

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 644**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2009 E 09753885 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2306993**

54 Título: **Nanopartículas de protamina/ARN para inmunoestimulación**

30 Prioridad:

**26.05.2008 EP 08009581**

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

**24.06.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)  
Protektorat Forschung Rämistrasse 71  
8006 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**PASCOLO, STEVE y  
KNUTH, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 470 644 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

Nanopartículas de protamina/ARN para inmunestimulación

5 **[0001]** La presente invención se refiere a nanopartículas de Protamina/ARN inmunostimulantes de un tamaño promedio definido, a una composición farmacéutica que contiene dichas nanopartículas y a un procedimiento de producción de las mismas. Las nanopartículas de la presente invención son especialmente útiles como medicamento inmunostimulante con un patrón preciso de inmunostimulación diferente de la técnica previa.

10 **Antecedentes de la invención**

**[0002]** Además de su función principal como transportadores de la información genética, se ha reconocido recientemente que determinadas moléculas de ácido nucleico son patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y se han usado como agentes para la estimulación de la respuesta inmune innata del huésped. Entre estas moléculas de ácido nucleico inmunostimulantes se incluyen desoxinucleótidos (ADN) que comprenden el motivo CpG no metilado (oligodesoxinucleótido CpG: ODN CpG) y ribonucleótidos (ARN) en forma de ARN bicatenario (ARNbc) y moléculas de ARN monocatenario (ARNmc) protegidas o modificadas químicamente de otra manera. Se sabe que las diferentes familias de PAMP de ácidos nucleicos (es decir, ODN CpG, ARNbc y ARNmc estabilizados) activan diferentes receptores similares a Toll (TLR) expresados por poblaciones celulares no solapantes (Jarrossay y col., 2001, Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. Eur. J. Immunol. 31: 3388-3393) y dan lugar a diferentes tipos de respuestas inmunes innatas caracterizadas por la secreción de un grupo específico de citoquinas.

25 **[0003]** Sin embargo, el ADN como adyuvante o como vehículo de administración de vacunas puede originar problemas de seguridad, por ejemplo, debido al riesgo de integración del ADN dentro del genoma celular, lo que causa mutaciones que desregulan la expresión génica (inducen o impiden una expresión génica). Dichas mutaciones también pueden ser transformantes, representando un grave riesgo de causar cáncer en el paciente.

30 **[0004]** Además, el ODN CpG, la versión sintética del ADN de bacterias para la inmunostimulación, o el ADN bacteriano puede desencadenar varios efectos secundarios debido a la sobreestimulación del sistema inmunitario (véase p. ej., Heikenwalder y col. [2004] Nat. Med. 10:187-192) lo que se sabe produce esplenomegalia en ratones (Montheith y col., Anticancer Drug Res. 1997, 12 (5): 421-432). Asimismo, las moléculas de ADN se degradan con relativa lentitud en el torrente sanguíneo y, como tal, pueden inducir la formación de autoanticuerpos (Gilkenson y col., J. Clin. Invest. 1995, 95: 1398-1402).

35 **[0005]** Recientemente se ha demostrado que el ARN estabilizado en forma de ARN mensajero (ARN) condensado sobre el péptido catiónico natural protamina o los oligorribonucleótidos (ORN) sintéticos con una estructura molecular de fosforotioato son señales de peligro para las células presentadoras de antígeno (APC) de ratón (véase Scheel y col., Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. Eur. J. Immunol. 2004. 34: 537-547, documento EP1806139 B1 para los oligonucleótidos de ARN químicamente modificados y el documento Rep1818409 B1 para el ARNm protegido con protamina).

45 **[0006]** En otras publicaciones, en lugar de protamina se usan lípidos catiónicos o polietilenimina (PEI) para proteger y transfectar el ARN. En Heil y col, Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. Science 2004. 303: 1526-1529 y en el documento WO 03/086280 A2 se identificaron el TLR-7 murino y el TLR-8 humano como receptores de ORN fosforotioato administrados mediante liposomas. Específicamente, se ha descrito que los oligonucleótidos de ARNmc ricos en guanósina (G) y en uridina (U) derivados de VIH-1 estimulan la secreción de interferón- $\alpha$  en células dendríticas y macrófagos, por lo que se reconoce que los oligonucleótidos de ARNmc (ORN) ricos en GU son una clase de ligandos fisiológicos de TLR-7 y TLR-8. Diebold y col. (2004, Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science 303:1529-1531) describen que los ARNmc protegidos con PEI también inducen la producción dependiente de TLR7 de citoquinas inflamatorias y postularon que las células del sistema inmunitario innato son sensibles a los ARNmc endosómicos para detectar la infección por virus de ARN. Los mismos autores además demostraron que los oligonucleótidos de ARN administrados con PEI estimulan de forma preliminar a través de sus residuos U. Por otro lado, Hornung y col. (Nat. Med. 2005 mar; 11 (3).263-70 y documento EP 1 764 107 A1) probaron muchos oligonucleótidos de ARN administrados mediante liposomas catiónicos y pudieron desarrollar a partir de estos resultados un algoritmo con el que se puede predecir la capacidad inmunostimulante de las secuencias de ARN. Lund y col., Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004. 101: 5598-5603, mostraron que los genomas de ARN monocatenario de virus (virus de la gripe, virus de la estomatitis vesicular) son reconocidos por TLR-7 en ratones. Finalmente, Kariko y col., mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. J. Biol. Chem. 2004. 279: 12542-12550, demostraron que el ARNm estabilizado mediante encapsulación en liposomas o mediante modificaciones 2' fluoro activa las células dendríticas (CD) a través de TLR-3. Debido a que el ARNmc estabilizado activa la inmunidad innata, puede usarse como adyuvante de vacunas como se describe en Scheel y col., para oligonucleótidos de ARN fosforotioato desnudo (Scheel, European Journal of Immunology, 2004) y Bourquin (Bourquin, Blood, 1 de abril de 2007, vol. 109, N.º 7, pág. 2953-2960) para los oligonucleótidos de ARN

encapsulados en liposomas.

**[0007]** Diebold y col., (Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single stranded RNA. Science 2004; 303: 1529-1531) mostraron que las moléculas de ARN protegidas por PEI estimulan a las CD plasmocitoides (CDp) de ratón a través de TLR-7.

**[0008]** Más recientemente, Diebold y col. (2006) (Eur. J. Immunol. 36:3256-3267) indicaron que la uridina y la ribosa son ambas necesarias y suficientes para la estimulación de TLR7 y que los ARNmc actúan como agonistas de TLR7 de forma independiente de la secuencia siempre que contengan varias uridinas próximas. Diebold y col. (2006) además mostraron que, cuando se administra en endosomas, el ARN vírico y autorreplicativo desencadenaba con similar eficacia la respuesta inmune innata mediada por TLR7, lo que apoyaba adicionalmente la noción de que la discriminación entre los ligandos de ARN autorreplicativo y vírico se basa en la accesibilidad endosómica en lugar de una secuencia de ARN. También se ha descrito recientemente que los ARNm transcritos a partir de los genes de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* o pp65 del CMV, cuando están formando complejos con la protamina, pueden inducir inmunidad antitumoral terapéutica en los ratones portador de tumores (Scheel y col., 2006, Eur. J. Immunol. 36:2807-2816).

**[0009]** No obstante, ninguna de las composiciones inmunoestimulantes a base de ARN anteriores es óptima para aplicaciones clínicas debido a que requieren formulaciones con liposomas catiónicos que son inestables *in vitro* y tóxicos o con PEI que es tóxico (revisado por Hunter AC. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. Adv Drug Deliv Rev. 2006 Dic 1;58(14):1523-31) o con protamina que proporciona agregados grandes heterogéneos (Scheel y col. (2005), Eur. J. Immunol. 35: 1557-1566, véase la fig. 1 del mismo) que precipitan rápidamente y no son fáciles de coger con una jeringa ni de inyectar (sedimentan en el tubo y quedan atrapadas en la jeringa o en la aguja). Además, la mayoría de estas formulaciones están hechas con oligonucleótidos de ARN modificados que son extraños para el organismo y pueden desencadenar una respuesta inmune contra la vacuna, es decir, una respuesta de anticuerpos específicas para las modificaciones químicas del oligonucleótido. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de una formulación inmunoestimulante clínicamente aceptable basada en ARN sin modificar como principio farmacéutico activo. Es objeto de la presente invención proporcionar procedimientos y composiciones para superar las anteriores deficiencias de la técnica previa. Puesto que se basa en nanopartículas homogéneas bien definidas, la presente «composición de nanopartículas de ARN-protamina inmunoestimulantes» es adecuada para la formulación farmacéutica y para cualquier tipo de inyección, incluso por vía intravenosa.

**[0010]** Por otro lado, es sabido que los inmunoestimulantes a base de ácidos nucleicos aumentan, además del nivel de IFN-alfa deseable que es una de las escasas citoquinas utilizadas como fármacos (tratamiento de infección por el virus de la hepatitis C), el nivel de citoquinas inflamatorias, como el TNF-alfa (véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 6.429.199) que se sabe es tóxico y limitante de dosis.

**[0011]** El TNF-alfa es una citoquina liberada principalmente por células del sistema inmunitario en respuesta a determinados inmunoestimulantes. Cuando se administra a animales o a humanos, produce inflamación, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación, caquexia y respuestas de fase aguda similares a las observadas durante infecciones agudas, enfermedades inflamatorias y estados de shock. Una producción de TNF-alfa excesiva o no regulada se ha implicado en varias enfermedades. Entre estas se incluyen la endotoxemia y/o el síndrome de choque tóxico (Tracey, y col., [1990] Nature 330, 662-664 [1987] y Hinshaw, y col., Circ. Shock 30, 279-292), artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, caquexia (Dezube, y col., [1990] Lancet, 335 [8690], 662) y lupus. La infusión sistémica de TNF $\alpha$  recombinante producía cambios observados normalmente en el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (Ferrai-Baliviera, y col., [1989] Arch. Surg. 124[12], 1400-1405). El TNF-alfa tiene actividades proinflamatorias que junto con su producción inicial (durante la fase inicial de un episodio inflamatorio) lo convierten en un posible mediador de las lesiones tisulares en varios trastornos importantes incluidos, pero sin limitaciones, infarto de miocardio, ictus y choque circulatorio.

**[0012]** También se ha notificado que el TNF-alfa es un potente activador de la replicación de retrovirus incluyendo la activación del VIH-1 (Duh, y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 86, 5974-5978 [1989]; Poll, y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 87, 782-785 [1990]; Monto, y col., Blood 79, 2670 [1990]; Clouse, y col., J. Immunol. 142, 431-438 [1989]; Poll, y col., AIDS Res. Hum. Retrovirus, 191-197 [1992]).

**[0013]** Scheel y col. (2005; véase la figura 3A) publicaron que agregados grandes obtenidos mezclando protamina y ARN en las condiciones previas de la técnica (es decir, en presencia de sales) inducían una fuerte producción de TNF-alfa por células inmunes humanas.

**[0014]** En los documentos WO2005016376, WO03051401, WO2007121347, Weyermann y col. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 59, 3. 2005. 431-438, Hoerr y col. European Journal of Immunology. 30, 1. 2000. 1-7 y Li Shyh-Dar y col. Molecular Pharmaceutics. 3, 5. 2006. 579-588 se describen composiciones de ARN en las que pueden incluirse la protamina y sus correspondientes usos.

**[0015]** A la vista de las deficiencias de las estrategias de la técnica previa sería altamente deseable tener una composición inmunoestimulante que pueda adaptarse al cliente para inducir la producción de IFN-alfa/TNF-alfa de forma controlada, en especial para inducir la producción de IFN-alfa incluso sin un fuerte aumento del nivel de TNF-alfa.

5 **[0016]** La solución del problema técnico anterior se proporciona mediante las realizaciones de la presente invención como se define en las reivindicaciones.

**Resumen de la invención**

10 **[0017]** En particular, según un primer aspecto la presente invención proporciona nanopartículas de un tamaño promedio de 50 a 450 nm que comprenden protamina y ARN. Las nanopartículas de la presente invención son especialmente de uso como medicamento inmunoestimulante.

15 **[0018]** Por tanto, según un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dichos nanopartículas de protamina y ARN en combinación con un excipiente, vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 **[0019]** Según un tercer aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento para la producción de las nanopartículas según la reivindicación 12, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una solución acuosa de ARN

25 1) a 1 mg/ml o más usando una solución de electrolitos de 0 a 75 mM; o

2) a menos de 1 mg/ml usando una solución de electrolitos de 0 a 225 mM;

b) proporcionar una solución acuosa de protamina

30 1) a 1 mg/ml o más usando una solución de electrolitos de 0 a 75 mM; o

2) a menos de 1 mg/ml usando una solución de electrolitos de 0 a 225 mM; y

35 c) combinar las soluciones obtenidas en los pasos a1) y b1) o mezclando las soluciones obtenidos en a2) y b2).

**[0020]** Preferiblemente, los pasos anteriores (a1 y/o a2) se realizan mediante resuspensión de una cantidad apropiada de ARN liofilizado a1) en una solución acuosa que contiene electrolitos de 0 a 75 mM o a2) en una solución acuosa que contenía electrolitos de 0 a 225 mM.

40 **[0021]** Preferiblemente, los pasos b1) y/o b2) anteriores se llevan a cabo diluyendo una solución stock isotónica acuosa de protamina, que preferiblemente contiene de 1000 («protamina 1000») a 5000 («protamina 5000») unidades neutralizantes de heparina por ml con una solución que contenía 1) sales de 0 a 75 mM o 2) sales de 0 a 225 mM. Por ejemplo, las soluciones stock de protamina 1000 y 5000 están disponibles en Valeant Pharmaceuticals International, Aliso Viejo, CA, EE. UU., con las marcas comerciales Valeant® 1000 y 5000, respectivamente.

45 **[0022]** Más preferiblemente, el procedimiento según la presente invención comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar una solución acuosa de ARN a menos de 2 mg/ml en agua pura;

50 b) proporcionar una solución acuosa de protamina a menos de 2 mg/ml diluyendo una solución stock isotónica acuoso que contiene 5000 unidades neutralizantes de heparina de protamina por ml con agua pura; y

c) combinar las soluciones obtenidas en los pasos a) y b).

55 **[0023]** En este contexto, se apreciará que, una vez que se formen las nanopartículas de la presente invención, no es necesario seguir manteniendo las condiciones específica de sal (o electrolito)/concentración para el ARN y la protamina según el procedimiento de la presente invención. Por tanto, las nanopartículas pueden procesarse adicionalmente, por ejemplo, recuperándolas finalmente por centrifugación y diluyéndolas, disolviéndolas o dispersándolas en un medio, preferiblemente un excipiente, vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, en especial, en un medio isotónico como una solución de Ringer o solución lactato de Ringer.

60 **[0024]** Las nanopartículas según la invención son especialmente útiles como inmunomoduladores, preferiblemente como medicamento inmunoestimulante. Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para estimular el sistema inmunitario de un paciente mamífero que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención.

65

5 [0025] La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que pueden proporcionarse composiciones de protamina y ARN como nanopartículas de tamaño definido diluyendo el ARN (preferiblemente oligonucleótidos o ARNm) y la protamina en agua o soluciones acuosas con baja fuerza iónica (preferiblemente menos de aproximadamente 75 mM de sales, más preferiblemente menos de 25 mM de sales) y mezclando las dos soluciones (véanse las figs. 1 a 3 y la tabla 1). Este resultado sorprendente es contrario a la técnica previa en la que la presencia de concentraciones más altas de electrolitos en el ARN y/o la protamina daban lugar a la producción de partículas y agregados grandes.

10 [0026] Según la presente invención, el término «mM de sales» significa la concentración en  $10^{-3}$  moles por litro de la suma de todos los electrolitos (incluyendo sales inorgánicas como NaCl, KCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  y sales como Tris-HCl, EDTA, Hepes, etc.) en las soluciones utilizadas para resuspender o diluir una solución stock de ARN y en las soluciones utilizadas para diluir una solución stock de protamina (como Protamina 1000 o 5000) antes de mezclar los componentes (es decir, a1) y b1) o a2) y b2) como se definen anteriormente).

15 [0027] En el contexto de la presente invención, los términos «sales» y «electrolitos» se usan indistintamente y significan un compuesto que está al menos parcialmente disociado en sus respectivos contraiones en agua.

20 [0028] Según una realización preferida de la presente invención, las nanopartículas de protamina y ARN pueden prepararse diluyendo tanto el ARN como la protamina (preferiblemente a partir de una solución stock como protamina 5000) a menos de 2 mg/ml, preferiblemente 1 mg/ml en agua pura, para tener un tamaño medio inferior a 500 nm, en particular, de 50 a 450 nm. Estas nanopartículas pueden usarse para inmunoestimulación (o para la preparación de un medicamento para inmunoestimulación) induciendo fuertemente la expresión de IFN-alfa y en menor grado la de TNF-alfa (véanse las figs. 4 y 5). Adicionalmente, estas partículas de pequeño tamaño tienen el beneficio adicional de que pueden ser inyectables, por ejemplo, mediante inyección venosa (cf. fig. 6).

