para tratar a individuos que sufren enfermedades hiperproliferativas. En tales métodos, la introducción de constructos genéticos sirve como una inmunoterapia, dirigiendo y promoviendo el sistema inmunitario del individuo para combatir células hiperproliferativas que producen la proteína diana.

La presente invención proporciona un método para tratar a individuos que sufren enfermedades y trastornos autoinmunitarios, confiriendo una respuesta inmunitaria protectora amplia frente a dianas que están asociadas con autoinmunidad, incluyendo receptores celulares y células que producen anticuerpos dirigidos contra “sí mismos”.

Las enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T incluyen artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), síndrome de Sjogren, sarcoidosis, diabetes mellitus insulinodependiente (IDDM), tiroiditis autoinmunitaria, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, esclerodermia, polimiositis, dermatomiositis, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por receptores de células T que se unen a抗ígenos endógenos e inicien la cascada inflamatoria asociada con enfermedades autoinmunitarias. La vacunación frente a la región variable de las células T provocaría una respuesta inmunitaria, incluyendo los CTL, para eliminar aquellas células T. A fin de tratar pacientes que sufren una enfermedad autoinmunitaria mediada por células T, particularmente aquellas para las cuales todavía se ha de caracterizar la región variable del TCR, se puede llevar a cabo una biopsia sinovial. Se pueden tomar muestras de las células T presentes, y la región variable de esos TCR se puede identificar usando técnicas estándar. Usando esta información, se pueden preparar vacunas genéticas.

Las enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T incluyen lupus (SLE), enfermedad de Grave, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, asma, crioglobulinemia, esclerosis biliar primaria y anemia perniciosa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por anticuerpos que se unen a抗ígenos endógenos e inicien la cascada inflamatoria asociada con enfermedades autoinmunitarias. La vacunación frente a la región variable de anticuerpos provocaría una respuesta inmunitaria, incluyendo los CTL, para eliminar aquellas células B que producen el anticuerpo. A fin de tratar pacientes que sufren una enfermedad autoinmunitaria mediada por células B, se debe de identificar la región variable de los anticuerpos implicados en la actividad autoinmunitaria. Se puede llevar a cabo una biopsia, y se pueden tomar muestras de los anticuerpos presentes en el sitio de inflamación. La región variable de esos anticuerpos se puede identificar usando técnicas estándar. Usando esta información, se pueden preparar vacunas genéticas.

