

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 458**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.1999 E 06021432 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **12.09.2007 EP 1832657**

54 Título: **Metilación de vectores plasmídicos**

30 Prioridad:

09.09.1998 US 99583 P

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

31.01.2013

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**CHENG, SENG H.;
MARSHALL, JOHN;
SCHEULE, RONALD K.;
YEW, NELSON S.;
TOUSIGNANT, JENNIFER D. y
PRZYBYLSKA, MALGORZATA**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 394 458 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

Metilación de vectores plasmídicos

5 **Campo técnico**

[0001] La presente invención se refiere a un novedoso procedimiento de reducción de la toxicidad y aumento de la eficacia de la administración génica. La presente invención también se refiere a procedimientos de modulación de la respuesta inmunoestimuladora frente al tratamiento génico, en especial, la reducción de las respuestas
10 inmunoestimuladoras como las respuestas inflamatorias, y la reducción del estrés en el hígado.

[0002] La introducción eficaz de genes extraños y de otras moléculas biológicamente activas en células diana de mamífero es un reto al que se siguen enfrentando los expertos. La terapia génica requiere la transfección eficaz de las células diana de un paciente. La transfección, que es especialmente útil de por sí, puede definirse en términos
15 generales como un proceso de introducción de un polinucleótido que se puede expresar (por ejemplo, un gen, un ADNc o un ARNm) para la expresión sentido o complementaria dentro de una célula. La expresión eficaz del polinucleótido codificador transfectado de esta forma da lugar a la producción en las células de un producto de transcripción y/o traducción que también es especialmente útil de por sí. Un objetivo es, por supuesto, obtener
20 suficiente expresión para dar lugar a la corrección del estado patológico asociado al gen anómalo.

Antecedentes de la técnica

[0003] Entre los ejemplos de enfermedades que son objeto de la terapia génica se incluyen: trastornos hereditarios, como fibrosis quística, hemofilia, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y distrofia muscular.
25 Ejemplos de trastornos adquiridos objetivo son: 1) para cánceres: mieloma múltiple, leucemias, melanomas, carcinoma de ovario y cáncer de pulmón microcítico; 2) para enfermedades cardiovasculares: insuficiencia cardiaca progresiva, reestenosis y hemofilias y 3) para enfermedades neurológicas: lesión cerebral traumática.

[0004] La fibrosis quística, un trastorno genético mortal común, es un ejemplo concreto de enfermedad que es
30 diana de la terapia génica. La enfermedad está causada por la presencia de una o más mutaciones en el gen que codifica una proteína conocida como regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística («CFTR»). La fibrosis quística (FQ) se caracteriza por la producción crónica de esputo, infecciones recurrentes y destrucción del pulmón (Boat, T.F., *McGraw-Hill, Inc.*, 1989, p. 2649 – 2680). Aunque no se conoce con precisión cómo puede la
35 mutación del gen CFTR causar la manifestación clínica (Welsh, M.J. y col. *Cell* 73: 1251 – 1254, 1993), está bien documentada la secreción defectuosa de Cl^- y el aumento de la absorción de Na^+ (Welsh, M.J. y col., *Cell* 73: 1251 – 1254, 1993; Quinton, P.M., *FASEB Lett.* 4: 2709 – 2717, 1990). Además, estos cambios en el transporte iónico producen alteraciones en el transporte de fluidos a través de la superficie de epitelios glandulares (Jiang, C. y col.,
40 *Science* 262: 424 – 427, 1993; Jiang, C. y col., *J. Physiol. (Londres)*, 501.3: 637 – 647, 1997; Smith, J.J. y col. *J. Clin. Invest.*, 91: 1148 – 1153, 1993 y Zhang, Y. y col., *Am.J.Physiol* 270: C1326 – 1335, 1996). Las alteraciones resultantes en el contenido de agua y sales del líquido de las vías respiratorias (LVR) puede disminuir la actividad de péptidos bactericidas secretados por las células epiteliales (Smith, J.J. y col., *Cell*, 85: 229 – 236, 1996) y/o
alteración del aclaramiento mucociliar, favoreciendo así las infecciones e inflamaciones pulmonares recurrentes.

[0005] Generalmente se espera que la terapia génica proporcionará una forma duradera y predecible de
45 terapia para determinados estados patológicos, como la FQ; sin embargo, continúa existiendo la necesidad de desarrollar procedimientos mejorados que faciliten la entrada de genes funcionales en las células y cuya actividad a este respecto sea suficiente para proporcionar la administración *in vivo* de genes u otras moléculas biológicamente activas.

[0006] La introducción eficaz de muchos tipos de moléculas biológicamente activas ha sido difícil y no todos
50 los procedimientos que se han desarrollado son capaces de llevar a cabo una administración eficaz de cantidades adecuadas de las moléculas deseadas en las células diana. La compleja estructura, comportamiento y entorno que presenta un tejido intacto diana de la administración intracelular de moléculas biológicamente activas, a menudo interfiere considerablemente con dicha administración. Se han empleado varios procedimientos y vehículos de
55 administración, entre los que se incluyen vectores virales, ADN encapsulado en liposomas, vehículos lipídicos de administración y ADN desnudo, para realizar la administración de ADN dentro de las células de mamíferos. Hasta la fecha, se ha demostrado la administración de ADN *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* usando muchos de los procedimientos mencionados anteriormente.

[0007] Por ejemplo, se ha demostrado que la transfección viral es relativamente eficaz. No obstante, la
60 respuesta inmunológica del huésped presenta posibles problemas. Específicamente, las proteínas virales activan los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) que destruyen las células infectadas con virus acabando, así, con la expresión génica en los pulmones de modelos *in vivo* examinados. Otro problema es la reducida transferencia

génica tras la administración repetida de vectores virales debido al desarrollo de anticuerpos antivirales neutralizantes. Actualmente estos temas se están abordando mediante la modificación tanto de los vectores como del sistema inmunitario del huésped. Asimismo, se está prestando más atención a los vectores no virales y no proteínicos como técnicas alternativas.

5

[0008] Puesto que los compuestos diseñados para facilitar la administración intracelular de moléculas biológicamente activas deben interaccionar tanto con entornos polares como no polares (por ejemplo, en o sobre la membrana plasmática, fluidos tisulares, compartimentos dentro de la célula y la propia molécula biológicamente activa), dichos compuestos se diseñan habitualmente para que tengan dominios polares y no polares. Los compuestos que tienen estos dos dominios pueden denominarse anfífilos, y muchos lípidos, incluidos los sintéticos que se han descrito por su uso para facilitar la administración intracelular (ya sea para la aplicación *in vitro* o *in vivo*) cumplen esta definición. Un grupo de compuestos anfífilos que han demostrado ser especialmente prometedores para la administración eficaz de moléculas biológicamente activas son los anfífilos catiónicos. Los anfífilos catiónicos tienen grupos polares que pueden estar cargados positivamente a un pH fisiológico o casi, y en la técnica se entiende que esta propiedad es importante a la hora de definir cómo interaccionan los anfífilos con muchos tipos de moléculas biológicamente activas, por ejemplo, polinucleótidos cargados negativamente como el ADN.

[0009] Ejemplos de compuestos anfífilos catiónicos que está establecido son útiles para la administración intracelular de moléculas biológicamente activas se encuentran, por ejemplo, en las siguientes referencias, y cuyas descripciones se incorporan específicamente por referencia. Muchas de estas referencias contienen también descripciones útiles de las propiedades de los anfífilos catiónicos que, como se entiende en la técnica, los hacen adecuados para dichas aplicaciones, y de la naturaleza de las estructuras que, como también se entiende en la técnica, están formados por complejos de dichos anfífilos y moléculas terapéuticas destinadas a la administración intracelular.

25

(1) Feigner, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 – 7417 (1987) describen el uso de lípidos catiónicos sintéticos cargados positivamente, como cloruro de N-[1(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio («DOTMA»), para formar complejos lípido/ADN adecuados para transfecciones. Véase también Feigner y col., The Journal of Biological Chemistry, 269(4), 2550 – 2561 (1994).

(2) Behr y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86, 6982 – 6986 (1989) describen varios anfífilos, como dioctadecilamidoglicilispermina («DOGS»).

(3) En la patente de EE. UU. 5.283.185 de Epan y col. se describen clases y especies adicionales de anfífilos, como 3β [N-(N¹,N¹-dimetilaminoetano)carbamoil] colesterol, denominado «DC-chole».

(4) En la patente de EE. UU. N.º 5.264.618 de Felgner y col. se describen compuestos adicionales que facilitan el transporte de moléculas biológicamente activas dentro de las células. Véase también Felgner y col., The Journal of Biological Chemistry, 269(4), pág. 2550 – 2561 (1994) en donde se describen compuestos adicionales como «DMRIE» (bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxiethyl amonio), el cual se discute a continuación.

(5) En la patente de EE. UU. N.º 5.334.761 de Gebeyehu y col. y en Felgner y col., Methods (Methods in Enzymology), 5, 67 – 75 (1993) también se encuentran referencias a anfífilos adecuados para la administración intracelular de moléculas biológicamente activas.

(6) Brigham, K.L., B. Meyrick, B. Christman, M. Magnuson, G. King y L.C. Berry. *In vivo* transfection of murine lungs with functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle Am. J. Med. Sci. 298: 278 – 281, 1989.

(7) Gao, X.A. y L. Huang. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 179: 280 – 285, 1991.

(8) Yoshimura, K., M.A. Rosenfeld, H. Nakamura, E.M. Scherer, A. Pavirani, J.P. Lecocq y R.G. Crystal. Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after *in vivo* intratracheal plasmid-mediated gene transfer. Nucl.Acids Res. 20: 3233 – 3240, 1992 .

(9) Zhu, N., D. Liggitt, Y. Liu y R. Debs. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. Science 261: 209 – 211, 1993.

(10) Solodin, I., C.S. Brown, M.S. Bruno, C.Y. Chow, E. Jang, R.J. Debs y T.D. Heath. A novel series of amphiphilic imidazolium compounds for *in vitro* and *in vivo* gene delivery. Biochem. 34: 13537 – 13544, 1995.

(11) Lee, E.R., J. Marshall, C.S. Siegal, C. Jiang, N.S. Yew, M.R. Nichols, J.B. Nietupski, R.J. Ziegler, M. Lane, K.X. Wang, N.C. Wan, R.K. Scheule, D.J. Harris, A.E. Smith y S.H. Cheng. Detailed analysis of structure and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. Hum.Gene Ther. 7: 1701 – 1717, 1996 .

[0010] Además, en varias patentes de EE. UU. recientemente publicadas, cuyas descripciones se incorporan específicamente por referencia en el presente documento, se ha descrito la utilidad de los anfífilos catiónicos para la administración de polinucleótidos a células de mamíferos (patente de EE. UU. N.º 5.676.954 de Brigham y col. y patente de EE. UU. N.º 5.703.055 de Felgner y col.).

[0011] Otra clase de anfífilos catiónicos con actividad mejorada se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 5.747.471 de Siegel y col., presentada el 5 de mayo de 1998, la patente de EE. UU. n.º 5.650.096 de Harris y

col., presentada el 22 de julio de 1997 y la publicación PCT WO 98/02191, publicada el 22 de enero de 1998, cuyas descripciones se incorporan por referencia al presente documento. Estas patentes también describen formulaciones de anfífilos catiónicos de importancia para la práctica de la presente invención.

5 **[0012]** Además de lograr la introducción eficaz de moléculas biológicamente activas, sigue existiendo la necesidad de reducir la toxicidad de la administración génica. En especial, existe la necesidad de reducir la respuesta inflamatoria asociada a la administración génica. Por ejemplo, la transferencia génica mediada por lípidos catiónicos al pulmón induce inflamación pulmonar dependiente de la dosis caracterizada por un infiltración de leucocitos (predominantemente neutrófilos) y niveles elevados de las citoquinas inflamatorias interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferón- γ (IFN- γ) en el líquido del lavado broncoalveolar (LBA).

15 **[0013]** La generación de niveles elevados de citoquinas en el líquido del LBA también tiene consecuencias para la expresión de la proteína terapéutica. Varios promotores virales como el promotor de CMV, usado frecuentemente en los vectores de administración génica, están sujetos a supresión por dichas citoquinas. Asimismo, cualquier inflamación adicional o reducción de la función pulmonar en pacientes que ya muestran vías respiratorias afectadas con inflamación crónica representa un aumento del riesgo para la salud. En la FQ y en otros trastornos genéticos hereditarios, una consecuencia de la presencia de motivos CpG podría aumentar la posibilidad de desarrollar anticuerpos neutralizantes frente al transgén terapéutico. Esto es especialmente pertinente en sujetos portadores de mutaciones completas o mutaciones que tienen como resultado la generación de una variante muy alterada. Para reducir este riesgo sería deseable la eliminación del efecto adyuvante de los motivos CpG inmunoestimuladores.

25 **[0014]** El análisis histopatológico de cortes de pulmón tratados con componentes individuales de complejos de lípido catiónico: ADN sugiere que el lípido catiónico era un mediador de la inflamación observada. No obstante, los resultados de los estudios clínicos en los que los pacientes con FQ se trataron con liposomas solos en aerosol o con complejos lípido catiónico: ADN indican que el ADN plasmídico derivado de bacterias también puede ser inflamatorio. Cada uno de los pacientes tratados con lípido catiónico: ADNp mostraron síntomas pseudogripales leves (que incluían fiebre, mialgia y reducción del VEF de aproximadamente el 15 %) en un periodo de aproximadamente 24 h. Estos síntomas no se observaron en pacientes tratados con el liposoma control. Una explicación posible para esta respuesta está relacionada con la presencia de secuencias de dinucleótidos CpG no metilados en el ADN derivado de bacterias. Véase Krieg y col., *Nature*, 374, 546 – 9 (1995); Klinman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2879 – 2883 (1996); Sato y col., *Science*, 273, 352 – 4 (1996). Se ha demostrado que los dinucleótidos CpG no metilados son inmunoestimuladores y están presentes en una frecuencia muy superior en el ADN plasmídico derivado de bacterias que en el ADN de vertebrados.

35 **[0015]** Puesto que el ADN plasmídico usado en los estudios de transferencia génica se aíslan invariablemente de fuentes bacterianas y que, además, portan necesariamente secuencias bacterianas para la propagación en este huésped, contienen una frecuencia superior de secuencias CpG no metiladas. Se ha demostrado que la presencia de estos motivos en el ADNp es capaz de estimular una fuerte respuesta mediada por linfocitos T cooperadores de tipo 1 en monocitos transfectados o en ratones BALB/c inyectados. Sin embargo, fue de especial importancia en la administración de genes al pulmón la demostración de que el ADN genómico bacteriano o los oligonucleótidos que contienen motivos CpG inmunoestimuladores eran capaces de provocar una respuesta inflamatoria aguda en las vías respiratorias y, en particular, causaban inflamación en las vías respiratorias bajas, aumentando tanto el número de células como los niveles elevados de citoquinas TNF- α , IL-6 y proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-2). Véase Schwartz y col., *J. Clin. Invest.*, 100, 68-73 (1997). También se ha publicado la activación por dinucleótidos CpG de un perfil de citoquina similar en linfocitos (Klinman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2879 – 2883, 1996), células dendríticas murinas (Sparwasser y col., *Eur. J. Immunol.*, 28, 2045 – 2054, 1998), macrófagos (Lipford y col., *Eur. J. Immunol.* 27, 2340 – 2344, 1997), monocitos (Sato y col., *Science*, 273, 352 – 4, 1995) y células NK (Cowdery y col., *J. Immunol.*, 156, 4370 – 4575, 1996). En un estudio reciente también se documentaba que los complejos formados entre el lípido catiónico DOTMA (cloruro de N-[1-(2-3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio) y ADNp aumentaban las citoquinas y los niveles celulares en el líquido del LBA de los animales tratados. Véase Friemark y col., *J. Immunol.*, 160, 4580 – 6 (1998).

55 **[0016]** Comparado con el ADN de origen eucariótico, el ADN genómico bacteriano contiene una frecuencia 20 veces superior de la secuencia de dinucleótidos CpG. Adicionalmente, a diferencia del ADN eucariótico en donde el 80 % de las citosinas están metiladas, las citosinas de origen procarionta están relativamente no metiladas. Estas diferencias supuestamente permiten al sistema inmunitario de vertebrados reconocer y responder al ADN extraño de origen bacteriano. A este respecto, se ha demostrado que la administración de ADN genómico bacteriano dentro de un huésped eucariota es capaz de provocar una potente respuesta inmunoestimuladora, activando células B, células NK, células dendríticas y macrófagos. Véase Krieg y col., *Trends Microbiol.*, 4, 73 – 76 (1995); Ballas y col., *J. Immunol.*, 157, 1840 – 5 (1996) y Sparwasser y col., *Eur. J. Immunol.*, 27, 1671 – 9 (1997).

[0017] El análisis sistemático indicaba que aquellas secuencias que portaban el motivo CpG 5'-RRCGY-3' eran especialmente potentes a la hora de inducir estas respuestas. Se demostró que estos efectos eran una

consecuencia del estado de metilación de las secuencias de dinucleótidos CpG mediante experimentos que mostraban que la administración de ADN genómico bacteriano u oligonucleótidos sintéticos portadores de la secuencia RRCGYT y que había sido premetilado con CpG metilasa, eran significativamente menos inmunoestimuladoras.

5

Descripción de la invención

[0018] La presente descripción proporciona procedimientos de reducción de la respuesta inflamatoria a la terapia génica mediante la modificación del plásmido administrado a la célula. El plásmido se modifica para reducir o eliminar la respuesta inmunoestimuladora con el fin de preservar la eficacia de la transferencia de ácidos nucleicos, reduciendo la toxicidad asociada. La presente descripción proporciona la modificación de cualquier plásmido para su administración a una célula de mamífero. El plásmido puede ser un plásmido de ARN o un plásmido de ADN.

10

[0019] En un aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento de reducción de la respuesta inflamatoria o inmunoestimuladora a la administración génica mediante la metilación parcial o completa del vector plasmídico a un grado suficiente para reducir la respuesta inflamatoria o inmunoestimuladora. Preferiblemente se reduce la respuesta inflamatoria. Los vectores de ADN plasmídico no metilado son el principal factor contribuyente a la respuesta inflamatoria asociada a la administración génica. La metilación del vector de ADN plasmídico reduce la respuesta inflamatoria, reduciendo así la toxicidad de la terapia génica.

15

[0020] La presente descripción también proporciona un procedimiento de reducción de la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero a una composición que comprende el paso de administrar una composición compuesta de al menos un plásmido que es un plásmido alterado en CpG y al menos un anfífilo catiónico. El procedimiento de alteración del plásmido se selecciona entre eliminar al menos un motivo CpG del plásmido, metilar al menos un motivo CpG del plásmido o eliminar al menos un motivo CpG y metilar al menos un motivo CpG. El plásmido puede ser un plásmido de ADN y también puede comprender al menos un fragmento KAN modificado, al menos un fragmento ORI modificado o al menos un fragmento CAT modificado. Adicionalmente, el anfífilo catiónico puede ser un lípido catiónico.

20

[0021] En un aspecto preferido, el plásmido de ADN codifica un gen de interés. El gen de interés puede ser, pero sin limitaciones, alfa-galactosidasa, factor VIII, factor IX o FQ. Al igual que el plásmido, el gen de interés también puede tener CpG alterados.

30

[0022] Otro aspecto es un procedimiento de reducción de la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero a una composición que comprende la alteración de un plásmido mediante la eliminación de al menos un motivo CpG del plásmido y la determinación de la respuesta inmunoestimuladora mediante el control de los niveles de enzimas en hígado inmunoestimulado en la sangre del mamífero. Los niveles de enzimas en hígado inmunoestimulado son preferiblemente factores de transaminasas séricas, como niveles de AST y/o ALT.

35

[0023] La presente descripción también proporciona un procedimiento de reducción de la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero a una composición que comprende la alteración de un plásmido mediante la metilación de al menos un motivo CpG del plásmido y la determinación de la respuesta inmunoestimuladora mediante el control de los niveles de citoquinas en el mamífero.

40

[0024] Los procedimientos descritos con respecto a la reducción de la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero a una composición también puede incluir la administración de un agente efectivo para inhibir la señalización de CpG. El agente eficaz para inhibir la señalización de CpG puede ser, pero sin limitaciones, monensina, bafilomicina, cloroquina y quinacrina.

45

[0025] En un aspecto adicional, la presente descripción requiere un procedimiento de modulación de la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero a una composición de anfífilo catiónico/plásmido que comprende modificar una cantidad de motivos CpG en el plásmido eficaz para alterar los niveles de enzimas hepáticas en la sangre de un mamífero. Los motivos CpG pueden modificarse mediante la eliminación de al menos un motivo CpG y/o la metilación de al menos un motivo CpG.

