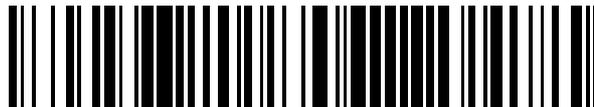


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 857**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2011 E 11841555 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2640426**

54 Título: **Oligonucleótidos inmunoestimulantes**

30 Prioridad:

16.11.2010 US 414194 P

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

12.05.2016

73 Titular/es:

**SELECTA BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
480 Arsenal Street Building One
Watertown, MA 02472, US**

72 Inventor/es:

**LIPFORD, GRAYSON B. y
FRASER, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 569 857 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

Oligonucleótidos inmunoestimulantes

ANTECEDENTES

5 La estimulación del sistema inmune, que incluye la estimulación de una o ambas la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, es un fenómeno complejo que puede dar lugar a resultados fisiológicos de protección o adversos para el huésped. En los últimos años ha habido un interés incrementado en los mecanismos que subyacen en la inmunidad innata, que se cree que inician y apoyan la inmunidad adaptativa. Este interés ha sido impulsado en parte por el reciente descubrimiento de una familia de proteínas receptoras de reconocimiento de patrones altamente conservados conocidos como receptores tipo Toll (TLRs) que se piensa están implicados en la inmunidad innata como receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Composiciones y métodos útiles para la modulación de la inmunidad innata son, por lo tanto, de gran interés, ya que pueden afectar a enfoques terapéuticos para afecciones que implican autoinmunidad, inflamación, alergia, asma, rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), infección, cáncer, e inmunodeficiencia, etc..

15 Recientemente ha habido un cierto número de informes que describen el efecto inmunoestimulante de determinados tipos de moléculas de ácido nucleico, incluyendo ácidos nucleicos con CpG, ARNss rico en GU y ARN de doble cadena. Digno de mención, se ha informado que el receptor 9 tipo Toll (TLR9) reconoce el ADN bacteriano y los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG en el que la citosina no está metilada. Véase, p. ej., Hemmi H et al. (2000), Nature 408: 740-5; Bauer S. et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:9237-42. Los efectos de oligonucleótidos que contienen CpG en la modulación inmune se han descrito en las patentes de EE.UU. tales como las Patentes de EE.UU. N^os 6.194.388; 6.207.646; 6.239.116; y 6.218.371; y las solicitudes de patente internacional publicadas tales como WO 98/37919, WO 98/40100, WO 98/52581 y WO 99/56755.

20 Sin embargo, las secuencias específicas de ácidos nucleicos adicionales capaces de acción inmunoestimulante son deseables para proporcionar una estimulación inmune en una diversidad de contextos. Por lo tanto, lo que se necesita son composiciones y métodos relacionados que abarquen estos nuevos ácidos nucleicos inmunoestimulantes.

SUMARIO

30 Los autores de la invención han descubierto que los problemas y limitaciones mencionados anteriormente se pueden superar mediante la puesta en práctica de las invenciones descritas en esta memoria. En particular, los autores de la invención han descubierto que es posible proporcionar composiciones y métodos relacionados, que incluyen una molécula de ácido nucleico aislada inmunoestimulante que comprende una secuencia:

5' - TCGTCGAACGTTTCGCGAACGTTTCG-3' [SEQ ID NO: 1];

en donde al menos un C no está metilado y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden incluir una o más modificaciones estabilizantes, p. ej., modificaciones de grupos 3' OH o 5' OH, modificaciones de bases de nucleótidos, modificaciones de componentes de azúcar y/o modificaciones de grupos fosfato. La modificación estabilizante puede incluir el uso de una cadena principal de fosforotioato. En algunas implementaciones, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes no incluyen una modificación estabilizante.

40 Las composiciones pueden incluir, además, un antígeno, p. ej., un antígeno de células B o un antígeno de células T. Un antígeno de células T puede incluir un antígeno de células T cooperadoras. Antígenos de células B a modo de ejemplo incluyen uno o más de una proteína, un péptido, una molécula pequeña y un hidrato de carbono.

Las composiciones pueden incluir, además, un soporte (p. ej., un soporte de proteína o un nanosoporte sintético) acoplado (p. ej., de forma covalente o no covalente) con el ácido nucleico inmunoestimulante. El nanosoporte sintético, además, se puede acoplar (por ejemplo, de forma covalente o no covalente) a un antígeno. Las composiciones pueden incluir, además, un nanosoporte sintético adicional que no está acoplado al ácido nucleico

aislado inmunoestimulante. El nanosoporte sintético adicional puede, p. ej., acoplarse a un antígeno (p. ej., un antígeno de célula T cooperadora).

La descripción también proporciona ácidos nucleicos que incluyen la secuencia de SEQ ID NO: 1.

5 La descripción proporciona, además, métodos que incluyen administrar a un sujeto una composición o un ácido nucleico descrito en esta memoria.

La descripción proporciona, además, métodos de inducir la producción de IL-6 en un sujeto, que incluyen la administración al sujeto de una composición o un ácido nucleico descrito en esta memoria en una cantidad eficaz para inducir IL-6 en el sujeto.

10 La descripción proporciona, además, métodos de inducir interferón-alfa en un sujeto, que incluyen la administración al sujeto de una composición o un ácido nucleico descrito en esta memoria en una cantidad eficaz para inducir el interferón-alfa en el sujeto.

La descripción proporciona, además, métodos de inducir IP-10 en un sujeto, que incluyen la administración al sujeto de una composición o un ácido nucleico descrito en esta memoria en una cantidad eficaz para inducir IP-10 en el sujeto.

15 La descripción proporciona, además, vacunas que incluyen las composiciones y los ácidos nucleicos descritos en esta memoria.

20 La descripción proporciona, además, métodos que incluyen administrar a un sujeto una composición descrita en esta memoria, que incluye un antígeno en una cantidad eficaz para inducir una respuesta de anticuerpos contra el antígeno en el sujeto. La descripción proporciona, además, el uso de una composición descrita en esta memoria, que incluye un antígeno para inducir una respuesta de anticuerpo contra el antígeno en un sujeto. La descripción proporciona, además, composiciones tal como se describen en esta memoria, que incluyen un antígeno para uso en la inducción de una respuesta de anticuerpo contra el antígeno en un sujeto.

25 La descripción proporciona, además, composiciones inmunoestimulantes y composiciones para inducir una respuesta de anticuerpos contra un antígeno en un sujeto, que incluyen las composiciones y los ácidos nucleicos descritos en esta memoria.

30 Antes de describir la presente invención en detalle, ha de entenderse que esta invención no se limita a materiales o parámetros de proceso particularmente ejemplificados dado que los mismos pueden, por supuesto, variar. Ha de entenderse también que la terminología utilizada en esta memoria tiene el propósito de describir implementaciones particulares de sólo las invenciones, y no se pretende que sea limitativa del uso de terminología alternativa para describir las presentes invenciones.

35 Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes en plural, a menos que el contenido dictamine claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "un polímero" incluye una mezcla de dos o más de este tipo de moléculas o una mezcla de diferentes pesos moleculares de una sola especie de polímero, la referencia a "un disolvente" incluye una mezcla de dos o más de estos disolventes, la referencia a "un adhesivo" incluye mezclas de dos o más de tales materiales, y similares.

Los detalles de una o más implementaciones de la invención se recogen en los dibujos adjuntos y en la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 Las Figs. 1A-1B son gráficos de barras que representan los niveles de citoquinas (1A, IFN- α ; 1B, IL-6), medidos por ELISA de las células mononucleares de la sangre periférica estimuladas en presencia de los oligonucleótidos CpG indicados o la ausencia (NS) de oligonucleótido.

Las Figs. 1C-1D son gráficos de líneas que representan respuesta a la dosis de los niveles de citoquinas (1C, IP-10; 1D, IL-6), medidos por ELISA de las células mononucleares de la sangre periférica estimuladas en presencia de las concentraciones indicadas de oligonucleótidos CpG.

5 La FIG. 2 es un gráfico de barras que muestra los perfiles de citoquinas de células mononucleares de la sangre periférica estimuladas en presencia de Selecta-7 o R848.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que representa los títulos de anticuerpos de ratones a los que se administraron nanopartículas que contenían nicotina y Selecta-7 (NP-7) o una mezcla de nanopartículas de nicotina similar que no contenía un adyuvante (NP[NIC,Ø,S-320] + NP [NIC,Ø,Ø]).

10 La FIG. 4 es un gráfico de barras que representa los títulos de anticuerpos de primates no humanos en las fechas indicadas, administradas las dosis indicadas de nanopartículas que contenían nicotina y Selecta-7 (NP-7).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta descripción proporciona composiciones y métodos relacionados, que incluyen una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante aislada que comprende una secuencia:

5'-TCGTCGAACGTTTCGCGAACGTTTCG-3' [SEQ ID NO: 1];

15 en donde al menos un C no está metilado y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se han identificado clases funcionales distintas de ácidos nucleicos CpG inmunoestimulantes. Ácidos nucleicos CpG de Clase A (tipo A) activan células asesinas naturales (NK) y estimulan la maduración de células dendríticas e inducen la producción de IP-10 e interferones de tipo I (incluyendo IFN α). Ácidos nucleicos CpG de Clase B (tipo B) son fuertes estimuladores de células B humanas y de la maduración de monocitos, estimulando la producción de IL-6 (pero no interferones de tipo I).

20

Estas diferencias funcionales se reflejan en características estructurales distintas: polinucleótidos de la Clase A exhiben una secuencia poli G en uno o en ambos de los extremos 5' y 3' con una secuencia palíndromo interna que contiene dinucleótidos GC, mientras que los polinucleótidos de la Clase B contienen uno o más de los motivos hexaméricos: 5'-Pu Py C G Py Pu-3'.

25 Más recientemente, se han descrito ácidos nucleicos CpG de la clase C (tipo C) que combinan las propiedades tanto de Clase A como de Clase B. Por lo tanto, los polinucleótidos de Clase C activan células NK y estimulan la producción de IL-6, IFN α e IP-10 como así como la maduración de células dendríticas, células B y monocitos.

Esta amplia inmunoestimulación de los componentes tanto innatos como adaptativos del sistema inmunológico es de profunda importancia clínica y en la actualidad existe una necesidad de polinucleótidos inmunoestimulantes de tipo C adicionales.

30

Para este fin, se han formulado determinadas reglas (y se han identificado motivos estructurales particulares) para polinucleótidos de tipo C. Por ejemplo, el documento WO 03/015711 identifica una combinación de un motivo estimulante (tal como un motivo CpG o la secuencia TCGTCG) con un palíndromo rico en CG (por lo menos dos tercios de G y C) o un motivo neutralizante, y describe el oligodesoxinucleótido 22-mero (ODN) 2395 (ahora considerado como un ODN tipo-C prototípico). ODN 2395 tiene la siguiente secuencia enlazada a fosforotioato:

35

5'-tcgtcgttttcgpcgpcgpcg-3' [SEQ ID NO: 8].

Intentos posteriores de ampliar la gama de oligonucleótidos de tipo C aplicaron diferentes reglas y moldes estructurales. Por ejemplo, el documento WO 05/042018 describe oligonucleótidos CpG de la clase C estructuralmente distintos con un palíndromo imperfecto en o cerca del extremo 3' que están diseñados para formar estructuras dúplex o de orden superior *in vivo*.

40

Sin embargo, las relaciones estructura-función que regulan la actividad de los oligonucleótidos de tipo C siguen no estando claras y sigue habiendo una necesidad de ensayos empíricos de un gran número de variantes de la secuencia.

5 Los autores de la presente invención han descubierto inesperadamente que los ácidos nucleicos que no se ajustan a las normas anteriores y que comprenden la secuencia:

5'-TCGT CGAACGTT CGCGAACGTT CG-3' [SEQ ID NO: 1];

exhiben una potente actividad inmunoestimulante de tipo C.