25 [0029] Según una realización preferida adicional de la invención una relación de masa de protamina con respecto a ARN de 1 a 1 o mayor (es decir, más protamina que ARN) tiene como resultado una inmunoestimulación óptima (fig. 7) mientras que una relación de 1:4 (es decir, cuatro veces menos protamina que ARN) o inferior tiene como resultado la expresión del ARNm (fig. 8).

30 [0030] Según la presente invención, la presencia de una doble U o del doblete UG en el ARN no es necesario para que los complejos protamina-ARN estimulen la producción de IFN-alfa por las PBMC; cf. fig. 9. Sin embargo, normalmente se prefiere un oligonucleótido que contenga al menos un resto U (véase la fig. 10). Los oligorribonucleótidos preferidos de la presente invención contienen de 6 a 100 nucleótidos. Por ejemplo, los oligonucleótidos de 10 residuos formando complejos con protamina muestran capacidad de estimulación de las células inmunes. Se ha demostrado que la estimulación de las PBMC humanas es óptima con oligonucleótidos de ARN de 16 o más restos (véase la fig. 11).

35 [0031] Por consiguiente, en una realización, i) la protamina formulada como una solución de 1 mg/ml gracias a la dilución con agua pura de una solución farmacéutica isotónica de al menos 10 mg/ml (protamina 5000) y ii) el ARN formulado como una solución de 1 mg/ml mediante dilución de un sedimento de ARN liofilizado en agua pura, al mezclarse, forman nanopartículas homogéneas de aproximadamente 250 nm de diámetro medio.

40 [0032] Los beneficios de la presente invención son independientes de la longitud del ARN (esto funciona igualmente bien con oligorribonucleótidos de un mínimo de aproximadamente 6 bases y con el ARNm largo transcrito *in vitro*). Cuando los electrolitos están presentes en las soluciones utilizadas para diluir el ARN o la protamina antes de la mezcla (p. ej., dilución de protamina y ARN a 1 mg/ml usando soluciones isotónicas como la solución lactato de Ringer), las partículas obtenidas son de tamaño más grande (aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ ) y heterogéneo, como se mostró anteriormente (Scheel y col., 2005, fig. 1).

45 [0033] Se encontró sorprendentemente que las partículas más pequeñas obtenidas según el procedimiento de la invención (preferiblemente mezclando protamina 5000 diluida 14 veces en agua pura y ARN a 1 mg/ml en agua pura) inducía fuertemente la producción de IFN-alfa, pero comparativamente solo inducía débilmente la producción de TNF-alfa, mientras que las partículas más grandes inducen fuertemente ambas citoquinas (fig. 6B). En realizaciones preferidas adicionales, el ARN comprende más de 10 nucleótidos y contiene uno o más restos U. Sin embargo, no son necesarios restos doble U. Los restos G también pueden inducir determinado nivel de inmunoestimulación. Sin embargo, al contrario que las notificaciones previas (véanse los documentos WO-A-2007/031322, WO-A-2008/014979) no son necesarios los pares UG o GU. No es necesario que el ARN de la presente invención tenga las características de un ARN mensajero (más de 100 restos, codón de inicio, codón de parada, cola poli A) como se sugirió previamente en la técnica previa (Scheel, 2004, Scheel, 2005 y Scheel, 2006).

**Breve descripción de los dibujos**

**[0034]** Otros objetos, ventajas y características novedosas de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada cuando se considere en conjunto con los dibujos acompañantes.

**[0035]** En la figura 1 se muestran ejemplos de los datos sin procesar obtenidos a partir de los experimentos de determinación del tamaño para diferentes composiciones de protamina/ARN. El oligonucleótido de ARN rico en U 18 mer (ARN18RU: 5' AGUGUUAUUCUUGUAUGG 3', [SEC ID N.º 1]; solución stock a 5 mg/ml en agua) o ARN mensajero (ARNm, aproximadamente 900 bases, solución stock a 5 mg/ml en agua) y protamina VALEANT® 5000 (solución stock a 14 mg/ml en una solución de inyección isotónica) se formularon a 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml o 0,25 mg/ml en agua pura o en agua más NaCl 25 mM o en agua más NaCl 75 mM o en agua más NaCl 225 mM o solución lactato de Ringer. Se mezclaron cantidades iguales de ARN y protamina (5 microlitros de cada solución). Un minuto después (tras la formación de las partículas) se añadió 1 ml de solución lactato de Ringer y la solución completa se transfirió a una cubeta transparente. La cubeta se colocó en un Malvern Zetasizer y se determinó el tamaño de las partículas. Se demuestra que el ARN diluido a 1 mg/ml en agua mezclado con protamina 5000 diluida a 1 mg/ml en agua, tras la mezcla generan nanopartículas con un tamaño medio (diámetro) de menos de 500 nm (ARN18RU más protamina [dilución en agua]: 267 nm; y ARNm más protamina [dilución en agua]: 254 nm). Por el contrario, cuando tanto el ARN como la protamina se diluyen a 1 mg/ml en una solución de NaCl 225 mM, los complejos formados son más grandes y heterogéneos (ARN18RU más protamina, ambos diluidos con una solución acuosa de NaCl 225 mM: 1288 nm). En el caso de moléculas largas de ARN (p. ej., ARNm), la presencia de concentraciones más altas de electrolitos (p. ej., dilución de ARN y protamina a 1 mg/l con solución lactato de Ringer) induce a la formación de agregados grandes que no pueden ser detectados mediante el Zetasizer (el tamaño de las partículas está fuera del intervalo detectable) aunque puede visualizarse con un microscopio convencional (véase Scheel y col. 2005; fig. 1).

**[0036]** En la tabla 1 a continuación se resumen los resultados del tamaño medio de partícula (diámetro) usando ARN18RU y protamina 5000 ambos diluidos a 2 mg/ml o 1 mg/ml o 0,5 mg/ml o 0,25 mg/ml o 0,125 mg/ml) en agua pura o NaCl 25 mM o NaCl 75 mM o NaCl 225 mM o solución lactato de Ringer (Ringer). Se muestra que los electrolitos contenidos en las soluciones de dilución o procedentes de una dilución baja de protamina 5000 (cuando se usa a 2 mg/ml, por tanto, diluida solo 7 veces en agua) dictan la formación de partículas más grandes (más de 450 nm de diámetro medio) que cuando tanto el ARN como la protamina 5000 se diluyen en agua a 1 mg/ml. La dilución adicional tanto del ARN como de la protamina a menos de 1 mg/ml es una forma de reducir los tamaños de partícula incluso cuando se usa, por ejemplo, NaCl a 25 mM o 75 mM o 225 mM o solución de lactato de Ringer

**Tabla 1:**

Concentración de ARN y protamina [mg/ml]	2,0	1,0	0,5	0,25	0,125
	Tamaño de partícula [nm]				
Agua	575	267	274	263	
Agua más NaCl 25 mM		492		277	
Agua más NaCl 75 mM		1045		512	
Agua más NaCl 225 mM		1288		869	
Ringer	1363	1432	926	571	560

**[0037]** En la figura 2 se muestran los datos sin procesar de un experimento de determinación del tamaño de partícula donde el ARN18RU y la protamina se diluyen a 1 mg/ml usando agua (dilución en agua: 268 nm) o en NaCl 25 mM (dilución en NaCl 25 mM: 320 nm) o en solución lactato de Ringer (dilución en Ringer: 1808 nm). De forma similar a los resultados mostrados en la figura 1 y en la tabla 1, la presencia de concentraciones de sales crecientes daba lugar a la producción de partículas de protamina-ARN de tamaños medios crecientes.

**[0038]** En la figura 3 se resumen los resultados de un experimento de determinación del tamaño de partícula adicional en el que el ARN18RU y la protamina 5000 se diluyen a 1 mg/ml con agua o con NaCl 10 mM o NaCl 20 mM o NaCl 25 mM o NaCl 30 mM o NaCl 40 mM o NaCl 50 mM o solución lactato de Ringer. Se realizaron al menos dos formulaciones y mediciones para cada condición.

**[0039]** En la figura 4 se muestra la capacidad de inmunoestimulación de las partículas formadas usando las condiciones de la tabla 1. Se prepararon PBMC procedentes de humanos sanos usando un gradiente de separación de Ficoll®. A continuación se lavaron con PBS y se resuspendieron a 5 millones por ml en RPMI con suero de

ternera fetal al 10% más penicilina y estreptomina. Se añadieron 200 microlitos (1 millón de células) a las partículas formadas en el pocillo de una placa de 96 pocillos mezclando 2 microgramos de ARN18RU con 2 microgramos de protamina 5000 ambos a la concentración indicada en la solución indicada. Los controles positivos son PBMC incubadas de forma similar con el oligonucleótido de ADN de clase A CpG fosforotioato, ARN bicatenario (ARNbc) ambos a una concentración final de 10 microgramos/ml o el agonista de TLR7/8 R848 a 2 microgramos/ml final. Estas preparaciones se incubaron durante 24 horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. A continuación, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y congelaron a -20°C. Los contenidos de IFN-alfa y TNF-alfa en estos sobrenadantes se evaluaron usando 20 microlitos de los sobrenadantes descongelados y los kits de ELISA de Bender (IFN-alfa) y Abazyme (TNF-alfa). Los resultados se presentan en pg/ml en el sobrenadante de cultivos celulares. Estos demuestran que solo las partículas generadas con ARN18RU y protamina 5000 ambos diluidos en agua a 1 mg/ml o menos (por debajo de 0,25 mg/ml) estimulan una fuerte producción de IFN-alfa y una producción relativamente débil de TNF-alfa. Cuanto mayor es la dilución, mayor es la cantidad de IFN-alfa que se produce (en comparación con los resultados utilizando 1 mg/ml y 0,25 mg/ml). Se obtienen los mismos resultados cuando en lugar de ARN18RU a 1 mg/ml se utiliza otro ARN, incluso ARNm en agua a 1 mg/ml (figuras 5C y 5D). Cuando hay sales presentes en las soluciones de dilución de ARN o protamina, aumenta la producción de TNF-alfa: se obtienen solo menos de 600 pg/ml cuando se usa agua para la dilución de la protamina y el ARN mientras que se obtienen más de 40 000 pg/ml cuando se usa NaCl 25 mM para la dilución.

**[0040]** Es sabido que los oligonucleótidos de clase A CpG inducen la producción de IFN-alfa pero no de TNF-alfa. El agonista de TLR7/8 R848 induce una alta producción de IFN-alfa y TNF-alfa. El ARN bicatenario que estimula a las células inmunes a través de TLR3 induce una débil producción de IFN-alfa y TNF-alfa por las PBMC humanas.

**[0041]** Figuras 5A y B: Se realizó un experimento similar independiente al mostrado en la figura 4 usando PBMC recién obtenidas de tres donantes sanos. El ARN18RU y la protamina 5000 se diluyeron hasta 1 mg/ml con agua o con agua que contenía NaCl 25 mM o con solución lactato de Ringer. Como en la figura 4, se cultivaron conjuntamente 200 microlitos de PBMC recién obtenidas a 5 millones de células/ml con 4 microgramos de partículas (2 microgramos de ARN mezclados con 2 microgramos de protamina) durante 24 horas a 37°C. A continuación, se midieron el IFN-alfa y el TNF-alfa en el sobrenadante del cultivo usando kits de ELISA. Independientemente del donante, cuando se diluyen la protamina 5000 y el ARN con agua pura hasta 1 mg/ml, forman partículas que inducen altos niveles de IFN-alfa (figura 5A) pero bajos niveles de TNF-alfa (fig. 5B). Cuando la protamina y el ARN se diluyen con NaCl 25 mM, en este experimento se inducen altos niveles de IFN-alfa y TNF-alfa. Este es el caso en la mayoría de los experimentos. Con las partículas más grandes producidas por la dilución de protamina 5000 y ARN en solución lactato de Ringer, se detecta la producción de altos niveles de TNF-alfa pero bajos niveles de IFN-alfa.

**[0042]** Figuras 5C y D: Se realizó un experimento adicional para evaluar si las nanopartículas de ARNm/protamina según la presente invención ejercían inmunoestimulación. Aproximadamente un millón de PBMC humanas a 5 millones de células por ml (200 microlitros) se cultivaron durante 24 horas «solos» o con 2 microgramos (2 microlitros) de «protamina sola» (protamina 5000 diluida a 1 mg/ml usando agua) o 2 microgramos de «ARNm NY-ESO-1» (ARNm con la secuencia que codifica la proteína NY-ESO-1 y diluido a 1 mg/ml con agua) o 2 microgramos del oligonucleótido CpG inmunoestimulante «CpG A» o con 0,5 microgramos de «R848» o con ARNm de NY-ESO-1 mezclado con protamina después de que ambos reactivos se hayan diluido a 1 mg/ml con agua (ARNm de NY-ESO-1 + prot en agua) o con ARNm de NY-ESO-1 mezclado con protamina después de que ambos reactivos se hayan diluido a 1 mg/ml con solución lactato de Ringer (ARNm de NY-ESO-1 + prot en Ringer). A continuación, se comprobó en el sobrenadante del cultivo celular la presencia de interferón-alfa usando un kit de ELISA de Bender. Los resultados muestran que, de forma similar a los oligonucleótidos de ARN, el ARNm mezclado con protamina induce una fuerte producción de interferón-alfa, si tanto la protamina como el ARNm se diluyen a 1 mg/ml usando agua pura (fig. 5C). La presencia de una concentración de sal isotónica en la protamina y el ARNm antes de la mezcla (cuando ambos reactivos se diluyen a 1 mg/ml en solución lactato de Ringer) genera partículas grandes que estimulan escasamente la producción de interferón-alfa por las PBMC humanas (fig. 5C). Los resultados también muestran que, de forma similar a los oligonucleótidos de ARN, el ARN mezclado con protamina induce una relativamente escasa producción de TNF-alfa, si tanto la protamina como el ARNm se diluyen a 1 mg/ml usando agua pura (fig. 5D). La presencia de una concentración de sal isotónica en la protamina y el ARNm antes de la mezcla (cuando ambos reactivos se diluyen a 1 mg/ml en solución lactato de Ringer) genera partículas grandes que estimulan fuertemente la producción de TNF-alfa por las PBMC humanas (fig. 5D).

**[0043]** Figura 6A: Se recogió médula ósea de ratones BALB/C y las células se cultivaron durante una semana en presencia de GM-CSF para obtener células dendríticas derivadas de médula ósea (CD-MO) de ratón. Las células se recogieron y distribuyeron en una placa de 96 pocillos a una concentración de aproximadamente 1 millón de células por pocillo (en 200 microlitros de medio). El ARN18RU, el ARNm que codifica NY-ESO-1 y la protamina 1000 se diluyeron a 1 mg/ml. Se añadieron solos a los cultivos celulares (como controles) o se mezclaron en diferentes proporciones (como se indica) antes de que se añadieran a los cultivos. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se recogieron los sobrenadantes y se evaluó el contenido de interleuquina 6 usando un ELISA (eBioscience). Los resultados muestran que las CD-MO de ratón se activan con nanopartículas de ARN-protamina con una proporción de protamina/ARN de 2:1 a 1:4. Este resultado es independiente de si el ARN es un oligonucleótido o un ARNm largo. Como controles positivos se usaron el agonista de TLR9 de ratón CpG 1826 (concentración final de 10

microgramos por ml) y el agonista de TLR7 R848 (concentración final de 2,5 microgramos por ml).

**[0044]** Figura 6B: Se recogió medula ósea de ratones que no expresaban TLR7 y las células se cultivaron durante una semana en presencia de GM-CSF para obtener células dendríticas derivadas de médula ósea (CD-MO) de ratón. Las células se recogieron y distribuyeron en una placa de 96 pocillos a una concentración de aproximadamente 1 millón de células por pocillo (en 200 microlitros de medio). El ARN18RU, el ARNm que codifica NY-ESO-1 y la protamina 1000 se diluyeron a 1 mg/ml. Se añadieron solos a los cultivos celulares (como controles) o se mezclaron en diferentes proporciones (como se indica) antes de que se añadieran a los cultivos. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se recogieron los sobrenadantes y se evaluó el contenido de interleuquina 6 usando un ELISA (eBioscience). Los resultados muestran que las CD-MO de ratón que no expresaban TLR7 no se activan con protamina-ARN lo que demuestra que TLR7 está implicado en el reconocimiento de las partículas de protamina-ARN por las células inmunes (independientemente de si el ARN es un oligonucleótido o una molécula de ARNm larga). Como control positivo se usó el agonista de TLR9 de ratón CpG 1932 (concentración final de 10 microgramos por ml).