50

55

[0026] En un aspecto adicional, la presente descripción requiere un procedimiento de modulación de la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero a una composición de anfífilo catiónico/plásmido que comprende modificar una cantidad de motivos CpG en el plásmido eficaz para alterar los niveles de citoquinas en la sangre de un mamífero. Los motivos CpG pueden modificarse mediante la metilación de al menos un motivo CpG.

60

[0027] Además, dentro la práctica de la presente descripción está una composición que comprende al menos un plásmido con alteraciones en CpG y al menos un anfífilo catiónico. El plásmido con alteraciones en CpG difiere de su correspondiente secuencia natural en: la ausencia de al menos un motivo CpG del plásmido; la presencia de al

menos un CpG metilado en el plásmido o la ausencia de al menos un motivo CpG del plásmido y la presencia de al menos un CpG metilado en al menos un motivo CpG. En un aspecto, el plásmido es un plásmido de ADN que comprende una región CpG modificada que tiene al menos un marcador seleccionable con CpG reducido, como un fragmento KAN con CpG deleciónado o un fragmento CAT con CpG reducido, o un origen de replicación con CpG reducido, como una región ORI acortada. La composición puede comprender además un agente que es eficaz para inhibir la señalización de CpG.

5 [0028] La presente descripción también abarca una composición que comprende un polinucleótido compuesto por la secuencia nucleotídica de la SEC ID N.º 1 y/o fragmentos de la secuencia nucleotídica de SEC ID N.º 1. La
10 composición puede comprender, además, un anfífilo catiónico.

[0029] La presente descripción proporciona la administración directa de ADN plasmídico modificado, la administración de complejos ADN plasmídico: lípido, junto con el uso de ADN plasmídico modificado con vectores virales como adenovirus y cualquier otro procedimiento que se ha empleado en la técnica para la administración
15 eficaz de moléculas biológicamente activas en células de mamíferos. En un aspecto preferido, se administra un vector de ADN plasmídico metilado como complejo lípido: ADN metilado.

[0030] En otro aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas de complejos de ADN plasmídico modificado que comprenden ADN plasmídico modificado y composiciones farmacéuticas de complejos de lípidos y no lípidos con ADN plasmídico modificado. El ADN plasmídico modificado puede ser un principio activo en una composición farmacéutica que incluye transportadores, cargas, modificadores de la viscosidad, dispersantes, cremas, geles, soluciones y otros excipientes que son comunes en las técnicas de formulación farmacéutica.
20

[0031] La presente descripción proporciona un procedimiento de administración del ADN plasmídico modificado o del complejo de ADN plasmídico modificado mediante cualquier procedimiento que se ha empleado en la técnica para efectuar la administración de moléculas biológicamente activas a las células de mamíferos, lo que incluye, pero sin limitaciones, la administración de una solución en aerosol, inyección intravenosa o por vía oral, parenteral, tópica o transmucosa.
25

[0032] La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más lípidos u otros transportadores que se han empleado en la técnica para efectuar la administración de moléculas biológicamente activas dentro de las células de mamíferos, y una o más moléculas biológicamente activas o vectores de ADN plasmídico modificado, en la que dichas composiciones facilitan la administración intracelular en los tejidos de pacientes de cantidades terapéuticamente eficaces de las moléculas biológicamente activas o de los
30 vectores de ADN plasmídico modificado. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden formularse para contener una o más sustancias fisiológicamente aceptables adicionales que estabilizan las composiciones para almacenar y/o contribuir a la administración intracelular eficaz de las moléculas biológicamente activas y el ADN plasmídico modificado.
35

[0033] Para uso farmacéutico, los complejos anfífilo(s) catiónico(s): ADN plasmídico modificado de la presente descripción pueden formularse con uno o más anfífilos catiónicos adicionales como los conocidos en la técnica, o con colípidos neutros como dioleoilfosfatidil-etanolamina («DOPE») para facilitar la administración de moléculas biológicamente activas a las células.
40

[0034] Ahora, basado en la descripción contenida en el presente documento, la presente invención proporciona el uso de un plásmido que comprende un gen de interés para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero mediante terapia génica, en el que el uso comprende la modificación del plásmido mediante la eliminación de un dinucleótido CpG o su mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro de dicho plásmido, y en el que el tratamiento comprende la administración del plásmido en combinación con
45 un anfífilo catiónico.
50

[0035] La presente invención también proporciona un proceso de preparación de una composición farmacéutica para el uso en la terapia génica de un mamífero, en el que la composición farmacéutica comprende: i) un plásmido que contiene un gen de interés y ii) un anfífilo catiónico; y en el que el proceso comprende: a) modificar el plásmido mediante la eliminación de un dinucleótido CpG o mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro del plásmido y b) combinar el plásmido con el anfífilo catiónico.
55

Breve descripción de los dibujos

60 [0036]

Figura 1. (a) Secuencia nucleotídica de pGZA-CAT (también denominada pGZA-sCAT) SEC ID N.º 1. (b) Mapa de la secuencia nucleotídica pGZA-CAT.

Figura 2. Análisis de citoquinas del líquido de LBA de ratón después de la instilación de complejos de GL-67 con pCF1-CAT metilado o no metilado. Se realizaron instilaciones intranasales a grupos de tres ratones BALB/c con 100 µl de GL-67: (m)pCF1-CAT, GL-67: pCF1-CAT, GL-67 solo, (m)pCF1-CAT, pCF1-CAT o el vehículo (nativo). Se recogió el líquido de LBA 24 h después de la instilación y se usaron ensayos ELISA para medir los niveles de diversas citoquinas. (m)pCF1-CAT hace referencia a pCF1-CAT que se ha metilado con la metilasa Sss I.

Figura 3. Recuento total de células y proporción de neutrófilos en el líquido de LBA después de la administración de complejos lípido catiónico: ADNp. Se realizaron instilaciones intranasales a grupos de tres ratones BALB/c con 100 µl de GL-67: (m)pCF1-CAT, GL-67: pCF1-CAT, GL-67 solo, (m)pCF1-CAT, pCF1-CAT o el vehículo. Se recogió el líquido de LBA 24 h después de la instilación y se hizo un recuento del número total de células y de los diferentes tipos de células. (m)pCF1-CAT hace referencia a pCF1-CAT que se ha metilado con la metilasa Sss I. PMN, leucocitos polimorfonucleares.

Figura 4. Análisis de citoquinas del líquido de LBA de ratón después de la instilación de complejos de GL-67 con mezclas de pCF1-CAT metilado y no metilado. Se mezcló pCF1-CAT metilado con Sss I con pCF1-CAT no metilado en proporciones de 0: 3, 1: 2, 2: 1 o 3: 0 [(m)pCF1-CAT: pCF1-CAT]; a continuación se formaron complejos con GL-67 a una concentración final de 0,3: 1,8 mM (GL-67: ADNp). Se realizaron instilaciones intranasales a grupos de tres ratones BALB/c con 100 µl de complejos GL-67: ADNp y se recogió líquido de LBA 24 h después de la instilación para los ensayos de citoquinas. Los animales nativos se trataron con el vehículo. (m), pCF1-CAT metilado; (nm), pCF1-CAT no metilado.

Figura 5. Análisis histopatológico de cortes de pulmón de ratones BALB/c tras la administración de complejos de GL-67 con pCF1-CAT metilado o no metilado. Se realizaron instilaciones intranasales a ratones BALB/c con 100 µl de GL-67: (m)pCF1-CAT, GL-67: pCF1-CAT, GL-67 solo, (m)pCF1-CAT, pCF1-CAT o el vehículo. Los ratones se sacrificaron dos días después de la instilación y se procesaron los pulmones para el examen histológico de forma enmascarada. La inflamación pulmonar se clasificó en una escala de 0 a 4, en donde 0 indica la ausencia de cambio, 1 un cambio mínimo, 2 un cambio leve, 3 un cambio moderado y 4 un cambio importante con respecto al pulmón normal. (m)pCF1-CAT hace referencia a pCF1-CAT que se ha metilado con la metilasa Sss I.

Figura 6. Motivos CpG presentes en pCF1-CAT. Los motivos que tienen la secuencia 5'-RRCGYY-3' son como se muestra. Los números entre paréntesis indican la posición nucleotídica del resto de citosina. Kan R, gen de kanamicina; CMV, citomegalovirus; promotor, CAT, ADNc de la cloranfenicol acetiltransferasa; BGH Poli A, secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

Figura 7. Niveles relativos de expresión de CAT tras la metilación o mutagénesis de pCF1-CAT. Se realizaron instilaciones de grupos de tres ratones BALB/c con 100 µl de GL-67: pCF1-CAT; GL-67: (m)pCF1-CAT, GL-67: pCFA-299-CAT o GL-67: pCFA-299-10M-CAT. pCFA-299-CAT porta una delección parcial del promotor de CMV y pCFA-299-10M-CAT, 10 mutaciones adicionales en sitios CpG que portan el motivo de secuencia RRCGYY. (m)pCF1-CAT se refiere a pCF1-CAT que se ha metilado con la metilasa Sss I. Los pulmones se recogieron para realizar el análisis de CAT 2 días después de la instilación.

Figura 8. Análisis de citoquinas de líquido de LBA de ratón después de la instilación de complejos de GL-67 con pCF1-CAT y formas modificadas de pCF1-CAT que contienen un número reducido de motivos CpG. Se realizaron instilaciones intranasales a grupos de tres ratones BALB/c con 100 µl de GL-67: pCF1-CAT, GL-67: (m)pCF1-CAT, GL-67: pCFA-299-CAT o GL-67: pCFA-299-10M-CAT. El líquido de LBA se recogió 24 h después de la instilación y se realizaron ensayos ELISA para TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-12. (m)pCF1-CAT se refiere a pCF1-CAT que se ha metilado con la metilasa Sss I. pCFA-299-CAT porta una delección parcial del promotor de CMV y pCFA-299-10M-CAT, 10 mutaciones adicionales en sitios CpG que portan el motivo de secuencia RRCGYY.

Figura 9. Efecto de la inhibición de la infiltración de neutrófilos sobre los niveles de citoquinas en el líquido de LBA de ratones BALB/c. Se inyectó a los animales en la vena de la cola una mezcla de anticuerpos frente a LFA-1 y Mac-1α murinos aproximadamente 15 min antes de la instilación de GL-67: pCF1-CAT en el pulmón. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la instilación y se recogió el líquido de LBA para el recuento de células y la cuantificación de citoquinas. Los ratones control no recibieron anticuerpos antes de la instilación del complejo, o se les instiló agua (vehículo). Ac se refiere al grupo que ha recibido tratamiento con los anticuerpos.

Figura 10. Efecto de la inhibición del infiltrado de neutrófilos sobre la expresión de CAT en el pulmón. Se inyectó a los ratones BALB/c en la vena de la cola una mezcla de anticuerpos frente a LFA-1 y Mac-1α murinos aproximadamente 15 min antes de la instilación de GL-67: pCF1-CAT en el pulmón. Los ratones se sacrificaron 2 y 7 días después de la instilación y se analizó en los pulmones la actividad CAT. Ac se refiere al grupo que ha recibido tratamiento con los anticuerpos.

Figura 11. Inducción de IL-12 en las células esplénicas de ratón por fragmentos de ADN no modificado y mutado de pCFA-CAT. Los fragmentos se amplificaron mediante PCR y, a continuación, se añadió cada fragmento a las células esplénicas de ratón y se recogieron los medios 24 horas después. Los niveles de IL-12 se analizaron mediante ELISA. El vehículo es agua. ori, región de origen de replicación; ori-mut, origen mutado; ori-min, origen mínimo; kan, gen de resistencia a kanamicina. Los datos se expresan como la media ± ETM.

Figura 12. Inducción de IL-12 en células esplénicas de ratón por vectores de ADNp no modificado o mutado. Se añadió ADN plasmídico a las células esplénicas de ratón y se recogieron los medios 24 horas después. Los niveles de IL-12 se analizaron mediante ELISA. El vehículo es agua. Los datos se expresaban como la media ± ETM.

Figura 13. Niveles de citoquinas en suero y expresión de CAT en los pulmones después de la administración intravenosa de vectores de ADNp no modificado y mutado. Los complejos GL-62: ADNp se inyectaron por la vena de la cola en ratones BALB/c. El suero se recogió 24 horas después de la instilación y se analizaron los niveles de IFN- γ , IL-12 e IL-6 mediante ELISA. El vehículo es agua. Los datos se expresaban como la media \pm ETM.

Figura 14. Niveles de citoquinas en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) y expresión de CAT en los pulmones después de la instilación de vectores de ADNp no modificado y mutado. Los complejos GL-67: ADNp se instilaron por vía intranasal en los pulmones de ratones BALB/c. El líquido de LBA se recogió 24 horas después de la instilación y se analizaron los niveles de IFN- γ , IL-12 e IL-6 mediante ELISA. El vehículo es agua. Los datos se expresaban como la media \pm ETM.

Figura 15. Inhibición de la producción de IL-12 por las células esplénicas de ratón estimuladas con cloroquina y quinacrina, se añadió a las células esplénicas de ratón pCFA-CAT (ADNp) o GL-67: pCFA-CAT (L: ADNp) más o menos cloroquina (C) o quinacrina (Q) y se recogieron los medios 24 horas después. El vehículo es agua. Los datos se expresaban como la media \pm ETM.

Figura 16. Niveles de citoquinas en el líquido de lavado broncoalveolar después de la instilación del complejo lípido: ADNp más cloroquina o quinacrina. Los niveles de IL-12 se analizaron mediante ELISA. Los datos se expresaban como la media \pm ETM.

Descripción detallada de la invención

[0037] Según la presente descripción, se puede modificar un plásmido para reducir la respuesta inflamatoria frente a dicho plásmido, tanto para reducir la toxicidad como para aumentar la eficacia de la administración génica. También puede modificarse el plásmido para modular la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero a una composición plasmídica. El plásmido modificado también puede administrarse solo, como principio activo de una formulación o como parte de un complejo con un transportador como lípidos (por ejemplo, compuestos de anfífilos catiónicos), vectores virales (por ejemplo adenovirus) y otros métodos que se han empleado en la técnica para efectuar la administración de moléculas biológicamente activas en las células de mamíferos. Los complejos plásmido: transportador también se pueden administrar solos o como principio activo de una formulación. Estos elementos se discutirán a continuación.

[0038] La presente descripción proporciona el uso de un plásmido modificado con cualquiera de los procedimientos con los que se efectúa la administración de moléculas biológicamente activas en las células de mamíferos. En un aspecto preferido, sin embargo, el ADN plasmídico modificado se usa con un anfífilo catiónico o una formulación viral, como un vector viral o un adenovirus.

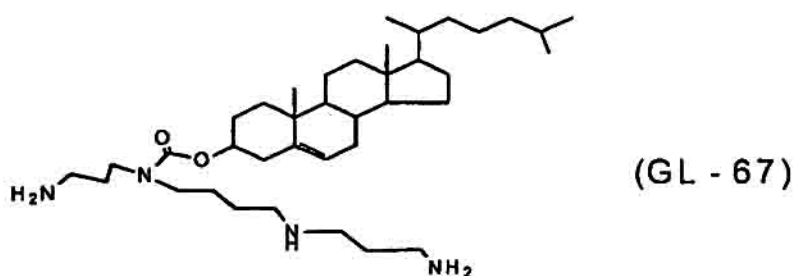
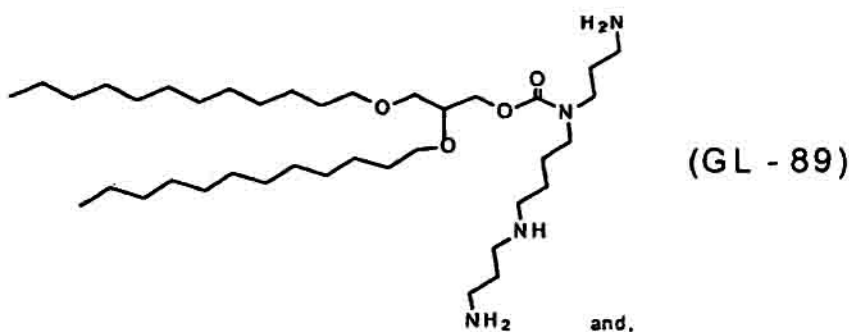
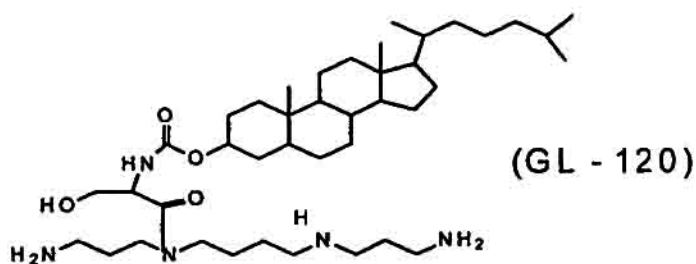
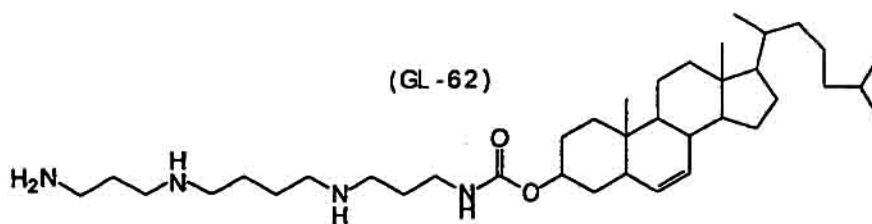
[0039] En un aspecto preferido, la presente descripción proporciona el uso de cualquier compuesto de anfífilo catiónico y composiciones que los contienen, que son útiles para facilitar la administración de ADN plasmídico modificado. Los anfífilos que son especialmente útiles facilitan el transporte de polinucleótidos biológicamente activos dentro de las células y, en particular, en las células de pacientes para los fines de terapia génica.

[0040] Ahora, como se discute en este documento, la presente invención proporciona el uso de un plásmido que comprende un gen de interés para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero mediante terapia génica, en el que el uso comprende la modificación del plásmido mediante la eliminación de un dinucleótido CpG o su mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro de dicho plásmido, y en el que el tratamiento comprende la administración del plásmido en combinación con un anfífilo catiónico.

[0041] Además, la presente invención proporciona un proceso de preparación de una composición farmacéutica para el uso de la terapia génica en un mamífero, en el que la composición farmacéutica comprende: i) un plásmido que comprende un gen de interés y ii) un anfífilo catiónico; y en el que el proceso comprende: a) modificar el plásmido mediante la eliminación de un dinucleótido CpG o mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro del plásmido y b) combinar el plásmido con el anfífilo catiónico.

[0042] Se pueden encontrar varios anfífilos catiónicos preferidos según la práctica de la presente descripción en las patentes de EE. UU. N.º 5.747.471 y 5.650.096 y en la publicación PCT WO 98/02191. Además de los compuestos de anfífilos catiónicos, en estas dos patentes se describen varios colípidos preferidos, moléculas biológicamente activas, formulaciones, procedimientos, vías de administración y dosis; y cuyas descripciones se incorporan específicamente por referencia en el presente documento.

[0043] En conexión con la práctica de la presente descripción, los anfífilos catiónicos tienden a tener una o más cargas positivas en una solución que está a un pH fisiológico o próximo. Los anfífilos catiónicos representativos que son útiles en la práctica de la presente descripción, incluyendo la presente invención, son:



y otros anfífilos que son conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en las patentes de EE. UU. 5.747.471 y 5.650.096 y en la publicación PCT WO 98/02191.

5

[0044] Se ha determinado que la estabilidad y la capacidad potenciadora de la transfección de composiciones de anfífilos catiónicos se puede mejorar considerablemente mediante la adición a dichas formulaciones de cantidades adicionales pequeñas de uno o más compuestos de polietilenglicol derivatizados. Este rendimiento mejorado es especialmente aparente cuando se mide mediante la estabilidad de las formulaciones de anfífilos catiónicos para el almacenamiento y la manipulación, incluso en forma líquida (resuspendidas), y cuando se mide mediante la estabilidad durante la administración en aerosol de dichas formulaciones que contienen una molécula terapéutica, especialmente polinucleótidos.

[0045] Según la práctica de la presente descripción, incluyendo la presente invención, cualquier derivado de polietilenglicol puede formar parte de una formulación de anfífilo catiónico. Los complejos se han preparado usando varios derivados de PEG y todos estos derivados de PEG, a una determinada relación mínima anfífilo catiónico:

15

derivado de PEG, han sido capaces de formar complejos estables.