10 Los Ejemplos ilustran la actividad biológica de una implementación de la presente invención, y también varias secuencias de ácidos nucleicos y composiciones diferentes, útiles en la presente invención descritas en esta memoria. El Ejemplo 1, en particular, proporciona soporte para la clasificación de los ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID NO: 1 como ácidos nucleicos inmunoestimulantes de tipo C.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporcionan ácidos nucleicos inmunoestimulantes de tipo C que comprenden la secuencia:

5'-TCGT CGAACGTT CGCGAACGTT CG-3' [SEQ ID NO: 1];

15 en donde al menos un C (p. ej., uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o todos los siete C) no está metilado.

Los ácidos nucleicos se pueden aislar.

Alternativamente, o además, los ácidos nucleicos pueden cumplir con los términos de los parámetros de longitud recogidos en esta memoria.

20 Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden tener una longitud en el intervalo de entre 24 y 100 nucleótidos. En algunas implementaciones, la longitud está en el intervalo de 24-30, 24-40, 24-50, 24-60, 24-70, 24-80 o 24-90 nucleótidos.

Los ácidos nucleicos, tal como se definen anteriormente, pueden consistir, o consistir esencialmente, en la secuencia:

5'-TCGT CGAACGTT CGCGAACGTT CG-3' [SEQ ID NO: 1].

25 Los ácidos nucleicos tal como se definen en uno cualquiera de los párrafos anteriores pueden comprender, además, una extensión de secuencia 5'. En tales implementaciones, los ácidos nucleicos pueden retener un hexámero TCGTCG como extremo 5'.

Los ácidos nucleicos tal como se definen en uno cualquiera de los párrafos anteriores pueden comprender, además, una extensión de secuencia 3'.

30 Por lo tanto, los ácidos nucleicos, tal como se definen en uno cualquiera de los párrafos anteriores, pueden comprender, además, extensiones de secuencia tanto 5' como 3'.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden los ácidos nucleicos del primer aspecto de las invenciones tal como se define en uno cualquiera de los párrafos precedentes.

35 Las composiciones del segundo aspecto pueden ser composiciones farmacéuticas que comprenden, además, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones del segundo aspecto pueden comprender, además, uno o más antígenos, p. ej., tal como se define en esta memoria.

Las composiciones del segundo aspecto pueden comprender, además, uno o más soportes (p. ej., tal como se define en esta memoria) junto con el ácido nucleico inmunoestimulante.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporcionan vacunas que comprenden los ácidos nucleicos descritos en esta memoria. Las vacunas pueden comprender, además, uno o más antígenos.

- 5 De acuerdo con un cuarto aspecto de las presentes invenciones se proporcionan ácidos nucleicos tal como se definen en esta memoria y en cualquiera de los párrafos precedentes para uso en terapia o profilaxis.

En el cuarto aspecto de las invenciones, los ácidos nucleicos tal como se definen en esta memoria y en cualquiera de los párrafos precedentes se utilizan en: (a) la vacunación (por ejemplo, vacunación profiláctica o terapéutica); (b) la inducción de la producción de IL-6 en un sujeto; (c) la inducción de la producción de interferón de tipo I (p. ej., IFN α) en un sujeto; (d) la inducción de interferón de tipo II (p. ej., IFN γ) en un sujeto; (e) la inducción de la producción de IP-10 en un sujeto; (f) la activación de células NK endógenas en un sujeto; (g) la estimulación de células dendríticas endógenas en un sujeto; (h) la estimulación de células B endógenas en un sujeto; (i) la estimulación de monocitos endógenos en un sujeto; (j) el tratamiento o la profilaxis de una infección, por ejemplo una infección bacteriana, viral, fúngica o por metazoos; (k) el tratamiento o la profilaxis de una afección alérgica (p. ej., asma); (l) el tratamiento o la profilaxis de cáncer; (m) inducir, potenciar, modular, dirigir o redirigir una respuesta inmune; (n) el tratamiento o la profilaxis de enfermedades metabólicas; (o) el tratamiento o la profilaxis de enfermedades degenerativas; (p) el tratamiento o la profilaxis de enfermedades autoinmunes; (q) el tratamiento o la profilaxis de enfermedades inflamatorias; (r) el tratamiento o la profilaxis de enfermedades, trastornos y/o afecciones inmunológicas; (s) el tratamiento o la profilaxis de una adicción (por ejemplo, una adicción a la nicotina o un narcótico); o (t) el tratamiento o la profilaxis de una afección que resulta de la exposición a una toxina, sustancia peligrosa, toxina ambiental, u otro agente dañino.

Usos profilácticos y terapéuticos adicionales de los ácidos nucleicos descritos en esta memoria se describen con más detalle a continuación.

25 En cada uno de los aspectos anteriores que se definen en los párrafos precedentes, los ácidos nucleicos pueden comprender modificaciones, p. ej., modificaciones estabilizantes. Tales modificaciones estabilizantes pueden comprender modificaciones de grupos 3' OH o 5' OH, modificaciones de bases de nucleótidos, modificaciones de componentes de azúcar o modificaciones de grupos fosfato. En algunas implementaciones, la modificación estabilizante comprende una cadena principal de fosforotioato.

Todavía otros aspectos de las invenciones son como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

30 Las invenciones se describirán ahora con más detalle a continuación.

DEFINICIONES

"Adyuvante" significa un agente que no constituye un antígeno específico, pero que aumenta la fuerza y la longevidad de la respuesta inmune a un antígeno co-administrado. Adyuvantes de este tipo pueden incluir, pero no se limitan a estimulantes de los receptores de reconocimiento de patrones tales como receptores de tipo Toll, receptores de tipo RIG-1 y NOD (NLR), sales minerales tales como el alumbre, alumbre combinado con monofosforil lípido (MPL) A de enterobacterias tales como *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri* o específicamente con MPL® (AS04), MPL A de las bacterias mencionadas anteriormente por separado, saponinas tales como QS-21, Quil-A, ISCOMs, ISCOMATRIX™, emulsiones tales como MF59™, Montanide® ISA 51 e ISA 720, AS02 (QS21 + escualeno + MPL®), liposomas y formulaciones de liposomas tales como AS01, micropartículas y micro-soportes sintetizados o específicamente preparados tales como las vesículas de la membrana externa (OMV) derivadas de bacterias de *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, y otros, o partículas de quitosano, agentes formadores de depósitos tales como copolímeros de bloques Pluronic®, péptidos específicamente modificados o preparados tales como dipéptido de muramilo, aminoalquil-glucosaminida 4-fosfatos tales como RC529, o proteínas tales como toxoides bacterianos o fragmentos de toxina.

45 En implementaciones, los adyuvantes comprenden agonistas para los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), incluyendo, pero no limitados a receptores tipo Toll (TLRs), específicamente TLRs 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y/o combinaciones de los mismos. En otras implementaciones, adyuvantes comprenden agonistas para receptores tipo Toll 3, agonistas para receptores tipo Toll 7 y 8 o agonistas para receptores tipo Toll 9; preferiblemente, los

adyuvantes citados comprenden imidazoquinolinas; tales como R848; derivados de adenina tales como los descritos en la patente de EE.UU. 6.329.381 (Sumitomo Pharmaceutical Company); ADN inmunoestimulante; o ARN inmunoestimulante. En implementaciones específicas, las composiciones de la invención incorporan como adyuvantes compuestos que son agonistas para los receptores tipo Toll (TLRs) 7 y 8 ("agonistas de TLR 7/8"). De utilidad son los compuestos agonistas de TLR 7/8 descritos en la Patente de EE.UU. 6.696.076 expedida a Tomai et al., Incluyendo, pero no limitados a aminas imidazoquinolina, aminas imidazopiridina, aminas cicloalquilimidazopiridinas 6,7-condensadas, y aminas imidazoquinolina 1,2-puenteadas.

Adyuvantes útiles incluyen imiquimod y resiquimod (también conocido como R848). En implementaciones específicas, un adyuvante puede ser un agonista para la molécula de superficie CD40. En determinadas implementaciones, para estimular la inmunidad en lugar de la tolerancia, una composición de la invención incorpora un adyuvante que fomenta la maduración de DC (necesario para el cebado de células T naif) y la producción de citoquinas tales como interferones de tipo I, que fomentan respuestas inmunes de anticuerpos. En implementaciones, los adyuvantes también pueden incluir moléculas de ARN inmunoestimulantes tales como, pero no limitado a ARNds o poli I:C (un estimulante de TLR3), y/o los descritos en F. Heil et al., "Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8" *Science* 303(5663), 1526-1529 (2004); J. Vollmer et al., "Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides" documento WO 2008033432 A2; A. Forsbach et al., "Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway" documento WO 2007062107 A2; E. Uhlmann et al., "Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity" Sol. de Pat. Publ. de EE.UU. US 2006/0241076; G. Lipford et al., "Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections" documento WO 2005097993 A2; G. Lipford et al., "Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods" documento WO 2003086280 A2. En algunas implementaciones, un adyuvante puede ser un agonista de TLR-4 tales como lipopolisacárido (LPS) bacteriano, VSV-G y/o HMGB-1. En algunas implementaciones, los adyuvantes pueden comprender agonistas de TLR-5 tales como flagelina, o partes o derivados de los mismos, incluyendo, pero no limitados a los descritos en las Patentes de EE.UU. 6.130.082, 6.585.980 y 7.192.725.

En implementaciones específicas, las composiciones de la invención incorporan un ligando para el receptor de tipo Toll (TLR)-9 tal como moléculas de ADN inmunoestimulantes que comprenden CpGs, que inducen la secreción de interferón de tipo I y estimulan la activación de células T y B, conduciendo a una producción incrementada de anticuerpos y respuestas citotóxicas de células T (Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature*. 1995. 374:546-549; Chu et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.* 1997. 186:1623-1631; Lipford et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur. J. Immunol.* 1997. 27:2340-2344; Roman et al. "Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants," *Nat. Med.* 1997. 3:849-854; Davis et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998. 160:870-876; Lipford et al., "Bacterial DNA as immune cell activator," *Trends Microbiol.* 1998. 6:496-500; patente de EE.UU. 6.207.646 expedida a Krieg et al.; patente de EE.UU. 7.223.398 expedida a Tuck et al.; patente de EE.UU. 7.250.403 expedida a Van Nest et al.; o patente de EE.UU. 7.566.703 expedida a Krieg et al. En implementaciones preferidas en las que un adyuvante comprende un ligando para el receptor de tipo Toll (TLR)-9 tales como moléculas de ADN inmunoestimulantes que comprenden CpGs, las moléculas de ADN inmunoestimulantes no comprenden ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID NO: 1.

En algunas implementaciones, los adyuvantes pueden ser estímulos pro-inflamatorios liberados de células necróticas (p. ej., cristales de urato). En algunas implementaciones, los adyuvantes pueden ser componentes activados de la cascada del complemento (p. ej., CD21, CD35, etc.). En algunas implementaciones, los adyuvantes pueden ser componentes activados de complejos inmunes. Los adyuvantes también pueden incluir agonistas de los receptores del complemento tal como una molécula que se une a CD21 o CD35. En algunas implementaciones, el agonista del receptor del complemento induce una opsonización del complemento endógena del nanosoproteo sintético. En algunas implementaciones, los adyuvantes son citoquinas, que son pequeñas proteínas o factores biológicos (en el intervalo de 5 kD - 20 kD) que son liberados por las células y que tienen efectos específicos en la interacción célula-célula, la comunicación y el comportamiento de otras células. En algunas implementaciones, el agonista del receptor de citoquinas es una molécula pequeña, anticuerpo, proteína de fusión o aptámero.