ES 2 333 282 T3

- Según algunas formas de realización preferidas, el complejo es una formulación de vacuna, y el ADN es ADN plasmídico que codifica de forma operable un inmunógeno frente al cual se puede inducir una respuesta inmunitaria contra el patógeno. Las formas de realización preferidas incluyen plásmidos que codifican inmunógenos que inducen respuestas inmunitarias frente a patógenos expuestos en las Tablas 1 y 2. Segundo algunas formas de realización preferidas, el inmunógeno es un antígeno patógeno. En algunas formas de realización, se pueden incluir proteínas inmunomoduladoras en el complejo, y/o se pueden codificar por el plásmido. En algunas formas de realización preferidas, se pueden incluir en el complejo proteínas y péptidos inmunogénicos, particularmente los relacionados con el inmunógeno codificado por el plásmido.
- Según algunas formas de realización preferidas, el ADN es ADN plasmídico que codifica de forma operable una proteína terapéuticamente activa, tal como una proteína inmunomoduladora o una proteína de otro modo fisiológicamente activa. El suministro de tal ADN a un individuo da como resultado la expresión de la proteína, la cual es activa entonces en el individuo.
- En algunas formas de realización de la invención, las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser un ADN portador usado para formar los complejos para portar otros agentes activos pero no codificar proteínas a expresar en las células en el individuo al que se administran los complejos. Los ejemplos de ADN portador incluyen ADN plasmídico, ADN de esperma de salmón, ADN humano, ADN bacteriano, y ADN fágico. En algunas formas de realización de la invención, las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser ARN.
- En algunas formas de realización de la invención, el otro agente activo puede ser proteínas, polipéptidos, péptidos, ARN, u otras moléculas no proteicas tales como compuestos terapéuticos/fármacos. Los ejemplos de proteínas incluyen antígenos/inmunógenos que son dianas para una respuesta inmunitaria deseada, citocinas tales como IL-12, GM-CSF, factores coestimulantes, quimiocinas tales como MCP-1 y RANTES, factores de transcripción, polimerasas, hormonas, y factores de crecimiento. Ejemplos de ARN incluyen ARN antisentido, ribozimas y ARN formador de tríplex. Ejemplos de proteínas, polipéptidos y péptidos incluyen proteínas, polipéptidos y péptidos antigenicos/inmunogénicos que son dianas para una respuesta inmunitaria deseada, y péptidos biológicamente activos tales como somatostatina e IGF-1. Los ejemplos de moléculas no proteicas, tales como compuestos terapéuticos/fármacos, incluyen: compuestos antitumorales tales como tamoxifeno, doxirubicina, taxol, cisplatino; compuestos antiviricos tales como ddI y ddA, compuestos antiinflamatorios tales como NSAID y esteroides; compuestos antibióticos tales como compuestos antifúngicos y antibacterianos, y fármacos que reducen el colesterol.
- La formación del complejo de anestésico local/ácido nucleico se produce en las condiciones específicas, incluyendo relaciones molares específicas de anestésico local y ácido nucleico, concentraciones de sal específicas, y pH específico. Además, dependiendo de las etapas del procedimiento, se pueden producir complejos de diferentes tamaños que tienen diferentes estructuras macromoleculares.
- Con respecto al pH, éste debería de estar por encima del pKa del anestésico local, para asegurar que el grupo amino está cargado positivamente. El pH es 4-8,5, más preferentemente 6-7,5.
- Con respecto a la concentración de sal, ésta debería de ser suficientemente baja para permitir la carga positiva de los complejos de anestésico local con la carga negativa de los grupos fosfato del ácido nucleico. En algunas formas de realización, las concentraciones de sal de las formulaciones de anestésico local/ácido nucleico se incrementan tras la formación del complejo.
- Las vías de administración incluyen la parenteral así como las vías tópica o mucosal. En algunas formas de realización, las vesículas se suministran intramuscularmente, intravenosamente, intraarterialmente, intratumoralmente, intradérmicamente, subcutáneamente, transdérmicamente, intraperitonealmente, tópicamente, intranasalmente, oralmente, incluyendo el suministro oral protegido entéricamente, mediante inhalación, o tópicamente o mediante sonda al tejido mucosal seleccionado del grupo que consiste en vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual. La composición de la invención se puede administrar por medios tradicionales, incluyendo, pero sin limitarse a, jeringuillas, dispositivos de inyección sin agujas, o "pistolas génicas de bombardeo con microproyectiles". Los procedimientos de bombardeo de partículas en forma de microproyectiles, mostrados por Sanford *et al.* en la patente U.S. 4.945.050 expedida el 31 de julio de 1990, que se incorpora aquí como referencia, se pueden adaptar para la administración de composiciones de la invención a individuos.
- Como se usan aquí, las expresiones "composiciones farmacéuticas" y "composiciones farmacéuticas inyectables" tienen su significado normal y bien entendido y aceptado, el cual se aprecia totalmente por los expertos normales en la técnica. Las composiciones que se administran a pacientes como composiciones farmacéuticas son generalmente composiciones estériles, libres de pirógenos. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección, es decir, composiciones farmacéuticas inyectables, son estériles, libres de pirógenos y esencialmente libres de materia extraña, así como están ajustadas para isotonicidad y con un pH apropiado y consistente con la inyección segura y eficaz en un individuo.
- Con respecto a la relación anestésico local/ácido nucleico, el tamaño de las partículas del complejo depende de la relación. De este modo, el tamaño de partículas se puede determinar ajustando la relación anestésico local/ácido nucleico. Se pueden desear diferentes tamaños de partículas, dependiendo de qué tipo de célula se selecciona para la transferencia génica.