**[0045]** Figura 6C: Los ratones BALB/c se inyectaron por vía intravenosa con 100 microgramos (50 microgramos de protamina mezclados con 50 microgramos de ARN) de partículas. Se inyectaron nanopartículas pequeñas (prot-ARN en agua: protamina 5000 y ARN diluido a 1 mg/ml en agua pura antes de la mezcla) o partículas más grandes (prot-ARN en Ringer: protamina 5000 y ARN diluido a 1 mg/ml con solución lactato de Ringer) y 1 hora, 3 horas o 6 horas después se recogió una gota de sangre de los ratones (tres ratones para partículas pequeñas y tres ratones para las partículas grandes, así como para los controles negativos de ARN solo y protamina sola y para el control positivo 10 microgramos de R848). El contenido de interleuquina 6 en el suero se cuantificó mediante ELISA. Se muestra que solo la inyección de nanopartículas pequeñas induce una potente estimulación del sistema inmunitario del ratón.

**[0046]** Figura 7: Se probaron las proporciones óptimas de protamina y ARN usando protamina 1000 diluida en agua y ARN diluido a 1 mg/ml en agua. Este protocolo da lugar a nanopartículas (aproximadamente 500 nm) que pueden inducir la producción tanto de IFN-alfa como de TNF-alfa. Por tanto, esto permitió a los inventores en un experimento comprobar el efecto de las proporciones de protamina-ARN sobre la producción tanto de IFN-alfa como de TNF-alfa. Como anteriormente, se cultivaron 200 microlitros de PMBC humanas recién obtenidas a 5 millones de células por ml conjuntamente con 4 microgramos de partículas (2 microgramos de protamina y 2 microgramos de ARN) durante 24 horas. Si se utiliza un ARNm largo y un oligonucleótido de 21 restos (oligo 21: 5' GUUGCAUGGGCCUCAUAUACA 3' (SEC ID N.º 2) la mejor inmunoestimulación se observa cuando la protamina está en una cantidad igual a la de ARN o cuando hay más gramos de protamina que de ARN.

**[0047]** Figura 8: Se comprobó la proporción óptima entre protamina y ARN con respecto a la expresión de ARNm (traducción tras la inyección). Cada ratón BALB/c se inyectó en la oreja izquierda con 10 microgramos de ARNm desnudo que codificaba la luciferasa. En la oreja derecha los ratones recibieron una mezcla de protamina y ARN que codificaba la luciferasa donde las proporciones entre los dos productos eran como se indica. Dieciocho horas después, los ratones recibieron luciferina por vía intraperitoneal (200 µl de solución de luciferina a 20 mg/ml) y la emisión de luz se monitorizó durante 1 minuto usando un dispositivo Xenogen IVIS. El resultado muestra que al contrario de lo que se ve para la inmunoestimulación, para la expresión del ARNm debe haber al menos 4 veces menos protamina que ARN para que se produzca la expresión del ARN que es necesaria, por ejemplo, para la vacunación a base de ARNm.

**[0048]** Figura 9. Los datos de la literatura, al igual que los resultados de los inventores (fig. 10), indican que en el ARN, los restos U y G son inmunoestimulantes. Además, se ha sugerido en la técnica previa que son importantes la doble U o los pares UG o GU. Se comprobó la capacidad inmunoestimulante de un oligonucleótido de ARN carente de restos doble U y de dobletes UG o GU (ARN18 PU por pobre en U). Este oligonucleótido de 18 restos ARN18PU (5' AUCGCUAUCGAUCUCUAG 3' [SEC ID N.º 3]) se diluyó a 1 mg/ml en agua y se mezcló con protamina 5000 diluida a 1 mg/ml en agua para generar nanopartículas pequeñas. Las partículas se añadieron a PBMC humanas recién obtenidas a 5 millones de células por ml y después de 24 horas de cultivo, el contenido de IFN-alfa en el sobrenadante se determinó mediante ELISA. Como se muestra en la figura 9, el ARN18PU mezclado con protamina podría inducir la producción de IFN-alfa de forma similar al oligonucleótido rico en U ARN18RU. Cuando el ARN y la protamina se diluyen a 1 mg/ml en solución lactato de Ringer, como de forma habitual, se desencadena una baja producción de IFN-alfa por las nanopartículas/micropartículas grandes.

**[0049]** Figura 10: El efecto de la secuencia del ARN sobre la inmunoestimulación se comprobó usando protamina 1000 diluida en agua y ARN diluido a 1 mg/ml en agua. Este protocolo da lugar a nanopartículas de aproximadamente 500 nm de media que pueden inducir la producción tanto de IFN-alfa como de TNF-alfa. Por tanto, esto permitió a los inventores comprobar en un experimento el efecto de las proporciones de protamina-ARN sobre la producción tanto de IFN-alfa como de TNF-alfa. Como anteriormente, se cultivaron 200 microlitros de PMBC humanas recién obtenidas a 5 millones por ml conjuntamente con 4 microgramos de partículas (2 microgramos de protamina y 2 microgramos de ARN) durante 24 horas. Se usaron oligonucleótidos de ARN dodecámeros de diferentes secuencias (12mer rico en A: GAAAAACAAGAA [SEC ID N.º 4]; 12mer rico en U: GUUAUUCUUGUA [SEC ID N.º 5]; 12mer rico en C: GCCACCCCGCA [SEC ID N.º 6]; 12mer rico en G: GGGAGCGGAGA (SEQ ID

NO: 7]; 12mer purina: AGAGAGAGAGAG [SEC ID N.º 8]; 12mer pirimidina: CUCUCUCUCUCU [SEC ID N.º 9]). Solo el oligonucleótido 12mer rico en U combinado con la protamina es fuertemente inmunoestimulante tanto para la producción de IFN-alfa como de TNF-alfa. El oligonucleótido rico en G, desprovisto de restos U, genera una actividad inmunoestimulante detectable cuando se mezcla con protamina. Los oligonucleótidos de pirimidina y purina también muestran una actividad inmunoestimulante detectable cuando se mezclan con protamina. Estos datos confirmaron trabajos previamente publicados en los que se demostraba que principalmente los restos U y, en menor grado, los restos G son entidades inmunoestimulantes dentro del ARN.

[0050] Figura 11: El efecto de la longitud del ARN sobre la inmunoestimulación se comprobó usando protamina 1000 diluida en agua y ARN diluido a 1 mg/ml en agua. Este protocolo da lugar a nanopartículas de aproximadamente 500 nm de media que pueden inducir la producción tanto de IFN-alfa como de TNF-alfa. Por tanto, esto permitió a los inventores comprobar en un experimento el efecto de las proporciones de protamina-ARN sobre la producción tanto de IFN-alfa como de TNF-alfa. Como anteriormente, se cultivaron 200 microlitos de PMBC humanas recién obtenidas a 5 millones de células por ml conjuntamente con 4 microgramos de partículas (2 microgramos de protamina y 2 microgramos de ARN) durante 24 horas. Se probaron oligonucleótidos de diferente longitud pero que siempre contenían restos U (21merU: AGUGUUUUCUUGUAUGGUUG [SEC ID N.º 10]; 18merU: AGUGUUUUCUUGUAUGG [SEC ID N.º 1]; 16merU: GUGUUUUCUUGUAUG [SEC ID N.º 11]; 14merU: GUUUAUCUUGUAUG [SEC ID N.º 12]; 12merU: GUUUAUCUUGUA [SEC ID N.º 5]; 10merU: GUUUAUCUUG [SEC ID N.º 13]). Los resultados muestran que aunque los oligonucleótidos de 10 restos son capaces de proporcionar inmunoestimulación cuando se mezclan con la protamina, la estimulación aumenta usando oligonucleótidos de 18 restos o más.

#### Descripción detallada de la invención

[0051] En oposición a lo descrito en la técnica previa (véase Scheel 2006, fig. 1), los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que pueden producirse nanopartículas de un tamaño medio definido mezclando protamina y ARN. Un procedimiento preferido para la preparación de estas nanopartículas es diluir la protamina y el ARN a concentraciones de menos de aproximadamente 2 mg/ml, en el mejor de los casos a 1 mg/ml o menos usando agua pura o solución salina a baja concentración (preferiblemente electrolitos a menos de 75 mM, más preferido electrolitos a menos de 25 mM) y mezclando a continuación las dos soluciones.

[0052] Adicionalmente se descubrió que, dependiendo de la concentración de sales en las soluciones de protamina y/o ARN antes de la mezcla, no solo se modifica el tamaño de las partículas resultantes sino también su capacidad inmunoestimulante: Por ejemplo, cuando se diluyen la protamina 5000 y el ARN en agua pura (o soluciones que contiene menos de 25 mM de electrolitos) a 1 mg/ml o menos (por debajo de 0,25 mg/ml) y se mezclan, las partículas resultantes de menos de 450 nm de diámetro de media como se describe anteriormente, estimulan la producción más alta de interferón-alfa por las PBMC mientras que la producción de TNF-alfa es baja.

[0053] También se descubrió que se obtienen preferiblemente nanopartículas homogéneas de tamaños ligeramente mayores (de 450 nm a 990 nm de media) diluyendo la protamina 5000 y el ARN a 1 mg/ml o menos usando soluciones con 30 a 75 mM de electrolitos. Estas partículas pueden obtenerse también en presencia de concentraciones mayores de sales (diluyendo con solución de NaCl 225 mM o soluciones isotónicas como solución lactato de Ringer), si la concentración de protamina y ARN está por debajo de 1 mg/ml antes de la mezcla.

[0054] Estas nanopartículas más grandes inducen una fuerte producción tanto de IFN-alfa como de TNF-alfa por las PBMC humanas.

[0055] Como se muestra en este documento con protamina 5000 y ARN diluidos a 1 mg/ml en solución lactato de Ringer y en el estado de la técnica (Scheel 2005), las partículas más grandes y agregadas obtenidas mezclado protamina y/o ARN en presencia de electrolitos induce una producción máxima de TNF-alfa y una baja producción de IFN-alfa.

[0056] Para generar nanopartículas altamente inmunoestimulantes, las moléculas de ARN tienen preferiblemente al menos 10 restos de longitud y la relación de masa de protamina con respecto al ARN es preferiblemente de al menos 0,5 (preferiblemente no más de dos veces más ARN que protamina). Según una realización especialmente preferida esta proporción es de 1 o superior (más preferiblemente la misma cantidad de masa de protamina y ARN o se usa más protamina que ARN).

[0057] La restricción con respecto a la proporción entre protamina y ARN es la opuesta a la del estado de la técnica: para la vacunación con ARNm, la proporción entre protamina y ARNm debe ser menor de 0,25 (al menos cuatro veces más ARN que protamina) para garantizar la expresión del ARNm (traducción). La ocupación de protamina en el ARN a las relaciones de masa necesarias para producir nanopartículas inmunoestimulantes (protamina/ARN > 0,5) probablemente previenen la traducción del ARN por los ribosomas.

[0058] En la molécula de ARN, contenida en las nanopartículas para la presente invención, no son necesarios

dobletes de U o pares GU o UG ya que, por ejemplo, el oligonucleótido pobre en U AUCGCUAUCGAUCUCUAG (SEC ID N.º 3) cuando se diluía a 1 mg/ml en agua pura y se mezclaba con protamina 5000 diluida a 1 mg/ml en agua pura genera nanopartículas que inducen una fuerte producción de IFN-alfa.

5 **[0059]** El carácter singular del aspecto en cuestión de la presente invención se muestra por el hecho de que se proporcionan nanopartículas de tamaño medio definido (diámetro), es decir, de aproximadamente 50 a aproximadamente 990 nm, preferiblemente: menos de 450 nm, en particular de 50 a 450 nm para las partículas más pequeñas y, según otras realizaciones preferidas, de 450 a 990 nm para nanopartículas más grandes que son especialmente adecuados para la producción de composiciones farmacéuticas que pueden administrarse *i.v.* y  
10 mediante otros procedimientos de administración.

**[0060]** Un beneficio adicional de la presente invención es que a través del procedimiento específico de producción de las nanopartículas es posible controlar de forma precisa la respuesta inmune: producción preferida de IFN-alfa y baja producción de TNF-alfa usando partículas pequeñas (tamaño medio de aproximadamente 50 a aproximadamente 450 nm) y producción tanto de IFN-alfa como de TNF-alfa mediante nanopartículas más grandes (tamaño medio de aproximadamente 450 a aproximadamente 990 nm). Esto es contrario a las estrategias de la técnica previa en las que se obtuvo una fuerte producción de TNF-alfa y una relativamente baja producción de IFN-alfa usando partículas/agregados grandes.

20 **[0061]** En función de la inmunostimulación inespecífica por nanopartículas de protamina-ARN de tamaño definido según la presente invención, pueden usarse para activar o potenciar la inmunidad frente a enfermedades crónicas como el cáncer o infecciones víricas persistentes.

25 **[0062]** Entre los ejemplos de cánceres tratables con las nanopartículas y la composición inmunostimulante, respectivamente, según la invención se incluyen melanoma maligno, todos los tipos de carcinoma (carcinoma de colon, células renales, vejiga, próstata, pulmonar no microcítico y microcítico, etc.), linfomas, sarcomas, blastomas, gliomas, etc.

30 **[0063]** Entre los ejemplos de enfermedades infecciosas tratables con las nanopartículas y la composición inmunostimulante, respectivamente, según la invención se incluyen enfermedades infecciosas víricas, como el SIDA (VIH), hepatitis A, B o C, herpes, herpes zóster (varicela), rubéola, fiebre amarilla, dengue etc. flavivirus, virus de la gripe, enfermedades infecciosas hemorrágicas (virus de Marburg o Ebola), enfermedades infecciosas bacterianas, como la enfermedad del legionario (*Legionella*), úlcera gástrica (*Helicobacter*), cólera (*Vibrio*), infecciones por *E. coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella* o *Streptococcus* (tétano); infecciones por patógenos protozoos como la malaria, enfermedad del sueño, leishmaniasis; toxoplasmosis, es decir, infecciones por *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Toxoplasma*; o infecciones fúngicas causadas, por ejemplo, por *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* o *Candida albicans*.

40 **[0064]** Cambiando la inmunidad, puede probarse que las nanopartículas inmunostimulantes y la composición farmacéutica, respectivamente, de la presente invención son útiles para tratar también las alergias.

**[0065]** En una realización, la presente invención proporciona nanopartículas, preferiblemente en forma de una composición inmunostimulante, que comprende un ARN monocatenario, no homopolimérico y no modificado.

45 **[0066]** El ARN es preferiblemente un oligonucleótido de aproximadamente 6 a 100 ribonucleótidos o un ARN mensajero (ARNm) de aproximadamente 100 a 10 000 nucleótidos.

50 **[0067]** Debido a que la fabricación de oligonucleótidos mediante síntesis química es más fácil a escalas muy grandes (kilogramos) que la síntesis enzimática del ARNm, los oligonucleótidos son las moléculas de ARN preferidas para los fines de la presente invención.

55 **[0068]** Los oligonucleótidos pueden también obtenerse a partir de fuentes de ácido nucleico usando procedimientos de aislamiento bien conocidos por los expertos en la materia, aunque se sintetizan preferiblemente mediante síntesis química (p. ej., producido mediante síntesis de oligonucleótidos). Se prefieren los oligonucleótidos sintetizados debido a que están químicamente bien definidos y debido a su pureza y homogeneidad de secuencia.

60 **[0069]** Según se usa en este documento, el término «oligonucleótido» debería significar ribonucleótidos múltiples (es decir, una molécula que comprende una ribosa) unidos a un grupo fosfato y a una base orgánica seleccionada entre el grupo compuesto por citosina (C), uracilo (U), adenina (A) y guanina (G). Un oligómero generalmente se define como compuesto de un número finito de unidades de monómeros, cuyo número oscila de unos pocos a un centenar. En el contexto de la presente invención, un oligorribonucleótido consta de aproximadamente 6 a 100 ribonucleótidos. Preferiblemente, de 12 a 40 e incluso más preferiblemente de 16 a 21.

65 **[0070]** El ARN de la presente invención es preferiblemente monocatenario y normalmente no contiene ninguna modificación química en sus subunidades (p. ej., en la base, o en el fosfato o en el resto de ribosa). Sin embargo,

también son objeto de la presente invención las modificaciones que podrían ayudar a la fabricación o formulación de las actividades biológicas de las nanopartículas de protamina-ARN descritas en este documento. El extremo 5' del ARN puede ser OH, monofosfato o trifosfato, permitiendo este último la estimulación del RIG-1 citosólico y potenciando la inmunoestimulación.