En diversas implementaciones, al menos una parte de la dosis de adyuvante se puede acoplar a nanosoproteos sintéticos, p. ej., toda la dosis de adyuvante puede ser acoplado a nanosoproteos sintéticos. En otras implementaciones, al menos una parte de la dosis del adyuvante no está acoplado a los nanosoproteos sintéticos. En determinadas implementaciones, la dosis de adyuvante comprende dos o más tipos de adyuvantes. Por ejemplo, y

sin limitación, se pueden combinar adyuvantes que actúan sobre diferentes receptores de TLR. Como un ejemplo, en una implementación, un agonista de TLR 7/8 se puede combinar con un agonista de TLR 9. En otra implementación, un agonista de TLR 7/8 se puede combinar con un agonista de TLR 4. En aún otra implementación, un agonista de TLR 9 se puede combinar con un agonista de TLR 3.

5 "Administrar" o "administración" significa proporcionar un fármaco a un sujeto de una manera que sea farmacológicamente útil.

"Antígeno" significa un antígeno de células B o antígeno de células T. En determinadas implementaciones, los antígenos están acoplados a los nanosoportes sintéticos. En otras implementaciones, los antígenos no están acoplados a los nanosoportes sintéticos. En implementaciones, los antígenos se co-administran con los nanosoportes sintéticos. En otras implementaciones antígenos no se co-administran con los nanosoportes sintéticos. "Tipo(s) de antígenos" significa moléculas que comparten las mismas, o sustancialmente las mismas características antigénicas.

"Antígeno de células B" se refiere a cualquier antígeno que es o es reconocido por y desencadena una respuesta inmune en una célula B (p. ej., un antígeno que es reconocido específicamente por un receptor de células B en una célula B). En algunas implementaciones, un antígeno que es un antígeno de células T es también un antígeno de células B. En otras implementaciones, el antígeno de células T no es también un antígeno de células B. Antígenos de células B incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos, moléculas pequeñas (que significan moléculas con un peso molecular medio ponderal de menos de 10.000), e hidratos de carbono. En algunas implementaciones, el antígeno de células B es un antígeno no proteico (es decir, no es un antígeno de la proteína o péptido). En algunas implementaciones, el antígeno de células B es un hidrato de carbono asociado con un agente infeccioso. En algunas implementaciones, el antígeno de células B es una glicoproteína o glicopéptido asociado con un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser una bacteria, un virus, un hongo, un protozoo o un parásito. En algunas implementaciones, el antígeno de células B es un antígeno escasamente inmunogénico. En algunas implementaciones, el antígeno de células B es una sustancia de abuso o una parte de la misma. En algunas implementaciones, el antígeno de células B es una sustancia adictiva o una parte de la misma. Sustancias adictivas incluyen, pero no se limitan a nicotina, un narcótico, un supresor de la tos, un tranquilizante y un sedante. En algunas implementaciones, el antígeno de células B es una toxina tal como una toxina de un arma química o de fuentes naturales. El antígeno de células B también puede ser un agente ambiental peligroso. En algunas implementaciones, el antígeno de células B es un antígeno propio. En otras implementaciones, el antígeno de células B comprende un aloantígeno, un alérgeno, un sensibilizador de contacto, un antígeno de una enfermedad degenerativa, un hapteno, un antígeno de una enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de la enfermedad atópica, un antígeno de una enfermedad autoinmune, una sustancia adictiva, un xenoantígeno o una enzima de enfermedad metabólica o producto enzimático de la misma.

"Soporte" significa una sustancia que puede ser co-administrada con el ácido nucleico aislado inmunoestimulante de la invención, y que puede alterar características in vivo del ácido nucleico aislado inmunoestimulante de la invención tal como la farmacocinética, la estabilidad y la circulación. Los soportes difieren de excipientes farmacéuticamente aceptables en que los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden materiales farmacológicamente inactivos, mientras que los soportes comprenden materiales que pueden alterar las características in vivo del ácido nucleico aislado inmunoestimulante de la invención. En diversas implementaciones, los soportes pueden comprender nanosoportes que comprenden PLG, PLGA, o sílice; perfluorocarbono(s); lípidos; gelatina; quitosano; o ciclodextrina. En otras implementaciones, los soportes pueden comprender también proteínas tales como albúmina, colágeno, o la proteína de la difteria CRM197.

"Co-administrado" significa la administración de dos o más sustancias a un sujeto de una manera que se correlaciona en el tiempo. En implementaciones, la coadministración puede producirse a través de la administración de dos o más sustancias en la misma forma de dosificación. En otras implementaciones, la coadministración puede abarcar la administración de dos o más sustancias en formas de dosificación diferentes, pero dentro de un período especificado de tiempo, p. ej., en el espacio de 1 mes, en el espacio de 1 semana, en el espacio de 1 día o en el espacio de 1 hora.

"Acoplar" o "acoplado" o "acoplas" (y similares) significa asociar químicamente una entidad (por ejemplo, un resto) con otro. En algunas implementaciones, el acoplamiento es covalente, lo que significa que el acoplamiento se produce en el contexto de la presencia de un enlace covalente entre las dos entidades. En implementaciones no covalentes, el acoplamiento no covalente es mediado por interacciones no covalentes que incluyen, pero no se limita a cargar interacciones, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones

hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento TT, interacciones de enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo y/o combinaciones de las mismas. En implementaciones, la encapsulación es una forma de acoplamiento.

- 5 "Ácido nucleico inmunoestimulante de tipo C" es un ácido nucleico que contiene al menos un CpG no metilado, y que puede estimular la producción, entre otros, de IL-6, IP-10 e IFN α *in vivo*, y puede estimular las células dendríticas plasmacitoides.

10 "Encapsular" significa para encerrar dentro de un nanosoporte sintético, preferiblemente encerrar por completo dentro de un nanosoporte sintético. La mayor parte o la totalidad de una sustancia que se encapsula no está expuesta al entorno local externo al nanosoporte sintético. La encapsulación es distinta de la absorción, lo que sitúa la mayoría o toda una sustancia en una superficie de un nanosoporte sintético y deja a la sustancia expuesta al entorno local externo al nanosoporte sintético.

15 "Inmunoestimulante" significa que una sustancia tiene un efecto estimulante sobre el sistema inmunológico. Sustancias de este tipo se pueden identificar fácilmente utilizando ensayos estándares que indican diversos aspectos de la respuesta inmune tales como la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos, la activación de células NK y la proliferación de células T. Véase, p. ej., el documento WO 97/28259; el documento WO 98/16247; el documento WO 99/11275; Krieg et al. (1995) *Nature* 374: 546-549; Yamamoto et al. (1992) *J. Immunol.* 148: 4072-76; Ballas et al. (1996) *J. Immunol.* 157: 1840-1845; Klinman et al. (1997) *J. Immunol.* 158:3635-39; Sato et al. (1996) *Science* 273:352-354; Pisetsky (1996) *J. Immunol.* 156: 421-423; Shimada et al. (1986) *J. Cancer Res.* japonesa 77:808-816; Cowdery et al. (1996) *J. Immunol.* 156: 4570-75; Roman et al. (1997) *Nat. Med.* 3:849-854; Lipford et al. (1997a) *Eur. J. Immunol.* 27:2340-44; documento WO 98/55495 y documento WO 00/61151. En consecuencia, estos y otros métodos se pueden utilizar para identificar, testar y/o confirmar sustancias inmunoestimulantes tales como nucleótidos inmunoestimulantes, preferiblemente ácidos nucleicos aislados inmunoestimulantes.

25 "Ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico que se sintetiza o se separa de su entorno nativo y que está presente en cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Un ácido nucleico aislado puede ser una que es (i) amplificado *in vitro* mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido de forma recombinante por clonación; (iii) purificado tal como por escisión y separación en gel; o (iv) es sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que es fácilmente manipulable por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos contenida en un vector en el que se conocen sitios de restricción 5' y 3' o para los que se han descrito secuencias de cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera aislada, pero no una secuencia de ácido nucleico que existe en su estado nativo en su huésped natural. Ácidos nucleicos aislados se pueden aislar utilizando procesos convencionales de aislamiento de polinucleótidos. Tales procesos incluyen, pero no se limitan a la hibridación de sondas a bancos genómicos o de ADNc para detectar secuencias de nucleótidos compartidas, rastreo de anticuerpos de bancos de expresión para detectar características estructurales compartidas y síntesis de secuencias nativas particulares por parte de la reacción en cadena de la polimerasa.

40 Un ácido nucleico aislado puede estar sustancialmente purificado, pero no tiene por qué. Por ejemplo, un ácido nucleico que está aislado dentro de un vector de clonación o expresión no es puro, ya que puede comprender sólo un minúsculo porcentaje del material en la célula en la que reside. Un ácido nucleico de este tipo está aislado, sin embargo, como el término se utiliza en esta memoria, porque es fácilmente manipulable por técnicas estándares conocidas por los expertos ordinarios en la técnica. Cualquiera de los ácidos nucleicos proporcionados en esta memoria puede ser aislado. En el contexto de la presente invención, ácido nucleico se utiliza de forma indistinta con la expresión ácido polinucleico, que se pretende que abarque compuestos que comprenden múltiples residuos de ácido nucleico.

50 "Dimensión máxima de un nanosoporte sintético" significa la dimensión más grande de un nanosoporte medida a lo largo de cualquier eje del nanosoporte sintético. "Dimensión mínima de un nanosoporte sintético" significa la dimensión más pequeña de un nanosoporte sintético medida a lo largo de cualquier eje del nanosoporte sintético. Por ejemplo, para un nanosoporte sintético esférico, la dimensión máxima y mínima de un nanosoporte sintético serían sustancialmente idénticas, y sería el tamaño de su diámetro. De manera similar, para un nanosoporte sintético cúbico, la dimensión mínima de un nanosoporte sintético sería la más pequeña de su altura, anchura o longitud, mientras que la dimensión máxima de un nanosoporte sintético sería la más grande de su altura, anchura o longitud. En una implementación, una dimensión mínima de al menos 75%, preferiblemente 80%, más

preferiblemente 90% de los nanosoportes sintéticos en una muestra, basada en el número total de nanosoportes sintéticos en la muestra, es mayor que 100 nm. En una implementación, una dimensión máxima de al menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% de los nanosoportes sintéticos en una muestra, basada en el número total de nanosoportes sintéticos en la muestra, es igual o inferior a 5 µm. Preferiblemente, una dimensión mínima de al menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90% de los nanosoportes sintéticos en una muestra, basada en el número total de nanosoportes sintéticos en la muestra, es mayor que 110 nm, más preferiblemente mayor que 120 nm, más preferiblemente mayor que 130 nm, y más preferentemente aún mayor que 150 nm. Relaciones de aspectos de las dimensiones máximas y mínimas de nanosoportes sintéticos de la invención pueden variar dependiendo de la implementación. Por ejemplo, relaciones de aspecto de las dimensiones máximas a mínimas de los nanosoportes sintéticos pueden variar de 1:1 a 1.000.000:1, preferiblemente de 1:1 a 100.000:1, más preferiblemente de 1:1 a 1000:1, aún preferiblemente de 1:1 a 100:1, y aún más preferiblemente de 1:1 a 10:1. Preferiblemente, una dimensión máxima de al menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90%, de los nanosoportes sintéticos en una muestra, basado en el número total de nanosoportes sintéticos en la muestra es igual o inferior a 3 µm, más preferiblemente igual a o menor que 2 µm, más preferiblemente igual a o menor que 1 µm, más preferiblemente igual a o menor que 800 nm, más preferiblemente igual a o menor que 600 nm, y más preferentemente todavía igual a o menor que 500 nm. En implementaciones preferidas, una dimensión máxima de al menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 90%, de los nanosoportes sintéticos en una muestra, basado en el número total de nanosoportes sintéticos en la muestra, es igual a o mayor que 100 nm, más preferiblemente igual a o mayor que 120, más preferiblemente mayor que 130 nm, más preferiblemente mayor que 140 nm, y más preferentemente aún mayor que 150 nm. La medición de los tamaños de los nanosoportes sintéticos se obtiene suspendiendo los nanosoportes sintéticos en un medio líquido (habitualmente acuoso) y el uso de la dispersión de luz dinámica (p. ej., utilizando un instrumento Brookhaven ZetaPALS).