ES 2 333 282 T3

El tamaño de los complejos de anestésico local/ácido nucleico, o de las estructuras de mayor orden, se puede controlar mediante varios factores, incluyendo si se usan lípidos de tipo ácido graso de cadena larga, la longitud de la cadena hidrófoba tanto del componente lipídico como del componente del anestésico local, y las relaciones exactas de anestésicos locales y lípidos entre sí.

5 En algunas formas de realización preferidas, los anestésicos locales se proporcionan a una concentración final de 0,01-2,5% (p/v), más preferentemente 0,05-1,25% (p/v). En algunas formas de realización preferidas, la concentración final es 0,25% (p/v).

10 En algunas formas de realización preferidas, los ácidos nucleicos se proporcionan a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10 mg/ml, más preferentemente 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -3 mg/ml. En algunas formas de realización preferidas, la concentración final es 1 mg/ml.

15 En algunas formas de realización preferidas, la relación de la concentración de [ácido nucleico]:[anestésico local] es [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10 mg/ml]:[0,01-2,5% (p/v)], preferentemente [100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -3 mg/ml]:[0,05-1,25% (p/v)]. En algunas formas de realización preferidas, la relación de concentración de [ácido nucleico]:[anestésico local] es [800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$]:[0,1-0,25% (p/v)].

20 Los complejos de anestésico local se forman espontáneamente cuando se combinan con moléculas de ácidos nucleicos. La carga del anestésico local se puede determinar seleccionando condiciones que favorezcan una forma cargada. En algunas formas de realización preferidas, el anestésico local está cargado positivamente y se combina con ácido nucleico cargado negativamente, en algunas formas de realización preferidas ADN. La combinación de anestésicos locales cargados positivamente con ADN da como resultado la formación de complejos. Las estructuras individuales se pueden agregar en estructuras más grandes, de mayor orden. Algunos agregados aparecen como estructuras de tipo 25 rodillo, que parecen ser estructuras individuales organizadas como habas en una vaina, es decir, vesículas encapsuladas en una estructura vesicular en láminas más grande.

30 Si el anestésico local, tal como bupivacaína, se mezcla directamente con el ácido nucleico, tal como ADN, tal como mediante mezcla inmediata, se forman estructuras de aproximadamente 100-150 nm de diámetro, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido, las cuales se pueden agregar en estructuras más grandes, y en algunos casos con forma irregular, que son mayores que 300 nm de diámetro, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido. Se pueden obtener velocidades más lentas de mezclamiento usando dialización; ya sea dializando el anestésico local en una disolución de moléculas de ácidos nucleicos, o combinando el anestésico local, las moléculas de ácidos nucleicos y la sal y eliminando la sal mediante dialización. La combinación del anestésico local y ácido nucleico 35 mediante una velocidad lenta de mezclamiento, tal como mediante dialización, usando concentraciones bajas de ADN con relación a la concentración de anestésico local, favorece la formación de estructuras más pequeñas, de 50-150 nm de diámetro, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido. La combinación del anestésico local y el ácido nucleico usando concentraciones más elevadas de ADN con relación a la concentración de anestésico local favorece la formación de estructuras más grandes hasta 1 micrómetro o más de diámetro, según se mide mediante microscopía 40 electrónica de barrido. Un procedimiento de mezclamiento lento preferido combina los componentes en presencia de una gran cantidad de sal, que se elimina mediante dialización durante varias horas.

45 Como se ha expuesto anteriormente, la dialización se puede usar para controlar la velocidad de la formación del complejo. En algunos procedimientos, el anestésico local y las moléculas de ácidos nucleicos se combinan en una membrana de dialización en una disolución con una concentración elevada de sal. La membrana se coloca entonces en una vasija que contiene una baja concentración de sal, habitualmente la concentración deseada para la disolución final que contiene el complejo. La sal en la disolución en la membrana migra a través y hacia fuera de la membrana hacia la disolución que la rodea, y la concentración de sal en la membrana se reduce en consecuencia. Puesto que la concentración de sal disminuye, la disolución dentro de la membrana favorece la formación del complejo. Este procedimiento es particularmente útil cuando los agentes adicionales a encapsular en los complejos son hidrófobos.