[0046] Los derivados de PEG estabilizan las formulaciones de anfífilos catiónicos y mejoran las propiedades de transfección y la afinidad de formulaciones por moléculas biológicamente activas. El uso de PEG y derivados de PEG permite utilizar una relación mayor de ADN frente a lípidos. Previos intentos de preparar complejos lípido: ADNp más concentrados tuvieron como resultado la precipitación de dichos complejos, especialmente a relaciones lípido: ADNp a las cuales la mayoría del ADNp estaba unido al lípido. Se consideró que la precipitación observada a concentraciones superiores podría estar relacionada con una fase de separación del componente lipídico catiónico del componente lipídico no bicapa. En un esfuerzo por mantener las formulaciones lipídicas tradicionales en una configuración bicapa, se encontró que los lípidos que contienen PEG eran eficaces para evitar la precipitación del complejo a concentraciones de ADNp superiores.

[0047] Se encontró que se requería solo una pequeña fracción de moles de lípido que contenga PEG para formar formulaciones estables que no precipiten a altas concentraciones de lípido y ADN. Por ejemplo, a 0,05 moles de PEG-DMPA, los complejos lípido catiónico: ADNp se pueden estabilizar a concentraciones de ADNp que excedan de 20 mM. Sin lípidos que contengan PEG, se requiere un excipiente salino, que no es aconsejable ya que un excipiente iónico también reduce la actividad de transfección, para mantener la relación lípido: ADNp del complejo durante ciertos procedimientos como la aerosolización. Para más información con respecto al uso de derivados de PEG, las siguientes referencias se incorporan específicamente por referencia. Simon J. Eastman y col., Human Gene Therapy, 8, pág. 765 – 773 (1997); Simon J. Eastman y col. Human Gene Therapy, p. 8, pág. 313 – 322 (1997).

[0048] Entre los derivados de polietilenglicol útiles en la práctica de la presente descripción se incluye cualquier derivado de polímero PEG con un grupo hidrófobo unido al polímero PEG. Entre los ejemplos se incluirían PEG-PE, PEG-DMPE, PEG-DOPE, PEG-DPPE o PEG-serinamida. Sin ceñirse a la teoría, se considera que los lípidos preferidos que contienen PEG serían cualquier derivado de polímero PEG unido a un grupo hidrófobo que puede anclarse a la membrana celular. Dos especies muy preferidas de los mismos son dimiristoilfosfatidiletanolamina (di C₁₄) («DMPE») y dilaurilfosfatidiletanolamina (di C₁₂) («DLPE»).

[0049] Con respecto a la selección del polímero PEG, un aspecto preferido de la presente descripción es que el polímero sea lineal, con un peso molecular que oscile de 1.000 a 10.000. Entre las especies preferidas de los mismos se incluyen aquellos con pesos moleculares entre 1.500 y 7.000, siendo los de 2.000 y 5.000 ejemplos de tamaños útiles y disponibles en el mercado. En la práctica de la presente descripción, incluyendo la presente invención, es conveniente usar especies de PEG derivatizadas de origen comercial y se señala que el peso molecular asignado al PEG en dichos productos a menudo representan un promedio de peso molecular, existiendo moléculas más pequeñas y más grandes en el producto. Dichos intervalos de peso molecular normalmente son una consecuencia de los procedimientos de síntesis utilizados, estando el uso de cualquiera de estos productos dentro de la práctica de la presente descripción, incluyendo la presente invención.

[0050] También está dentro de la práctica de la presente descripción, incluyendo la presente invención, el uso de especies de PEG derivatizadas que 1) incluyen más de un fosfolípido unido, 2) incluyen una secuencia de PEG ramificada o 3) incluyen tanto la modificación 1) como la 2).

[0051] En consecuencia, las especies preferidas de PEG derivatizado son:

- a) polietilenglicol 5000-dimiristoilfosfatidiletanolamina, también denominado PEG₍₅₀₀₀₎-DMPE;
- b) polietilenglicol 2000-dimiristoilfosfatidiletanolamina, también denominado PEG₍₂₀₀₀₎-DMPE;
- c) polietilenglicol 5000-dilaurilfosfatidiletanolamina, también denominado PEG₍₅₀₀₀₎-DLPE; y
- d) polietilenglicol 2000-dilaurilfosfatidiletanolamina, también denominado PEG₍₂₀₀₀₎-DLPE.

[0052] Ciertos derivados fosfolipídicos del PEG pueden obtenerse de proveedores comerciales. Por ejemplo, las siguientes especies: di C14: 0, di C16: 0, di C18: 0, di C18: 1 y 16: 0/18: 1 están disponibles como derivados de PEG de un PM promedio de 2.000 o 5.000 en Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EE. UU., con los números de catálogo 880150, 880160, 880120, 880130, 880140, 880210, 880200, 880220, 880230 y 880240.

[0053] El uso de colípidos neutros es opcional. Dependiendo de la formulación, la inclusión de colípidos neutros puede mejorar considerablemente la administración y la capacidad de transfección. Entre los colípidos neutros representativos se incluyen dioleoilfosfatidiletanolamina («DOPE»), las especies usadas con más frecuencia en la técnica, difitanoiilfosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolaminas, otras fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas y colesterol. Normalmente, una proporción molar preferida de anfífilo catiónico: colípido es de aproximadamente 1: 1. No obstante, está dentro de la práctica de la presente descripción, incluyendo la presente invención, variar esta proporción, incluyendo también un intervalo considerable, aunque generalmente se prefiere una proporción de 2: 1 a 1: 2. El uso de difitanoiilfosfatidiletanolamina es muy preferida de acuerdo con la práctica de

la presente descripción, incluyendo la presente invención, tal como el uso de «DOPE».

- [0054]** Según la práctica de la presente descripción, incluyendo la presente invención, las formulaciones preferidas también pueden definirse en relación con la proporción molar del derivado de PEG; sin embargo, la proporción preferida variará con el anfífilo catiónico elegido. En ejemplos preferidos de los mismos, el colípido neutro es difitanoilfosfatidiletanolamina, o es DOPE, y el derivado de PEG es un conjugado DMPE o DLPE de PEG₂₀₀₀ o PEG₅₀₀₀. En un ejemplo muy preferido, el colípido neutro es difitanoilfosfatidiletanolamina y el derivado de PEG es PEG₂₀₀₀-DMPE.
- 10 **[0055]** La presente descripción proporciona un procedimiento para modular la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero a una composición, así como reducir la toxicidad y aumentar la eficacia de la administración génica. En la práctica de la presente descripción, el ADN plasmídico puede modificarse para reducir la respuesta inflamatoria al ADN plasmídico. En un aspecto, los motivos CpG del ADN plasmídico pueden metilarse para reducir la respuesta inmunoestimuladora. En otro aspecto, los motivos CpG del ADN plasmídico pueden eliminarse para reducir la
- 15 respuesta inmunoestimuladora.
- [0056]** El ADN plasmídico contribuye de forma significativa a la respuesta inflamatoria observada tras la administración de complejos lípido catiónico: ADNp al pulmón. Se demostró que la mayor parte del aumento en los niveles de citoquinas TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-6 y una proporción del infiltrado celular observado en el líquido de LBA tras la administración de complejos lípido catiónico: ADNp eran atribuibles al ADNp. Sin ceñirse a la teoría, se determinó que la base para esta respuesta inflamatoria era debida a la presencia de dinucleótidos CpG no metilados en el ADNp. La implicación de los dinucleótidos CpG se evidenció en experimentos en los que se demostraban que la respuesta inflamatoria podía reducirse mediante la metilación del ADNp con una CpG metilasa. Asimismo, se conseguía una relación dosis-respuesta entre la cantidad de ADNp no metilado usada en la instilación y los niveles
- 20 de citoquinas inducidas.
- [0057]** La inducción de la respuesta inflamatoria por el ADNp no metilado se exacerbó significativamente tras la formación de complejos con un lípido catiónico. Sin ceñirse a la teoría, esta respuesta mejorada fue probablemente debida al aumento de la captación celular del ADNp por las células o el aumento de la estabilización del ADNp por el
- 30 lípido catiónico en el compartimento intracelular. Coincidiendo con esta propuesta está la observación de que los oligonucleótidos CpG, unidos covalentemente a un soporte sólido de modo que ya no se internalizarán, no son estimuladores.
- [0058]** La inducción de citoquinas y el aumento en la proporción de los infiltrados celulares, especialmente de neutrófilos en el líquido de LBA, se considera que es el efecto del componente ADNp. Está de acuerdo con esta propuesta el que dicha reducción en la concentración de neutrófilos en el líquido de LBA por la administración de anticuerpos freta a Mac-1 α y LFA-1 coincidía con una reducción simultánea en los niveles de citoquinas. En consecuencia, parte de la respuesta inflamatoria observada era el resultado de una manifestación directa de los complejos lípido catiónico: ADNp. Entre los ejemplos de estos complejos se incluyen la activación de la citoquina KC
- 40 y el reclutamiento de otras células en el líquido de LBA, como macrófagos y linfocitos, presumiblemente para eliminar las partículas relativamente grandes de complejos lípido catiónico: ADNp.
- [0059]** Las estrategias para minimizar los efectos inmunoestimuladores de los dinucleótidos CpG en el ADNp están dentro de la práctica de la presente descripción. En un aspecto de la presente descripción, la metilación de los
- 45 motivos CpG suprime la inflamación en el pulmón. De hecho, se sabe que la metilación de CpG se asocia a la inactivación a largo plazo de determinados genes durante el desarrollo de mamíferos y en la represión de genomas virales. A este respecto, la selección de promotores que carezcan de motivos CpG y que no sean, por tanto, sensibles a la metilación, representa un aspecto adicional de la presente descripción. Uno de estos promotores conocidos es el MMTV-LTR (repetición terminal larga del virus del tumor de Moloney murino).
- 50 **[0060]** También está dentro de la práctica de la presente descripción modular las propiedades inmunoestimuladoras del ADNp alterando el contenido de CpG de un plásmido. El contenido de CpG de un plásmido puede alterarse mediante el aumento o reducción de la presencia de motivos CpG, o modificando los motivos CpG que están presentes mediante el aumento o disminución de la cantidad de metilación. El aumento de la
- 55 inmunoestimulación puede lograrse mediante el aumento del número de motivos CpG presentes en el plásmido o mediante la reducción de la cantidad de metilación de dichos motivos CpG. El aumento del número de motivos CpG combinado con la reducción de los sitios de metilación podría ser especialmente útil si se desea la inmunoestimulación.
- 60 **[0061]** Se ha demostrado que la metilación *in vitro* de todos los dinucleótidos CpG de un ADNp determinado reduce significativamente la inducción de citoquinas, pero también puede inhibir en gran medida la expresión génica. La eliminación de motivos CpG se puede lograr mediante la delección de regiones no esenciales del vector. Los fragmentos de ADN que contienen solo el promotor, el transgén y la señal de poliadenilación han mostrado tener

una actividad estimuladora reducida después de la administración intravenosa a ratones. Está dentro de la práctica de la presente descripción un procedimiento de eliminación de algunas regiones no esenciales, a la vez que se mantiene un origen funcional y un gen de resistencia a antibiótico. Puede usarse mutagénesis dirigida a sitio y fragmentos sintéticos desprovistos de secuencias CpG para generar un vector menos estimulador.

5

[0062] Según la presente descripción, puede construirse un vector de expresión de ADNp que contenga considerablemente menos dinucleótidos CpG en su secuencia que los plásmidos convencionales. Se ha demostrado que el reducido contenido de CpG se correlaciona con una respuesta inmunoestimuladora reducida *in vitro*, y que los complejos lípido catiónico-ADNp que contienen estos plásmidos modificados inducían niveles significativamente más

10

bajos de citoquinas en suero cuando se administraban por vía intravenosa, así como niveles reducidos en el pulmón de ratón cuando se administraba por vía intranasal. El papel del contenido de CpG se demostró mediante la observación de que fragmentos de ADN carentes de dinucleótidos CpG no eran estimuladores ni *in vitro* ni *in vivo*.

[0063] Los estudios previos de toxicología sugieren que los cambios fisiológicos mediados por la administración sistémica del complejo lípido catiónico: ADNp se caracterizan también en parte por la elevaciones estadísticamente significativas de los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST). Las elevaciones de los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST) se aceptan, en general, como indicadores de la toxicidad hepática, aunque se reconocen con certeza otros parámetros clínicos de daño hepático y podrían sustituirse. Está, por tanto, dentro de la práctica de la presente descripción medir la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero controlando los niveles de enzimas hepáticas, tal como los niveles de AST y ALT. En un aspecto, una respuesta inmunoestimuladora deseada se obtiene alterando el contenido de CpG de un plásmido y controlando los niveles de enzimas hepáticas en sangre hasta que se observe la respuesta inmunoestimuladora deseada.

15

20

25

[0064] También está dentro de la práctica de la presente descripción medir la respuesta inmunoestimuladora de un mamífero controlando los niveles de citoquinas en el mamífero. En un aspecto, una respuesta inmunoestimuladora deseada se obtiene alterando el contenido de CpG de un plásmido y controlando los niveles de citoquinas en sangre hasta que se observe la respuesta inmunoestimuladora deseada.

30

[0065] Otra estrategia para modular las propiedades inmunoestimuladoras del vector de ADNp es utilizar inhibidores específicos de la ruta de señalización de CpG. La captación de ADN dentro de un compartimento intracelular acidificado mediante endocitosis es la primera etapa necesaria en la ruta. Los inhibidores de la acidificación endosómica, como monesina, bafilomicina, cloroquina y quinacrina, pueden bloquear de forma eficaz la inducción de citoquinas inducida por CpG por los leucocitos *in vitro*.

35

40

[0066] La propiedad característica de la cloroquina o de la quinacrina es la baja concentración necesaria para la inhibición específica de la estimulación mediada por CpG. Una dosis eficaz en el pulmón de ratón es, comparativamente, una dosis pequeña para el pulmón humano. Una dosis de 0,5 microgramos de cloroquina en el pulmón de ratón equivale a aproximadamente 1,0 mg en el pulmón humano. Sin embargo, considerando las limitaciones de dichas extrapolaciones, la dosis se compara favorablemente a la dosis recomendada para la indicaciones antipalúdicas (aproximadamente 100 a 200 mg).

45

[0067] La presente descripción también proporciona un procedimiento para alterar genéticamente los motivos CpG que se ha demostrado tienen una potente actividad inmunoestimuladora, como el motivo 5'- RRCGY-3' más inmunoestimulador. No obstante, los demás dinucleótidos CpG que no están dentro del contexto de secuencia RRCCGY también contribuyen a la inducción de citoquinas. Se prefiere la eliminación mediante mutagénesis dirigida a estos sitios.

50

[0068] Aún en otro aspecto, los motivos CpG que tienen actividad neutralizante se usan para contrarrestar a los que tienen actividad inmunoestimuladora. Así pues, la incorporación de estos motivos neutralizantes, junto con la eliminación de aquellos que muestran actividad inmunoestimuladora de los vectores de ADNp, reducirá la respuesta inflamatoria en el pulmón.

55

[0069] Las composiciones que contienen plásmidos alterados en CpG también están dentro de la práctica de la presente descripción. En un aspecto, una composición comprende el plásmido alterado en CpG, pGZA-CAT, como se muestra en la figura 1, SEQ ID NO 1. El plásmido puede estar alterado en CpG mediante mutagénesis dirigida.

60

[0070] Un método alternativo a la mutagénesis para reducir el número de sitios CpG dentro de la región del origen de replicación fue determinar el fragmento mínimo que podía seguir siendo funcional. Otro aspecto de la presente descripción es una composición que comprende un marcador seleccionable o fragmento del plásmido alterado en CpG, como un marcador seleccionable de pGZA-CAT. Entre los fragmentos representativos se incluyen los mencionados en la tabla 1 y en la figura 1.

[0071] Se encontró que la disminución de la actividad estimuladora del vector de ADNp era más o menos

proporcional al número de sitios CpG. Esto mimetiza la estrategia de supresión de CpG encontrada en el ADN de vertebrados, aunque el ADN de vertebrados también contiene otras características en su secuencia que reducen sus propiedades estimuladoras. Se ha demostrado que los motivos CpG en contextos de secuencia en particular no son estimuladores y se han denominado motivos CpG neutralizantes (CpG-N). Los oligonucleótidos que contienen determinados patrones de motivos repetidos directos CGC, CCG y CGCG, no solo carecen de actividad estimuladora, sino que también inhiben los motivos CpG estimuladores en *cis* y en *trans*. Aunque es potencialmente útil, la inserción adicional de motivos CpG-N en el vector de ADNp, hasta el momento no ha alterado su actividad estimuladora. Las interacciones entre CpG-N y CpG-S (estimuladores) no se conocen bien, por lo que, actualmente, la estrategia más eficaz ha sido reducir simplemente el número de sitios CpG.

10

[0072] Los sitios CpG problemáticos restantes están dentro del potenciador-promotor y de la región origen de replicación. En su lugar se podría usar un potenciador-promotor que contenga menos sitios CpG que se encuentra en el CMV. La región origen de replicación, junto con el gen de resistencia a antibióticos, podrían deletionarse en su totalidad. Se ha demostrado que la recombinación específica de sitio usando una integrasa del fago lambda produce «minicírculos» compuestos solo del casete de expresión y un fragmento del sitio recombinado. La purificación de estos plásmidos recombinados está actualmente solo disponible para fines analíticos a pequeña escala, pero los procedimientos a gran escala son ciertamente posibles.

15

Tabla 1. Sitios CpG en fragmentos de ADN no modificado y mutado

	longitud (pb)	N.º de CpG
origen natural	1.276	161
origen mutado	1.276	153
origen mínimo	740	96
kan natural	1.252	117
kan mutado	1.252	85
kan sintético	957	0
promotor natural	607	74
intrón/poliA natural	734	80
CAT natural	793	80
CAT sintético	703	2
pCFA-CAT	4.739	526
pGZA-CAT	3.788	256

20

[0073] Resumiendo, un vector de ADNp que contiene un número considerablemente reducido de sitios CpG disminuye la respuesta inflamatoria al vector, así como a los complejos lípido catiónico-ADNp. Una advertencia es la publicación de que el ADN exógeno, independientemente de su contenido en CpG, puede aumentar la expresión del MHC I en células no inmunitarias. Sin embargo, un ADNp con propiedades inmunoestimuladoras reducidas es un paso útil hacia una mayor seguridad y viabilidad de la terapia génica no viral.

25

Preparación de composiciones farmacéuticas y administración de las mismas

[0074] La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que facilitan la administración intracelular de cantidades terapéuticamente eficaces de moléculas de ADNp. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción facilitan la entrada del ADNp en los tejidos y órganos, como por ejemplo, pero sin limitaciones, en la mucosa gástrica, corazón, pulmón, músculo y en tumores sólidos.

30

[0075] Además de ADNp, otras moléculas biológicamente activas representativas que se pueden proporcionar intracelularmente en cantidades terapéuticas usando los procedimientos de la presente descripción son: a) polinucleótidos como el ADN genómico, ADNc y ARNm que codifican proteínas terapéuticamente útiles como se conoce en la técnica; b) ARN ribosómico; c) polinucleótidos complementarios, ya sea de ARN o de ADN, que son útiles para inactivar productos de transcripción de genes y que son útiles, por ejemplo, como terapias para regular el crecimiento de células de mamíferos; d) ribozimas y e) moléculas biológicamente activas de bajo peso molecular como hormonas y antibióticos.

40

[0076] Las especies de anfífilos catiónicos, los derivados de PEG y los colípidos de la presente descripción pueden mezclarse, de modo que se usen dos o más especies de anfífilo catiónico o derivado de PEG o colípido en combinación, para facilitar la entrada de moléculas biológicamente activas en las células diana y/o en

compartimentos subcelulares de las mismas. Los anfífilos catiónicos de la presente descripción también se pueden mezclar para tal uso con anfífilos conocidos en la técnica. Asimismo, un agente dirigido puede acoplarse a cualquier combinación de anfífilo catiónico, derivado de PEG y colípido u otra formulación lipídica o no lipídica que efectúe la administración de una molécula biológicamente activa a una célula de mamífero.

5

[0077] Las dosis de la composición farmacéutica de la presente descripción variarán dependiendo de factores como la semivida de la molécula biológicamente activa, la potencia de la molécula biológicamente activa, la semivida del vehículo de administración, cualquier posible efecto adverso del vehículo de administración o de los productos de degradación del mismo, la vía de administración, la afección del paciente y similares. Los expertos en la materia son capaces de determinar estos factores.

10

[0078] Pueden usarse diversos procedimientos de administración para proporcionar dosis altamente precisas de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción. Dichas preparaciones pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica, transmucosa o mediante inyección de un preparado en una cavidad corporal de un paciente, mediante el uso de una formulación de liberación mantenida que contenga un material biodegradable o mediante la administración *in situ* usando micelas, geles y liposomas adicionales. Los dispositivos de nebulización, inhaladores en polvo y soluciones en aerosol son representativos de procedimientos que pueden usarse para administrar dichos preparados en las vías respiratorias.