"Ácido nucleico" en el contexto de los ácidos nucleicos inmunoestimulantes de la invención significa una cadena de nucleótidos enlazados o nucleótidos modificados. Los restos azúcar pueden ser ribosa, desoxirribosa o cualquiera de los diversos azúcares modificados tal como se describe en esta memoria (incluyendo combinaciones de los mismos). Los restos base pueden ser cualesquiera bases de purina o pirimidina, incluyendo C, A, T, G, U y cualquiera de las bases modificadas tal como se describe en esta memoria (incluyendo combinaciones de las mismas). Los ácidos nucleicos pueden estar enlazados por enlaces fosfodiéster naturales, o por cualquiera de los otros enlaces descritos en esta memoria (incluyendo, por ejemplo, enlaces fosforotioato, exhibiendo así una cadena principal modificada), incluyendo combinaciones de los mismos. El ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o doble, y puede ser de cualquier topología/conformación (incluyendo ramificada, circular y en forma de horquilla). La modificación de los ácidos nucleicos de la invención con este tipo de azúcares modificados, bases y/o cadenas principales son preferiblemente modificaciones estabilizantes tal como se describe en esta memoria.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un material farmacológicamente inactivo utilizado para formular las composiciones de la invención. Excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden una diversidad de materiales conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, auxiliares de reconstitución, colorantes, solución salina, tampones inorgánicos u orgánicos (p. ej., sales de sodio o potasio de fosfato, carbonato, acetato o citrato; incluyendo solución salina tamponada con fosfato), agentes de ajuste del pH (p. ej., ácido clorhídrico, hidróxido sódico o potásico, sales de citrato o acetato, aminoácidos y sus sales) antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, alfa-tocoferol), tensioactivos (p. ej., polisorbato 20, polisorbato 80, polioxietileno 9-10 nonil-fenol, desoxicolato de sodio), di solución y/o estabilizadores de crio/lío (p. ej., sacarosa, lactosa, manitol, trehalosa), agentes de ajuste osmótico (p. ej., sales o azúcares), agentes antibacterianos (p. ej., ácido benzoico, fenol, gentamicina), agentes antiespumantes (p. ej., polidimetilsiloxano), conservantes (p. ej., timerosal, 2-fenoxietanol, EDTA), estabilizantes poliméricos y agentes de ajuste de la viscosidad (p. ej., polivinilpirrolidona, poloxámero 488, carboximetilcelulosa) y co-disolventes (p. ej., glicerol, polietilenglicol, etanol).

"Sujeto" significa seres humanos y animales, incluyendo mamíferos de sangre caliente tales como los primates; aves; animales domésticos o de granja tales como gatos, perros, ovejas, cabras, vacas, caballos y cerdos; animales de laboratorio tales como ratones, ratas y cobayas; pescado; reptiles; animales de zoológico y salvajes; y similares.

"Nanosoporte(s) sintético(s)" significa un objeto discreto que no se encuentra en la naturaleza, y que posee al menos una dimensión que es menor que o igual a 5 micras de tamaño. Nanopartículas de albúmina generalmente se incluyen como nanosoportes sintéticos, sin embargo, en determinadas implementaciones los nanosoportes sintéticos no comprenden nanopartículas de albúmina. En implementaciones, nanosoportes sintéticos de la invención no comprenden quitosano.

Un nanosoporte sintético puede ser, pero no se limita a uno o una pluralidad de nanopartículas basadas en lípidos, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, emulsiones a base de tensoactivos, dendrímeros, fulerenos,

nanocables, partículas tipo virus, partículas basadas en péptidos o proteínas (tales como nanopartículas de albúmina) y/o nanopartículas que se desarrollan utilizando una combinación de nanomateriales tales como nanopartículas de lípidos-polímeros. Los nanosopores sintéticos pueden tener una variedad de diferentes formas, incluyendo, pero no limitadas a esférica, cuboidal, piramidal, oblonga, cilíndrica, toroidal y similares. Nanosopores sintéticos de acuerdo con la invención comprenden una o más superficies. Nanosopores sintéticos a modo de ejemplo que se pueden adaptar para su uso en la práctica de la presente invención comprenden: (1) las nanopartículas biodegradables descritas en la Patente de EE.UU. 5.543.158 expedida a Gref et al., (2) las nanopartículas poliméricas de la solicitud de patente publicada US 2006/0002852 expedida a Saltzman et al., (3) las nanopartículas construidas por litografía de la solicitud de patente publicada US 2009/0028910 expedida a DeSimone et al., (4) la descripción del documento WO 2009/051837 de von Andrian et al. o (5) las nanopartículas descritas en la solicitud de patente publicada US 2008/0145441 expedida a Penades et al. En implementaciones, los nanosopores sintéticos pueden poseer una relación de aspecto mayor que 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, o mayor que 1:10.

Nanosopores sintéticos de acuerdo con la invención que tienen una dimensión mínima igual a o menor que 100 nm, preferiblemente igual a o menor que aproximadamente 100 nm, no comprenden una superficie con grupos hidroxilo que activan el complemento o, alternativamente, comprender una superficie que consiste esencialmente en restos que no son grupos hidroxilo que activan el complemento. En determinadas implementaciones, nanosopores sintéticos tal como se describen en esta memoria que tienen una dimensión mínima igual o menor que aproximadamente 100 nm, p. ej., igual a o menor que aproximadamente 100 nm, no comprenden una superficie que activa sustancialmente el complemento o, alternativamente, comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no activan sustancialmente el complemento. En una implementación más preferida, nanosopores sintéticos de acuerdo con la invención que tienen una dimensión mínima igual a o menor que aproximadamente 100 nm, preferiblemente igual a o menor que aproximadamente 100 nm, no comprenden una superficie que activa el complemento o, alternativamente, comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no activan el complemento. En implementaciones, los nanosopores sintéticos excluyen partículas similares a virus (VLPs). En implementaciones, cuando los nanosopores sintéticos comprenden partículas similares a virus, las partículas similares a virus comprenden adyuvante no natural (lo que significa que las VLPs comprenden un adyuvante que no es ARN que se produce de forma natural, generado durante la producción de las VLPs). En implementaciones, los nanosopores sintéticos pueden poseer una relación de aspecto mayor que 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, o mayor que 1:10.

"Antígeno de células T" significa cualquier antígeno que es reconocido por y desencadena una respuesta inmune en una célula T (p. ej., un antígeno que es reconocido específicamente por un receptor de células T en una célula T o una célula NKT a través de la presentación del antígeno o parte del mismo unido a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de Clase I o Clase II, o unido a un complejo CD1. En algunas implementaciones, un antígeno que es un antígeno de células T es también un antígeno de células B. En otras implementaciones, el antígeno de células T no es también un antígeno de células B. Los antígenos de células T son generalmente proteínas o péptidos. Los antígenos de células T pueden ser un antígeno que estimula una respuesta de células T CD8 +, una respuesta de células T CD4 +, o ambos. Los nanosopores, por lo tanto, en algunas implementaciones pueden estimular eficazmente ambos tipos de respuestas. En implementaciones, los antígenos de células T pueden comprender uno o más de los siguientes: tétanos: TT830-843, TT947-967; difteria DT331-350, adenovirus H910-924; CMV pp65, sarampión F288-302, F421-435, F256-270, NP335-345; HCV A1248-1261, C1781-1800, D2571-2590; gripe HA91-108, HA307-319, HA354-372.

En algunas implementaciones el antígeno de células T es un antígeno de células T cooperadoras (es decir, uno que puede generar una respuesta mejorada a un antígeno de células B no relacionado a través de la estimulación de células T cooperadoras). En implementaciones, un antígeno de célula T cooperadora puede comprender uno o más péptidos obtenidos o derivados de toxoide del tétanos, el virus de Epstein-Barr, virus de la gripe, virus sincitial respiratorio, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, citomegalovirus, adenovirus, toxoide de la difteria, o un péptido PADRE (conocido del trabajo de Sette et al. Patente de EE.UU. 7.202.351). En otras implementaciones, un antígeno de células T cooperadoras puede comprender uno o más lípidos, o glicolípidos, que incluyen, pero no se limitan a: α -galactosilceramida (α -GalCer), glicoesfingolípidos α -enlazados (de *Sphingomonas* spp.), galactosil diacilglicerol (de *Borrelia burgdorferi*), lipofosfoglicano (de *Leishmania donovani*) y tetramanosido de fosfatidilinositol (PIM4) (de *Mycobacterium leprae*). Para lípidos y/o glicolípidos adicionales, útiles como un antígeno de células T cooperadoras, véase V. Cerundolo et al., "Harnessing invariant NKT Cells in vaccination strategies". Nature Rev Immun, 9: 28-38 (2009). En implementaciones, los antígenos de células T CD4 + pueden ser derivados de un antígeno de células T CD4 + que se obtiene de una fuente, tal como una fuente natural. En tales implementaciones, las secuencias de antígenos de células T CD4 +, tales como los péptidos que se unen a MHC II, pueden tener al menos 70%, 80%, 90% o 95% de identidad con el antígeno obtenido a partir de la fuente. En

implementaciones, el antígeno de células T, preferiblemente un antígeno de células T cooperadoras, se puede acoplar a, o desacoplar de un nanosoporte sintético.

"Vacuna" significa una composición de materia que mejora la respuesta inmune a un patógeno o enfermedad particular. Una vacuna contiene típicamente factores que estimulan el sistema inmune de un sujeto para reconocer un antígeno específico como extraño y eliminarlo del cuerpo del sujeto. Una vacuna también establece una "memoria" inmunológica, de modo que el antígeno será reconocido rápidamente y responderá si una persona es re-desafiada. Las vacunas pueden ser profilácticas (por ejemplo, para prevenir una futura infección por cualquier patógeno) o terapéuticas (por ejemplo, una vacuna contra un antígeno específico del tumor para el tratamiento del cáncer). En implementaciones, una vacuna puede comprender las formas de dosificación de acuerdo con la invención.

ÁCIDOS NUCLEICOS

En implementaciones, la invención abarca composiciones que comprenden un ácido nucleico aislado inmunoestimulante, que comprende:

5'-TCGTCTGAACGTTTCGCGAACGTTTCG-3' [SEQ ID NO: 1].

En implementaciones, las composiciones de la invención comprenden de 0,001 microgramos a 100.000 microgramos del oligonucleótido enumerado; 0,01 microgramos a 10.000 microgramos del oligonucleótido enumerado; 0,1 microgramos a 1.000 microgramos del oligonucleótido enumerado; 1 microgramo a 500 microgramos de los oligonucleótidos enumerados, o 1 microgramo a 200 microgramos de los oligonucleótidos enumerados. En determinadas implementaciones, ninguno de los oligonucleótidos enumerados está absorbido a una superficie de los nanosopores sintéticos.

En implementaciones, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes aislados de la presente invención generan un patrón de respuesta de citoquinas característico de ácidos nucleicos que contienen CpG de "tipo C". Este patrón de citoquinas se puede distinguir de un ácido nucleico que contiene CpG de "tipo B", debido a que los tipos tanto B como C inducen la expresión de IL-6, mientras que sólo los de tipo C inducen también la expresión de interferón-alfa e IP-10. Por consiguiente, y como se ve en los Ejemplos, en diversas implementaciones, los ácidos nucleicos enumerados inducen la producción de IL-6 en un sujeto cuando cualquiera de las composiciones de la invención se administran al sujeto en una cantidad eficaz para inducir IL-6 en el sujeto. En determinadas implementaciones, los ácidos nucleicos enumerados inducen interferón-alfa en un sujeto cuando cualquiera de las composiciones de la invención se administra al sujeto en una cantidad eficaz para inducir la producción de interferón-alfa en el sujeto. En algunas implementaciones, los ácidos nucleicos enumerados inducen IP-10 en un sujeto cuando cualquiera de las composiciones de la invención se administran al sujeto en una cantidad eficaz para inducir la producción de IP-10 en el sujeto.

En determinadas implementaciones, los ácidos nucleicos enumerados no comprenden modificaciones estabilizantes, preferiblemente dichos ácidos nucleicos comprenden una cadena principal de fosfodiéster.