50 En algunos procedimientos, las moléculas de ácidos nucleicos están en una disolución en una membrana de dialisis. La membrana se coloca entonces en una vasija que contiene el anestésico local a la concentración para la formación del complejo, habitualmente la concentración final de la disolución que contiene el complejo. El anestésico local en la disolución circundante migra a través de la membrana hacia la disolución en la membrana. Puesto que aumenta la concentración de anestésico local en la disolución en la membrana, la disolución dentro de la membrana favorece la formación del complejo. Generalmente, usando una membrana de dialisis con un tamaño de corte de 10.000-100.000 kD, el tiempo de equilibrio para que la concentración del anestésico local dentro de la membrana sea igual a la concentración del anestésico local fuera de la membrana es de aproximadamente 2-3 horas. Usando una membrana de dialisis con un tamaño de corte de 3.000 kD, el tiempo de equilibrio para que la concentración de anestésico local dentro de la membrana sea igual a la concentración de anestésico local fuera de la membrana es de aproximadamente 5 horas. En la disolución de ácido nucleico dentro de la membrana se pueden incluir agentes adicionales a encapsular en el complejo, con la condición de que tales agentes sean solubles en la disolución.

65 En una forma de realización, la bupivacaína se combina a una concentración final de 0,25% (p/v) de bupivacaína en una disolución acuosa con 100-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN mediante mezclamiento directo. El pH es inferior a 8, preferentemente 6,5-7. La concentración de sal es menor que 200 mM. Se forman estructuras de aproximadamente 100-150

ES 2 333 282 T3

nm de diámetro, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido, al igual que se forman agregados de tales complejos que forman estructuras más grandes que tienen un diámetro mayor que 300 nm, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido.

- 5 En una forma de realización, la bupivacaína se combina a una concentración final de 0,25% (p/v) con un disolvente orgánico, tal como cloroformo, y se seca mediante evaporación. El ADN en la disolución acuosa, a 100-1000 µg/ml, se mezcla con el evaporado. El pH es inferior a 8, preferentemente 6,5-7. La concentración de sal es menor que 500 mM. Se forman estructuras de aproximadamente 100-150 nm de diámetro, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido, como también se forman agregados de tales complejos que forman estructuras más grandes que tienen un diámetro mayor que 300 nm, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido.

En una forma de realización, la bupivacaína se combina a una concentración final de 0,25% (p/v) de bupivacaína en una disolución acuosa con menos de 100 µg/ml de ADN. El pH es inferior a 8, preferentemente 6,5-7. La concentración de sal es menor que 500 mM. Se forman estructuras de complejos de aproximadamente 50-150 nm de diámetro, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido.

En una forma de realización, la bupivacaína se combina a una concentración final de 0,25% (p/v) de bupivacaína en una disolución acuosa con hasta 1000 µg/ml de ADN. Los dos materiales se combinan lentamente mediante 20 diálisis durante más de una hora. El pH es inferior a 8, preferentemente 6,5-7. La concentración de sal es superior a 2M. La sal se extrae de la disolución, y las vesículas se autoensamblan a medida que se elimina la sal. Se forman estructuras de complejos de aproximadamente 50-150 nm de diámetro, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido. Para estabilizar la estructura final, se pueden usar cationes tales como Ca⁺⁺ o aniones tales como PO₄.

25 En otra forma de realización, una mezcla de anestésico local, lípido y ácido nucleico en una concentración elevada de sal se autoensambla lentamente en complejos al dializarla.

En una forma de realización, el anestésico local y, opcionalmente, lípidos se mezclan en un disolvente orgánico 30 como se describe anteriormente. El disolvente se evapora mediante técnicas estándar. Al material seco se le añade un tampón acuoso que contiene la molécula de ácido nucleico, y los complejos se autoensamblan al mezclar. Para el suministro de agentes activos hidrófobos, el agente activo se puede añadir a los lípidos en el disolvente antes del secado. En el tampón que contiene la molécula de ácido nucleico se pueden incluir proteínas, polipéptidos, péptidos y compuestos hidrófilos no proteicos. Los agentes activos se pueden encapsular en consecuencia.