5 **[0071]** No existe un requisito específico de secuencia de ribonucleótidos para que una molécula de oligorribonucleótido sea adecuada para preparar una composición de nanopartículas inmunoestimulantes según la presente invención. Preferiblemente, sin embargo, el ARN contiene al menos el 25% de restos de uridina.

10 **[0072]** Más preferiblemente, el ARN es un oligonucleótido que tiene las siguientes secuencias (escrito en sentido 5' a 3'): ARN18PU: AUCGCUAUCGAUCUCUAG (SEC ID N.º 3); 21merU: AGUGUUAUUCUUGUAUGGUUG (SEC ID N.º 10); 18merU: AGUGUUAUUCUUGUAUGG (SEC ID N.º 1); 16merU: GUGUUAUUCUUGUAUG (SEC ID N.º 11); 14merU: GUUAUUCUUGUAUG (SEC ID N.º 12); 12merU: GUUAUUCUUGUA (SEC ID N.º 5); 10merU: GUUAUUCUUG (SEC ID N.º 13); Oligo 21: GUUGCAUGGGCCUCAUAUACA (SEC ID N.º 2).

15 **[0073]** La protamina de la presente invención puede ser protamina sulfatada o clorhidrato de protamina. En una realización preferida, la fuente de protamina utilizada para la producción de las nanopartículas y la «composición de nanopartículas de protamina-ARN inmunoestimulante», respectivamente, es protamina 5000 que contiene protamina a más de 10 mg/ml (5000 unidades neutralizantes de heparina por ml) en una solución salina isotónica y que se diluye como se ha establecido anteriormente.

20 **[0074]** La protamina no es tóxica y ya se está utilizando a nivel clínico, por ejemplo, como tratamiento anti-heparina en cirugía y como estabilizante de la insulina en nuevas formulaciones de insulina. La protamina se ha utilizado previamente para estabilizar el ARNm en una preparación de vacuna de ARNm (documento EP 18184909), sin embargo, se ha encontrado que en la relación de masa de protamina: ARN usada en la presente invención (más de 1:2, en el mejor de los casos 1:1, 2:1 o 4:1), se inhibe la expresión del ARNm. Por tanto, el procedimiento para utilizar protamina como estabilizante del ARNm según la técnica previa es diferente al utilizado para generar nanopartículas homogéneas inmunoestimulantes según la presente invención.

25 **[0075]** La composición inmunoestimulante preferiblemente tiene una proporción en peso protamina:ARN de 8:1 a 1:2, más preferiblemente de 4:1 a 1:2.

30 **[0076]** En una realización preferida, en las nanopartículas de la presente invención, la proporción en peso entre la protamina y el oligorribonucleótido es de aproximadamente 1.

35 **[0077]** Para aumentar adicionalmente la eficacia, las composiciones inmunoestimulantes según la invención pueden comprender uno o más adyuvantes, preferiblemente para conseguir un efecto sinérgico de inmunoestimulación. «Adyuvante» en este contexto abarca cualquier compuesto que estimule una respuesta inmune. Varios mecanismos son posibles a este respecto, dependiendo de los diversos tipos de adyuvantes. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de las CD, por ejemplo, lipopolisacáridos o ligando de CD40, forman una primera clase de adyuvantes adecuados. En general, todo agente que influya sobre el sistema inmunitario del tipo «señal peligrosa» (LPS, GP96, ARNbc, etc.) o citoquinas, como GM-CFS, puede usarse como adyuvante que permita que una respuesta inmune se intensifique y/o vea influenciada de forma controlada. Los oligodesoxinucleótidos CpG pueden usarse también opcionalmente en este contexto, aunque deberán considerarse los efectos adversos que se produzcan en determinadas circunstancias como se explica anteriormente. Debido, sin embargo, a la presencia del agente inmunoestimulante según la invención que comprende ARN como el principal inmunoestimulante, solo es necesaria una cantidad relativamente pequeña de ADN CpG (en comparación con la inmunoestimulación con solo ADN CpG). Los adyuvantes especialmente preferidos son citoquinas, como monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GM-CFS, LT- $\alpha$  o factores de crecimiento, por ejemplo, hGH. Otros adyuvantes conocidos son hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund o aceite como Montanide<sup>®</sup>, más preferido Montanide<sup>®</sup> ISA51. Los lipopéptidos como Pam3Cys, son también especialmente adecuados para su uso como adyuvantes en la composición inmunoestimulante de la presente invención.

50 **[0078]** En una realización preferida, la composición inmunoestimulante según la invención también puede usarse junto con otro reactivo terapéutico. La composición inmunoestimulante de protamina/ARN de la presente invención puede por sí misma actuar de forma sinérgica con otros tratamientos como fármacos quimioterapéuticos para pacientes con cáncer, triterapia para pacientes con VIH o cloroquina, un fármaco utilizado frente a la infección de malaria y conocido porque mejora la reactividad cruzada. De hecho, la composición inmunoestimulante sola es capaz de inducir una activación general inespecífica del sistema inmunitario que, a su vez, ayuda al control de los patógenos.

55 **[0079]** Muchas de las pautas de quimioterapia (gemcitabina, etopofos, cisplatino, carboplatino, etc.) o protocolos de radioterapia no afectan gravemente al sistema inmunitario. Por tanto, durante la radio/quimioterapia en pacientes con cáncer, puede usarse la inmunomodulación de modo que la muerte de las células tumorales pueda ir

65

acompañada de la inducción de una respuesta inmune mediante composiciones inmunoestimulantes según la presente invención. Las inyecciones sistémicas (intravenosas o subcutáneas, por ejemplo) así como inyecciones locales (intratumoral o intradérmica, por ejemplo) de una composición de nanopartículas de protamina-ARN inmunoestimulantes según la presente invención en pacientes en tratamiento con radio/quimioterapia pueden ayudar al sistema inmunitario a aumentar la respuesta frente al tumor. Esta respuesta inmune podría también controlar el crecimiento tumoral.

**[0080]** En una realización adicional, la composición farmacéutica de la presente invención adquiere la forma de una preparación para vacuna que comprende las nanopartículas de protamina-ARN inmunoestimulantes definidas anteriormente y al menos un antígeno. Por «antígeno» se entiende cualquier estructura que puede inducir la formación de anticuerpos y/o la activación de una respuesta inmune celular. Son ejemplos de antígenos los polipéptidos, proteínas, células, extractos celulares, hidratos de carbono/polisacáridos, conjugados de polisacáridos, lípidos y glucolípidos. Estos antígenos pueden ser antígenos tumorales o antígenos o alérgenos víricos, bacterianos, fúngicos y de protozoos. El antígeno puede estar presente en la vacuna según la invención en forma de hapteno conjugado a un vehículo adecuado. Los vehículos adecuados son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA) o polietilenglicoles (PEG). El hapteno puede conjugarse al vehículo mediante procesos bien conocidos en la técnica previa, por ejemplo, en el caso de un vehículo polipeptídico a través de un enlace amida a un resto Lys.

**[0081]** La formulación de antígeno más nanopartículas de protamina-ARN puede formularse como una emulsión usando la mezcla con un aceite como Montanide®.

**[0082]** En una realización alternativa, la composición inmunoestimulante de la presente invención puede usarse en vacunación genética, en la que se estimula una respuesta inmune mediante la introducción en el organismo o en las células (electroporación *in vitro* seguida de transferencia adoptiva o inyección directa mediante dispositivos con o sin aguja) de una molécula de ácido nucleico adecuada que codifica este antígeno. Esta molécula de ácido nucleico puede ser un ADN o un ARNm. La «composición de nanopartículas de protamina-ARN inmunoestimulantes» puede inyectarse de modo sistémico (intravenoso o subcutáneo), así como a nivel local, en el sitio de administración del ADN o ARNm, proporcionando de este modo un entorno inmune (inducción de citoquinas y maduración de CPA) beneficioso para la inducción de una respuesta inmune.

**[0083]** Las vacunas según la invención son adecuadas para el tratamiento de cánceres. En este contexto puede usarse un antígeno específico de tumor (AET) o un ácido nucleico que codifique dicho antígeno, así como partes de antígenos tumorales o ácidos nucleicos que codifican dichas partes pueden. Entre los ejemplos específicos de los antígenos tumorales que pueden usarse según la invención se incluyen 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A\*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (o hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 menor bcr-abl, Pml/RAR.alfa, PRAME, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2 y WT1.

**[0084]** La vacuna según la invención puede además emplearse frente a enfermedades infecciosas.

**[0085]** La vacuna según la invención puede usarse en combinación con cloroquina, un compuesto farmacéutico que aumenta la presentación cruzada y, por tanto, la inducción de células T efectoras específicas de antígeno.

**[0086]** Un ejemplo de la formulación de vacuna que se usará podría ser la proteína NY-ESO-1 de longitud completa mezclada con nanopartículas de protamina-ARN y homogeneizada en Montanide®. La emulsión puede administrarse por vía subcutánea, opcionalmente en combinación con una captación concomitante de cloroquina por el individuo tratado.

**[0087]** La presente invención es especialmente adecuada para su uso en la inducción de producción, o aumento del nivel, de IFN-alfa. Cuando se añade a PBMC humanas *in vitro*, la composición inmunoestimulante es capaz de inducir la producción de al menos 500 pg/ml de interferón IFN-alfa por millón de PBMC humanas cultivadas 24 horas en 200 µl de medio de cultivo (RPMI más suero de ternera fetal al 10%).

**[0088]** Preferiblemente, una forma de las nanopartículas de la presente invención (nanopartículas pequeñas), en particular en forma de una composición inmunoestimulante, cuando se incubaba conjuntamente con las PBMC humanas *in vitro* durante 24 horas, es capaz de inducir una fuerte producción de INF-alfa por millón de PBMC humanas (más de 500 pg/ml) aunque una producción de TNF-alfa menor del 10 000 pg/ml.

**[0089]** Otra forma de las nanopartículas de la presente invención preferiblemente proporcionada en forma de una composición inmunoestimulante, cuando se incubaba conjuntamente con las PBMC humanas *in vitro* durante 24 horas, es capaz de inducir una fuerte producción de INF-alfa por millón de PBMC humanas (más de 100 pg/ml) y una producción de TNF-alfa de más de 10 000 pg/ml.

[0090] En una realización preferida adicional, las nanopartículas de la presente invención tienen un tamaño medio de no más de aproximadamente 450 nm de diámetro, preferiblemente de 50 a 450 nm de diámetro (nanopartículas pequeñas).

5 [0091] En otra realización preferida, la presente invención proporciona nanopartículas más grandes de protamina y ARN que tienen un tamaño medio de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 900 nm de diámetro.

10 [0092] En «tamaño» medio de las nanopartículas generalmente es el «tamaño diseñado» o tamaño pretendido de las partículas preparadas según un proceso establecido. El tamaño puede ser una dimensión determinada directamente, como el diámetro medio o máximo, o puede determinarse mediante un ensayo indirecto, como un ensayo de selección por filtración. La determinación directa del tamaño de las partículas se realiza típicamente mediante dispersión dinámica de luz. Puesto que surgen variaciones mínimas de tamaño durante el proceso de fabricación, es aceptable una variación de hasta el 40% en la medición establecida y se considera que está dentro del tamaño establecido. Alternativamente, el tamaño del microvehículo puede determinarse mediante ensayos de selección por filtración. Por ejemplo, una preparación de partículas tiene un tamaño menor al establecido, si al menos el 97% de las partículas pasan a través de un filtro «de separación» del tamaño establecido.

15 [0093] Las composiciones de la presente invención pueden además procesarse y pueden contener principios activos adicionales. Por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 7.018.657 se describe un procedimiento para preparar formulaciones nanoparticuladas de composiciones farmacéuticas que comprenden polinucleótidos precondensados con un péptido policatiónico, como sulfato de protamina.

20 [0094] Una realización adicional es una formulación inyectable que comprende las nanopartículas inmunoestimulantes de la invención en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptables como solución lactato de Ringer.

25 [0095] La presente invención además proporciona un procedimiento de inmunoestimulación, en concreto, para estimular una respuesta inmune del huésped en un sujeto, preferiblemente un mamífero, especialmente un humano. Se administra una cantidad eficaz de una composición farmacéutica según la invención, opcionalmente en combinación con otro tratamiento (por ejemplo, radioterapia) o agente terapéutico, como una vacuna proteica, un agente quimioterapéutico para el cáncer, un agente inmunomodulador adicional, un fármaco que potencie la reactividad cruzada como cloroquina, un agente antiviral, un agente antiparasitario o un agente antibacteriano. Por tanto, la presente invención también comprende el uso de nanopartículas como se define en este documento para la preparación de una composición farmacéutica o medicamento para la inmunomodulación, en particular para estimular la respuesta inmune del huésped en un sujeto, preferiblemente un mamífero, especialmente un humano.

30 [0096] Preferiblemente, el agente de inmunomodulación adicional es un anti-CTL-A4 o reactivos anti-células T reguladoras como un anticuerpo anti-CD25 o ciclofosfamida.

35 [0097] El al menos un agente terapéutico adicional puede administrarse de forma simultánea con la composición farmacéutica, o el al menos un agente terapéutico adicional se administra de forma secuencial con la composición farmacéutica.

40 [0098] Según el procedimiento de la presente invención, el nivel de IFN-alfa aumenta por la administración de la composición inmunoestimulante de la invención.

45 [0099] En una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento *ex vivo* para estimular una respuesta inmune del huésped en un mamífero. En una realización se aíslan células inmunes adecuadas a partir del mamífero y se tratan *in vitro* mediante la administración a las células inmunes aisladas de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención y las células inmunes estimuladas se reintroducen en el organismo. Entre las células inmunes adecuadas para dicho tratamiento *ex vivo* se incluyen, pero sin limitaciones, las células dendríticas.

50 [0100] El procedimiento y la composición de la presente invención pueden usarse como suplemento del tratamiento con interferón- $\alpha$  o para aumentar el interferón- $\alpha$  en un sujeto.

55 [0101] La composición inmunoestimulante de la invención comprende, además de ARN y protamina, y otros agentes terapéuticos o inmunogénicos, un transportador farmacéuticamente aceptable y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Las vías apropiadas para la formulación y preparación adecuadas del agente inmunoestimulante según la invención y la vacuna se describen en Remington: «The Science and Practice of Pharmacy,» 20ª Edn., A.R. Gennaro, Editor, Mack Publishing Co., Easton, PA (2003). Las posibles sustancias vehículo para la administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, solución de Ringer, solución lactato de Ringer, solución de cloruro sódico estéril, polialquilénglicoles, naftalenos hidrogenados y, en especial, polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros lactida/glicólico o copolímero de polioxietileno/polioxi-propileno. Los agentes inmunoestimulantes y las vacunas según la invención pueden

comprender sustancias de carga o sustancias como lactosa, manitol, sustancias para la unión covalente de polímeros, como por ejemplo, de polietilenglicol, a haptenos, péptidos o polipéptidos antigénicos, según la invención, formando complejos con iones metálicos o inclusión de materiales dentro o sobre preparaciones en particular de compuestos poliméricos, como por ejemplo, polilactato, ácido poliglicólico, hidrogel o en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fragmentos de eritrocitos o esferoblastos. Las realizaciones en particular del agente inmunoestimulante y la vacuna se eligen según las propiedades físicas, por ejemplo, con respecto a la solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad o degradabilidad. La liberación controlada o constante de los componentes (similares a) farmacéuticos activos según la invención en la vacuna o en el agente inmunoestimulante incluye formaciones a base de depósitos lipófilos (p. ej., ácidos grasos, ceras o aceites). En el contexto de la presente invención también se describen recubrimientos de sustancias inmunoestimulantes y sustancias de vacuna o composiciones de vacuna (todas ellas según la invención) que comprenden dichas sustancias, en concreto recubrimientos con polímeros (p. ej., polioxámeros o polioxaminas). Las sustancias o composiciones inmunoestimulantes o de vacuna según la invención pueden además tener recubrimientos protectores, p. ej., inhibidores de proteasas o intensificadores de la permeabilidad. Los vehículos preferidos son normalmente materiales transportadores acuosos, usándose agua para inyección (API) o agua tamponada con fosfato, citrato, HEPES o acetato, o solución de Ringer o solución lactato de Ringer, etc., y normalmente el pH se ajusta de 5,0 a 8,0, preferiblemente de 6,5 a 7,5. El transportador o vehículo comprenderá adicionalmente de forma preferida constituyentes salinos, por ejemplo, cloruro sódico, cloruro potásico y otros componentes que conviertan la solución en, por ejemplo, isotónica. Adicionalmente, el transportador o vehículo puede contener, además de los constituyentes mencionados anteriormente, componentes adicionales como albúmina sérica humana (SHA), polisorbato 80, azúcares o aminoácidos.