En implementaciones, los ácidos nucleicos enumerados pueden contener modificaciones estabilizantes. Las modificaciones estabilizantes de los ácidos nucleicos incluyen cualquiera de las conocidas en la técnica, pero no se limitan a las modificaciones del grupo 3' OH o 5' OH, modificaciones de la base de nucleótidos, modificaciones del componente azúcar y modificaciones del grupo fosfato. Varias de las modificaciones estabilizantes de este tipo se describen en esta memoria, y también se pueden encontrar en la solicitud de patente publicada de EE.UU. 2008/0207550 expedida a Fearon et al. o la patente de EE.UU. 6.239.116 expedida a Krieg et al.

Los ácidos nucleicos enumerados pueden ser ADN de cadena sencilla o de doble cadena, y/o pueden comprender secuencias flanqueantes adicionales. Los ácidos nucleicos enumerados pueden contener bases que se producen de forma natural, o modificadas, que no se producen de forma natural, y pueden contener azúcar, fosfato y/o terminales modificados. Por ejemplo, modificaciones de fosfato incluyen, pero no se limitan a, metil-fosfonato, fosforotioato, alquilfosforotioato, p. ej., -O-P=O(-S-CH₂CO₂-), fosforamidato (puenteante o no puenteante), fosfotriéster y fosforoditioato, y alquilfosforoditioato como anteriormente y se pueden utilizar en cualquier combinación. También se pueden utilizar otros enlaces no fosfato. En una implementación útil, ácidos nucleicos modificados de la presente invención comprenden cadenas principales de fosforotioato. Modificaciones de azúcar conocidas en el sector tales como análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN y quimeras de 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN y otras

5 descritas en esta memoria, también se pueden realizar y combinar con cualquier modificación de fosfato. Ejemplos de modificaciones de bases (comentadas más adelante) incluyen, pero no se limitan a la adición de un resto eliminador de electrones a C-5 y/o C-6 de una citosina del ácido nucleico (p. ej., 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-yodocitosina) y C-5 y/o C-6 de un uracilo del ácido nucleico (p. ej., 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-yodouracilo). Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 99/62923.

10 La síntesis de ácidos nucleicos que contienen enlaces fosfato modificados o enlaces no fosfato es conocida en la técnica. Para una revisión, véase Matteucci (1997) "Oligonucleotide Analogs: an Overview" en Oligonucleotides as Therapeutic Agents, (D. J. Chadwick y G. Cardew, comp.) John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado), que puede ser fijado al resto de azúcar o análogo de azúcar en el ácido nucleico de la presente invención, puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato, o similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en ácidos nucleicos, per se, también es conocida y no necesita ser descrita aquí en detalle. Peyrottes et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24:1841-1848; Chaturvedi et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24:2318-2323; y Schultz et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24:2966-2973. Por ejemplo, la síntesis de ácido nucleico de fosforotioato es similar a la descrita anteriormente para ácidos nucleicos que se producen de forma natural, excepto que la etapa de oxidación se sustituye por una etapa de sulfuración (Zon (1993) "Oligonucleoside Phosphorothioates" en Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties (Agrawal, comp.) Humana Press, págs. 165-190).

20 De manera similar, también se ha descrito la síntesis de otros análogos de fosfato tales como fosfotriéster (Miller et al (1971) JACS 93:6657-6665), fosforamidatos no puenteantes (Jager et al (1988) Biochem 27: 7247-7246), N3' a P5' fosforamidatos (Nelson et al. (1997) JOC 62:7278-7287) y fosforoditioatos (Patente de EE.UU. N° 5.453.496). También se pueden utilizar otros ácidos nucleicos modificados no basados en fósforo (Stirchak et al (1989) Nucleic Acids Res. 17:6129-6141). Los ácidos nucleicos con cadenas principales de fosforotioato pueden ser más resistentes, bajo determinadas circunstancias, a la degradación después de la inyección en el huésped. Braun et al. (1988) J. Immunol. 141:2084-2089; y Latimer et al. (1995) Mol. Immunol. 32:1057-1064.

25 Ácidos nucleicos útiles en las invenciones descritas en esta memoria pueden comprender uno o más ribonucleótidos (que contienen ribosa como el único o principal componente azúcar) o, como se conoce en la técnica, azúcares o análogos de azúcares modificados se pueden incorporar en los ácidos nucleicos. Por lo tanto, además de la ribosa, el resto azúcar puede ser uno de una clase de azúcares tales como pentosa, desoxipentosa, hexosa o desoxihexosa; un azúcar específico tal como glucosa, arabinosa, xilosa, lixosa; o un análogo de azúcar tal como un grupo ciclopentilo "análogo" de azúcar. El azúcar puede estar en forma piranosilo o en una forma furanosilo. En los ácidos nucleicos enumerados, el resto azúcar es preferiblemente el furanosido de ribosa, arabinosa o 2'-O-alquilribosa, y el azúcar puede estar unido a las respectivas bases heterocíclicas, ya sea en configuración alfa o beta anomérica. La preparación de estos azúcares o análogos de azúcares y los respectivos "nucleósidos", en donde estos azúcares o análogos están unidos a una base heterocíclica (base del ácido nucleico) per se es conocida, y no necesita ser descrita aquí, excepto en la medida en que la preparación pueda pertenecer a cualquier ejemplo específico. Modificaciones de azúcar también se pueden hacer y combinar con cualquier modificación de fosfato en la preparación de un ácido nucleico enumerado.

40 Las bases heterocíclicas, o bases de ácidos nucleicos, que se incorporan en los ácidos nucleicos enumerados pueden ser las bases purina y pirimidina principales que se producen de forma natural (a saber, uracilo, timina, citosina, adenina y guanina tal como se mencionó anteriormente), así como modificaciones que se producen de forma natural y sintéticas de dichas bases principales.

45 Los expertos en la técnica reconocerán que en la técnica está disponible un gran número de nucleósidos no naturales "sintéticos" que comprenden diversas bases heterocíclicas y diversos restos azúcar (y análogos de azúcares) y que siempre que se satisfagan otros criterios de la presente invención, los ácidos nucleicos enumerados pueden incluir una o varias bases heterocíclicas distintas de los principales cinco componentes de base de ácidos nucleicos que se producen de forma natural. En determinadas implementaciones, la base heterocíclica en los ácidos nucleicos enumerados incluye, pero no se limita a grupos uracil-5-ilo, citosin-5-ilo, adenin-7-ilo, adenin-8-ilo, guanin-7-ilo, guanin-8-ilo, 4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrolo[2,3-d]pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrolo[2,3-d]pirimidin-3-ilo, en donde las purinas están fijadas al resto azúcar del ácido nucleico a través de la posición 9, las pirimidinas a través de la posición 1, las pirrolopirimidinas a través de la posición 7 y las pirazolopirimidinas a través de la posición 1.

50 Los ácidos nucleicos enumerados pueden comprender al menos una base modificada. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "base modificada" es sinónima a "análogo de base", por ejemplo, "citosina modificada" es

sinónima a "análogo de citosina". De manera similar, los nucleósidos o nucleótidos "modificados" se definen en esta memoria como sinónimo de "análogos" de nucleósidos o nucleótidos. Ejemplos de modificaciones de bases incluyen, pero no se limitan a la adición de un resto eliminador de electrones a C-5 y/o C-6 de una citosina del ácido nucleico. Preferiblemente, el resto eliminador de electrones es un halógeno. Citosinas modificadas de este tipo pueden incluir, pero no se limitan a azacitosina, 5-bromocitosina, bromouracilo, 5-clorocitosina, citosina clorada, ciclocitosina, citosina arabinósido, 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, fluorouracilo, 5,6-dihidrocitosina, 5-yodocitosina, hidroxurea, yodouracilo, 5-nitrocitosina, uracilo, y cualquier otro análogo de pirimidina o pirimidina modificada. Otros ejemplos de las modificaciones de bases incluyen, pero no se limitan a la adición de un resto eliminador de electrones a C-5 y/o C-6 de un uracilo del ácido nucleico enumerado. Preferiblemente, el resto eliminador de electrones es un halógeno. Uracilos modificados de este tipo pueden incluir, pero no se limitan a 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-yodouracilo.

Otros ejemplos de modificaciones de bases incluyen la adición de uno o más grupos tiol a la base, incluyendo, pero no limitado a, 6-tio-guanina, 4-tio-timina y 4-tio-uracilo.

Los ácidos nucleicos enumerados se pueden sintetizar utilizando técnicas y equipos de síntesis de ácidos nucleicos que son bien conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a métodos enzimáticos, métodos químicos y la degradación de secuencias de ácidos nucleicos más grandes. Véase, por ejemplo, Ausubel et al. (1987); y Sambrook et al. (1989). Cuando se ensamblan enzimáticamente, las unidades individuales pueden ligarse, por ejemplo, con una ligasa tal como ADN o ARN ligasa de T4 según la patente de EE.UU. Nº 5.124.246. La degradación del ácido nucleico se puede lograr a través de la exposición de un ácido nucleico a una nucleasa tal como se ejemplifica en la patente de EE.UU. Nº 4.650.675.

Ácidos nucleicos circulares, útiles en la presente invención, pueden aislarse, sintetizarse a través de métodos recombinantes o sintetizarse químicamente. Cuando se obtiene el ácido nucleico circular a través de aislamiento o a través de métodos recombinantes, el ácido nucleico será preferiblemente un plásmido. La síntesis química de ácidos nucleicos circulares más pequeños se puede realizar utilizando cualquier método descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Gao et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2025-2029; y Wang et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:2326-2333.

Técnicas para preparar los ácidos nucleicos enumerados son conocidas en la técnica. ADN que se produce de forma natural que contiene enlaces fosfodiéster, se sintetiza generalmente por acoplamiento secuencial del nucleósido fosforamídita apropiado al grupo 5'-hidroxi del ácido nucleico en crecimiento fijado a un soporte sólido en el extremo 3', seguido por oxidación del triéster de fosfito intermedio en un triéster de fosfato. Una vez que se ha sintetizado la secuencia de ácido nucleico deseada, el ácido nucleico se retira del soporte, los grupos de triéster fosfato se desprotegen a diésteres de fosfato y las bases de nucleósidos se desprotegen utilizando amoniaco acuoso u otras bases. Véase, por ejemplo, Beaucage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, comp.) Humana Press, Totowa, N.J.; Warner et al. (1984) *DNA* 3:401 y la patente de EE.UU. Nº 4.458.066.

Se prefiere que citosinas de motivos CG presentes en los ácidos nucleicos enumerados no estén metiladas, aunque se contemplan otras modificaciones y/o adiciones. Sin embargo, en determinadas implementaciones, los ácidos nucleicos enumerados pueden contener una o más citosinas metiladas que no son parte de un motivo CG.

La preparación de nucleósidos modificados en bases, y la síntesis de ácidos nucleicos modificados utilizando dichos nucleósidos modificados en bases como precursores, ha sido descrita, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nºs. 4.910.300, 4.948.882 y 5.093.232. Estos nucleósidos modificados en bases se han diseñado de modo que puedan ser incorporados mediante síntesis química en cualquiera de las posiciones terminales o internas de un ácido nucleico. Tales nucleósidos modificados en bases, presentes en cualquiera de las posiciones terminales o internas de un ácido nucleico, pueden servir como sitios para la fijación de un péptido u otro antígeno. Los nucleósidos modificados en su grupo azúcar también han sido descritos (incluyendo, pero no limitado a, p. ej., patentes de EE.UU. Nºs. 4.849.513, 5.015.733, 5.118.800, 5.118.802) y se puede utilizar de manera similar.