35 En otra forma de realización, los complejos catiónicos se pueden obtener como se expone anteriormente, excepto que se forman sin moléculas de ácidos nucleicos, que se añaden después. Por ejemplo, el anestésico local y, opcionalmente, lípidos se mezclan en un disolvente orgánico como se describe anteriormente. El disolvente se evapora mediante técnicas estándar. Al material seco se le añade un tampón acuoso que no contiene la molécula de ácido nucleico, y los complejos "vacíos" se autoensamblan al mezclar. El tampón que contiene la molécula de ácido nucleico se añade entonces en disolución como una segunda etapa tras la reconstitución.

40 En otro ejemplo, los complejos sólidos que precipitan como partículas o cristales en asociación con el ácido nucleico se producen en mezcla ajustando hacia arriba el pH cerca del pKa del anestésico local.

45 En algunas formas de realización, los complejos de anestésico local:ácido nucleico comprenden además proteínas tales como citocinas, y/o proteínas o péptidos inmunogénicos. En consecuencia, las proteínas inmunomoduladoras se pueden administrar como parte de complejos de anestésico local:ácido nucleico en los que el ácido nucleico codifica una proteína inmunomoduladora y/o una proteína inmunogénica. En algunas formas de realización, el ácido nucleico es una vacuna genética, y la proteína coagente es una proteína inmunomoduladora tal como una citocina, por ejemplo GMCSF o IL-12. En algunas formas de realización, el ácido nucleico es una vacuna genética, y la proteína coagente es una proteína o péptido inmunogénico. Según tales formas de realización, la vacuna, tal como se suministra, es una dosis simultánea de sensibilización/recuerdo.

55 Los complejos se pueden combinar para formar estructuras/complejos más grandes, incluyendo estructuras de 1-5 micrómetros.

60 En algunas formas de realización, los complejos tienen un diámetro mayor que 400 nm, según se mide mediante microscopía electrónica de barrido. Tales complejos se pueden usar para suministrar material al pulmón cuando se administran a un individuo, por ejemplo, mediante administración intravenosa.

65 Las composiciones y métodos de la presente invención son útiles en los campos de medicina tanto humana como veterinaria. En consecuencia, las composiciones y métodos de la presente invención se pueden usar para tratar terapéutica y profilácticamente mamíferos individuales, pájaros o peces. Las composiciones y métodos de la presente invención pueden ser particularmente útiles para composiciones y métodos para tratar individuos de especie mamífera, incluyendo la especie humana, bovina, ovina, porcina, equina, canina y felina.

ES 2 333 282 T3

La presente invención no pretende estar limitada por ninguna teoría particular. Los Ejemplos expuestos a continuación se refieren a algunas formas de realización de aspectos de la presente invención. Los ejemplos no se proporcionan a título limitativo del alcance de la invención, sino que se proporcionan a título ejemplificativo. El experto en la materia apreciará fácilmente aspectos y otras formas de realización de la invención.

5

Ejemplos

Según algunas formas de realización preferidas de la presente invención, las respuestas inmunitarias inducidas mediante vacunas de ADN facilitadas por anestésicos locales se pueden mejorar cuando se combinan un anestésico local y ADN y se suministran como complejos de un anestésico local con ADN. En algunas formas de realización preferidas, el anestésico local es bupivacaína.

Según la presente invención, las respuestas inmunitarias inducidas mediante vacunas de ADN facilitadas por anestésicos locales se pueden mejorar cuando se combina un anestésico local con un coagente y ADN para formar complejos.

Una molécula aniónica tal como ADN se asocia con la porción positiva hidrófila de la estructura autoensamblada. El complejo se asocia con las células, y su propiedad altamente lipófila facilita su captación en las células. La utilidad incluye la terapia génica y la inmunización genética.