15

[0079] Adicionalmente, las composiciones terapéuticas de la presente descripción pueden formularse, en general, con excipientes (como los hidratos de carbono lactosa, treosa, sacarosa, manitol, maltosa o galactosa y sales orgánicas o inorgánicas) y pueden también liofilizarse (y, a continuación, rehidratarse) en presencia de dichos excipientes antes de su uso. Los expertos en el campo farmacéutico pueden determinar las condiciones de la formulación optimizada para cada complejo de la presente descripción. La selección de las concentraciones óptimas de excipientes en particular para formulaciones en particular está sujeta a la experimentación, pero puede ser determinada por los expertos en la materia para cada una de dichas formulaciones.

20

25

Ejemplos

[0080] Los siguientes ejemplos son representativos de la práctica de la presente descripción.

30

Ejemplo 1 *Construcción y purificación de ADN plasmídico.*

[0081] La construcción y caracterización del vector plasmídico pCF1-CAT que codifica el producto cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) del gen indicador se ha descrito previamente. Véase Yew y col. Hum. Gene Ther., 8, 575 – 84 (1997). pCF1-CAT contiene el promotor fuerte del gen inmediato-temprano del citomegalovirus humano (CMV), un intrón, la secuencia señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, un origen pUC y el gen de la aminoglucósido 3'-fosfotransferasa que confiere resistencia a la kanamicina. pCF1-nulo es análogo a pCF1-CAT excepto en que se delecionó el ADNc de CAT. pCFA-299-CAT se construyó mediante la digestión de pCFA-CAT (idéntico a pCF1-CAT excepto por la adición de un pequeño polienlazador 5' de CMV) con Pme I (en el polienlazador) y BglI (en CMV), la obtención de extremos romos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y, a continuación, su replicación. Esto da lugar a la delección de los nucleótidos -522 a -300 del promotor de CMV.

35

40

[0082] La mutagénesis dirigida a sitio se realizó usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange (Stratagene) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una modificación fue que se usaron múltiples grupos de oligonucleótidos simultáneamente, lo que permitió la mutagénesis de tres o más sitios en una única reacción. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación extensiva del ADN y el mapeo de enzimas de restricción para comprobar la integridad del plásmido. Se delecionan los motivos CpG de pCFA-299-10M-CAT en los nucleótidos 88, 118, 141 y 224 (los números hacen referencia al resto C del dinucleótido CpG excepto cuando se indica y se basa en la secuencia de pCF1-CAT; véase la figura 6) y contiene 10 mutaciones puntuales en los nucleótidos 410, 564, 1.497 (G a A), 1.887, 2.419, 2.600, 2.696, 3.473, 4.394 (G a A) y 4.551.

45

50

[0083] El ADN plasmídico se preparó mediante fermentación bacteriana y se purificó mediante ultrafiltración y cromatografía en columna secuencial esencialmente como se ha descrito previamente. Véase Lee y col., Hum. Gene Ther., 7, 1701 – 1717 (1996) y Scheule y col., Hum. Gene Ther., 8, 689 – 707 (1997). Los preparados purificados contenían menos de 5 unidades de endotoxina/mg de ADNp determinado mediante un ensayo LAL cromogénico (BioWhittaker, Maryland), menos de 10 µg de proteína/mg de ADNp determinado mediante el ensayo micro BCA (Pierce, Illinois) y menos de 10 µg de ADN cromosómico bacteriano/mg de ADNp determinado mediante un ensayo de transferencia en puntos. Además, carecían esencialmente de ARN detectable y mostraban relaciones espectrofotométricas $A_{260/280}$ entre 1,8 y 2,0.

55

60

Ejemplo 2 *Metilación in vitro del ADNp.*

[0084] Los ADN plasmídicos se metilaron *in vitro* en 5 ml de reacción que contenían 1 x tampón NEB 2 [NaCl 50 mM, Tds-HCl 10 mM, pH 7,9, MgCl₂ 10 mM y ditioneitol 1 mM], S-adenosilmetionina (SAM) 160 µM, 1-3 mg de ADNp y 1 U de metilasa Sss I (New England Biolabs) por µg de ADNp. La mezcla se incubó a 37 °C durante 18 h. Se añadió SAM adicional a una concentración de 150 µM después de 4 h de incubación. En el tratamiento simulado del ADNp se usó el mismo procedimiento, excepto porque se omitió la metilasa Sss I. El ADNp metilado y con el tratamiento simulado se centrifugó a través de una columna Millipore Probind, se precipitó con etanol y se lavó con etanol al 70 % (v/v). El ADNp se resuspendió en agua a una concentración final de aproximadamente 3 mg/ml. En los experimentos para examinar los efectos de la metilación de ADNp mediada por Sss I, se usó siempre el ADNp con metilación simulada como control.

[0085] El grado de metilación del ADNp se valoró mediante la digestión de 0,2 – 0,5 µg del ADNp tratado con 10 U de BstU o Hpa II durante 1 h, analizando, a continuación, el ADNp mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADNp metilado estaba protegido de la digestión con BstU I y Hpa II, mientras que el ADNp no metilado o metilado parcialmente se escindió. El análisis en gel mostró que el ADNp metilado estaba completamente protegido tanto de la digestión por BstU I como por Hpa II.

[0086] Los plásmidos usados en estos estudios estaban altamente purificados y contenían predominantemente la forma supercoloidal, menos de 1 unidad de endotoxina/mg de plásmido y no presentaba contaminantes infecciosos, según se determinó mediante un ensayo del grado de contaminación microbiana. Para valorar el papel de la metilación de los dinucleótidos CpG del ADN plasmídico en la inflamación pulmonar, los ADNp purificados se metilaron o se sometieron a metilación simulada *in vitro* usando la metilasa Sss I de *E. coli*. Esta enzima metila el resto de citosina (C5) de todos los dinucleótidos CG. El grado de metilación se valoró mediante el control de la susceptibilidad de los plásmidos modificados para la digestión por BstU I o Hpa II, pero no Msp I. Los plásmidos metilados por Sss I estaban completamente protegidos de la digestión con BstU I y Hpa II, pero no los sometidos a metilación simulada (datos no mostrados). La metilación de pCF1-CAT también tenía como consecuencia una reducción de aproximadamente 5 veces en los niveles de expresión tras la administración intranasal en los pulmones de ratones BALB/c (figura 7).

[0087] Los niveles de citoquinas en el líquido de LBA de ratón se cuantificaron mediante kits de ensayos de inmunoadsorción ligados a enzima (ELISA) según las especificaciones de los fabricantes. Los kits de ELISA para IFN-γ, TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-10 e IL-6 eran de Genzyme Corporation, los kits de ELISA para mKC, MIP-2 y GM-CSF eran de R&D Systems y el kit de ELISA para leucotrieno B4 era de Perseptive Diagnostics.

[0088] Los procedimientos para el procesamiento del tejido pulmonar y el ensayo de la actividad enzimática de CAT ya se ha descrito anteriormente. Véase Lee y col., *Hum. Gene Ther.*, 7, 1701 – 1717 (1996) y Yew y col., *Hum. Gene Ther.*, 8, 575 – 84 (1997).

Ejemplo 3 *Instilación nasal de complejos lípido catiónico: ADNp a ratones.*

[0089] Los complejos lípido catiónico: ADNp se formaron mediante la mezcla de volúmenes iguales de GL-67: DOPE (1: 2) con ADNp como se describe previamente (Lee y col., *Hum. Gene Ther.*, 7, 1701 – 1717, 1996) a una concentración final de 0,6: 1,2: 3,6 mM (GL-67: DOPE: ADNp) o 0,3: 0,6: 1,8 mM, como se indica en la leyenda de la figura. La concentración de ADN se expresa en términos de nucleótidos, usando un peso molecular de nucleótidos promedio de 330 Daltons. Se instilaron por vía intranasal 100 µl del complejo a ratones BALB/c como se ha descrito. Véase Lee y col., *Hum. Gene Ther.*, 7, 1701 – 1717 (1996) y Scheule y col., *Hum. Gene Ther.*, 8, 689 – 707 (1997). Los animales se sacrificaron y se hizo un lavado pulmonar 24 h después de la instilación usando solución salina tamponada con fosfato (PBS). El líquido de LBA recuperado se centrifugó a 1.500 rpm durante 4 min; se retiraron los sobrenadantes resultantes y se congelaron a -80 °C para el posterior análisis de citoquinas. Los sedimentos de células se resuspendieron en PBS para la determinación microscópica del número y los tipos de células.

Ejemplo 4 *Composición del líquido del lavado broncoalveolar tras la administración de complejos lípido catiónico: ADNp portadores de ADNp metilado o no metilado.*

[0090] El ADNp(m) metilado con Sss I o el ADNp no metilado se utilizaron para formar complejos con el lípido catiónico GL-67 y, posteriormente, se instilaron por vía intranasal a ratones BALB/c. Se instilaron grupos independientes de ratones con ADNp(m), ADNp no metilado solo o vehículo, y se recogieron los líquidos del lavado broncoalveolar para su análisis 24 h después del tratamiento.

[0091] Para determinar si la metilación del ADNp afecta a la respuesta inflamatoria en los pulmones, se determinaron los niveles de varias citoquinas diferentes en el líquido de LBA 24 h después de la instilación. Se encontraron niveles significativamente mayores de TNF-α, IFN-γ y, en menor grado, de IL-6 en el líquido de LBA de

ratones que recibieron GL-67: pCF1-CAT en comparación con los ratones a los que se administró GL-67: (m)pCF1-CAT (figura 2). Los niveles de KC murina también aumentaron tras la instilación de los complejos lípido catiónico: ADNp, pero no se observaron diferencias significativas en los niveles de la citoquina inducida por ADNp metilado o no metilado formando complejo con GL-67. Por el contrario, se encontraron niveles bajos de estas cuatro citoquinas tras la instilación de GL-67 solo, (m)pCF1-CAT solo o pCF1-CAT no metilado solo (figura 2). Sin embargo, aunque los niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-6 son bajos en el líquido de LBA de los animales tratados con ADNp libre en comparación con el ADNp formado complejo, los niveles de estas citoquinas eran invariablemente superiores en el grupo que recibió solo ADNp no metilado libre que en el grupo al que se administró (m)pCF1-CAT. También se analizaron las citoquinas IL-10, leucotrieno B-4, IL-1 β , IL-1 α , MIP-2 y GM-CSF, pero en todos los casos los niveles eran bajos e indistinguibles de los niveles en animales no tratados (datos no mostrados). Estos resultados indicaban que el ADNp no metilado era inflamatorio en el pulmón y que esta respuesta se exacerbaba cuando el ADNp se presentaba formando complejo con GL-67. Además, de las citoquinas inducidas por la administración de los complejos GL-67: pCF1-CAT al pulmón, TNF- α , IFN- γ y una proporción de la IL -6 se debían principalmente a la presencia de ADNp no metilado. El lípido catiónico GL-67 no contribuía significativamente a la inducción de citoquinas en el líquido de LBA con la excepción de KC, que parecía funcionar en concierto con el ADNp para aumentar su nivel.

[0092] El carácter de la respuesta inflamatoria inducida por GL-67: pCF1-CAT también se evaluó mediante la determinación del número total de células y los recuentos diferenciales recuperados en el líquido de LBA de los animales tratados. Se observó un número elevado de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el líquido de LBA de ratones a los que se instiló GL-67: ADNp en comparación con los ratones que recibieron GL-67 solo o ADNp solo (figura 3A). El estado de metilación del ADNp en el complejo GL-67: pDNA no afectaba significativamente al número total de células. No obstante, los animales a los que se administró (m)pCF1-CAT solo (4 experimentos independientes) mostraban de forma uniforme una ligera reducción del número total de leucocitos PMN en comparación con los que recibieron pCF1-CAT. Un análisis de los diferentes tipos celulares mostró un aumento de la proporción de neutrófilos en ratones que recibieron GL-67: pCF1-CAT en comparación con los ratones que recibieron GL-67: (m)pCF1-CAT (figura 3B). Este aumento se observó también después de la instilación de pCF1-CAT solo en comparación con (m)pCF1-CAT solo. En conjunto, estos datos indican que la inducción del infiltrado celular estaba mediada tanto por el lípido catiónico como por el ADNp. Sin embargo, la administración en el pulmón de ADNp no metilado, y no la de ADNp metilado, puede dar lugar a un aumento del número de leucocitos PMN, especialmente neutrófilos, en el líquido de LBA.

[0093] Puesto que pCF1-CAT expresa niveles elevados de la enzima indicadora CAT, que es una proteína bacteriana, existía la posibilidad de que la respuesta de citoquinas se debiera a la expresión de la proteína extraña. Por tanto, los experimentos se repitieron usando un vector plasmídico que contiene la misma estructura molecular del plásmido, pero que carece de transgén (pCF1-nulo). El perfil de inducción de citoquinas después de la administración de pCF1-nulo metilado o no metilado formado complejo con GL-67 era esencialmente idéntico al obtenido con pCF1-CAT (datos no mostrados). Esto confirmaba que el ADN plasmídico por sí solo, y no la expresión de CAT bacteriano, era responsable de la inducción de citoquinas observada.

Ejemplo 5 *Relación dependiente de dosis entre pADN no metilado y los niveles de citoquinas.*

[0094] Para determinar si existía una relación dependiente de la dosis entre la cantidad de ADNp no metilado administrado en los pulmones y los niveles de citoquinas inducidas, se mezcló (m)pCF1-CAT con pCF1-CAT a diferentes proporciones antes de formar complejos con GL-67. La dosis de GL-67 y la cantidad total de nucleótidos administrados permanecían constantes. En este experimento se analizaron MIP-2 e IL-12, además de TNF- α , IFN- γ , IL-6 y mKC. Cuando aumentaba la proporción de pCF1-CAT no metilado en el complejo, se observaba un aumento correspondiente en los niveles de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 (figura 4). Con IFN- γ , IL-6 e IL-12, el aumento estimulado en los niveles de citoquinas era máximo cuando la proporción de ADNp metilado: no metilado era 1: 2. Esta relación dependiente de la dosis respalda la propuesta de que la inducción de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12 en el líquido de LBA era una respuesta directa a la presencia de ADNp no metilado. Esta tendencia no se observó para KC ni MIP-2, coincidiendo con las observaciones anteriores (figura 4).

Ejemplo 6 *Cambios histopatológicos en el pulmón tras la administración de complejos lípido catiónico: ADNp metilado.*

[0095] También se examinaron los cambios histopatológicos en los pulmones de ratones BALB/c tras la administración del lípido catiónico solo, ADNp solo o complejos lípido catiónico: ADNp. Se realizaron instilaciones intranasales a ratones BALB/c con GL-67: (m)pCF1-CAT, GL-67: pCF1-CAT, GL-67 solo, (m)pCF1-CAT, pCF1-CAT o agua (vehículo control). Los ratones se sacrificaron 2 días después de la instilación y se procesaron los pulmones para el examen histológico de forma enmascarada.

Histopatología

- [0096]** Los pulmones se fijaron mediante insuflación a una presión de 30 cm de H₂O con paraformaldehído al 2 % y glutaraldehído al 0,2 %. Se tomaron muestras representativas de cada lóbulo pulmonar, se incluyeron en glicol metacrilato, se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La histopatología del pulmón se evaluó a ciegas y se clasificó subjetivamente usando una escala de 0 a 4, donde una puntuación de 0 indica la ausencia de hallazgos anómalos y una puntuación de 4 refleja cambios intensos con infiltrado intenso. Véase Scheule y col., Hum. Gene Ther., 8, 689 – 707 (1997).
- 10 **[0097]** Se observaron áreas multifocales de inflamación alveolar en ratones que recibieron complejos GL-67: pDNA. El grado de inflamación pulmonar se clasificó usando una escala de 0 a 4, donde 0 indica la ausencia de anomalías, 1 indica un cambio mínimo, 2 un cambio leve, 3 un cambio moderado y 4 representa cambios intensos respecto al pulmón normal (figura 5). No se observaron diferencias significativas en la puntuación de inflamación de los pulmones que recibieron GL-67: ADNp en comparación con los pulmones que recibieron el complejo GL-67: ADNp(m). Los pulmones que recibieron solo GL-67 obtuvieron puntuaciones ligeramente inferiores que los pulmones que recibieron el complejo lipido: ADNp, mientras que se observó inflamación mínima en los pulmones que recibieron ADNp o ADNp(m) solo. Estos resultados indicaban que la presencia de motivos CpG no metilados en el ADNp no afectaban en gran medida a los cambios histopatológicos observados en el pulmón tras la administración de complejos lipido catiónico: ADNp. Asimismo, la mayoría de los cambios histopatológicos observados tras la administración de los complejos estaban mediados por el componente lipídico catiónico.

Ejemplo 7 Efecto de la mutación de los motivos CpG inmunoestimuladores dentro de pCF1-CAT.

- [0098]** Si un subgrupo de dinucleótidos CpG no metilados presentes en pCF1-CAT eran responsables de la mayoría de la respuesta de citoquinas, entonces la eliminación de estos motivos CpG en particular podría reducir el nivel de inducción. Hay 17 motivos en pCF1-CAT que tienen la secuencia 5'-RRCGYY-3', que se ha demostrado previamente es el contexto de secuencia en el que el motivo CpG es la más inmunoestimulador (figura 6). Catorce de estos motivos se eliminaron mediante delección o mediante mutagénesis dirigida a sitio. Los cuatro motivos CpG localizados en el promotor de CMV (en las posiciones nucleotídicas 88, 118, 141 y 224) se eliminaron mediante la delección de un fragmento de 400 pb que contenía una porción de la región del potenciador antes del extremo 5', para crear pCFA-299-CAT (figura 6). Diez de los trece motivos restantes (en las posiciones 410, 564, 1.497, 1.887, 2.419, 2.600, 2.696, 3.473, 4.394 y 4.551) se modificaron mediante mutagénesis dirigida a sitio para crear pCFA-299-10M-CAT (figura 6). El resto de citosina de cada motivo se mutó a un resto timidina en todos los casos, con la excepción de un motivo (nucleótido 1.497) dentro de la secuencia codificadora de CAT y un motivo (nucleótido 4.394) dentro del gen de resistencia a kanamicina. En estos dos motivos, con el fin de conservar la secuencia codificadora de las respectivas proteínas, el resto de guanidina del dinucleótido CpG se cambió por un resto de adenosina. No fue posible mutar el resto del nucleótido 2.789 que se localiza en la proximidad del origen y que se especula puede ser esencial para la replicación del plásmido.
- 40 **[0099]** Se formaron complejos con los plásmidos, pCF1-CAT, (m)pCF1-CAT, pCFA-299-CAT y pCFA-299-10M-CAT y con el lipido catiónico GL-67 y, a continuación, se instilaron por vía intranasal en ratones BALB/c. Veinticuatro horas después de la instilación se recogió el líquido de LBA para el análisis de citoquinas y se extrajeron los pulmones para los ensayos de CAT. La expresión de pCFA-299-CAT, que contenía el promotor de CMV, era aproximadamente un tercio de la de pCF1-CAT (figura 7). La expresión de pCFA-299-10M-CAT era equivalente a la de pCFA-299-CAT, lo que indicaba que la introducción de 10 mutaciones puntuales no afectaba a la expresión del transgén (figura 7). Al igual que antes, se observaron niveles elevados de TNF- α , IFN- β , IL-6 e IL-12 en el líquido de LBA de ratones que recibieron pCF1-CAT no metilado (figura 8). Sin embargo, también se observaron niveles igualmente altos de estas citoquinas con pCFA-299-CAT y pCFA-299-10M-CAT. Por consiguiente, la reducción del contenido de motivos CpG en el plásmido no reducía su capacidad para elevar los niveles de citoquinas en el pulmón. Esto sugiere que es necesaria la eliminación de otros motivos inmunoestimuladores, además de los que portan la secuencia 5'-RRCGYY-3' consenso para reducir la respuesta inflamatoria.

Ejemplo 8 Efecto de la inhibición del infiltrado y de la activación de citoquinas en el pulmón sobre la expresión de CAT.

- 55 **[0100]** Aunque la mutación del vector plasmídico no conseguía reducir la inflamación en el pulmón, se ha demostrado previamente que la inyección de anticuerpos frente a Mac-1 α y LFA-1 puede limitar el infiltrado de neutrófilos y la inducción de TNF- α . Este procedimiento se usó para determinar el efecto de la reducción transitoria de la respuesta inflamatoria sobre la expresión de CAT.
- 60 **[0101]** El infiltrado de neutrófilos en los pulmones de ratones BALB/c se inhibía mediante la administración sistémica de una combinación de anticuerpos frente a Mac-1 α y LFA-1, como se describe previamente. Véase Scheule y col., Hum. Gene Ther., 8, 689 – 707 (1997). El anticuerpo monoclonal que reconoce la molécula Mac-1 α

murina (clon M1/70; ATCC; TIB 128) se generó a partir de ascitis y los que reconocen LFA-1 se obtuvieron de R&D Systems. Brevemente, para inhibir el infiltrado de neutrófilos, se inyectó en la vena de la cola de los ratones 100 μ l de una mezcla que contenía 40 μ l de líquido ascitis de Mac-1 α y 40 μ l de anticuerpo anti-LFA-1 aproximadamente 10 minutos antes de la administración del complejo lipido catiónico: ADNp. Los ratones se sacrificaron en distintos puntos temporales después de la instilación, se hizo un lavado de los pulmones y se analizaron los niveles de citoquinas y los recuentos celulares en el líquido de LBA resultante.