Parámetros de longitud de ácidos nucleicos

En algunas implementaciones, el ácido nucleico enumerado es menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes longitudes (en bases o pares de bases): 10.000; 5000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 50; 25. En algunas implementaciones, un polinucleótido inmunomodulador es mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes longitudes (en bases o pares de bases): 24; 30; 40; 50; 60; 75;

100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500; 10000; 20000; 50000. Alternativamente, el polinucleótido inmunomodulador puede ser cualquiera de un intervalo de tamaños que tienen un límite superior de 10.000; 5.000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 50; ó 25; y un límite inferior seleccionado de forma independiente, de 24; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500, en donde el límite inferior es menor que el límite superior.

COMPOSICIONES

Las composiciones de la invención pueden comprender una diversidad de materiales y sustancias, además de los ácidos nucleicos enumerados. Como se ha indicado aquí en otra parte, tales materiales y sustancias pueden comprender adyuvantes, antígenos, soportes, excipientes farmacéuticamente aceptables, y similares.

10 En determinadas implementaciones, soportes útiles en la práctica de las presentes invenciones comprenden soportes de proteínas o nanosportes sintéticos. En implementaciones, los nanosportes sintéticos que comprenden la composición de la invención se pueden acoplar a un antígeno. En implementaciones adicionales, tales nanosportes sintéticos pueden comprender, además, un nanosporte sintético adicional no acoplado al ácido nucleico aislado inmunoestimulante y, en implementaciones preferibles, el nanosporte sintético adicional está
15 acoplado a un antígeno.

En determinadas implementaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse junto con conjugado, o no conjugado, vacunas. En implementaciones, las composiciones de la invención pueden comprender un péptido o proteína de soporte, u otro tipo de soporte. Soportes útiles comprenden proteínas de soporte conocidas por ser útiles en vacunas de conjugados, incluyendo pero no limitados a toxoide tetánico (TT), toxoide de la difteria (DT), el
20 mutante no tóxico de la toxina de la difteria, CRM197, el complejo de proteína de la membrana externa del grupo B N. meningitidis, y hemocianina de lapa bocallave (KLH). Otros soportes pueden comprender los nanosportes sintéticos descritos en esta memoria, y otros soportes que pueden ser conocidos de forma convencional.

El acoplamiento del antígeno o los ácidos nucleicos enumerados a soportes se puede realizar utilizando técnicas de acoplamiento covalentes o no covalentes convencionales. Técnicas útiles para el desarrollo de vacunas conjugadas incluyen, pero no se limitan a las descritas en general en MD Lairmore et al., "Human T-lymphotropic virus type 1
25 peptides in chimeric and multivalent constructs with promiscuous T-cell epitopes enhance immunogenicity and overcome genetic restriction." J. Virol. Oct;69(10):6077-89 (1995); CW Rittershause et al., "Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol. Sep;20(9):2106-12 (2000); MV Chengalvala et al., "Enhanced immunogenicity of hepatitis B surface antigen by insertion of a helper T cell epitope from tetanus toxoid." Vaccine. Mar 5;17(9-10):1035-41 (1999).
30 NK Dakappagari et al., "A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses." J Immunol. Abr15;170(8):4242-53 (2003); JT Garrett et al. "Novel engineered trastuzumab conformational epitopes demonstrate in vitro and in vivo antitumor properties against HER-2/neu." J. Immunol. Jun 1;178(11):7120-31 (2007).

35 En otras implementaciones, las composiciones de la invención pueden combinarse con el antígeno, o una vacuna convencional, en un vehículo para formar una mezcla inyectable. Las mezclas se pueden hacer utilizando técnicas de fabricación farmacéuticas y de composiciones convencionales para llegar a formas de dosificación útiles. Técnicas adecuadas para su uso en la práctica de la presente invención se pueden encontrar en una diversidad de fuentes, incluyendo, pero no limitadas a M.F. Powell et al, Vaccine Design, 1995 Springer-Verlag publ.; o L.C. Paoletti et al. comps, Vaccines: from Concept to Clinic. A Guide to the Development and Clinical Testing of Vaccines for Human Use 1999 CRC Press publ.

En implementaciones, nanosportes sintéticos se pueden utilizar como soportes. Una amplia diversidad de nanosportes sintéticos se puede utilizar de acuerdo con la invención. En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos son esferas o esferoides. En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos son
45 planos o en forma de placa. En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos son cubos o cúbicos. En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos son óvalos o elipses. En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos son cilindros, conos o pirámides.

En algunas implementaciones, es deseable utilizar una población de nanosportes sintéticos que es relativamente uniforme en términos de tamaño, forma y/o composición, de manera que cada uno de los nanosportes sintéticos
50 tiene propiedades similares. Por ejemplo, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de los nanosportes sintéticos, basados en el número total de nanosportes sintéticos, puede tener una dimensión mínima o una

dimensión máxima que cae dentro de 5%, 10% o 20% del diámetro medio o dimensión media de los nanosportes sintéticos. En algunas implementaciones, una población de nanosportes sintéticos puede ser heterogénea con respecto al tamaño, la forma y/o composición.

- 5 Los nanosportes sintéticos pueden ser macizos o huecos y pueden comprender una o más capas. En algunas implementaciones, cada una de las capas tiene una composición única y propiedades únicas con respecto a la otra u otras capas. Para dar un solo ejemplo, los nanosportes sintéticos pueden tener una estructura de núcleo/envuelta, en la que el núcleo es una capa (p. ej., un núcleo polimérico) y la envuelta es una segunda capa (p. ej., una bicapa o monocapa lipídica). Los nanosportes sintéticos pueden comprender una pluralidad de capas diferentes.
- 10 En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos pueden comprender opcionalmente uno o más lípidos. En algunas implementaciones, un nanosporte sintético puede comprender un liposoma. En algunas implementaciones, un nanosporte sintético puede comprender una bicapa lipídica. En algunas implementaciones, un nanosporte sintético puede comprender una monocapa lipídica. En algunas implementaciones, un nanosporte sintético puede comprender una micela. En algunas implementaciones, un nanosporte sintético puede comprender un núcleo que comprende una matriz polimérica rodeada por una capa de lípidos (p. ej., bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.).
- 15 En algunas implementaciones, un nanosporte sintético puede comprender un núcleo no polimérico (p. ej., partículas de metal, punto cuántico, partículas de material cerámico, partículas de hueso, partícula viral, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, etc.) rodeado por una capa de lípidos (p. ej., bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.).
- 20 En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos pueden comprender uno o más polímeros. En algunas implementaciones, un polímero de este tipo puede estar rodeado por una capa de revestimiento (p. ej., liposoma, monocapa lipídica, micela, etc.). En algunas implementaciones, diversos elementos de las nanosportes sintéticos se pueden acoplar con el polímero.
- 25 En algunas implementaciones, una superficie inmuno-activa, un resto fijador de objetivo y/o un ácido nucleico puede estar asociado de forma covalente con una matriz polimérica. En algunas implementaciones, la asociación covalente está mediada por un enlazador. En algunas implementaciones, una superficie inmuno-activa, un resto fijador de objetivo y/o un oligonucleótido puede estar asociado no covalentemente con una matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas implementaciones, una superficie inmuno-activa, un resto fijador de objetivo y/o un ácido nucleico puede estar encapsulado dentro, rodeado por y/o dispersado en una matriz polimérica.
- 30 En algunas implementaciones, una superficie inmuno-activa, un resto fijador de objetivo y/o un nucleótido se pueden asociar con una matriz polimérica mediante interacciones hidrofóbicas, interacciones de carga, fuerzas de van der Waals, etc.
- 35 Es conocida convencionalmente una amplia diversidad de polímeros y métodos para formar matrices poliméricas a partir de los mismos. En general, una matriz polimérica comprende uno o más polímeros. Los polímeros pueden ser polímeros naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, en bloque o pueden comprender una combinación de secuencias al azar y de bloques. Típicamente, los polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos.
- 40 Ejemplos de polímeros adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a polietilenos, policarbonatos (p. ej., poli(1,3-dioxan-2-ona)), polianhídridos (p. ej., poli(anhídrido sebácico)), poli(fumaratos de propilo), poliamidas (p. ej., policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (p. ej., polilactida, poliglicolida, polilactida-co-glicolida, policaprolactona, polihidroxiácido (p. ej., poli(β -hidroxialcanoato))), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, poli(alcoholes vinílicos), poliuretanos, polifosfacenos, poliácridatos, polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos y poliaminas, polilisina, copolímeros de polilisina-PEG y poli(etilenimina), copolímeros de poli(etilenimina)-PEG.
- 45 En algunas implementaciones, los polímeros de acuerdo con la presente invención incluyen polímeros que han sido aprobados para su uso en seres humanos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) bajo 21 CFR § 177.2600, incluyendo pero no limitados a poliésteres (p. ej., ácido poliláctico, poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2-ona)); polianhídridos (p. ej., poli(anhídrido sebácico)); poliéteres (p. ej., polietilenglicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poliácridatos; y policianoacrilatos.
- 50 En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser hidrofílicos. Por ejemplo, los polímeros pueden comprender grupos aniónicos (p. ej., un grupo fosfato, grupo sulfato, grupo carboxilato); grupos catiónicos (p. ej., grupo amina

cuaternaria); o grupos polares (p. ej., grupo hidroxilo, grupo tiol, grupo amina). En algunas implementaciones, un nanosoporte sintético que comprende una matriz polimérica hidrofílica genera un entorno hidrofílico dentro del nanosoporte sintético. En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser hidrofóbicos. En algunas implementaciones, un nanosoporte sintético que comprende una matriz polimérica hidrofóbica genera un entorno hidrofóbico dentro del nanosoporte sintético. La selección de la hidrofiliidad o hidrofobicidad del polímero puede tener un impacto en la naturaleza de los materiales que se incorporan (p. ej., acoplan) dentro del nanosoporte sintético.

En algunas implementaciones, los polímeros se pueden modificar con uno o más restos y/o grupos funcionales. Se puede utilizar una diversidad de restos o grupos funcionales de acuerdo con la presente invención. En algunas implementaciones, los polímeros pueden estar modificados con polietilenglicol (PEG), con un hidrato de carbono y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). Determinadas implementaciones pueden realizarse utilizando las enseñanzas generales de la patente de EE.UU. N° 5.543.158 expedida a Gref et al. o la publicación WO2009/051837 por Von Andrian et al.

En algunas implementaciones, los polímeros se pueden modificar con un grupo lípido o ácido graso. En algunas implementaciones, un grupo ácido graso puede ser una o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas implementaciones, un grupo ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linoleico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúxico.

En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser poliésteres, incluyendo copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico tales como poli(ácido láctico-ácido co-glicólico) y poli(lactida-co-glicolida), a los que se alude colectivamente en esta memoria como "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, a los que se alude en esta memoria como "PGA", y unidades de ácido láctico tales como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida y poli-D,L-lactida, a las que se alude colectivamente en esta memoria como "PLA". En algunas implementaciones, los poliésteres a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; copolímeros de PEG y copolímeros de lactida y glicolida (p. ej., copolímeros de PLA-PEG, copolímeros de PGA-PEG, copolímeros de PLGA-PEG y sus derivados. En algunas implementaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, poli(caprolactona), copolímeros de poli(caprolactona)-PEG, poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli [ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico], y derivados de los mismos.

En algunas implementaciones, un polímero puede ser PLGA. PLGA es un co-polímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico, y diversas formas de PLGA se caracterizan por la relación de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La velocidad de degradación del PLGA se puede ajustar alterando la relación ácido láctico:ácido glicólico. En algunas implementaciones, el PLGA a utilizar de acuerdo con la presente invención se caracteriza por una relación ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75 o aproximadamente 15:85.

En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En determinadas implementaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de ácido metacrílico y alquilamida, poli(metacrilato de metilo), poli(anhídrido de ácido metacrílico), metacrilato de metilo, polimetacrilato, copolímero de poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), copolímero de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros totalmente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido en grupos amonio cuaternario.