En algunas formas de realización, se generan complejos más grandes, que tienen un tamaño suficiente para ser captados por las células como partículas mediante un mecanismo que implica pinocitosis o fagocitosis. Tales complejos en partículas grandes se usan en el campo de vacunas para la inmunización o immunoterapia, o en el campo de la terapia génica para seleccionar como dianas a células en el sistema inmunitario, tales como células que presentan抗原s que expresan MHC-II, como células dendríticas o macrófagos. La ventaja adicional de tal complejo grande es que el anestésico local también facilita la liberación de endosomas y lisozomas dentro de las células.

En algunas formas de realización, los complejos de anestésico local/ADN liofilizados/secados tienen la utilidad para el suministro génico y la inmunización genética. Como ejemplo, se usan solos o en combinación con otros ingredientes sólidos para obtener comprimidos para el suministro oral de ADN, o para obtener nanopartículas o micropartículas para el suministro de ADN. Los complejos o partículas de anestésico local se usan para el suministro oral de vacunas o para terapia génica, puesto que protegen las moléculas activas asociadas de la degradación en el estómago, y facilitan su captación en los tejidos linfáticos asociados con el intestino.

En otro ejemplo, un fármaco hidrófobo poco soluble se encapsula en el medio hidrófobo en el núcleo del complejo, mientras que la superficie de la estructura está cargada positivamente, lo que mejora la solubilidad del fármaco. La especie cargada positivamente tiene una atracción natural por la superficie de células rica en fosfolípicos y cargada negativamente. Después de la atracción, la naturaleza altamente lipófila de la estructura facilita el suministro a través de las membranas celulares. La utilidad incluye el suministro de fármacos contra el cáncer poco solubles o sistémicamente tóxicos, tales como taxoles o vincristina, a células cancerígenas/tumores de mama.

En otro ejemplo, los complejos protegen a biomoléculas asociadas de la degradación enzimática en la sangre, o de la interacción no productiva con componentes sanguíneos, o de respuestas inmunitarias no productivas. Los anestésicos locales de tipo amida usados en estos complejos pueden tener una ventaja particular con respecto a los anestésicos locales de tipo éster, puesto que no se degradan en la sangre.

En otro ejemplo, los complejos se formulan en una crema, jalea, loción, ungüento para el suministro tópico de fármacos, ADN, etc., a los sitios de las mucosas y a través de la piel.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 333 282 T3

TABLA 1

5	Familia de Picornavirus Género:	Rinovirus: (médicamente) responsables de ~50% de los casos del resfriado común Enterovirus: (médicamente) incluyen poliovirus. Coxsackievirus, ecovirus, y enterovirus humanos tales como el virus de la hepatitis A Aftovirus: (veterinariamente) estos son los virus de la glosopeda.
10		
15	Antígenos diana: VP1, VP2, VP3, VP4, VPG	
20	Familia de Calcivirus Género:	Grupo de virus de Norwalk: (médicamente) estos virus son un agente etiológico importante de gastroenteritis epidémica.
25	Familia de Togavirus Género:	Alfavirus: (médica y veterinariamente) los ejemplos incluyen virus de Sindbis, virus de RossRiver y encefalitis equina oriental y occidental. Rubivirus: (médicamente) virus de la rubéola.
30	Familia de Flariviridae	los ejemplos incluyen: (médicamente) los virus del dengue, de la fiebre amarilla, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis de St. Louis y de la encefalitis portada por la garrapata.
35	Virus de la Hepatitis C:	(médicamente) estos virus no están colocados en una familia todavía, pero se cree que son un togavirus o un flavivirus. La mayor similitud la tienen con la familia de togavirus.
40	Familia de Coronavirus: (médica y veterinariamente)	Virus de la bronquitis infecciosa (aves) Virus gastroenterico transmisible porcino (cerdo) Virus de encefalomielitis hemoaglutinante porcina (cerdo)
45		Virus de peritonitis infecciosa felina (gatos) Coronavirus entérico felino (gato) Coronavirus canino (perro)
50		Los coronavirus respiratorios humanos provocan ~40 casos de resfriado común. EX. 224E, 0C43 Nota – los coronavirus pueden provocar hepatitis no A, B o C
55	Antígenos diana:	E1 – también denominado M o proteína de la matriz E2 – también denominado S o proteína Spike
60		E3 – también denominada HE o glicoproteína de hemaglutinina-alterosa (no presente en todos los coronavirus) N – nucleocápsida