**[0102]** El modo y el procedimiento de administración y la dosis del agente inmunoestimulante según la invención y la vacuna según la invención dependen de la naturaleza de la enfermedad que se va a tratar, cuando se considere apropiado, la fase de la misma, el antígeno (en el caso de la vacuna) y también del peso corporal, la edad y el sexo del paciente.

**[0103]** La composición inmunoestimulante de la presente invención puede preferiblemente administrarse al paciente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular. También es posible administrar el agente inmunoestimulante o la vacuna por vía tópica u oral. Una inyección adicional posiblemente es dentro del tejido tumoral o cavidad tumoral (tras lo cual el tumor se extirpa mediante cirugía, por ejemplo, en el caso de tumores cerebrales).

### Ejemplo

Procedimiento para la preparación de una composición de nanopartículas de protamina-ARN inmunoestimulante

**[0104]** Se sintetiza y purifica un oligorribonucleótido de aproximadamente 18 restos. A continuación, el producto se liofiliza y resuspende a 1 mg/ml en agua pura. La protamina Valeant® 5000 se diluye 14 veces en agua pura para obtener una solución de protamina a aproximadamente 1 mg/ml a baja concentración de sal. El ARN y la protamina se mezclan en igual volumen. El mezclado consiste en pipetear arriba y abajo varias veces o en agitar. La formulación se deja durante unos minutos sobre la mesa de trabajo y puede, a continuación diluirse adicionalmente con solución para inyección (por ejemplo, solución lactato de Ringer) o mezclarse con el antígeno y, finalmente, Montanide®. Si la solución de nanopartículas de protamina-ARN está demasiado diluida, las nanopartículas pueden recuperarse mediante centrifugación o liofilización y resuspenderse en el volumen adecuado de la solución deseada antes de usarse para la formulación de tratamiento.

### LISTADO DE SECUENCIAS

**[0105]**

<110> Universidad de Zürich

<120> Nanopartículas de protamina/ARN para inmunoestimulación

<130> U 0016 WOEP

<140> EP 09753885.4

<141> 26/05/2009

<150> EP 08009581.3

<151> 26/05/2008

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 18

5 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

10 <223> oligonucleótido rico en U ARN18RU

<400> 1

aguguuauuc uuguauagg 18

15 <210> 2

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

20 <220>

<223> oligonucleótido oligo 21

<400> 2

25 guugcauggg ccucauauac a 21

<210> 3

<211> 18

<212> ARN

30 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido ARN18PU

35 <400> 3

aucgcuaucg aucucuag 18

<210> 4

40 <211> 12

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

45 <223> oligonucleótido 12mer rico en A

<400> 4

gaaaaacaag aa 12

50 <210> 5

<211> 12

<212> ARN

<213> Artificial

55 <220>

<223> oligonucleótido 12mer rico en U

<400> 5

60 guuauucuug ua 12

<210> 6

<211> 12

<212> ARN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido 12mer rico en C  
  
 <400> 6  
  
 gccacccccg ca 12  
 10  
 <210> 7  
 <211> 12  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> oligonucleótido 12mer rico en G  
  
 <400> 7  
 20  
 gggaggcgga ga 12  
  
 <210> 8  
 <211> 12  
 25 <212> ARN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido 12mer de purina  
 30  
 <400> 8  
  
 agagagagag ag 12  
 35  
 <210> 9  
 <211> 12  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> oligonucleótido 12mer de pirimidina  
  
 <400> 9  
 45  
 cucucucucu cu 12  
  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido 12merU  
 55  
 <400> 10  
  
 aguguuauuc uuguaugguu g 21  
 60  
 <210> 11  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
  
 <220>

# ES 2 470 644 T3

<223> oligonucleótido 16merU

<400> 11

5    guguuauucu uguaug    16

<210> 12

<211> 14

<212> ARN

10 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido 14merU

15 <400> 12

    guuauucuug uaug    14

<210> 13

20 <211> 10

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

25 <223> oligonucleótido 10merU

<400> 13

30    guuauucuug    10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que contiene nanopartículas de un tamaño medio de aproximadamente 50 a 450 nm que comprende protamina y ARN en combinación con un transportador, vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable para su uso en inmunestimulación.
2. La composición para su uso de la reivindicación 1 en la que la proporción en peso de protamina con respecto al ARN es de 8:1 a 1:2, preferiblemente de 4:1 a 1:2.
- 10 3. La composición para su uso de la reivindicación 1 o 2 en la que el ARN contiene al menos un nucleótido U y/o al menos un nucleótido G.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el ARN es un oligonucleótido de 6 a 100 nucleótidos.
- 15 5. La composición para su uso de la reivindicación 3 o 4 en la que el ARN es un oligonucleótido que tiene una secuencia seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEC ID N.º 1, 2, 3, 5,10,11,12 y 13.
6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el ARN es un ARNm de 10 a 10 000 nucleótidos.
- 20 7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la que la composición además contiene al menos un antígeno.
- 25 8. La composición para su uso de la reivindicación 7 en la que el antígeno se selecciona a partir del grupo compuesto por 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A\*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (o hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 menor bcr-abl, Pml/RAR.alfa, PRAME, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2 y WT1.
- 30 9. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la que la composición farmacéutica además contiene al menos un adyuvante.
- 35 10. La composición para su uso de la reivindicación 9 en la que el adyuvante es un aceite.
11. La composición para su uso según una cualquier de las reivindicaciones 1 a 10 en la que la composición se administra conjuntamente con un agente inmunomodulador adicional seleccionado a partir del grupo compuesto por fármacos quimioterapéuticos, cloroquina, reactivos anti-CTLA-4 o anti-células T reguladoras.
- 40 12. Un procedimiento para la preparación de nanopartículas de un tamaño medio de 50 a 450 nm que comprende los pasos de:
- 45 a) proporcionar una solución acuosa de ARN
- 1) a 1 mg/ml o más usando una solución que contiene de 0 a 75 nM de electrolitos, o
- 2) a menos de 1 mg/ml usando una solución que contiene de 0 a 75 nM de electrolitos;
- 50 b) proporcionar una solución acuosa de protamina
- 1) a 1 mg/ml o más usando una solución que contiene de 0 a 75 mM de electrolitos; o
- 55 2) a menos de 1 mg/ml usando una solución que contiene de 0 a 75 mM de electrolitos; y
- c) combinar las soluciones obtenidas en los pasos a1) y b1) o mezclar las soluciones obtenidas en a2) y b2).
- 60 13. El procedimiento de la reivindicación 12 en el que los pasos a1) y/o a2) comprenden resuspender el ARN liofilizado en una solución acuosa que contiene de 0 a 75 mM de electrolitos.
14. El procedimiento de la reivindicación 12 o 13 en el que los pasos b1) y/o b2) comprende diluir una solución stock isotónica acuosa que contiene de 1000 a 5000 unidades neutralizantes de heparina de protamina por ml con una solución acuosa que contiene de 0 a 75 mM de electrolitos.
- 65

15. El procedimiento de la reivindicación 13 o 14 que comprende las etapas de: a) proporcionar una solución acuosa de ARN a menos de 2 mg/ml resuspendiendo el ARN liofilizado en agua pura; b) proporcionar una solución acuosa de protamina a menos de 2 mg/ml diluyendo una solución stock isotónica acuosa que contienen 5000 unidades neutralizantes de heparina de protamina por ml con agua pura; y c) combinar las soluciones obtenidas en los pasos a) y b).