En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son capaces de condensar y/o proteger hebras cargadas negativamente de los ácidos nucleicos (p. ej., ADN, o derivados de los mismos). Polímeros con contenido en amina tales como poli(lisina) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; y Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), poli(etilenimina) (PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92: 7297) y dendrímeros de poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; y Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372) están cargados positivamente a pH fisiológico, forman pares iónicos con ácidos nucleicos y median

en la transfección en una diversidad de líneas celulares. En implementaciones, los nanosportes sintéticos de la invención pueden no comprender (o pueden excluir) polímeros catiónicos.

En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que portan cadenas laterales catiónicas (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22:3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633; y Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399). Ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina) (Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010), poli(éster de serina) (Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; y Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633), y poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; y Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633).

Las propiedades de estos y otros polímeros y métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.123.727; 5.804.178; 5.770.417; 5.736.372; 5.716.404; 6.095.148; 5.837.752; 5.902.599; 5.696.175; 5.514.378; 5.512.600; 5.399.665; 5.019.379; 5.010.167; 4.806.621; 4.638.045; y 4.946.929; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7; y Uhrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). Más en general, una diversidad de métodos para la síntesis de determinados polímeros adecuados se describen en *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Comp. por Goethals, Pergamon Press, 1980; *Principles of Polymerization* por Odian, John Wiley & Sons, Cuarta Edición, 2004; *Contemporary Polymer Chemistry* por Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, *Nature*, 390:386; y en las patentes de EE.UU. 6.506.577, 6.632.922, 6.686.446 y 6.818.732.

En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser dendrímeros. En algunas implementaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente reticulados entre sí. En algunas implementaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente libres de enlaces cruzados. En algunas implementaciones, los polímeros se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, sin someterse a una etapa de reticulación. Además, ha de entenderse que nanosportes sintéticos de la invención pueden comprender copolímeros de bloque, copolímeros de injerto, combinaciones, mezclas y/o aductos de cualquiera de los anteriores y otros polímeros. Los expertos en la técnica reconocerán que los polímeros enumerados en esta memoria representan una lista a modo de ejemplo, no exhaustiva, de polímeros que pueden ser de uso de acuerdo con la presente invención.

En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos pueden no comprender un componente polimérico. En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos pueden comprender partículas de metal, puntos cuánticos, partículas de material cerámico, etc. En algunas implementaciones, un nanosporte sintético no polimérico es un agregado de componentes no poliméricos tales como un agregado de átomos de metales (p. ej., átomos de oro).

En algunas implementaciones, los nanosportes sintéticos pueden comprender opcionalmente una o más entidades anfífilas. En algunas implementaciones, una entidad anfífilica puede fomentar la producción de nanosportes sintéticos con estabilidad incrementada, uniformidad mejorada o viscosidad incrementada. En algunas implementaciones, las entidades anfífilicas se pueden asociar con la superficie interior de una membrana de lípidos (p. ej., bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.). Muchas entidades anfífilicas conocidas en la técnica son adecuadas para uso en la fabricación de nanosportes sintéticos de acuerdo con la presente invención. Tales entidades anfífilicas incluyen, pero no se limitan a fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidil-etanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltriethylamonio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerol-succinato; difosfatidilglicerol (DPPG); hexanodecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9-lauriléter; un ácido graso tensioactivo tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; trioleato de sorbitán (Span®85) glicocolato; monolaurato de sorbitán (Span®20); polisorbato 20 (Tween®20); polisorbato 60 (Tween®60); polisorbato 65 (Tween®65); polisorbato 80 (Tween®80); polisorbato 85 (Tween®85); monoestearato de polioxietileno; surfactina; un poloxómero; un éster de sorbitán de ácidos grasos, tal como trioleato de sorbitán; lecitina; lisolectina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrósidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecil-amina; palmitato de acetilo; ricinoleato de glicerol; estearato de hexadecilo; miristato de isopropilo; tiloxapol; poli(etilenglicol)5000-fosfatidiletanolamina; monoestearato de poli(etilenglicol)400; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen altas propiedades tensioactivas; desoxicolatos; ciclodextrinas; sales caotrópicas; agentes de emparejamiento de iones; y sus combinaciones. Un componente de entidad anfífilica puede ser una mezcla de diferentes entidades anfífilicas. Los expertos en la técnica reconocerán que ésta es una lista a modo de

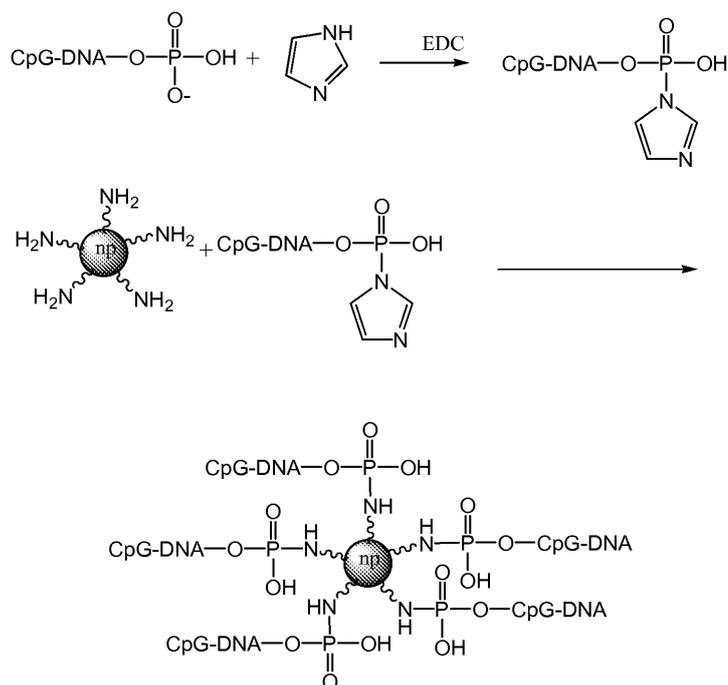
ejemplo, no exhaustiva, de sustancias con actividad tensioactiva. Cualquier entidad anfífila se puede utilizar en la producción de nanosopores sintéticos a ser utilizados de acuerdo con la presente invención.

5 En algunas implementaciones, los nanosopores sintéticos pueden comprender opcionalmente uno o más hidratos de carbono. Los hidratos de carbono pueden ser naturales o sintéticos. Un hidrato de carbono puede ser un hidrato de carbono natural derivatizado. En determinadas implementaciones, un hidrato de carbono comprende un monosacárido o disacárido, incluyendo, pero no limitado a glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, manosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neurámico. En determinadas implementaciones, un hidrato de carbono es un polisacárido, incluyendo, pero no limitado a pululano, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC), hidroxixelulosa (HC), metilcelulosa (MC), dextrano, ciclodextrano, glucógeno, hidroxietil-almidón, carragenano, glicona, amilosa, quitosano, N,O-carboximetilquitosano, algina y ácido algínico, almidón, quitina, inulina, konjac, glucomanano, pustulano, heparina, ácido hialurónico, curdlan y xantano. En implementaciones, los nanosopores sintéticos de la invención no comprenden (o específicamente excluyen) hidratos de carbono tales como un polisacárido. En determinadas implementaciones, el hidrato de carbono puede comprender un derivado de hidrato de carbono tal como un alcohol de azúcar, incluyendo, pero no limitado a manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol y lactitol.

20 En implementaciones, en la preparación de vehículos para su uso con las composiciones de la invención, pueden ser útiles los métodos para acoplar de forma covalente los ácidos nucleicos enumerados u otros elementos de las composiciones de la invención a los soportes. En implementaciones, los ácidos nucleicos enumerados u otros elementos de las composiciones de la invención pueden acoplarse de forma no covalente a los soportes. Si el elemento a ser acoplado comprende una molécula pequeña, puede ser ventajoso fijar el elemento a un soporte polimérico antes de ensamblar los nanosopores sintéticos. En implementaciones, puede ser ventajoso (para la fabricación o por otras razones) preparar soportes, especialmente nanosopores sintéticos, con grupos de superficie que se utilizan para acoplar el adyuvante al soporte a través del uso de estos grupos de superficie.

25 En determinadas implementaciones, el acoplamiento no covalente se puede lograr utilizando adsorción. La adsorción de ácidos nucleicos a la superficie de una nanopartícula se puede lograr mediante la formación de sales. Cuando se utiliza este método, la nanopartícula se prepara de manera que la nanopartícula comprende un material que introduce una carga en la nanopartícula. A menudo, el uso de un tensioactivo cargado, p. ej., un tensioactivo catiónico que se utiliza para adsorber los ácidos nucleicos cargados negativamente durante la preparación de nanopartículas, es suficiente para proporcionar una carga de superficie a la nanopartícula. La puesta en contacto con las nanopartículas cargadas con una disolución de ácidos nucleicos provoca la adsorción de los ácidos nucleicos. Este método se describe en la solicitud de patente en la Solicitud de Patente Internacional publicada WO 00/06123 de O'Hagen et al. La encapsulación de ácidos nucleicos puede lograrse mediante la disolución de los ácidos nucleicos en un tampón acuoso y, a continuación, utilizando esta disolución en el proceso de emulsión sencilla o doble para formar nanopartículas mediante auto-ensamblaje. Este proceso se describe en Tse, et al *International Journal of Pharmaceutics*, 370 (1-2), 33 (2009). Métodos de encapsulación adicionales se describen en otra parte en esta memoria.

40 El acoplamiento covalente se puede lograr mediante un cierto número de métodos. Estos métodos se describen con detalle en *Bioconjugate Techniques*, 2ª edición, Elsevier (2008) por Hermanson. Un método que es particularmente adecuado para el acoplamiento de ácidos nucleicos a los polímeros o nanopartículas que portan grupos funcionales amina consiste en activar el 5' fosfato del ácido nucleico con metiyoduro de 1-(3-dimetilamino)propil-3-etilcarbodiimida (EDC) e imidazol y luego permitiendo que el ácido nucleico activado reaccione con el polímero o nanopartículas sustituido con amina [Shabarova et al, *FEBS Letters*, 154 288, (1983)]. Este proceso se muestra a continuación para las nanopartículas funcionalizadas con amina en superficie.



5 En determinadas implementaciones, el acoplamiento covalente puede realizarse a través de un enlazador covalente. En implementaciones, el enlazador covalente puede comprender un enlazador de amida, un ligador de disulfuro, un enlazador de tioéter, un enlazador de hidrazona, un enlazador de hidrazida, un enlazador de imina u oxima, un enlazador de urea o tiourea, un enlazador de amidina, un enlazador de amina y una enlazador de sulfonamida.

10 Un enlazador de amida se forma a través de un enlace amida entre una amina en un elemento con el grupo ácido carboxílico de un segundo elemento tal como el nanosoporte. El enlace amida en el enlazador se puede hacer utilizando cualquiera de las reacciones convencionales formadoras de enlace amida con aminoácidos adecuadamente protegidos o antígenos o adyuvantes y ácido carboxílico activado tal como éster de N-hidroxisuccinimida activado.

Un enlazador de disulfuro se realiza mediante la formación de un enlace disulfuro (S-S) entre dos átomos de azufre de la forma, por ejemplo, $R_1-S-S-R_2$. Un enlace disulfuro se puede formar por intercambio de tiol de un antígeno o adyuvante que contiene un grupo tiol/mercaptano (-SH) con otro grupo tiol activado en un elemento que contiene grupos tiol/mercaptano con un elemento que contiene un grupo tiol activado.



15 Un enlazador de triazol, específicamente un 1,2,3-triazol de la forma , en donde R_1 y R_2 pueden ser cualquier entidad química, se realiza por la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de una azida fijada a un primer elemento con un alquino terminal fijado a un segundo elemento. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar se lleva a cabo con o sin un catalizador, preferiblemente con un catalizador de Cu(I), que enlaza los dos elementos a través de una función de 1,2,3-triazol. Esta química se describe en detalle por Sharpless et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(14), 2596, (2002) y Meldal, et al., *Chem. Rev.*, 2008, 108(8), 2952-3015 y se la alude a menudo como una "reacción clic" o CuAAC.