[0102] Se inyectó a los ratones a través de la vena de la cola una mezcla de los dos anticuerpos justo antes de la instilación de GL-67: pCF1-CAT en el pulmón. Se analizaron los tipos celulares y las citoquinas en el líquido de LBA y la actividad CAT en el pulmón los días 2 y 7 después de la instilación. En el caso de los ratones pretratados con los anticuerpos se observó una disminución significativa del número de neutrófilos; en el líquido de LBA se observó también una reducción en los niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-12 (figura 9). De forma concomitante con esta disminución en los niveles de citoquinas, se observó un aumento superior a 4 veces en la expresión de CAT el día 2 después de la instilación (figura 10). El día 7 se observaron niveles aproximadamente equivalentes de CAT. Estos resultados indican que reduciendo el infiltrado de neutrófilos y la inducción de citoquinas en el pulmón se puede conseguir una mejora significativa en la expresión del transgén.

Ejemplo 9 Efectos de la modificación del vector ADNp mediante mutagénesis dirigida a sitio.

20 Células esplénicas de ratón

[0103] Se sacrificaron ratones BALB/c de 6 – 8 semanas de edad mediante dislocación cervical. Se extirparon los bazo y se colocaron en PBS estéril sobre hielo. Para preparar suspensiones de células disgregadas, los bazo se colocaron en una placa de cultivo tisular en PBS y se aplastaron entre los bordes esmerilados de dos portaobjetos estériles. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1.200 rpm durante 8 min y se lavaron 3 veces con PBS. Después del lavado final, las células se resuspendieron en medio RPMI suplementado con tampón HEPES 25 mM, suero bovino fetal al 10 %, L-glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol (2-ME) 50 μ M. Las células resuspendidas se sembraron a razón de 6×10^6 células/ml/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos. Se recogió el sobrenadante 24 h después de la adición de oligonucleótidos o ADN plasmídico para la determinación de la producción de citoquinas (IL-12).

Mutagénesis dirigida a sitio

[0104] La mutagénesis dirigida a sitio se realizó usando el kit de mutagénesis QuickChange (Stratagene) según el protocolo proporcionado por el fabricante. En general, la citosina del dinucleótido CpG se cambió por una adenina. En algunos casos se cambió la guanina para no alterar la secuencia codificadora. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación del ADN.

Construcción del vector plasmídico

[0105] El vector pCFA-CAT se ha descrito previamente (véase el ejemplo 1). Se aisló un fragmento Sph I de 2,6 Kb de pCFA-CAT que contenía el gen de resistencia a kanamicina y la región origen de replicación y se ligó consigo mismo para formar pOri-K. Para construir los plásmidos con número reducido de CpG, se sintetizó un fragmento de 995 pb que contenía el gen 3-aminoglucosidasa (gen de resistencia a kanamicina) y un fragmento de 721 pb que contenía el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) de *E. coli* por Operon Technologies (GeneOp). Se amplificó un fragmento de 740 pb que contenía el origen de replicación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de pCFA. Esta región se corresponde con los nucleótidos 1.894 a 2.633 de pUC19. El fragmento de kanamicina sintética y el fragmento origen se ligaron para formar pOri-K-mut. Para construir pGZA-CAT, el gen CAT de pCFA-CAT se sustituyó primero por el gen CAT sintético. A partir de esta construcción se aisló un fragmento Sph I de 2 kb que contenía el promotor de CMV, el intrón, el CAT sintético y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina y se ligó a pOri-K-mut para formar pGZA-CAT.

Modificación del vector de ADNp mediante mutagénesis dirigida a sitio

[0106] El vector plasmídico de expresión pCFA-CAT contiene el potenciador y el promotor del gen inmediato temprano del citomegalovirus, un intrón, el gen indicador de la cloranfenicol acetiltransferasa de *E. coli*, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, una región origen de replicación ColE1 y un gen de resistencia a la kanamicina. Contando ambas hebras del plásmido, había en total 526 dinucleótidos CpG (tabla 1).

[0107] Se realizó la mutagénesis dirigida a sitio en los sitios CpG de la región origen de replicación y del gen de resistencia a kanamicina, que contienen el mayor número de estos sitios. En la mayoría de los casos, el dinucleótido CpG se cambió por CA, con algunas excepciones en las que se diseñaron algunas mutaciones para no alterar la secuencia codificadora. Dentro del gen de resistencia a kanamicina se eliminaron 32 de los 117 sitios CpG. Dentro

de la región origen de replicación, muchas de las mutaciones que se probaron destruían aparentemente la función de replicación, por lo que solo se eliminaron ocho de los 161 sitios CpG. Para comparar la actividad estimuladora relativa de la región origen de replicación no modificada y mutada y el gen de resistencia a kanamicina, los fragmentos que contenían estas regiones se amplificaron en primer lugar mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se añadieron, a continuación, cantidades iguales de cada fragmento a las células esplénicas de ratón y, 24 h después, se determinaron los niveles de IL-12. Ambos fragmentos inducían niveles elevados de IL-12 (figura 11), en concordancia con la actividad estimuladora conocida del ADN derivado de *E. coli*. El gen de resistencia a kanamicina mutado inducía el 50 % menos de IL-12 a partir de las células esplénicas de ratón en comparación con el gen no modificado. La región origen de replicación mutado también inducía ligeramente menos IL-12 en comparación con la región no mutada. Estos resultados indican que la reducción del número de sitios CpG dentro de un segmento determinado de ADN reduce la actividad estimuladora.

[0108] Un método alternativo a la mutagénesis para reducir el número de sitios CpG dentro de la región del origen de replicación fue determinar el fragmento mínimo que podía seguir siendo funcional.

15 Estudios previos han demostrado que la región mínima necesaria para la replicación del ADN abarca el origen y aproximadamente 999 pb antes del extremo 5', lo que codifica el cebador ARN II.

La región se redujo en tamaño de 1.276 a 740 pb, se eliminaron 65 motivos CpG, pero continuaba siendo completamente competente para la replicación. Cuando se probó en células esplénicas de ratón, la región de replicación acortada inducía niveles de IL-12 similares a los del origen mutado. Sin embargo, sobre una base de plásmido, este fragmento de replicación mínimo contribuye con significativamente menos motivos CpG.

[0109] En función de estos resultados, probablemente se conseguían reducciones adicionales de la actividad estimuladora mediante la eliminación adicional de sitios CpG-S. En lugar de realizar mutagénesis adicionales, se sintetizó el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina mediante el ensamblaje de varios oligonucleótidos solapantes. La secuencia se diseñó para eliminar todos los dinucleótidos CpG sin alterar la secuencia de aminoácidos. El fragmento del gen indicador CAT se sintetizó de forma similar, eliminando 78 de los 60 sitios CpG. Cuando se probó en células esplénicas de ratón, estos fragmentos deficientes en CpG eran esencialmente no estimuladores, con niveles de IL-12 equivalentes a los del vehículo control. Estos resultados demuestran que fragmentos grandes de ADN pueden hacerse no estimuladores mediante la eliminación de los sitios CpG.

30

Ejemplo 10 *Actividad estimuladora del vector con número reducido de CpG.*

Administración de complejos lípido catiónico: ADNp a ratones.

35 **[0110]** Para la administración sistémica, se formaron complejos lípido catiónico: ADNp mezclando volúmenes iguales de GL-62: DOPE (1: 2) con ADNp como se describe previamente (Lee y col., 1996) a una concentración final de 0,6: 1,2: 3,6 mM (GL-67: DOPE: ADNp). La concentración de ADN se expresa en términos de nucleótidos, usando un peso molecular de nucleótidos promedio de 330 Daltons. Se inyectaron ratones BALB/c a través de la vena de la cola con 100 µl del complejo. El suero se recogió 24 h después de la inyección.

40

[0111] Para la administración dentro del pulmón, los complejos de GL-67: DOPE: ADNp se instilaron por vía intranasal a ratones BALB/c con 100 µl del complejo como se ha descrito (Lee y col., 1996; Scheule y col., 1997). Los animales se sacrificaron y se hizo un lavado pulmonar 24 h después de la instilación usando solución salina tamponada con fosfato (PBS). El líquido de LBA recuperado se centrifugó a 1.500 rpm durante 4 min; se recogieron los sobrenadantes resultantes y se congelaron a -80 °C para el posterior análisis de citoquinas.

45

Ensayos de citoquinas y actividad CAT.

[0112] Los niveles de citoquinas se cuantificaron usando kits de ensayos de inmuoadsorción ligados a enzima (ELISA) según las especificaciones del fabricante (Genzyme Corporation, Framingham, MA). Los procedimientos para el procesamiento del tejido pulmonar y los ensayos de la actividad enzimática de CAT se han descrito previamente (Lee y col., 1996; Yew y col., 1997).

50

Actividad estimuladora del vector con número reducido de CpG

55

[0113] El gen de resistencia a kanamicina y la región origen de replicación mínima se ligaron entre sí para formar pOri-K-mut. Este plásmido contiene 96 sitios CpG en comparación con los 278 sitios CpG del plásmido pOri-K compuesto por el gen de resistencia a kanamicina no mutado y la región origen de replicación no modificada. Los plásmidos se añadieron a las células esplénicas de ratón y se midieron los niveles de IL-12 en el sobrenadante 24 h después. Los niveles de IL-12 inducida por pOri-K-mut eran aproximadamente el 20 % de los inducidos por pOri-K.

60

[0114] El pOri-K-mut se uso, entonces, para reensamblar la forma modificada de pCFA-CAT. El potenciador-promotor de CMV se dejó sin alterar por miedo a que las mutaciones dentro de esta región redujeran la actividad del

promotor. El intrón/poli A tampoco se cambió, pero se encontró que era solo débilmente estimulador cuando se probó en células esplénicas de ratón. El gen CAT sintético se usó en lugar del gen CAT no modificado. El vector reensamblado final pGZA-CAT contiene 256 sitios CpG frente a los 526 sitios en pCFA-CAT. Cuando se probó en células esplénicas de ratón, los niveles de IL-12 eran aproximadamente el 35 % de los inducidos por pCFA-CAT.

5

[0115] Para valorar la actividad estimuladora de pGZA-CAT *in vivo*, se formó un complejo con el vector y el lípido catiónico GL-62 y, a continuación, se inyectó por vía intravenosa en ratones BALB/c. El suero se recogió 24 horas después de la inyección y los niveles de citoquinas se midieron mediante ELISA. Como se mostró previamente, los complejos lípido catiónico: ADNp inducen niveles elevados de las citoquinas inflamatorias INF- γ , IL-12 e IL-6. Comparado con los niveles inducidos por los complejos GL-62: pCFA-CAT, los niveles de IL-12 en suero tras la inyección de GL-62: pGZA-CAT se redujeron el 43 % y los niveles de INF- γ e IL-6 se redujeron el 81 % y el 78 %, respectivamente. También se formaron complejos con el vector pGZA-CAT y el lípido catiónico GL-67 y, a continuación, se instiló por vía intranasal en los pulmones de ratones BALB/c. El líquido del lavado broncoalveolar se recogió 24 horas después de la inyección y los niveles de citoquinas se midieron mediante ELISA. En comparación con los niveles inducidos por los complejos GL-67: pCFA-CAT, los niveles de IL-12 en el líquido de LBA después de la instilación de GL-67: pGZA-CAT se redujeron el 55 % y los niveles de TNF- α e IL-6 se redujeron el 55 % y el 60 %, respectivamente.

[0116] Aquí se han eliminado 270 de los 526 dinucleótidos CpG en un plásmido indicador (pCFA-CAT) y se ha analizado la respuesta inflamatoria frente a los complejos lípido catiónico: ADNp que contenían el vector modificado (pGAZ-CAT) tras la administración sistémica o intranasal a ratones BALB/c. En comparación con el vector no modificado, se observó que pGZA-CAT con número reducido de CpG era significativamente menos estimulador, puesto que los niveles de IL-12, INF- γ e IL-6 en suero 24 horas después de la administración intravenosa se redujo el 40 – 80 %. Reducciones similares en los niveles de citoquinas se observaron en los líquidos del lavado broncoalveolar tras la administración intranasal, mientras que los niveles de expresión del gen indicador no se vieron afectados por las modificaciones.

Ejemplo 11 *Inhibición de la producción de IL-12 por las células esplénicas de ratón con cloroquina y quinacrina.*

[0117] Otra estrategia para reducir las propiedades estimuladoras del vector de ADNp es usar inhibidores específicos de la ruta de señalización de CpG. Se ha demostrado previamente que la cloroquina y la quinacrina inhiben las propiedades inmunoestimuladoras de los oligonucleótidos que contienen el motivo CpG *in vitro*. En estos compuestos se analizó la capacidad de inhibir las propiedades estimuladoras del ADNp y los complejos lípido catiónico-ADNp *in vitro* y en el pulmón del ratón. Se añadió pCFA-CAT, junto con cloroquina o quinacrina, a las células esplénicas de ratón y se midieron los niveles de IL-12 en el medio de cultivo 24 horas después. Cloroquina 10 μ M o quinacrina 1 μ M reducían de forma eficaz la inducción de los niveles de IL-12 hasta casi los niveles basales (figura 15). Para determinar si la cloroquina y la quinacrina podían inhibir la estimulación por los complejos lípido catiónico: ADNp, se añadió cloroquina y quinacrina junto con un complejo de lípido catiónico GL-67 y pCFA-CAT. Cloroquina 10 μ M o quinacrina 1 μ M de nuevo reducían de forma eficaz la inducción de los niveles de IL-12 casi hasta niveles basales (figura 15).

Ejemplo 12 *Perfil de citoquinas en el líquido del lavado broncoalveolar después de la instilación del complejo lípido catiónico: ADNp más cloroquina o quinacrina.*

[0118] La cloroquina y la quinacrina se instilaron también con complejos de GL-67 y pCFA-CAT en los pulmones de ratones BALB/c. Se recogió el líquido de LBA 24 horas después de la instilación y se midieron las citoquinas mediante ELISA. La adición de cloroquina 0,1 μ M o quinacrina 0,1 μ M reducía los niveles de IL-12, TNF- α e INF- γ del 50 al 70 % en comparación con los niveles después de la instilación del complejo solo. Concentraciones más altas de cloroquina o quinacrina no disminuyeron adicionalmente los niveles de citoquinas (datos no mostrados). Los niveles de expresión de CAT no se vieron afectados por la adición de cualquiera de los dos compuestos (figura 16). Estos resultados sugieren que concentraciones bajas de cloroquina y quinacrina pueden reducir de forma eficaz la respuesta inflamatoria asociada a la instilación de complejos lípido catiónico-ADNp en el pulmón.

[0119] Los resultados demuestran que inhibidores conocidos de la ruta de señalización de CpG reducen los niveles de citoquinas inflamatorias. Dos de estos inhibidores, cloroquina y quinacrina, reducían en gran medida la inducción de la producción de IL-12 por las células esplénicas de ratón *in vitro* e inhibían la producción de citoquinas en el pulmón al 50 % sin afectar a la expresión génica. El uso de un vector de ADNp menos estimulador, junto con inhibidores de la estimulación inducida por CpG, reduce la toxicidad asociada a los complejos lípido catiónico-ADNp y, por tanto, aumenta la seguridad de la terapia génica no viral.

60

Ejemplo 13 *Papel del estado de metilación de los motivos CpG en pCF1-CAT sobre la toxicidad observada tras la administración sistémica de complejos GL-67: pCF1-CAT.*

[0120] Se hidrató GL-67: DOPE: DMPEPeg5000 (proporción molar 1: 2: 0,05) en agua estéril apirógena a una concentración de 4 mM de GL-67. El ADN plasmídico (ADNp) se diluyó en agua estéril apirógena a una concentración de 4 mM. Se preparó el complejo GL-67: ADNp añadiendo un volumen igual de suspensión de lípido catiónico a un volumen igual de ADNp seguido del mezclado suave para lograr la homogeneidad de la suspensión.

5 La mezcla se incubó a continuación durante un mínimo de 15 minutos y un máximo de 60 minutos antes de la inyección. El complejo se preparó usando los siguientes tipos de ADNp: 1) pCF1-CAT no tratado [pCF1-CAT que no se ha modificado tras la purificación en columna], 2) pCF1-CAT metilado [pCFA-CAT en el que los motivos CpG se han metilado con metilasa Sss I, 3) pCF1-CAT con metilación simulada [pCF1-CAT que se ha sometido a la reacción de metilación, pero en la que no había metilasa en la mezcla de reacción].

10

[0121] Se inyectaron ocho ratones BALB/c hembras por grupo con un bolo de 100 µl del complejo GL-67: ADNp o del vehículo a través de la vena de la cola. A las 24 horas aproximadamente de la inyección, se recogieron muestras de sangre completa y suero de los ratones mediante sangrado retroorbital. La sangre completa se sometió a un examen hematológico completo para el cual se siguió un conjunto representativo, pero no exclusivo, de parámetros: 15 recuento de leucocitos, fórmula leucocitaria, recuento de eritrocitos, hemoglobina y recuento de plaquetas. También se analizó en el suero un perfil de bioquímica sérica para animales pequeños, para lo cual se siguió un conjunto representativo, pero no exclusivo, de parámetros; transaminasas séricas (alanina aminotransferasa [ALT], aspartato aminotransferasa [AST]), creatinina quinasa, bilirrubina, niveles séricos de proteínas incluyendo niveles de albúmina y globulina, nitrógeno ureico en sangre, electrolitos y glucosa. También se analizó en el suero, usando kits de 20 inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA) de R&D Systems, la presencia de las siguientes citoquinas representativas: interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN-γ).

[0122] Estudios previos de toxicología han sugerido que los cambios fisiológicos mediados por la administración sistémica del complejo lípido catiónico: ADNp se caracterizaban, en parte, por elevaciones estadísticamente 25 significativas en los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST) y en las citoquinas IL-6, IL-12 e IFN-γ, en comparación con los animales tratados con el vehículo. Las elevaciones de los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST) se aceptan, en general, como indicadores de la toxicidad hepática, aunque se conocen con certeza otros parámetros clínicos de daño hepático por lo que podrían sustituirse. Dos fuentes para obtener información más detallada sobre las pruebas diagnósticas y usos de la bioquímica clínica son *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 30 N.W. Tietz, Editor, Saunders, Filadelfia, 1976 y *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 15ª ed., Saunders, Filadelfia, 1974. Los niveles de citoquinas se midieron como indicadores de la inflamación; el grupo de citoquinas seleccionado se acepta, en general, como un grupo proinflamatorio. Sin embargo, estudios previos de toxicología indican que se produce la inducción de más citoquinas que las de este subgrupo tras la administración sistémica del 35 complejo lípido catiónico: ADNp. Por tanto, este grupo de citoquinas debe revisarse como medición representativa, pero no exclusiva, de la respuesta de citoquinas generadas por el complejo lípido catiónico: ADNp. Una fuente de información adicional sobre la relación de la inflamación y las citoquinas / otros mediadores solubles en sangre de las interacciones célula-célula se puede encontrar en *Immunology*, 5ª ed., Mosby International Ltd., Londres, 1998.

Resultados

40

[0123] Los ratones a los que se inyectaron tanto complejos GL-67: pCF1-CAT no tratado como GL-67: pCF1-CAT con metilación simulada mostraban elevaciones significativas de los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST), así como elevaciones significativas de los niveles de IL-6, IL-12 e IFN-γ, en comparación con los animales tratados con el vehículo. Los ratones a los que se inyectó el complejo GL-67: pCF1-CAT metilado también mostraron 45 elevaciones significativas de los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST), pero presentaban niveles de IL-12 e IFN-γ próximos a los observados en los animales tratados con el vehículo. Estos resultados ponen de manifiesto que la metilación de los motivos CpG en pCF1-CAT bloquea la inducción de la expresión de IL-12 e IFN-γ, pero no altera la toxicidad sistémica observada tras la administración del complejo GL-67: pCF1-CAT, como indican los niveles de transaminasas séricas.