5

Fig. 1A

**ARN18RU más protamina (dilución en agua): 267 nm**

**Distribución de tamaños**

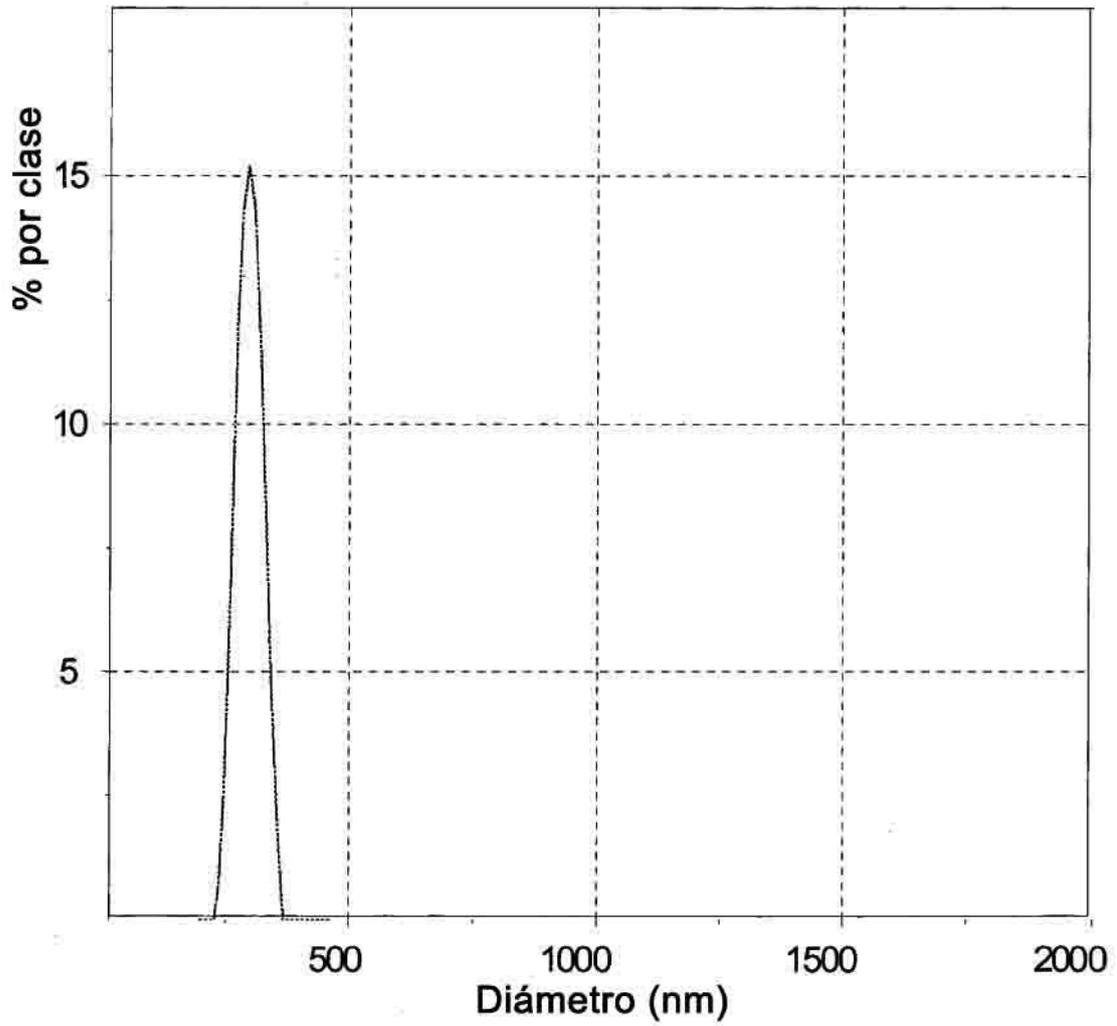


Fig. 1B

**ARNm más protamina (dilución en agua): 254 nm**

**Distribución de tamaños**

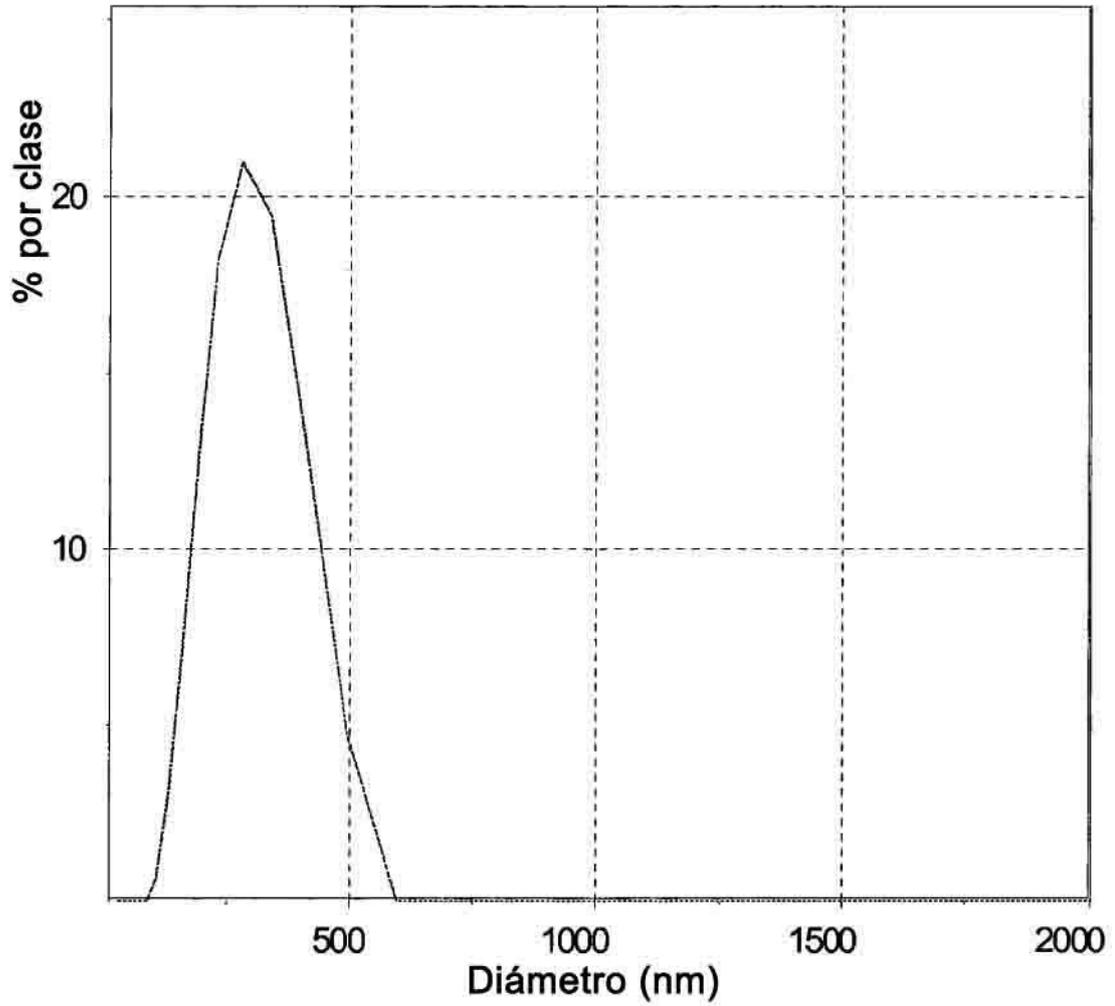


Fig. 1C

**ARN18RU más protamina (ambos diluidos con NaCl 225 mM): 1288 nm**

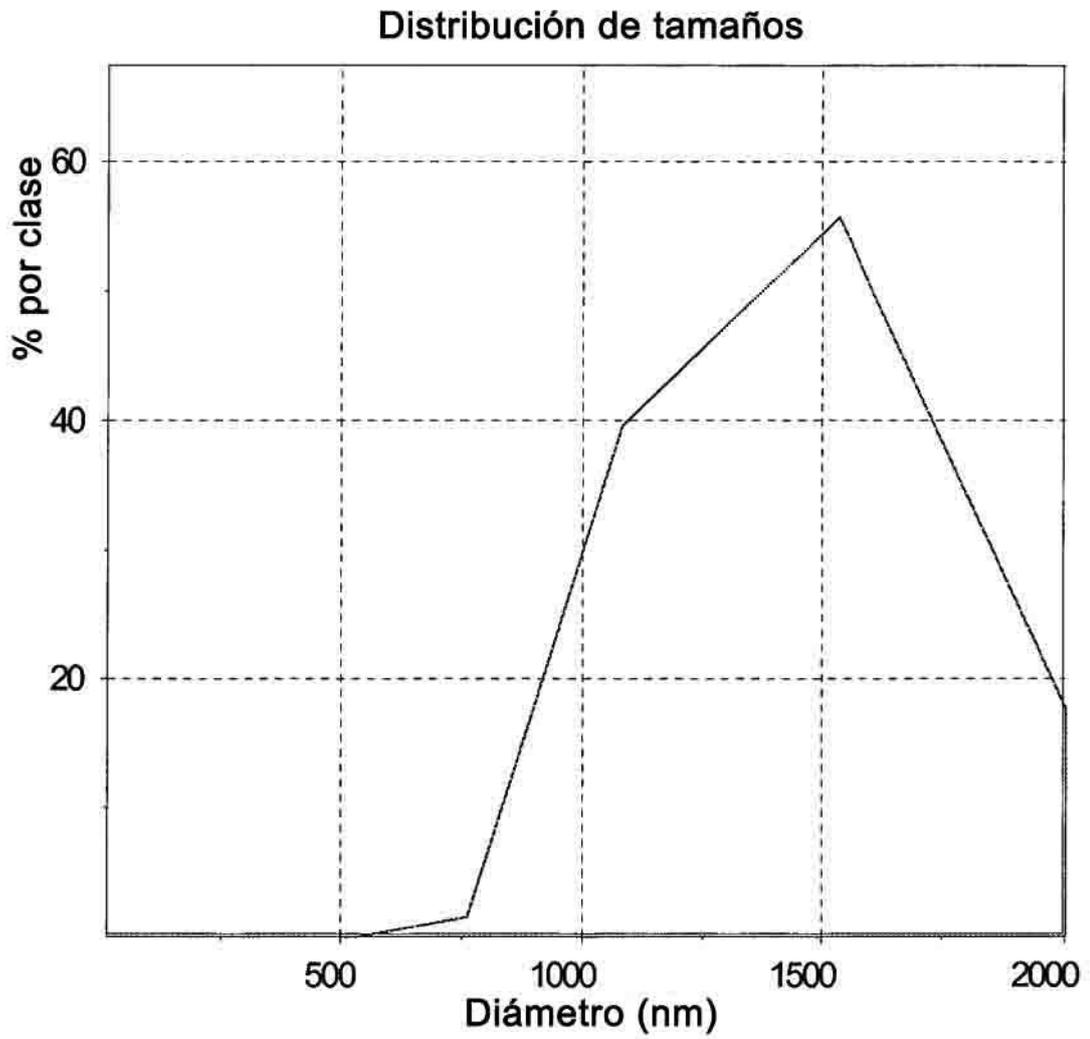


Fig. 2A

**Dilución en agua: 268 nm**

Distribución de tamaños

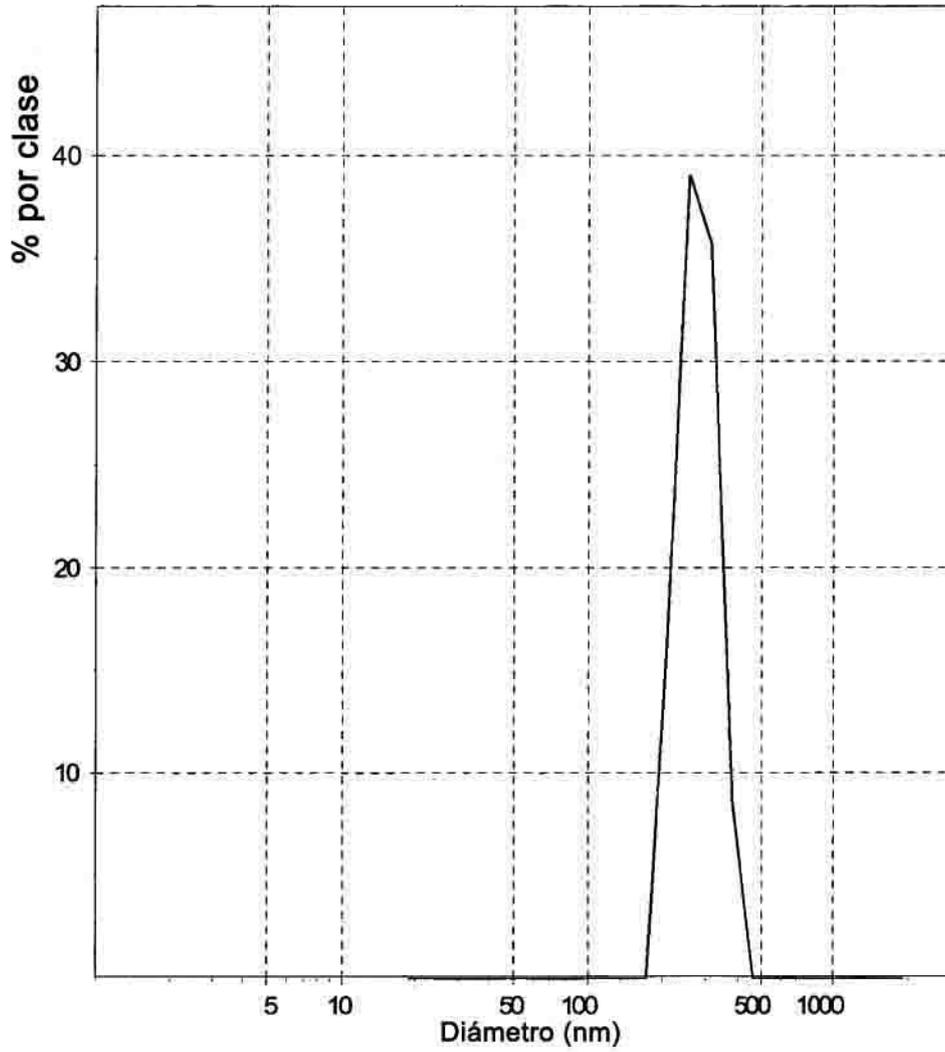


Fig. 2B

**Dilución con NaCl 25 mM: 320 nm**

Distribución de tamaños

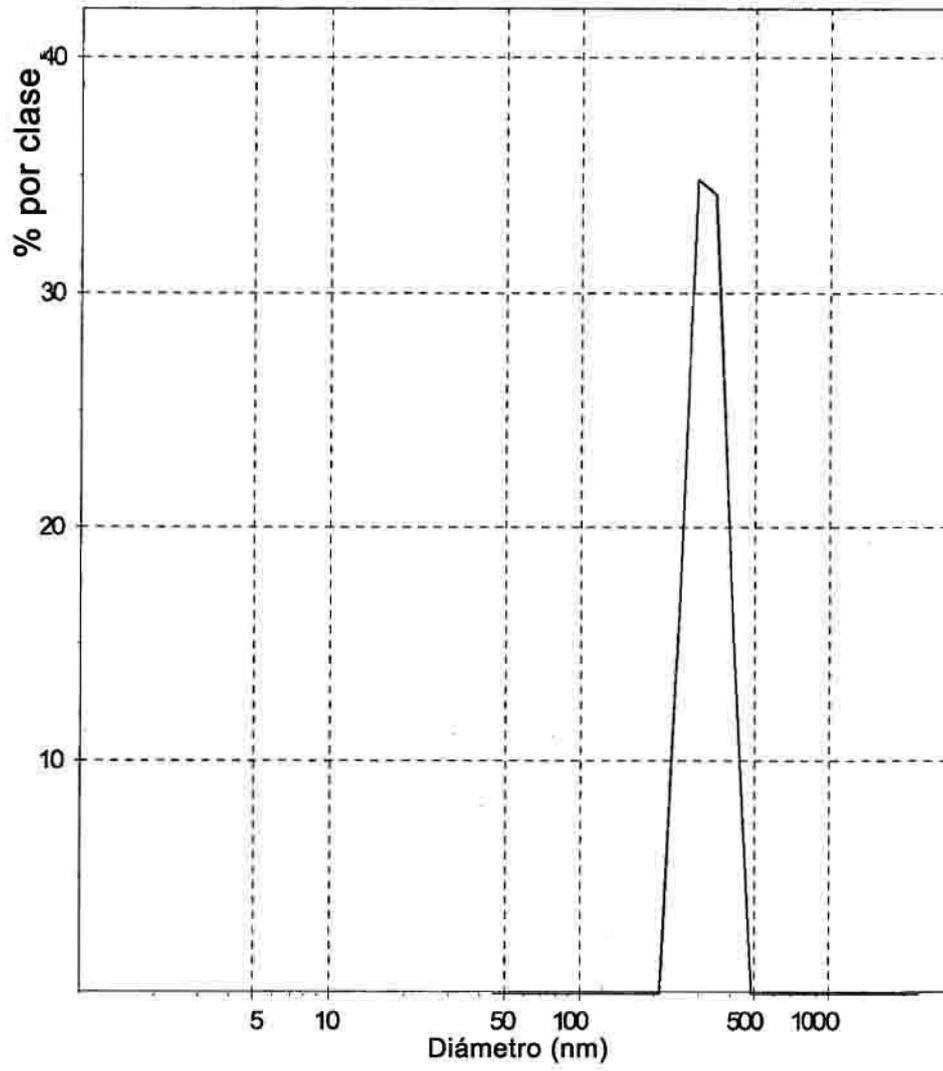


Fig. 2C

**Dilución con solución lactato de Ringer: 1808 nm**

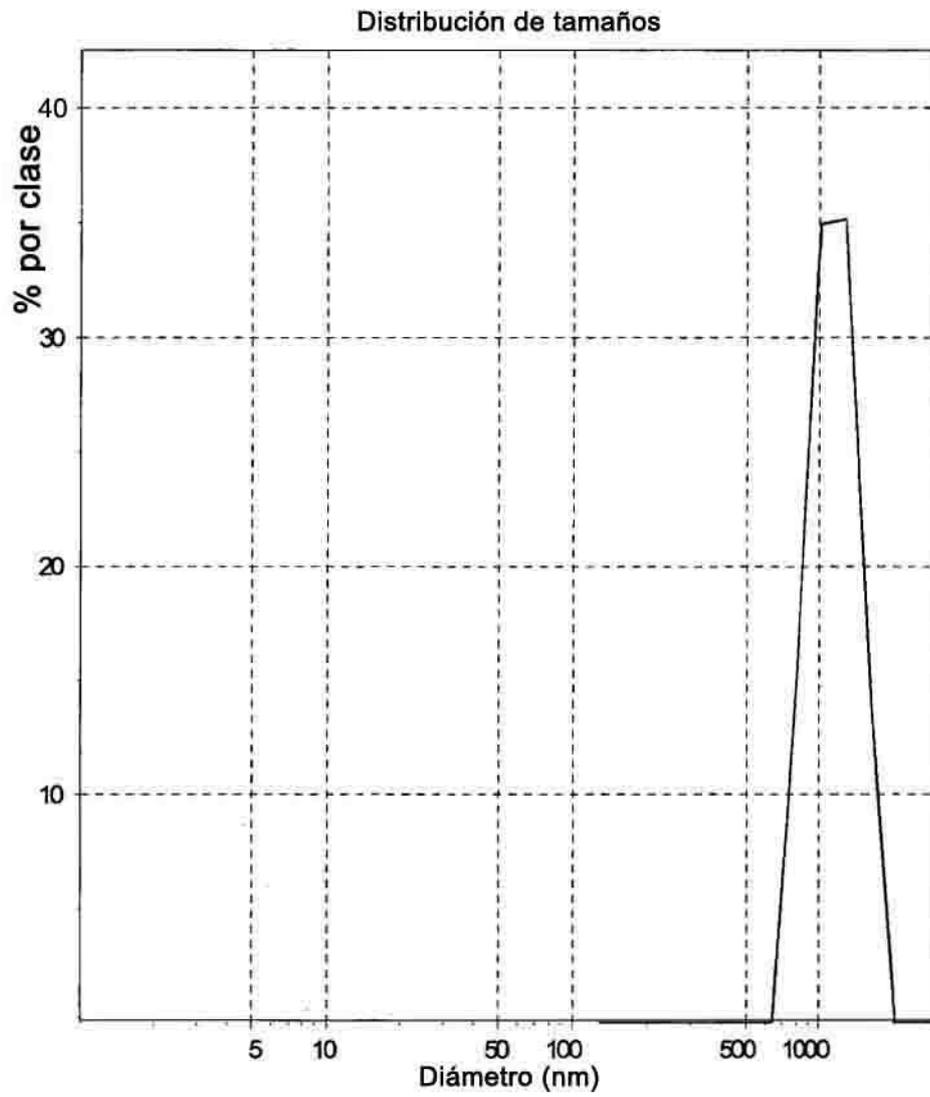


Fig. 3

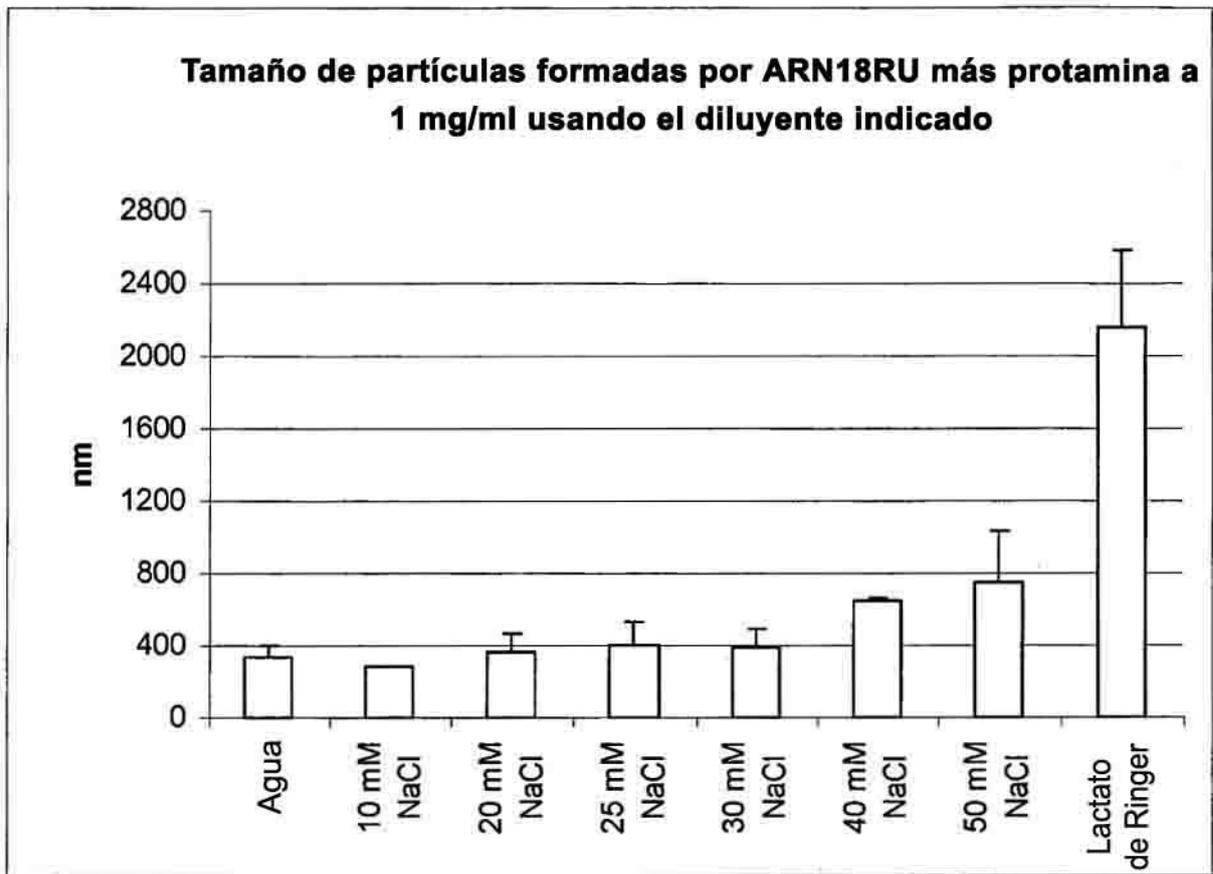


Fig. 4

Interferón-alfa (pg/ml)

	2mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	Controles
Agua	277,5	1312,5	2707,5	3180	
Agua más NaCl 25 mM		120		135	
Agua más NaCl 75 mM		150		105	
Ringer	315	120	105	135	
CpG					4275
ARNbc					217,5
R848					3405

TNF-alfa (pg/ml)

	2mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	Controles
Agua	240	204	588	552	
Agua más NaCl 25 mM		40620		45132	
Agua más NaCl 75 mM		30792		48048	
Ringer	48	9612	29280	45096	
CpG					0
ARNbc					4764
R848					39696