65

	Familia de Rhabdovirus	
	Género:	Vesiculovirus: virus de la estomatitis vesicular
5	Antígenos diana:	Lisavirus: (médica y veterinariamente) rabia proteína G proteína N
	Familia de Filoviridae: (médicamente)	Virus de fiebres hemorrágicas tales como el virus de Marburg y el de Ébola
10		
	Familia de Paramixovirus:	Virus de Parainfluenza tipo 1
	Género:	Virus de Parainfluenza tipo 3
15		Virus de Parainfluenza bovina tipo 3
		Rubulavirus: (médica y veterinariamente)
20		Virus de las paperas, virus de la parainfluenza tipo 2, virus de la parainfluenza tipo 4, virus de la enfermedad de NewCastle (patógeno importante en pollos)
		Morbillivirus: (médica y veterinariamente)
25		Sarampión, moquillo
		Pneumonvirus: (médica y veterinariamente)
		Virus sincitial respiratorio
	Familia de Ortomixovirus (médicamente)	El virus de la gripe
30	Familia de Bunyavirus	
	Género:	Bunyavirus: (médicamente) encefalitis de California, encefalitis de La Crosse
35		Flerovirus: (médicamente) fiebre del valle del Rift
		Hantavirus: Puremala es un virus de fiebre de hemahagina
		Nairovirus (veterinariamente) enfermedad de las ovejas de Nairobi
40		También muchos bungavirus no asignados
	Familia de Arenavirus (médicamente)	LCM, virus de la fiebre de Lassa
45	Familia de Reovirus	
	Género:	Reovirus: un posible patógeno humano
		Rotavirus: gastroenteritis aguda en niños
50		Orbivirus: (médica y veterinariamente)
		Cultivirus: fiebre de la garrapata de Colorado, encefalosis equina de Lebombo (seres humanos), lengua azul
55	Familia de Retrovirus	
	Sub-familia:	Oncorivinal: (veterinariamente) (médicamente) virus de la leucemia felina, HTLV y HTLVII
		Lentiviral: (médica y veterinariamente) VIH, virus de la inmunodeficiencia felina, infecciones equinas, virus de la anemia
60	Familia de Papovavirus	Spumavinal

ES 2 333 282 T3

5	Subfamilia: Subfamilia:	Poliomavirus: (médicamente) virus de BKU y JCU Papilomavirus: (médicamente) muchos tipos víricos asociados con cánceres o progresión tumoral de papiloma
10	Adenovirus (médicamente)	EX AD7, ARD, O.B. – provocan enfermedad respiratoria – algunos adenovirus tales como 275 provocan enteritis
15	Familia de Parvovirus (veterinariamente)	Parvovirus felino: provoca enteritis felina Panleucopeniavirus felino Parvovirus canino Parvovirus porcino
20	Familia de Herpesvirus: Subfamilia: alfaherpesviridae Género:	Simplexvirus (médicamente) HSV I, HSV II Varicelovirus: (médica - veterinariamente) pseudorrabia-varicela zóster
25	Subfamilia – betaherpesviridae Género:	Citomegalovirus (médicamente) HCMV Muromegalovirus
30	Subfamilia: Gammaherpesviridae Género:	Linfocryptovirus (médicamente) EBV – (linfoma de Burkitt) Radinovirus
35	Familia de Poxvirus Subfamilia: Chordopoxviridae (médica – veterinariamente) Género:	Ortopoxvirus Viruela (Smallpox) Virus de la vacuna (Cowpox) Parapoxvirus - veterinariamente Auiopoxvirus – veterinariamente Capropoxvirus Leporipoxvirus Suipoxvirus
40	Subfamilia: Entemopoxviridae	
45	Familia de Hepadnavirus: virus de la hepatitis B Sin clasificar: virus delta de la hepatitis	
50		
55		
60		
65		

ES 2 333 282 T3

TABLA 2

5 Patógenos bacterianos

10 Los cocos grampositivos patógenos incluyen: neumococos; estafilococos; y estreptococos. Los cocos gramnegativos patógenos incluyen: meningococos y gonococos.