50

Ejemplo 14 *Papel de los motivos CpG en pCFA-CAT sobre la toxicidad observada tras la administración sistémica de complejos GL-67: pCF1-CAT.*

[0124] Se hidrató GL-67: DOPE: DMPEPeg5000 (proporción molar 1: 2: 0,05) en agua estéril apirógena a una 55 concentración de 4 mM de GL-67. El ADN plasmídico (ADNp) se diluyó en agua estéril apirógena a una concentración de 4 mM. Se preparó el complejo GL-67: ADNp añadiendo un volumen igual de suspensión de lípido catiónico a un volumen igual de ADNp seguido del mezclado suave para lograr la homogeneidad de la suspensión. La mezcla se incubó a continuación durante un mínimo de 15 minutos y un máximo de 60 minutos antes de la inyección. El complejo se preparó usando los siguientes tipos de ADNp: 1) pCF1-CAT y 2) pGZA-CAT (un vector 60 plasmídico en el que el número total de motivos CpG se ha reducido el 50 % con respecto a pCF1-CAT).

[0125] Se inyectaron ocho ratones BALB/c hembras por grupo con un bolo de 100 µl del complejo GL-67: ADNp o del vehículo a través de la vena de la cola. A las 24 horas aproximadamente de la inyección, se recogieron muestras

de sangre completa y suero de los ratones mediante sangrado retroorbital. La sangre completa se envió para un examen hematológico completo para lo cual se siguió un conjunto representativo, pero no exclusivo, de parámetros: recuento de leucocitos, fórmula leucocitaria, recuento de eritrocitos, hemoglobina y recuento de plaquetas. También se envió suero para realizar un perfil de bioquímica sérica para animales pequeños, para lo cual se siguió un conjunto representativo, pero no exclusivo, de parámetros; transaminasas séricas (alanina aminotransferasa [ALT], aspartato aminotransferasa [AST]), creatinina quinasa, bilirrubina, niveles séricos de proteína incluyendo niveles de albúmina y globulina, nitrógeno ureico en sangre, electrolitos y glucosa. También se analizó en el suero, usando kits de inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA) de R&D Systems, la presencia de las siguientes citoquinas representativas: interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN- γ).

10

[0126] Estudios previos de toxicología han sugerido que los cambios fisiológicos mediados por la administración sistémica del complejo lípido catiónico: ADNp se caracterizan, en parte, por elevaciones estadísticamente significativas en los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST) y en las citoquinas IL6, IL-12 e IFN- γ , en comparación con los animales tratados con el vehículo. Las elevaciones de los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST) se aceptan, en general, como indicadores de la toxicidad hepática, aunque se conocen con certeza otros parámetros clínicos de daño hepático por lo que podrían sustituirse. Dos fuentes para obtener información más detallada sobre las pruebas diagnósticas y usos de la bioquímica clínica son *Fundamentals of Clinical Chemistry*, N.W. Tietz, Editor, Saunders, Filadelfia, 1976 y *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 15^a ed., Saunders, Filadelfia, 1974. Los niveles de citoquinas se midieron como indicadores de la inflamación; el grupo de citoquinas seleccionado se acepta, en general, como un grupo proinflamatorio. Sin embargo, estudios previos de toxicología indican que se produce la inducción de más citoquinas que las de este subgrupo tras la administración sistémica del complejo lípido catiónico: ADNp. Por tanto, este grupo de citoquinas debe revisarse como medición representativa, pero no exclusiva, de la respuesta de citoquinas generadas por el complejo lípido catiónico: ADNp. Una fuente de información adicional sobre la relación de la inflamación y las citoquinas / otros mediadores solubles en sangre de las interacciones célula-célula se puede encontrar en *Immunology*, 5^a ed., Mosby International Ltd., Londres, 1998.

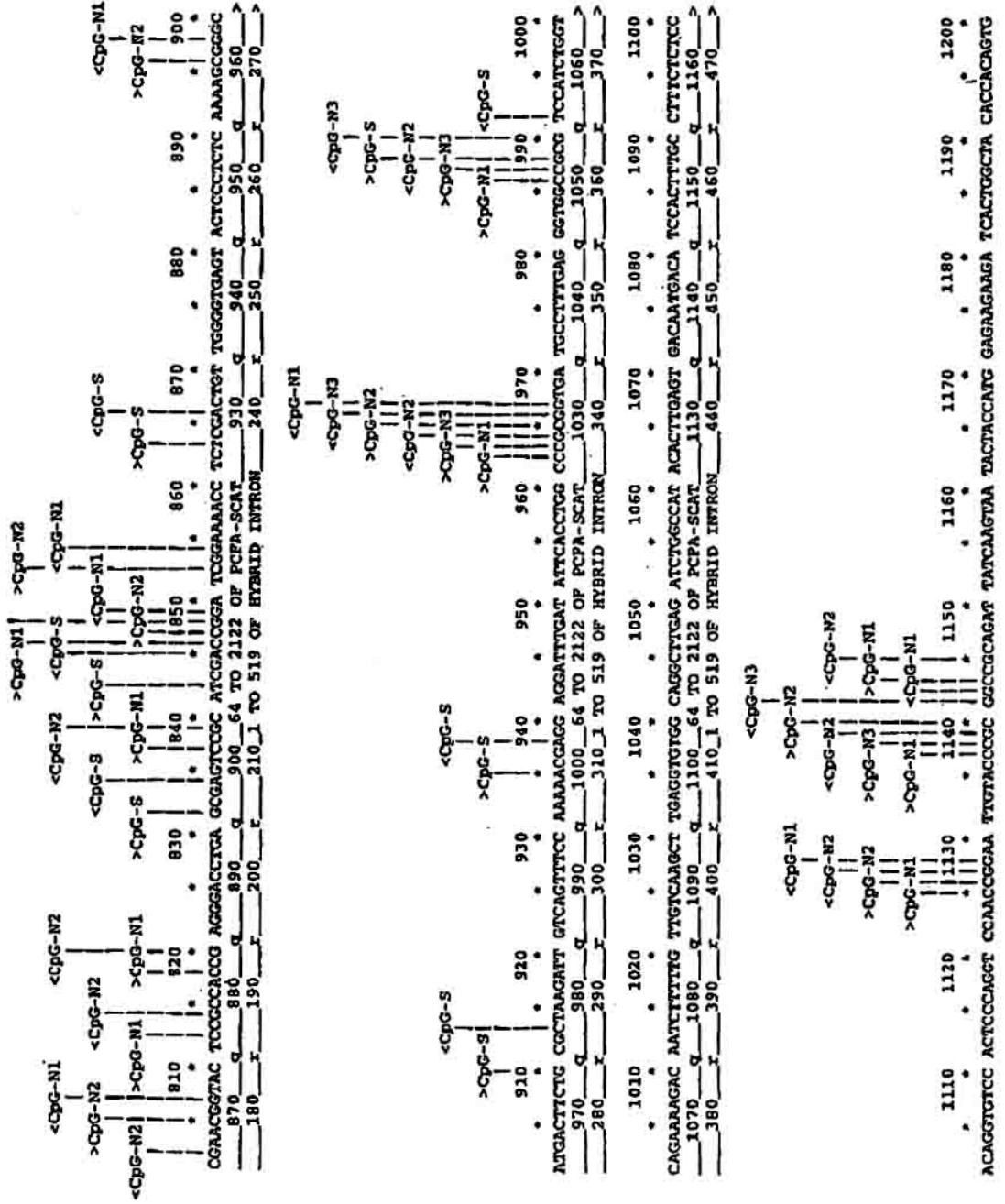
Resultados

[0127] Los ratones a los que se inyectó el complejo GL-67: pCF1-CAT muestran elevaciones significativas de los niveles de transaminasas séricas (ALT y AST), así como elevaciones significativas de IL-6, IL-12 e IFN- γ , en comparación con los animales tratados con el vehículo. Por el contrario, los ratones a los que se inyectó el complejo GL-67 preparado con pGZA-CAT (un vector plasmídico en el que el número de motivos CpG se había reducido el 50 % con respecto a pCF1-CAT) mostraban niveles de transaminasas séricas (ALT y AST) próximos a los que se encontraron en los animales tratados con el vehículo. Estos últimos animales también mostraban niveles séricos mucho más bajos de IL-6, IL-12 e IFN- γ que el de los animales tratados con el complejo GL-67: pCFA1-CAT donde el plásmido no se modifica con respecto a los motivos CpG. Estos resultados ponen de manifiesto que la eliminación de los motivos CpG de los vectores plasmídicos reduce tanto la respuesta inflamatoria como la toxicidad sistémica observadas tras la administración sistémica del complejo GL-67: ADNp, como indica el perfil de citoquinas y los niveles de transaminasas séricas, respectivamente.

40

REIVINDICACIONES

1. Uso de un plásmido que comprende un gen de interés para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero mediante terapia génica, en el que el uso comprende la modificación del plásmido mediante la eliminación de un dinucleótido CpG o su mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro de dicho plásmido, y en el que el tratamiento comprende la administración del plásmido en combinación con un anfífilo catiónico.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que el uso comprende la eliminación de un dinucleótido CPG o su mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro del gen de interés.
3. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el plásmido comprende un origen de replicación, y el uso comprende la eliminación de un dinucleótido CpG o su mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro del origen de replicación.
4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que el plásmido comprende un polinucleótido que codifica un marcador seleccionable, y el uso comprende la eliminación de un dinucleótido CpG o su mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro de dicho polinucleótido.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el transgén codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (FQ).
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento comprende un excipiente farmacéutico.
7. El uso según la reivindicación 6, en el que el uso comprende la liofilización del plásmido en presencia de dicho excipiente.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento comprende el anfífilo catiónico que tiene que ser administrado en combinación con el plásmido.
9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anfífilo catiónico es un lípido catiónico.
10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el plásmido y el anfífilo catiónico tienen que administrarse juntos como solución en aerosol.
11. Un proceso de preparación de una composición farmacéutica para el uso de la terapia génica en un mamífero, en el que la composición farmacéutica comprende: i) un plásmido que comprende un gen de interés y ii) un anfífilo catiónico; y en el que el proceso comprende: a) modificar el plásmido mediante la eliminación de un dinucleótido CpG o su mutación a un dinucleótido no-CpG de al menos un dinucleótido CpG dentro del plásmido y b) combinar el plásmido con el anfífilo catiónico.



```

1170 q 1180 q 1190 q 1200 64 TO 2122 OF PCFA-SCAT 1230 q 1240 q 1250 q 1260
48_1 TO 519 OF HYBRID INTRON 510 >
      u 10 u 2 TO 720 OF CAT HUMAN SYNTHETIC 50 u 60
*
1210 * 1220 * 1230 * 1240 * 1250 * 1260 * 1270 * 1280 * 1290 * 1300 *
GACATCAGCC AGAGCCACAG GAGAGACAC TTGAGGCCCT TCCAGCTGT GGCACAGCC AGCTCAGCA GCTGGACATC ACTGCCTTCC
1270 q 1280 q 1290 q 1300 64 TO 2122 OF PCFA-SCAT 1330 q 1340 q 1350 q 1360
70 u 80 u 90 u 2 TO 720 OF CAT HUMAN SYNTHETIC 130 u 140 u 150 u 160
*
1310 * 1320 * 1330 * 1340 * 1350 * 1360 * 1370 * 1380 * 1390 * 1400 *
TGAAGACAGT GAAGAGCAC AAGCAGCAGT TCTACCCCTC CTTCTCCAC ATCCCTGCCA GCGTAGTAA TCCCAACCT GAGTTCAGCA TGGCCATGAA
1370 q 1380 q 1390 q 1400 64 TO 2122 OF PCFA-SCAT 1430 q 1440 q 1450 q 1460
170 u 180 u 190 u 2 TO 720 OF CAT HUMAN SYNTHETIC 230 u 240 u 250 u 260
*
1410 * 1420 * 1430 * 1440 * 1450 * 1460 * 1470 * 1480 * 1490 * 1500 *
GGATGGGAG CTGGTATCT GGCACCTGT GACCCCTGC TACACATGT TCCATGACCA GACTGAGCC TTCAGCAGCC TGTGGTCTCA GTACCATGAT
1470 q 1480 q 1490 q 1500 64 TO 2122 OF PCFA-SCAT 1530 q 1540 q 1550 q 1560
270 u 280 u 290 u 2 TO 720 OF CAT HUMAN SYNTHETIC 330 u 340 u 350 u 360
*
1510 * 1520 * 1530 * 1540 * 1550 * 1560 * 1570 * 1580 * 1590 * 1600 *
GACTCCGC NSTTCTGCA CATCTACAGC CAGGATGG CCGTAGTG GGAGAACCTG GCGTACTCC CCAGGGCTT CATTTGAGAC ATGTTCTTTG
1570 q 1580 q 1590 q 1600 64 TO 2122 OF PCFA-SCAT 1630 q 1640 q 1650 q 1660
370 u 380 u 390 u 2 TO 720 OF CAT HUMAN SYNTHETIC 430 u 440 u 450 u 460
*
1610 * 1620 * 1630 * 1640 * 1650 * 1660 * 1670 * 1680 * 1690 * 1700 *
TGTCTGCCAA CCCTGGGTG AGCTTACCA GCTTGAACCT GAATGGCC AACATGGACA ACTTCTTGC CCTGTGTTT ACCATGGCA ACTACTACAC
1670 q 1680 q 1690 q 1700 64 TO 2122 OF PCFA-SCAT 1730 q 1740 q 1750 q 1760
470 u 480 u 490 u 2 TO 720 OF CAT HUMAN SYNTHETIC 530 u 540 u 550 u 560
*
1710 * 1720 * 1730 * 1740 * 1750 * 1760 * 1770 * 1780 * 1790 * 1800 *
CCAGGGGAC AAGGTGCTGA TGCCTCGGC CATCCAGTG CACCATCTG TGTGTATGG CTTCATGTC GGCAGGATCC TGAATGCT GCAGCAGTAC
1770 q 1780 q 1790 q 1800 64 TO 2122 OF PCFA-SCAT 1830 q 1840 q 1850 q 1860
570 u 580 u 590 u 2 TO 720 OF CAT HUMAN SYNTHETIC 630 u 640 u 650 u 660

```

<CpG-N1

|

<CpG-N2

||

>CpG-N2

|||

>CpG-N1

||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

|||||

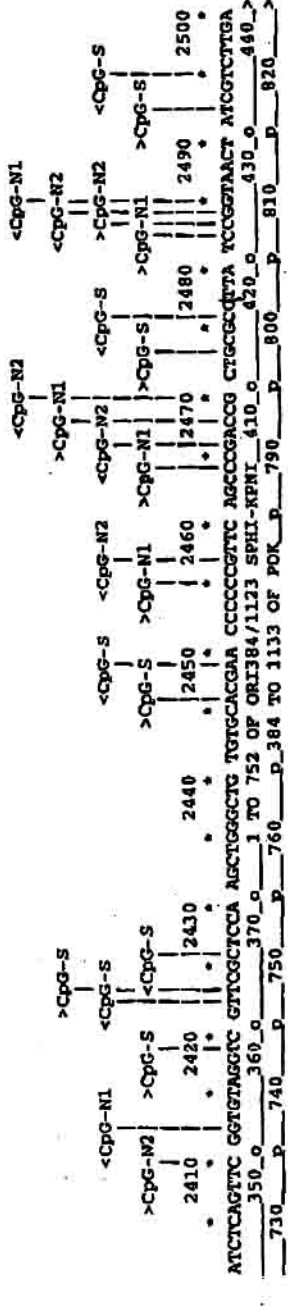
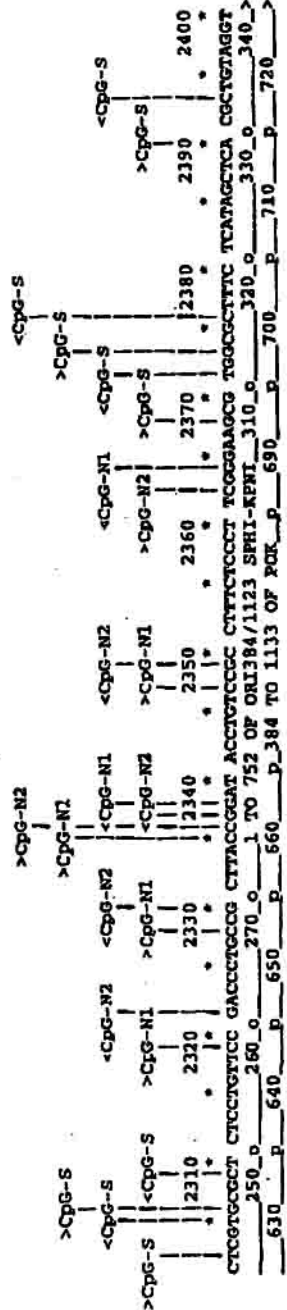
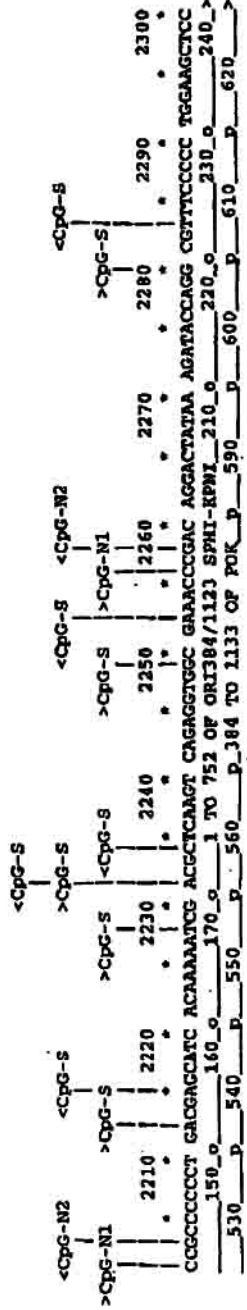
|||||

<CpG-N2

|

>CpG-N1

CAGATCAGG GGNATACCA GGAAGACAA TGTGACGAA AGGCACGAA AGCCGACGA ACCTAATAA GSCCGCTTG CUGCCGTTT TCCATAGCT
 50_o_p_440_p_450_p_460_p_490_p_510_p_520_p_140_p_>
 1 TO 752 OF ORI384/1123 SPHI-KPMI_110_o_p_120_o_p_130_o_p_140_p_>




```

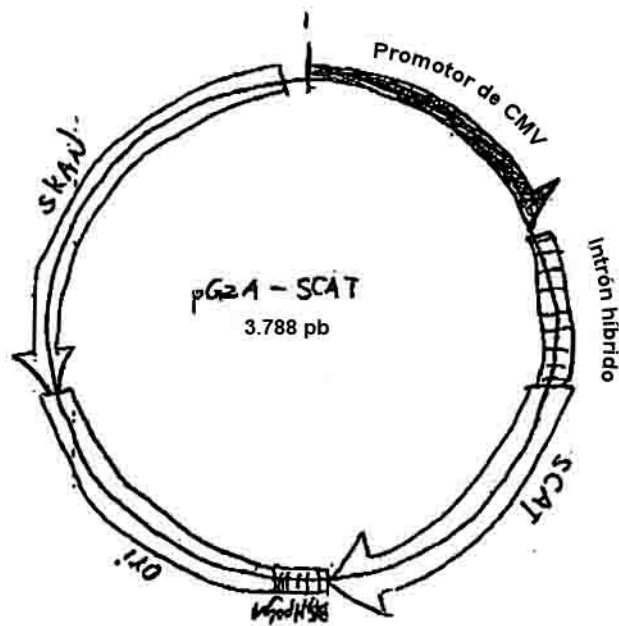
-20->
3010 . 3020 . 3030 . 3040 . 3050 . 3060 . 3070 . 3080 . 3090 . 3100
CAACTCTTCC AACATCAATA CAACCAATTA ATTTCOCCTC ATCAAAATA AGGTATATCA GTGAGAAATC ACATGATGTC ACCACTGAT ACCACTGAT CTGCTGAGAA
->
-20->
-2_18 TO 1269 OF PUC4K ECORI BLF_50-
-2_18 TO 1269 OF PUC4K ECORI BLFRAG [SPLIT]_1->
-20->
3110 . 3120 . 3130 . 3140 . 3150 . 3160 . 3170 . 3180 . 3190 . 3200
TGGCAAAAGC TTATGCACTT CTTTCAGAC TTGTTCAACA GGCAGCCAT TTCTCTATC ATCAAAATCA CTGGCATCA CCAAACTT ATTCAATCTT
-30_18 TO 1269 OF PUC4K ECORI BLFRAG [SPLIT]_0_k->
-20->
-18 TO 126_30->
-2_18 TO 12_30->
-20->
3210 . 3220 . 3230 . 3240 . 3250 . 3260 . 3270 . 3280 . 3290 . 3300
GATTCGCCCT GAGCCAGCTT AATACTCTA TCAGATTA AAGGAAAT ACAAACAGGA ATGGAATCCA ATCTTCTCAG GAACACTGCC AGGCATCA
20->
-20_q->
-20->
-20->
-2_18 TO 1269 OF PUC4K ECO_u->
-20_v->
-2_18 TO 1269_w->
-20->
3310 . 3320 . 3330 . 3340 . 3350 . 3360 . 3370 . 3380 . 3390 . 3400
CAATATTTT ACCTGAATCA GGTATTTT CTAATACCTG GAATCTCTT TTCCCTGGGA TGGCAGTGT GAGTAACCAT GCATCATCAG GAGTTCTCAT
-30_18 TO 1269 OF PUC4K ECORI BLFRAG [SPLIT]_k->
-20_y->
-2_18 TO 1269 OF PUC4K ECORI BL_>
-20->
3410 . 3420 . 3430 . 3440 . 3450 . 3460 . 3470 . 3480 . 3490 . 3500
AAATCCTTG ATGGTTGGAA GAGGCATAAA TTCAGTCAGC CAGTTTATG TGCATCTC ATCTGTAACA TCAATGGCAA CAGAATCTT GCCATGTTTC
-18 TO 126_>
-2_18 TO 1269 o->
-20_18 TO 1269 OF PUC4K ECORI BLFRAG [SPLIT]_0_c->
-2_18 TO 1869->