Fig. 5A

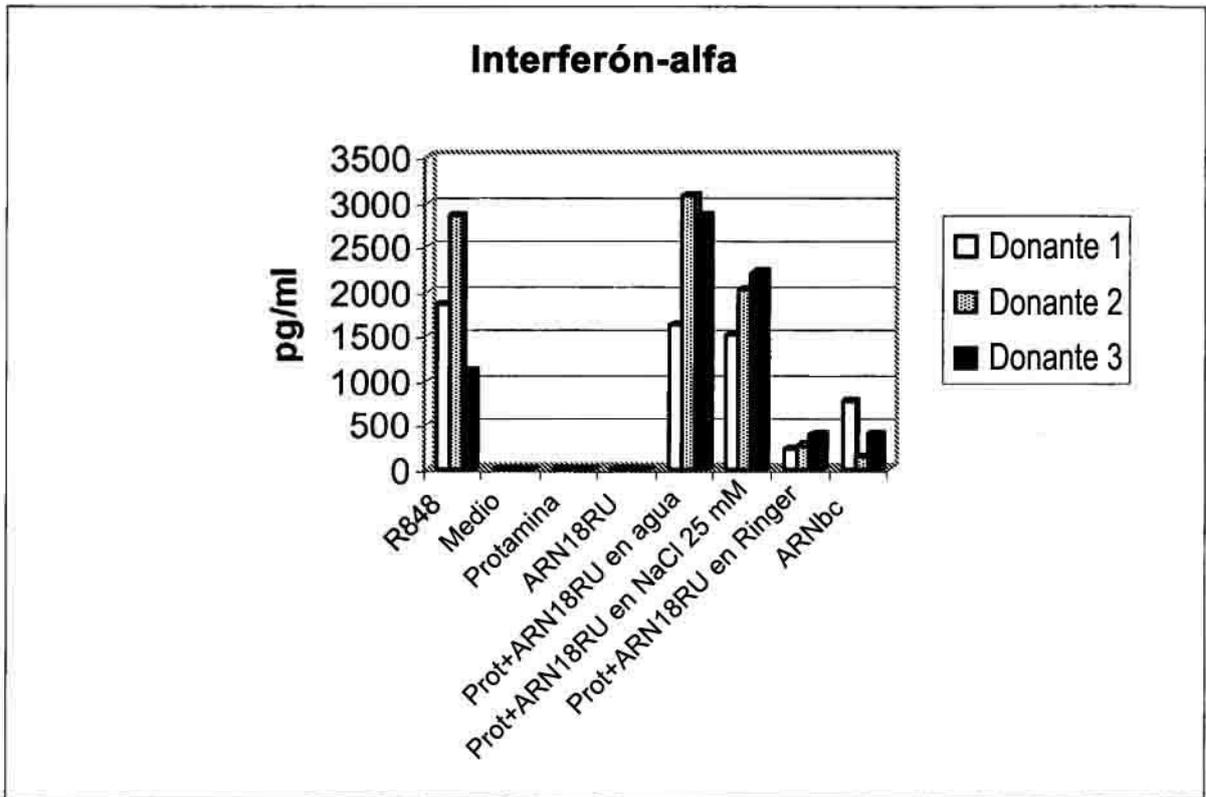


Fig. 5B

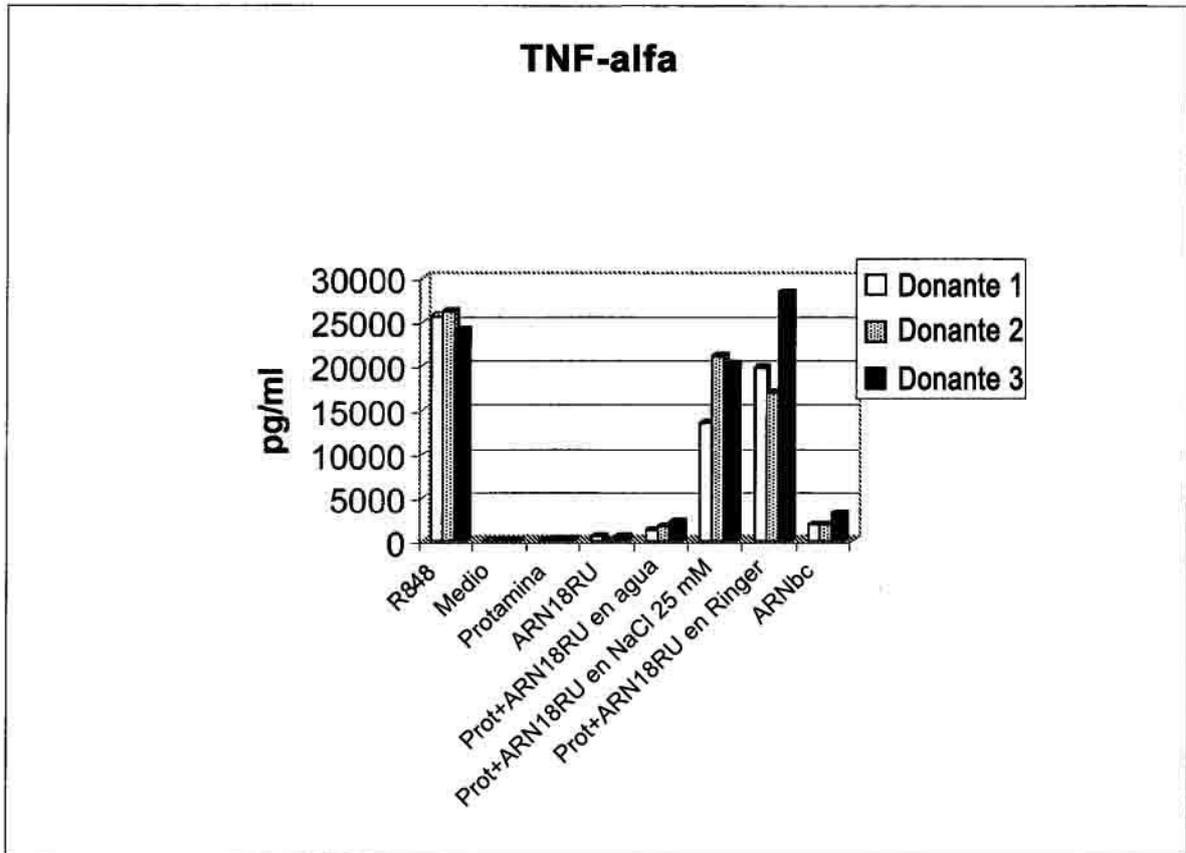


Fig. 5C

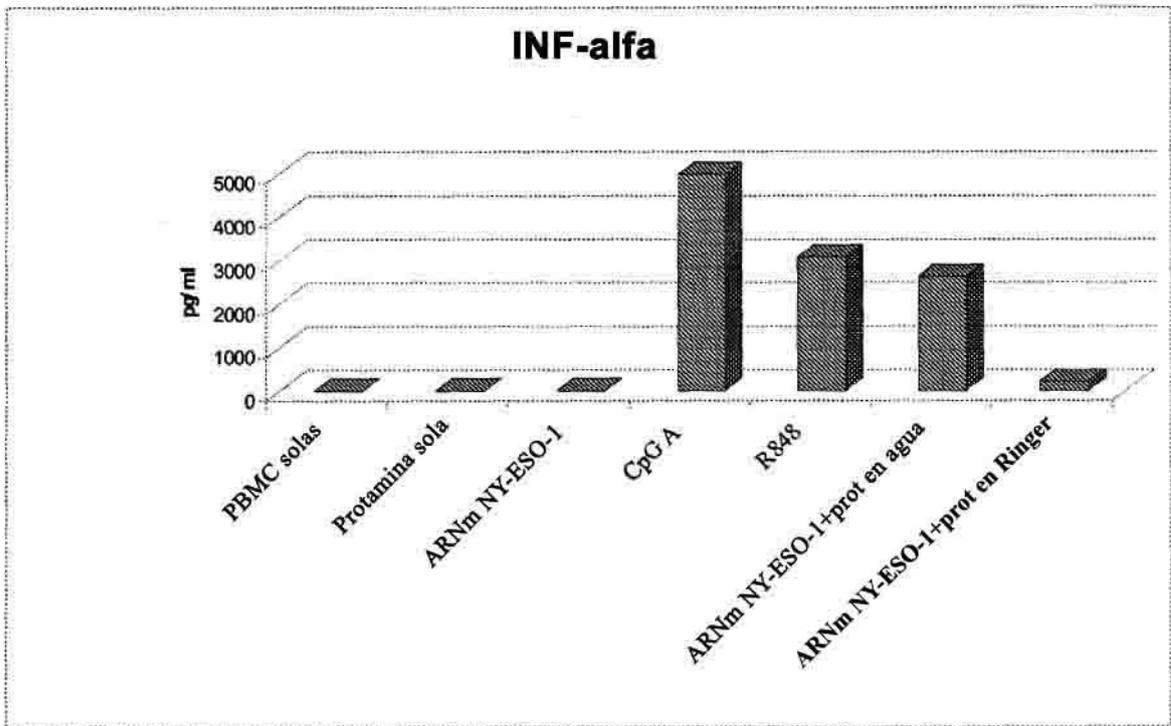


Fig. 5D

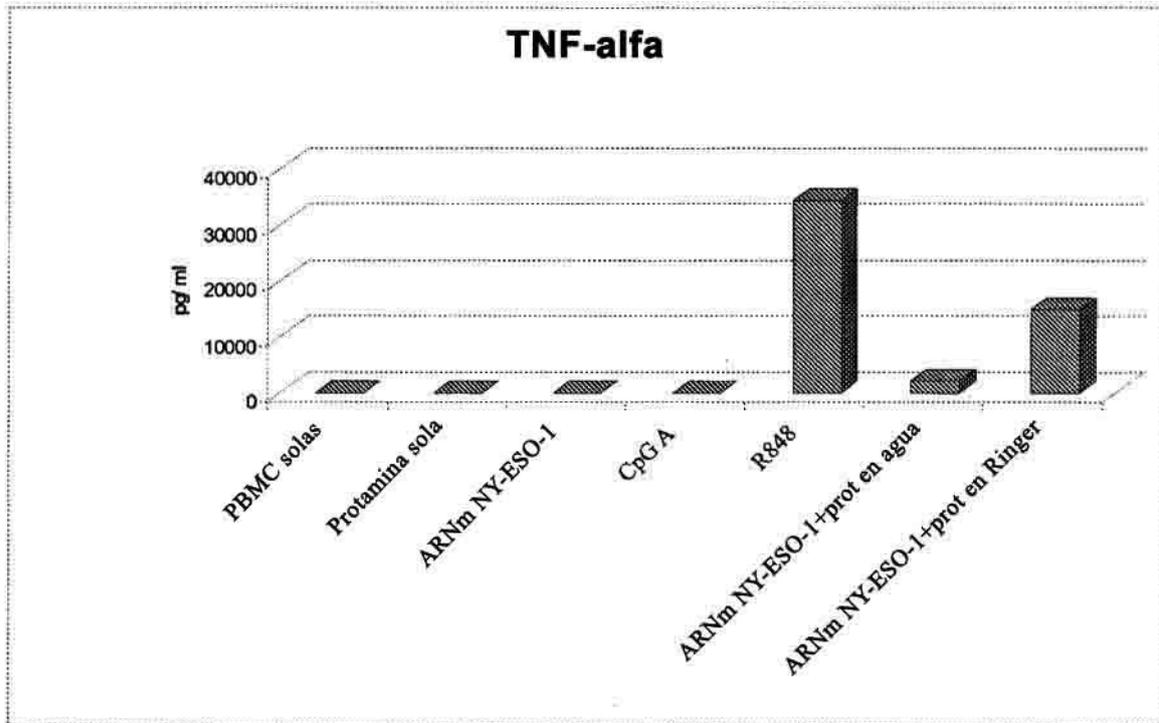


Fig. 6A

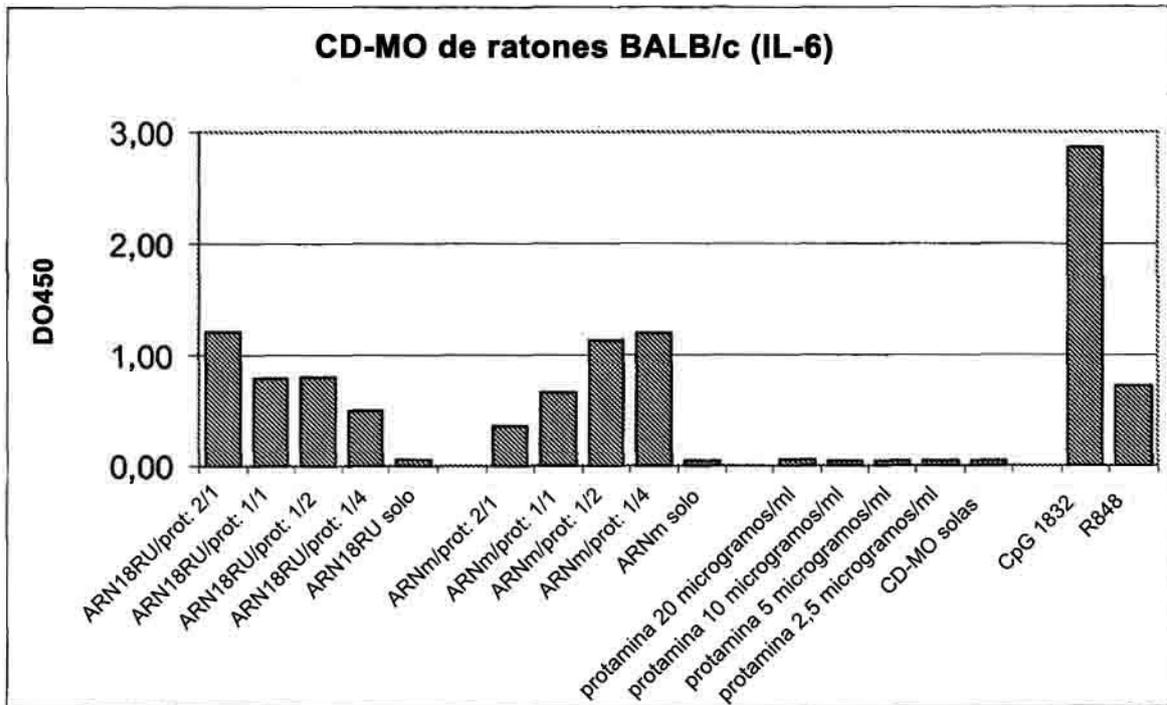


Fig. 6B

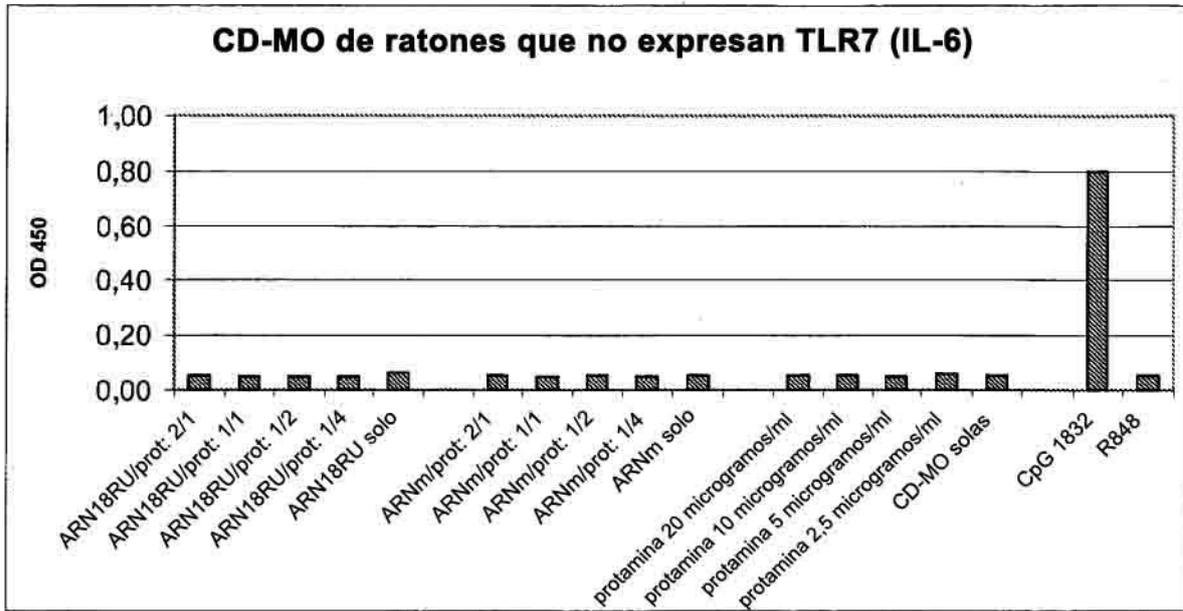


Fig. 6C

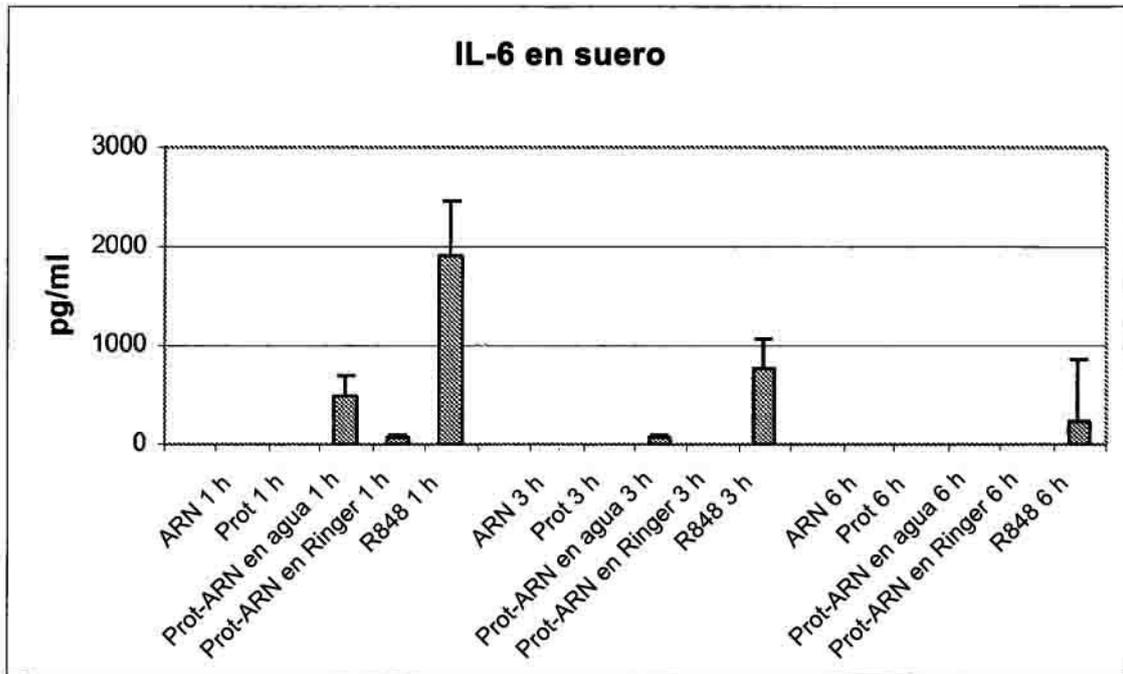