15 Los bacilos gramnegativos entéricos patógenos incluyen: enterobacteriáceas; pseudomonas, acinetobacterias y eikenella; melioidosis; salmonela; shigelosis; hemófilo; moraxela; chancroide; brucellosis; tularemia; yersinia (pasteurella); estreptobacilo moniliforme y espirilio; listeria monocitogenes; erisipeloctrix rhusiopathiae; difteria; cólera; ántrax; donovanosis (granuloma inguinal); y bartonelosis.

20 Bacterias anaerobias patógenas incluyen: tétano; botulismo; otros clostridios; tuberculosis; lepra; y otras micobacterias. Las enfermedades espiroquéticas patógenas incluyen: sífilis; treponematosis: yaws, pinta y sífilis endémica; y leptospirosis.

25 Otras infecciones provocadas por bacterias patógenas superiores y hongos patógenos incluyen: actinomicosis; nocardiosis; criptococcosis, blastomicosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis; candidasis, aspergilosis, y mucormicosis; esporotricosis; paracoccidioidomicosis; petrielidiosis, torulopsis, micetoma y cromomicosis; y dermatofitosis.

30 Las infecciones por rickettsias incluyen rickettsia y rickettsiosis.

35 Los ejemplos de infecciones por micoplasmas y clamidias incluyen: neumonía micoplásrica; linfogranuloma venéreo; psitacosis; e infecciones clamídicas perinatales.

40 Eucariotas Patógenas

45 Protozoos patógenos y helmintos e infecciones incluyen de ese modo: amebiasis; malaria; leishmaniasis; tripanosomiasis; toxoplasmosis; neumocistis carinii; babesiosis; giardiasis; triquinosis; filariasis; esquistosomiasis; nemátodos; tremátodos o infecciones parasitarias; e infecciones por céstodos (tenia).

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para obtener una composición que comprende complejos de un anestésico local y una molécula de ácido nucleico, que comprende las etapas de combinar 0,01-2,5% p/v de anestésico local con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10 mg/ml de ácido nucleico en presencia de una sal a un pH de 4-8,5, y en el que dicho anestésico local contiene un nitrógeno catiónico, un pKa de aproximadamente 7 a 9, se une a ADN, y contiene un grupo hidrófobo.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los complejos se forman combinando 0,05-1,25% p/v de anestésico local con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -1 mg/ml de ácido nucleico en presencia de menos de 500 mM de sal a un pH de 6-7,5.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los complejos se forman combinando 0,1-0,5% p/v de anestésico local con 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nucleico en presencia de menos de 500 mM de sal a un pH de 6-7,5.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los complejos se forman combinando 0,1-0,5% p/v de anestésico local con 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nucleico en presencia de más de 2M de sal a un pH de 6-7,5, seguido de la eliminación de la sal hasta una concentración por debajo de 500 mM.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los complejos comprenden además una proteína, polipéptido, péptidos, o fármaco/compuesto terapéutico no proteico, y las vesículas laminares se forman combinando 0,1-0,5% p/v de anestésico local con 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nucleico y dicha proteína, polipéptido, péptidos, o fármaco/compuesto terapéutico no proteico en presencia de una concentración mayor que 2M de sal a un pH de 6-7,5, seguido de la eliminación de la sal hasta una concentración por debajo de 500 mM.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el mezclamiento se lleva a cabo mediante diálisis.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la diálisis se lleva a cabo durante un período de dos a tres horas.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la diálisis se lleva a cabo durante un período de cinco horas.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de sal es menor que 200 mM.
- 50 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anestésico local es bupivacaína.
- 55 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico es ADN.
- 60 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho ácido nucleico es ADN plasmídico.
- 65 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico es ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un antígeno patógeno.
- 70 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico es ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un antígeno vírico.
- 75 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho ácido nucleico es ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína asociada con una enfermedad hiperproliferativa.

50

55

60

65