```

3510 * 3520 * 3530 * 3540 * 3550 * 3560 * 3570 * 3580 * 3590 * 3600 *
 AGRACACT CTGGGCATC TGGCTTCCA TACAACTAT AGATATGGC ACCGATGGC CCAACATAT CTCAGGCCA TTATACCCA TATATACAG
 18 TO 1269 -20- 18 TO 1269 -20- 18 TO 1269 -20- 18 TO 1269 -20- 18 TO 1269 -20-

3610 * 3620 * 3630 * 3640 * 3650 * 3660 * 3670 * 3680 * 3690 * 3700 *
 CATTATGTT CGAATTTAT CTGGCCCTGG AGCAAGAGGT TTCTCTTGA ATATGGCTCA TAAACCCCT TGTATTACTG TTATGTGAG CAGACACTTT
 18 TO 1269 OF PUC4K -20- 120 -20- 18 TO 1269 OF PUC4K B -20- 18 TO 1269 OF PUC4K B -20-

3710 * 3720 * 3730 * 3740 * 3750 * 3760 * 3770 * 3780 *
 TATGTTCAT CATGATAAT TTTTATCTG TGCATGTAA CATCAGAT TTTGACAC AACAAATGTT TTAACCCCTA GAACTAGT
 80 18 TO 1269 OF PUC4K ECORI BLFRAG [SPLIT] 130 18 TO 1269 OF PUC4K ECORI BLFRAG [SPLIT] 70



Promotor de CMV (natural):	1-612	
Intrón híbrido (natural):	628-1137	
CAT humano sintético:	1138-1857	marco de lectura abierto - codón de inicio: 1168 codón de terminación: 1824
BGH-poli A (natural):	1858-2057	
Ori (acortado):	2058-2805	
KAN sintético:	2806-3763	marco de lectura abierto - codón de inicio: 2661 codón de terminación: 2849
Polienlazador:	3764-3788	