Fig. 7A

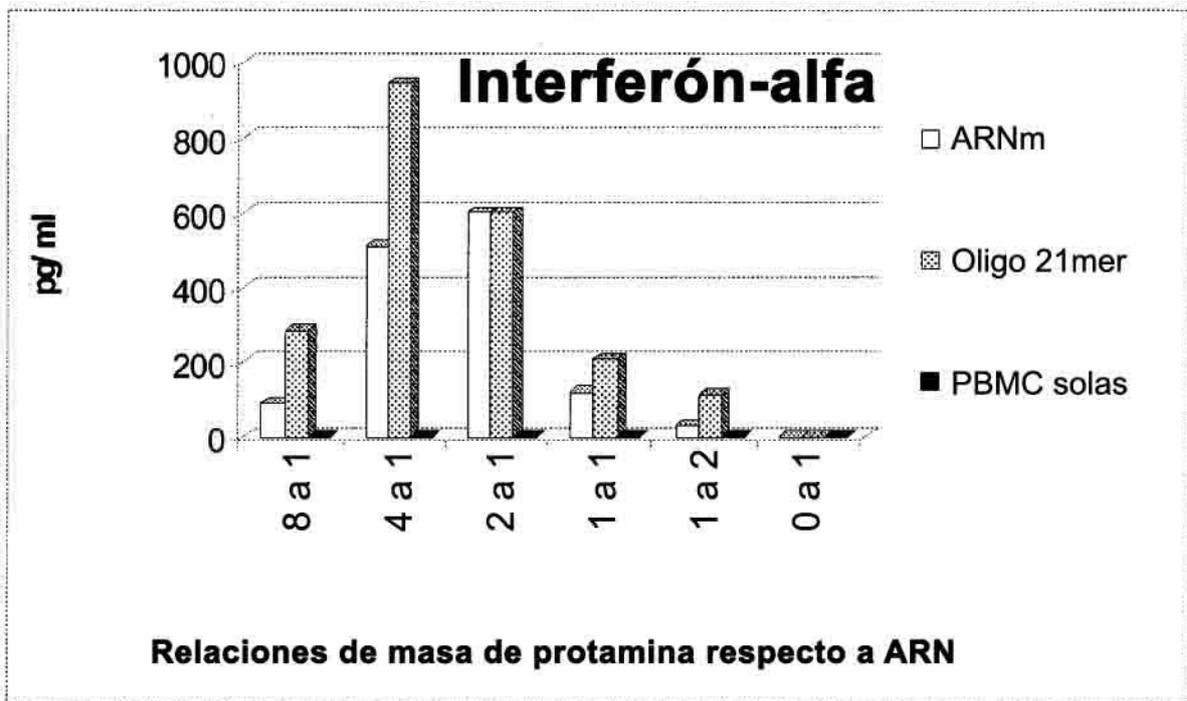


Fig. 7B

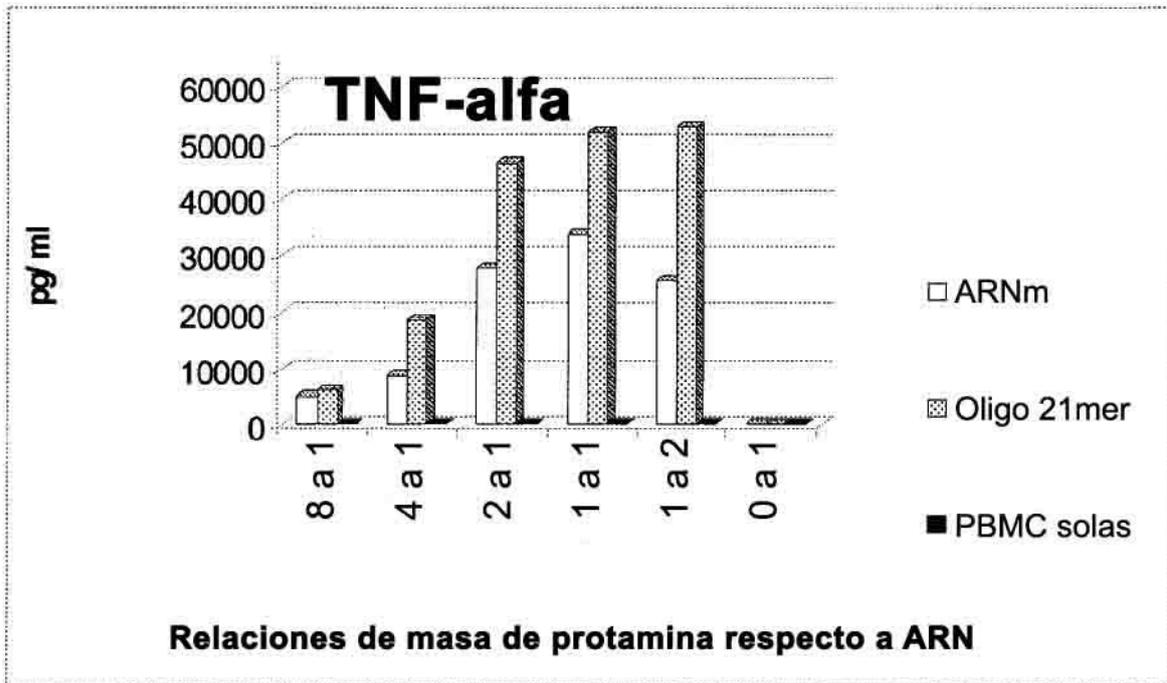


Fig. 8

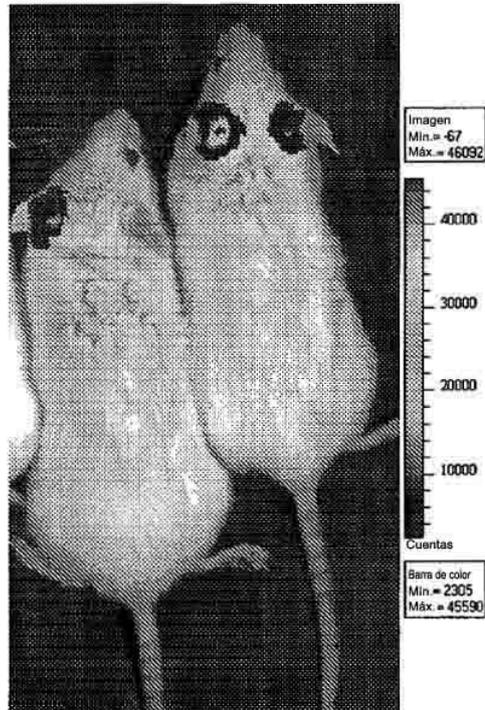
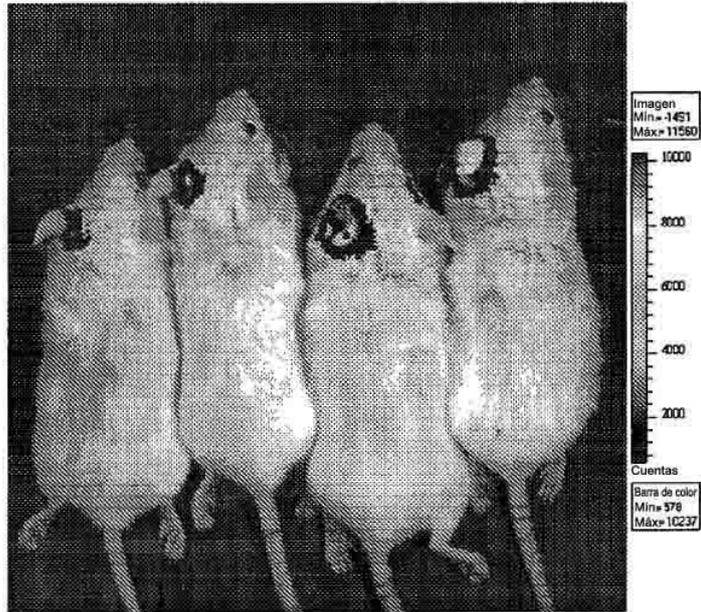


Fig. 9

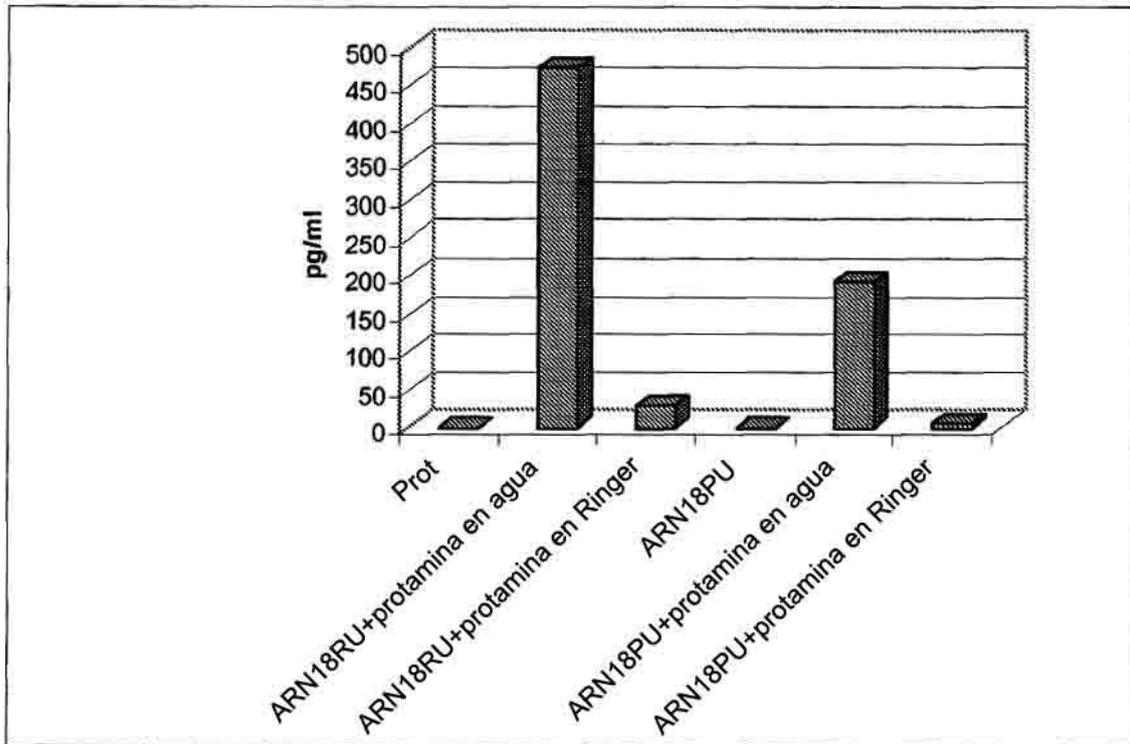


Fig. 10A

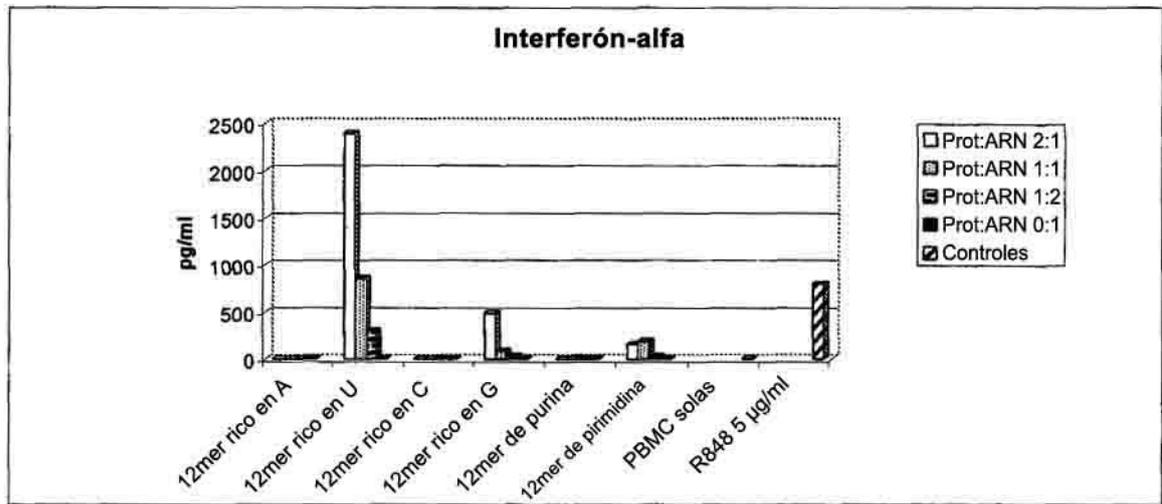


Fig. 10B

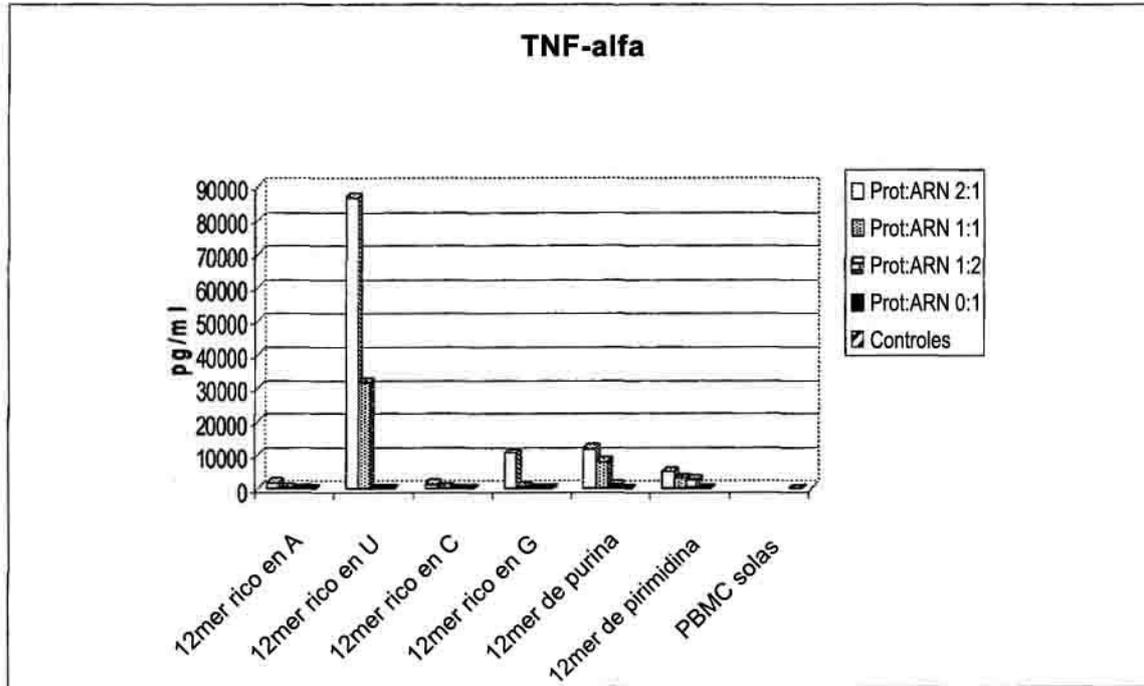


Fig. 11