FIGURA 1B

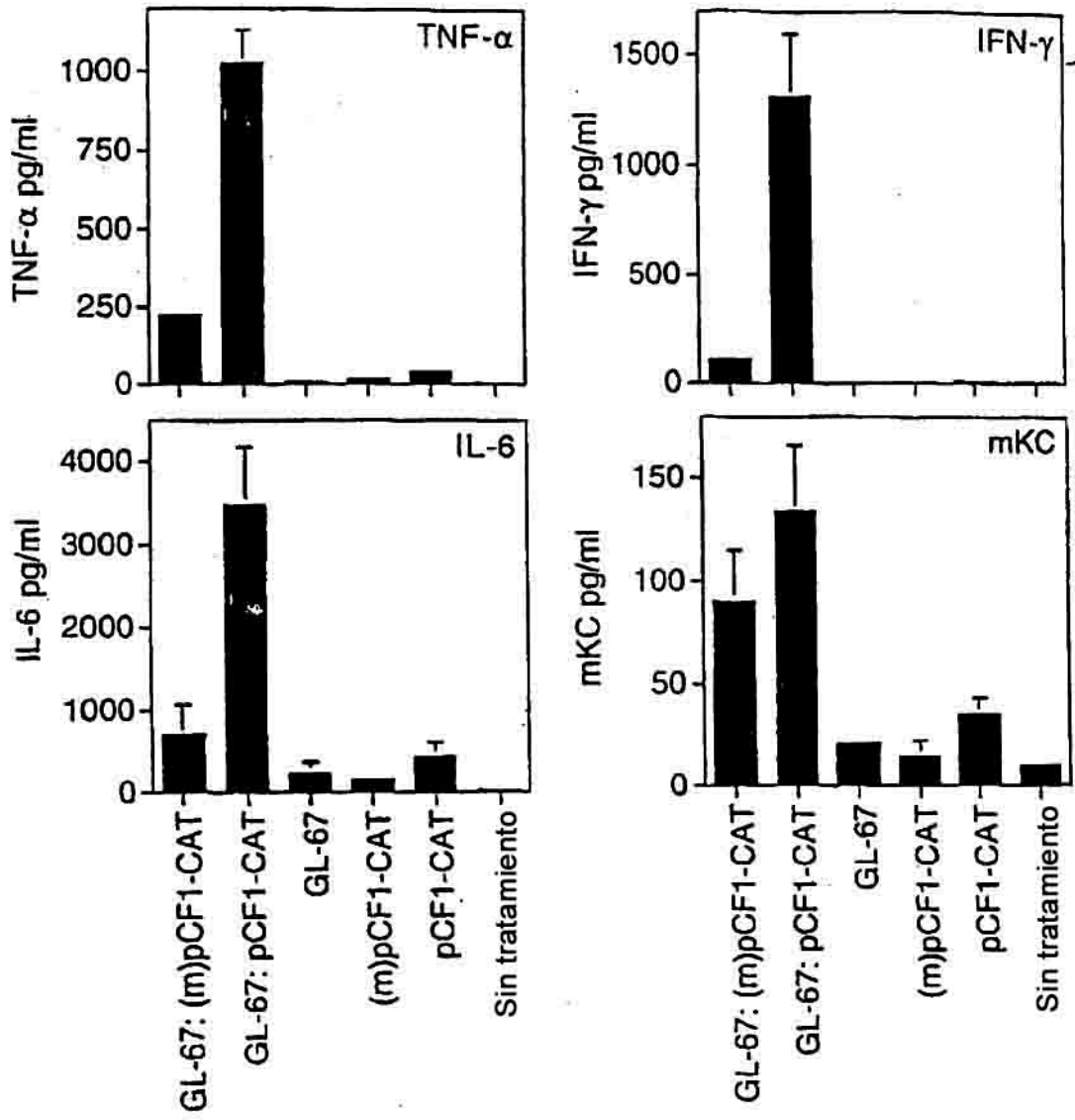


FIGURA 2

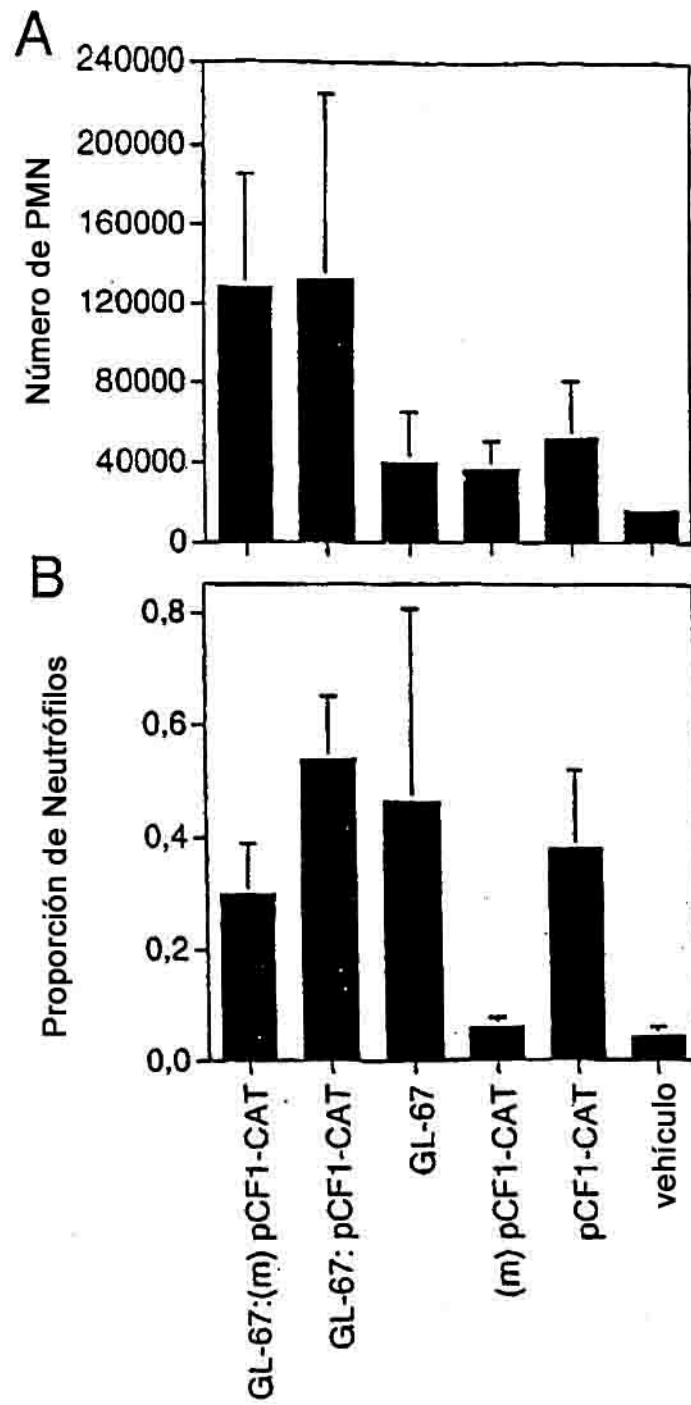


FIGURA 3

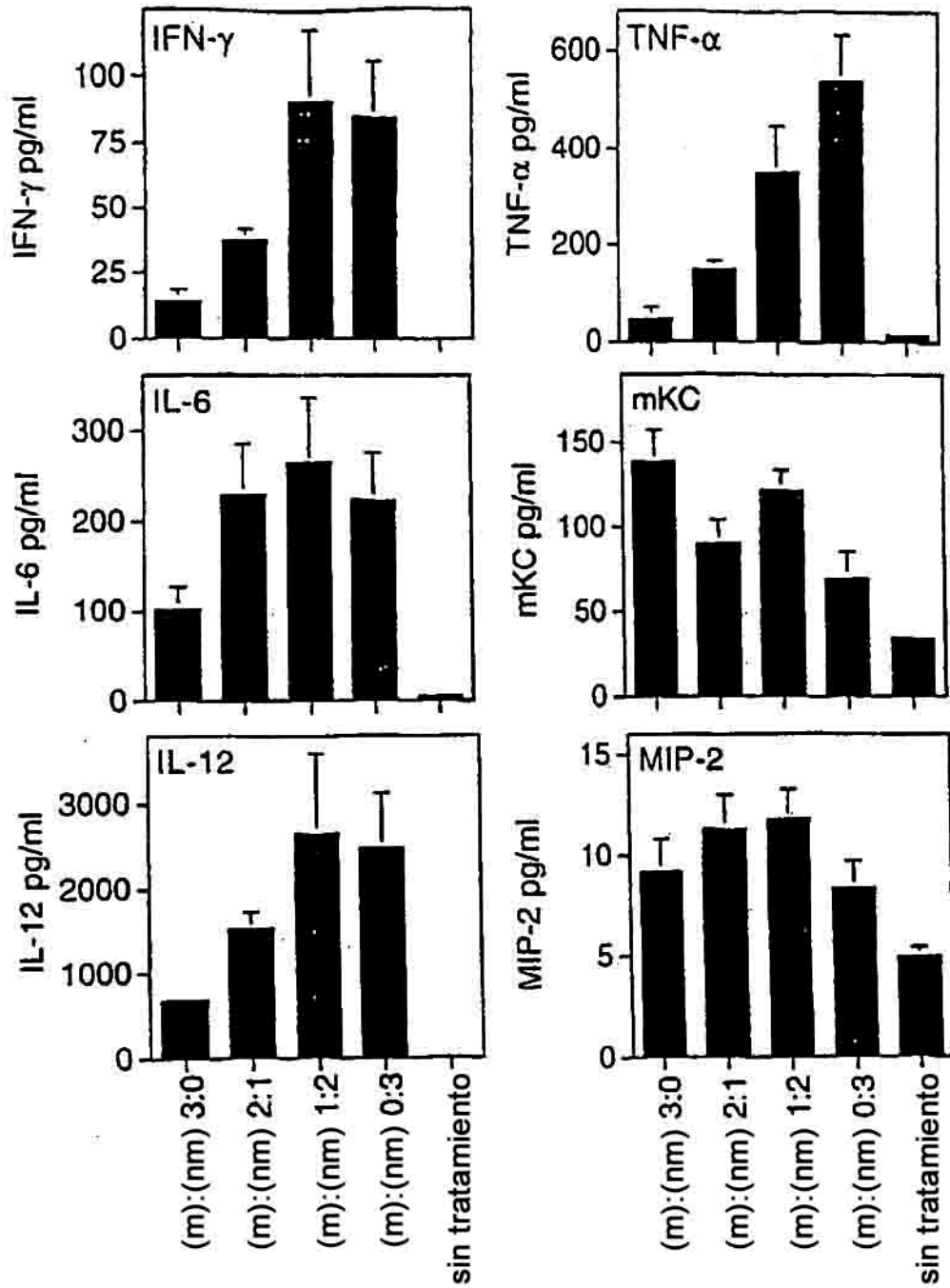


FIGURA 4

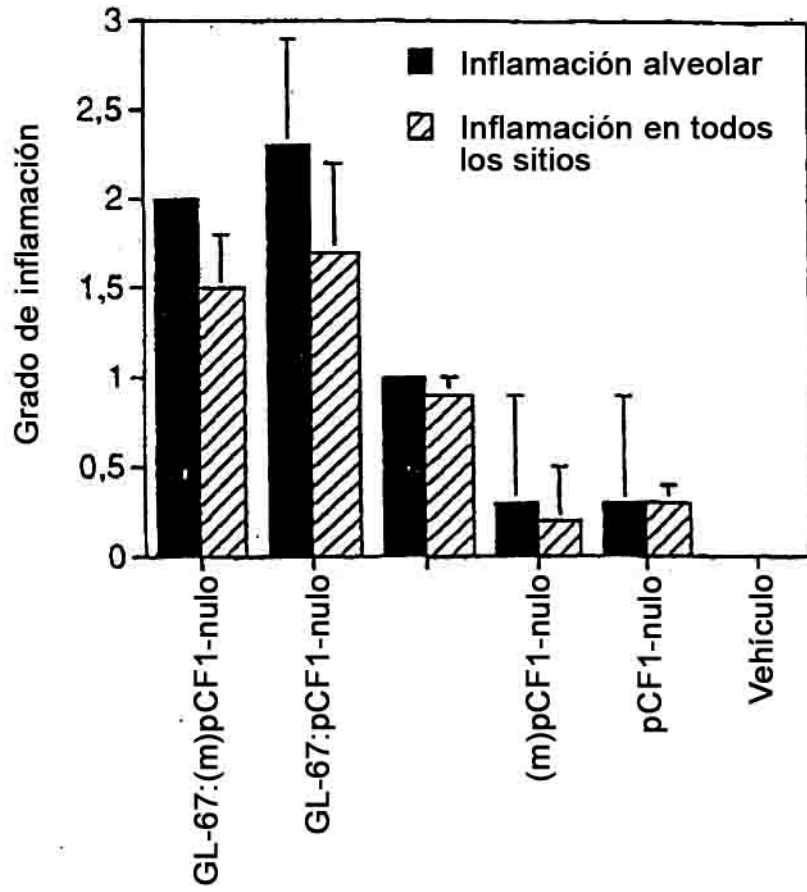


FIGURA 5

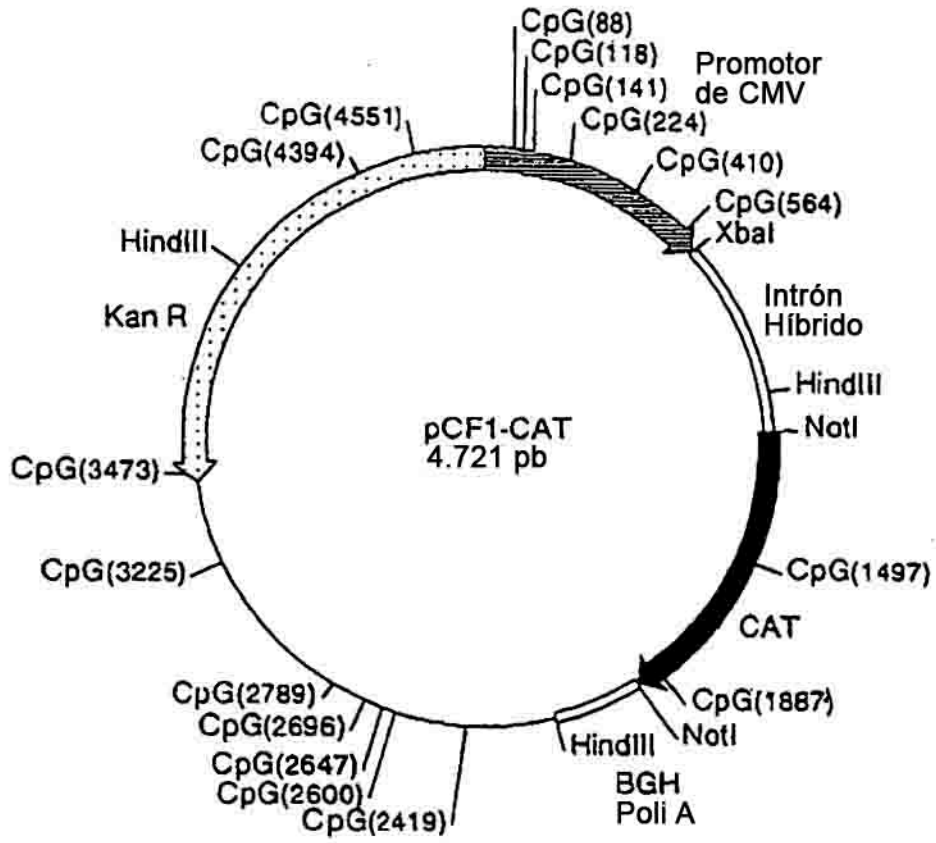


FIGURA 6

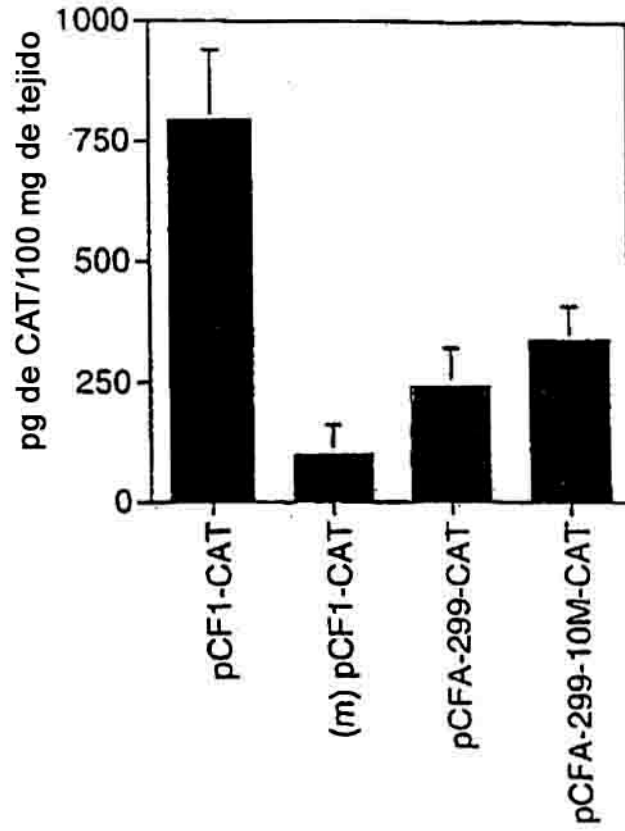


FIGURA 7

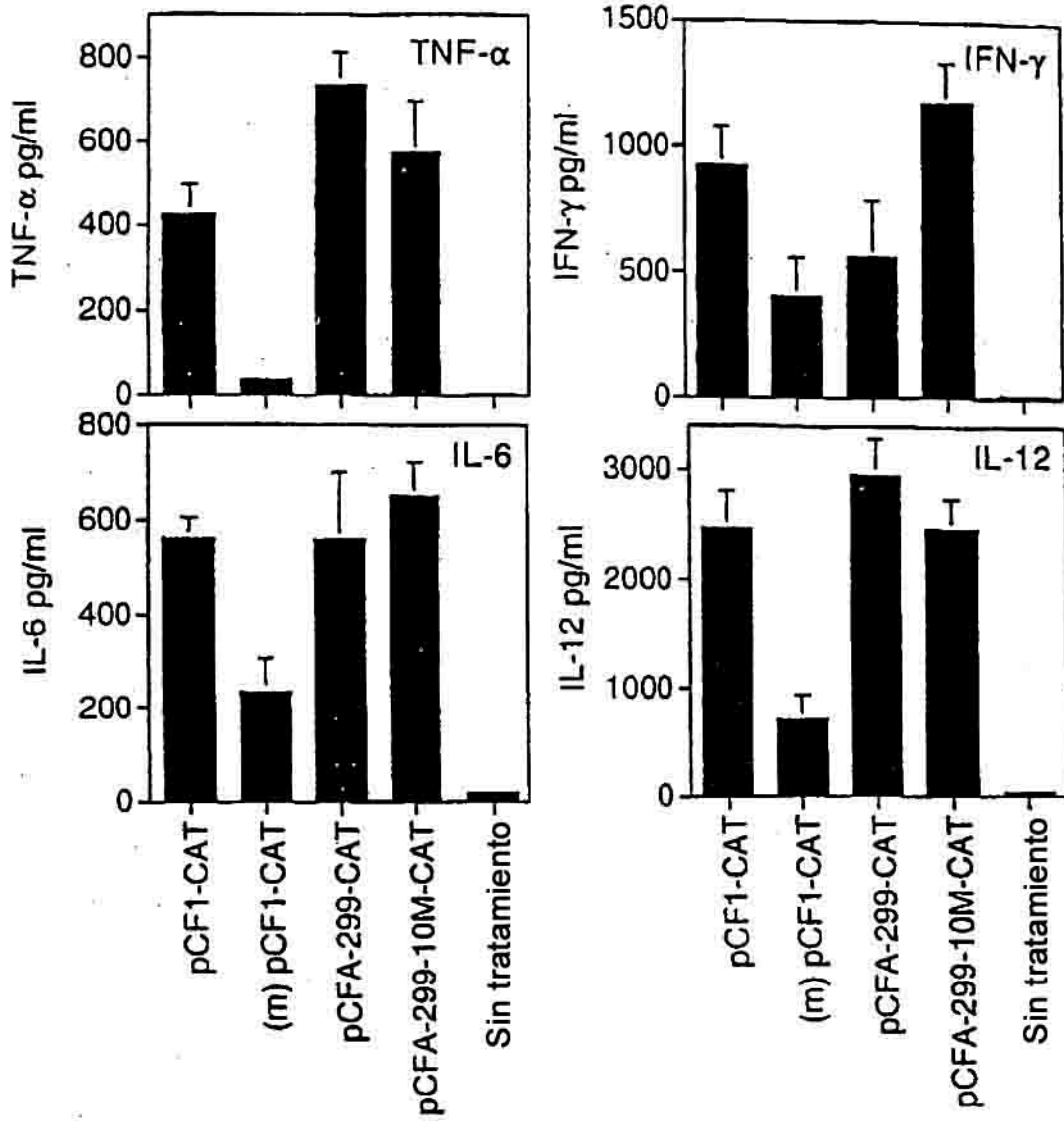


FIGURA 8

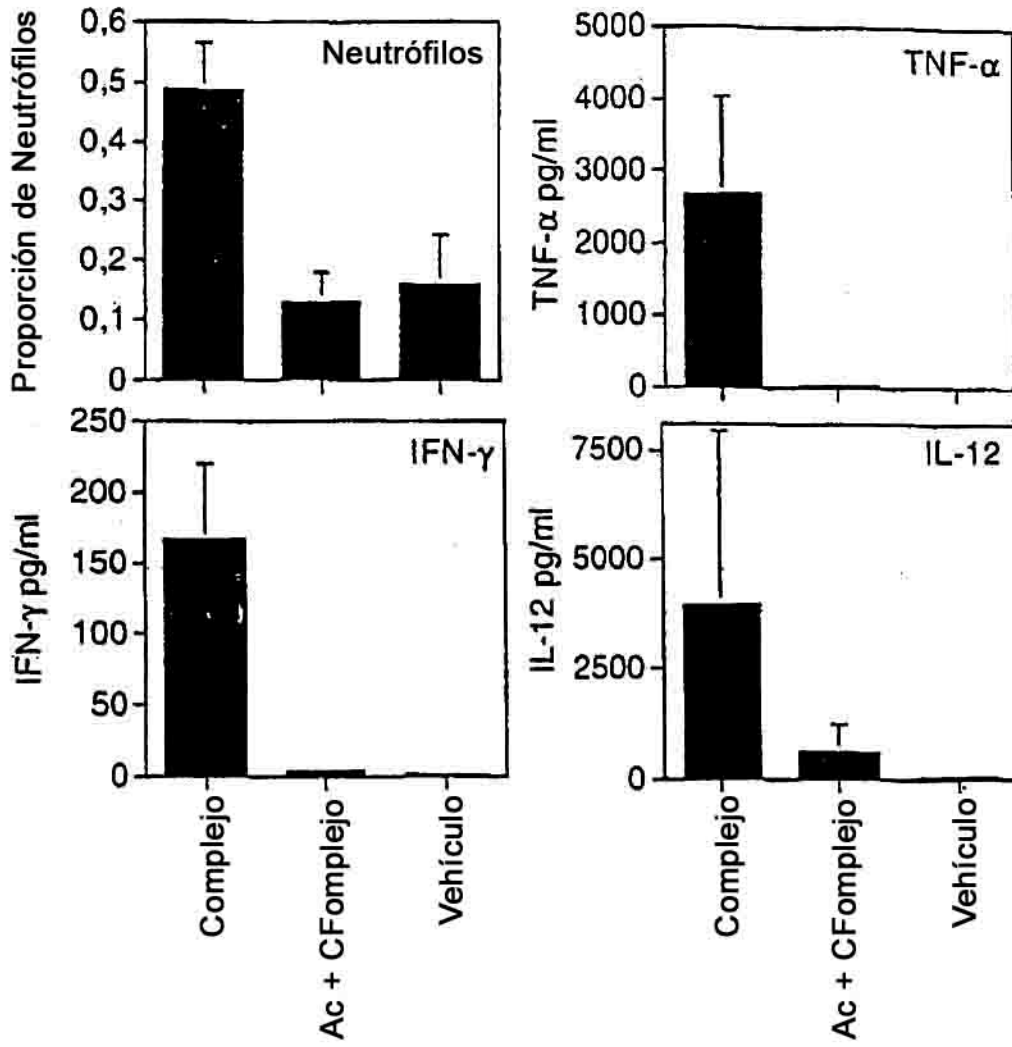


FIGURA 9

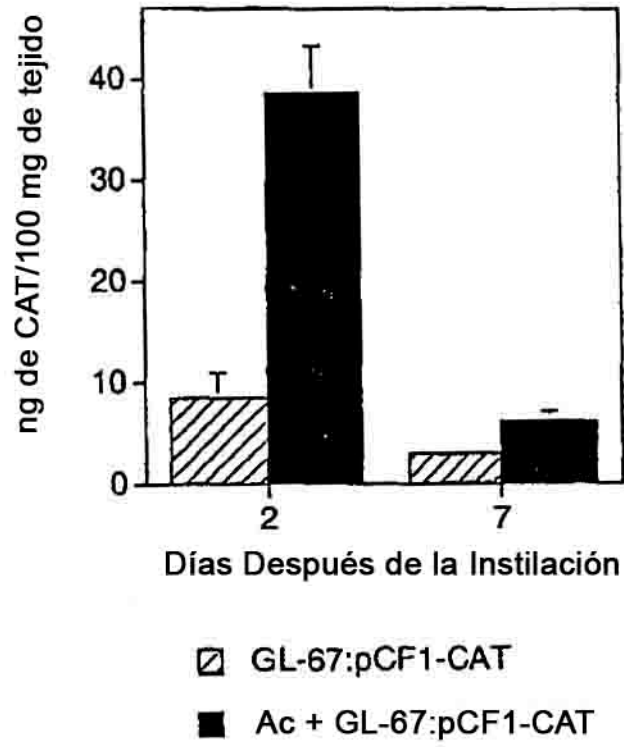


FIGURA 10

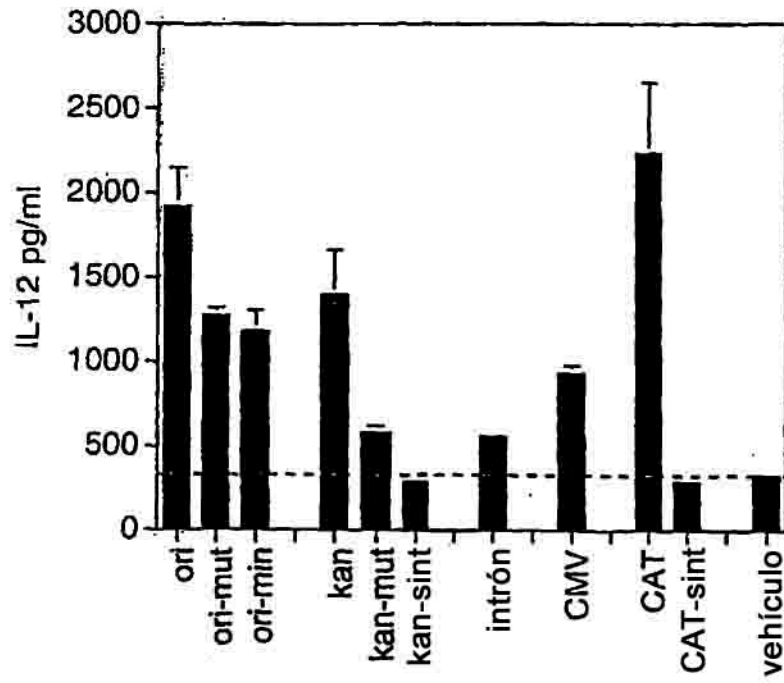


FIGURA 11

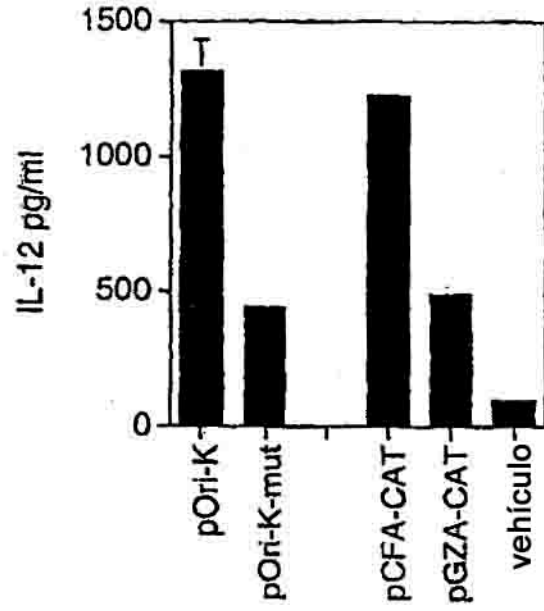


FIGURA 12

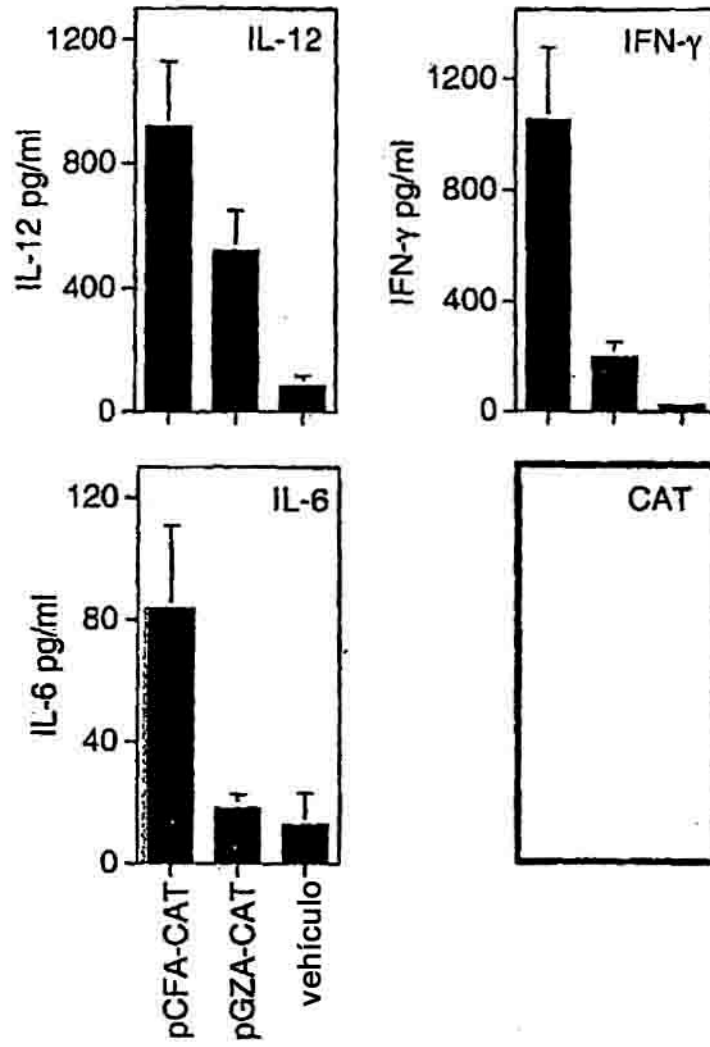


FIGURA 13

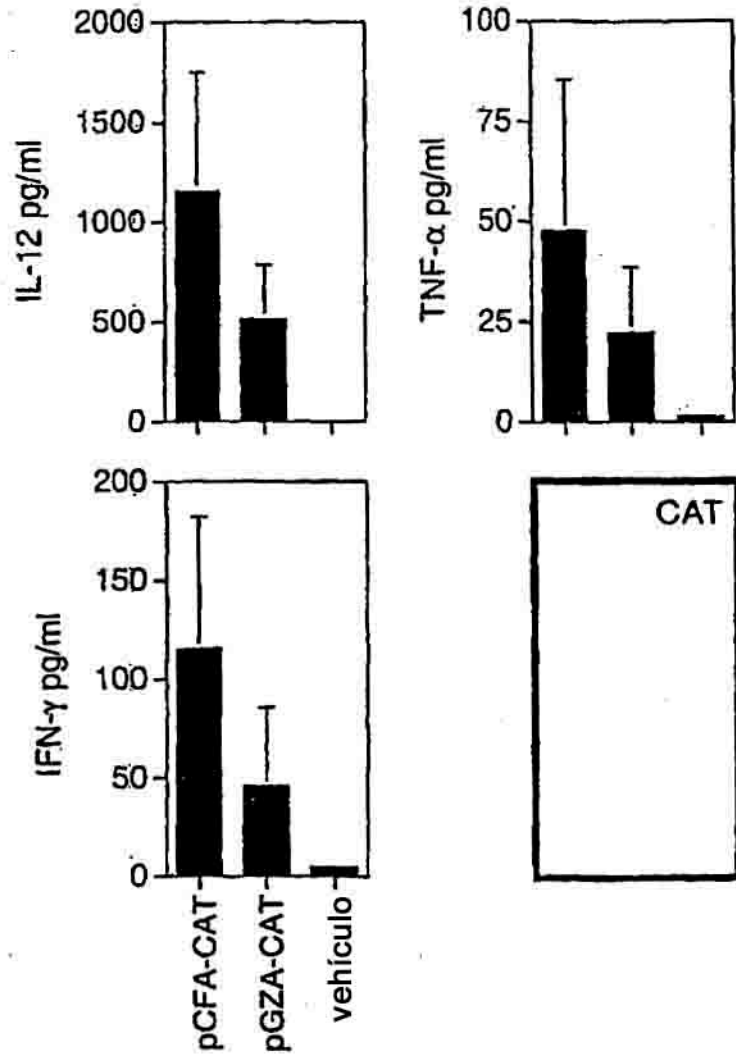


FIGURA 14

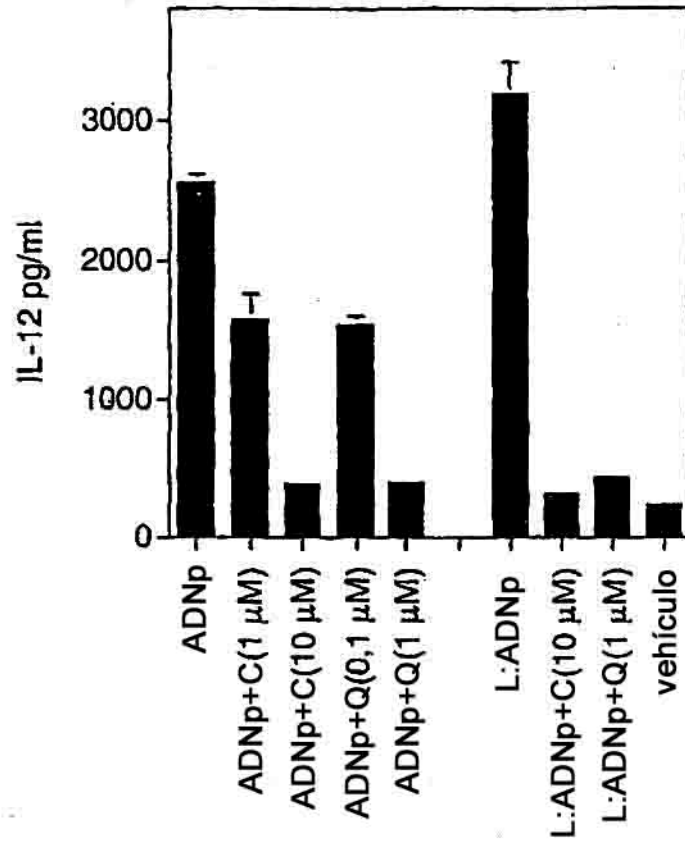


FIGURA 15

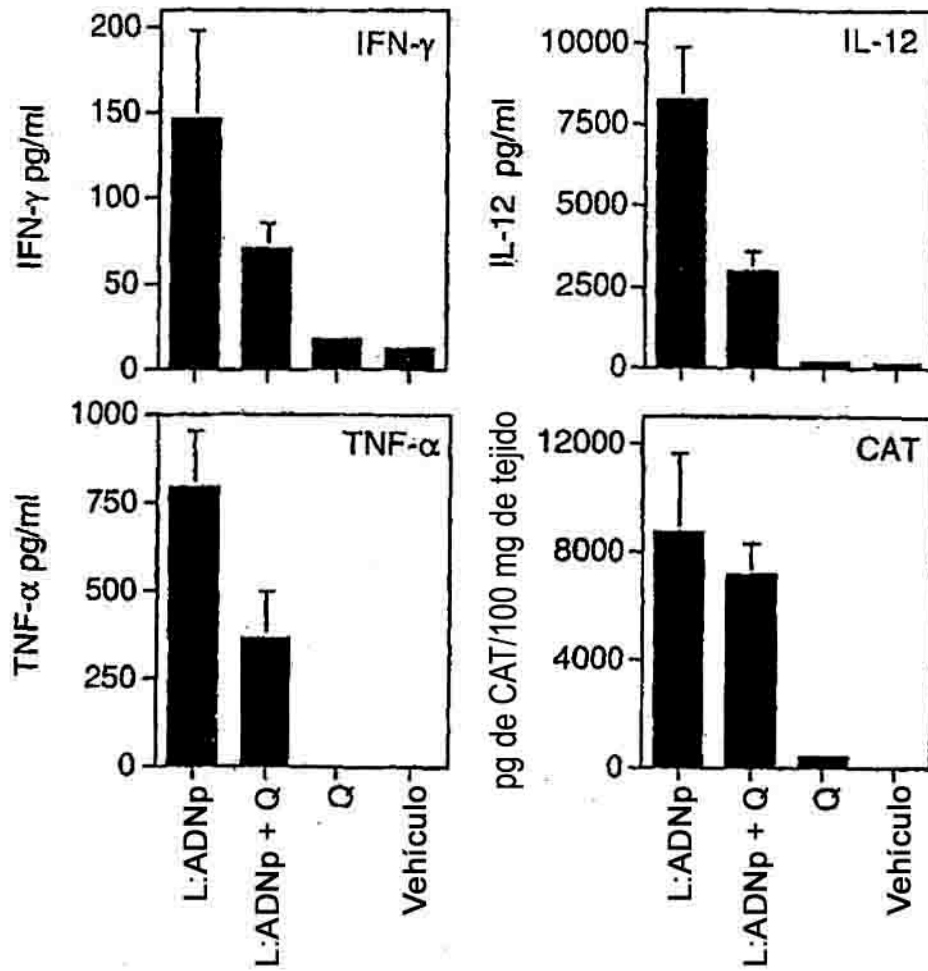


FIGURA 16