25 Un enlazador de tioéter se hace mediante la formación de un enlace azufre-carbono (tioéter) en forma, por ejemplo, de R_1-SR_2 . El tioéter se puede hacer por cualquiera de alquilación de un grupo tiol/mercaptano (-SH) en uno de los componentes tal como el elemento con un grupo alquilante tal como haluro o epóxido en un segundo elemento. Enlazadores de tioéter también pueden formarse por adición de Michael de un grupo tiol/mercaptano en un elemento a un grupo alqueno deficiente en electrones en un segundo elemento tal como un polímero que contiene un grupo

maleimida como aceptor de Michael. En otra forma, los enlazadores de tioéter se pueden preparar mediante la reacción en el radical tiol-eno de un grupo tiol/mercaptano en un elemento con un grupo alqueno en un segundo elemento tal como un polímero o nanosoporte.

5 Un enlazador de hidrazona se hace mediante la reacción de un grupo hidrazida en un elemento con un grupo aldehído/cetona en el segundo elemento.

Un enlazador de hidrazida se forma mediante la reacción de un grupo hidrazina en un elemento con un grupo ácido carboxílico en el segundo elemento. Una reacción de este tipo se realiza generalmente utilizando una química similar a la formación de enlace amida en el que el ácido carboxílico se activa con un reactivo activante.

10 Un enlazador de imina u oxima se forma mediante la reacción de un grupo amino o N-alcoxi-amino (o amino-oxi) en un elemento con un grupo aldehído o cetona en un segundo elemento.

Un enlazador de urea o tiourea se prepara mediante la reacción de un grupo amino en un elemento con un grupo isocianato o tiocianato en un segundo elemento.

Un enlazador de amidina se prepara mediante la reacción de un grupo amino en un elemento con un grupo imidoéster en un segundo elemento.

15 Un enlazador de amina se hace mediante la reacción de alquilación de un grupo amino en un elemento con un grupo alquilante tal como haluro, epóxido, o grupo éster de sulfonato en el segundo elemento. Alternativamente, un enlazador de amina también se puede hacer mediante aminación reductora de un grupo amino en un elemento con un grupo aldehído o cetona en el segundo elemento con un reactivo reductor adecuado tal como cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio.

20 Un enlazador de sulfonamida se hace mediante la reacción de un grupo amino en un elemento con un grupo haluro de sulfonilo (tal como cloruro de sulfonilo) en un segundo elemento.

25 Los elementos también pueden estar acoplados a través de métodos de acoplamiento no covalente. Para ejemplos, un antígeno o adyuvante cargado negativamente se puede acoplar a un soporte cargado positivamente a través de adsorción electrostática. Un antígeno o adyuvante que contiene un ligando de metal también se pueden acoplar a un soporte que contiene un complejo de metal a través de un complejo de metal-ligando.

30 En determinadas implementaciones, un elemento tal como los ácidos nucleicos enumerados, un antígeno o un adyuvante se puede fijar a un polímero, por ejemplo ácido poliláctico-bloque-poli-etilenglicol, antes del ensamblaje de un nanosoporte sintético, o un nanosoporte sintético puede formarse con grupos reactivos o activables en su superficie. En este último caso, el antígeno o adyuvante se pueden preparar con un grupo que sea compatible con la química de fijación que se presenta por la superficie de los nanosportes sintéticos. En otras implementaciones, un antígeno peptídico se puede fijar a VLPs o liposomas utilizando un enlazador adecuado.

35 Un enlazador es un compuesto o reactivo que capaz de acoplar dos moléculas juntas. En una implementación, el enlazador puede ser un reactivo homobifuncional o heterobifuncional como se describe en Hermanson 2008. Por ejemplo, un nanosoporte sintético de VLP o liposoma que contiene un grupo carboxílico en la superficie se puede tratar con un enlazador homobifuncional, dihidrazida adípica (ADH), en presencia de EDC para formar el nanosoporte sintético correspondiente con el enlazador ADH. El nanosoporte sintético enlazado a ADH resultante se conjuga entonces con un antígeno peptídico que contiene un grupo ácido a través del otro extremo del enlazador ADH en NC para producir el conjugado peptídico de VLP o liposoma correspondiente.

MÉTODOS PARA PREPARAR Y UTILIZAR LAS COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

40 Nanosportes sintéticos se pueden preparar utilizando una amplia diversidad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, nanosportes sintéticos se pueden formar por métodos tales como nanoprecipitación, enfoque de flujo utilizando canales de fluidos, secado por pulverización, evaporación del disolvente por emulsión simple y doble, extracción con disolventes, separación de fases, molienda, procesos de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y compleja, y otros métodos bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Alternativa o adicionalmente, se han descrito síntesis de disolventes acuosos y

45

orgánicos para semiconductor monodisperso, conductivo, magnético, orgánico, y otros nanomateriales (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; y Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). Métodos adicionales se han descrito en la bibliografía (véase, p. ej., Doubrow, Comp., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; y Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755, y también las patentes de EE.UU. 5.578.325 y 6.007.845).

Diversos materiales se pueden encapsular en nanosportes sintéticos según se desee, utilizando una diversidad de métodos, incluyendo pero no limitado a C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, N° 3, págs. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8- 21 (2006). Se pueden utilizar otros métodos adecuados para encapsular materiales, tales como ácidos nucleicos, en nanosportes sintéticos, que incluyen, sin limitación los métodos descritos la patente de Estados Unidos 6.632.671 a Unger expedida el 14 de octubre de 2003; H. Martimprey et al., "Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA" European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 71:490-504 (2009); o P. Malyala, et al., "Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles" Advanced Drug Delivery Reviews 61: 218-225 (2009).

En determinadas implementaciones, nanosportes sintéticos se preparan mediante un procedimiento de nanoprecipitación o secado por pulverización. Las condiciones utilizadas en la preparación de nanosportes sintéticos pueden alterarse para producir partículas de un tamaño o propiedad deseado (p. ej., hidrofobicidad, hidrofiliidad, morfología externa, "pegajosidad", forma, etc.). El método de preparar los nanosportes sintéticos y las condiciones (p. ej., disolvente, temperatura, concentración, caudal de aire, etc.) utilizado puede depender de los materiales a acoplar a los nanosportes sintéticos y/o de la composición de la matriz de polímero.

Si las partículas preparadas por cualquiera de los métodos anteriores tienen un intervalo de tamaños fuera del intervalo deseado, las partículas se pueden medir, por ejemplo, utilizando un tamiz.

Elementos de las composiciones de la invención (tales como restos de los que se compone una superficie inmuno-activa, restos fijadores de objetivo, matrices poliméricas, antígenos y similares) pueden acoplarse al soporte global, p. ej., mediante uno o más enlaces covalentes, o pueden acoplarse por medio de uno o más enlazadores. Métodos para funcionalizar nanosportes sintéticos pueden adaptarse de la solicitud de patente publicada de EEUU. 2006/0002852 expedida a Saltzman et al., la solicitud de patente publicada de EE.UU. 2009/0028910 expedida a DeSimone et al., o la solicitud de patente internacional publicada WO 2008/127532 A1 expedida a Murthy et al.

Alternativa o adicionalmente, los soportes se pueden acoplar a los ácidos nucleicos, superficies inmuno-activas, restos fijadores de objetivo, adyuvantes, diversos antígenos y/u otros elementos enumerados directa o indirectamente a través de interacciones no covalentes. En implementaciones no covalentes, el acoplamiento no covalente es mediado por interacciones no covalentes que incluyen, pero no se limitan a interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrofóbicas, interacciones de apilamiento TT, interacciones de enlaces hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, y/o combinaciones de las mismas. Tales acoplamientos se pueden disponer para estar en una parte de un soporte tal como una superficie externa o una superficie interna de un nanosporte sintético de la invención. En determinadas implementaciones, la encapsulación y/o absorción esta en forma de acoplamiento.

En diversas implementaciones, las composiciones de la invención descritas en esta memoria pueden comprender determinados adyuvantes, además de los ácidos nucleicos aislados inmunoestimulantes de la invención, a través de mezcla en el mismo sistema de vehículo o suministro. Adyuvantes de este tipo pueden incluir, pero no se limitan a sales minerales tales como alumbre, alumbre combinado con lípidos de monofosforilo (MPL) A de enterobacterias tales como *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri* o específicamente con MPL® (AS04), MPL A de las bacterias mencionadas anteriormente por separado, saponinas tales como QS-21, Quil-A, ISCOMs, ISCOMATRIX™, emulsiones tales como MF59™, Montanide® ISA 51 e ISA 720, AS02 (QS21 + escualeno + MPL®), liposomas y formulaciones de liposomas tales como AS01, micropartículas y microsportes sintetizados o específicamente preparados tales como vesículas de la membrana externa (OMV) derivadas de bacterias de *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y otros, o partículas de quitosano, agentes formadores de depósitos tales como copolímeros de bloque Pluronic®, específicamente péptidos modificados o preparados tales como dipéptido de muramilo, aminoalquil-glucosaminida 4-fosfatos tales como RC529, o proteínas tales como

toxoides bacterianos o fragmentos de toxina. Las dosis de estos otros adyuvantes pueden determinarse utilizando estudios convencionales de oscilación de dosis.

5 En algunas implementaciones, las composiciones de la invención descritas en esta memoria se pueden combinar con un antígeno. Un antígeno de este tipo puede ser diferente de, o similar o idéntico a los acoplado a un nanosoporte (con o sin adyuvante, utilizando o no utilizando otro vehículo de suministro) administrado por separado en un momento diferente y/o en un lugar diferente del cuerpo y/o por una ruta diferente de inmunización o con otro antígeno y/o composición portadora de adyuvante administrado por separado en un momento diferente y/o en un lugar diferente del cuerpo y/o por una ruta de inmunización diferente.

10 Las composiciones de la invención se pueden hacer utilizando técnicas convencionales de fabricación farmacéuticas y de composición para llegar a formas de dosificación útiles. Técnicas adecuadas para su uso en la práctica de la presente invención se pueden encontrar en Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Editado por Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, y Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; y Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2ª Ed. Editado por M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone. En algunas implementaciones, composiciones de la invención se formulan en solución salina estéril para inyección junto con un conservante.

15 Ha de entenderse que las composiciones de la invención pueden prepararse de cualquier manera adecuada, y la invención no está en modo alguno limitada a composiciones que se pueden producir utilizando los métodos descritos en esta memoria. La selección de un método apropiado puede requerir atención a las propiedades de los materiales y sustancias particulares que se utilizan.

20 En algunas implementaciones, composiciones de la invención se fabrican bajo condiciones estériles o se esterilizan al final. Esto puede asegurar que las composiciones resultantes sean estériles y no infecciosas, mejorando así la seguridad cuando se comparan con composiciones no estériles. Esto proporciona una medida de seguridad valiosa, especialmente cuando los sujetos que reciben composiciones de la invención tienen defectos inmunes, padecen infección y/o son susceptibles de infección. En algunas implementaciones, composiciones de la invención pueden ser liofilizadas y almacenadas en suspensión o en forma de polvo liofilizado, dependiendo de la estrategia de formulación durante períodos prolongados sin perder actividad.

25 Las composiciones de la invención descritos en esta memoria se pueden administrar por una diversidad de vías de administración, incluyendo, pero no limitadas a, subcutánea, intramuscular, intradérmica, oral, intranasal, transmucosal, sublingual, rectal, oftálmica, transdérmica, transcutánea o mediante una combinación de estas vías.

30 La cantidad de ácidos nucleicos enumerados presentes en las formas de dosificación de la invención se puede variar de acuerdo con la naturaleza de los ácidos nucleicos enumerados, el beneficio terapéutico a lograr, y otros parámetros. En algunas implementaciones, los estudios de oscilaciones de dosis pueden llevarse a cabo para establecer una cantidad terapéutica óptima de los ácidos nucleicos enumerados, y la cantidad de diversos antígenos que pueden estar presentes en las composiciones de la invención. En diversas implementaciones, los ácidos nucleicos enumerados están presentes en la composición en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmune a los ácidos nucleicos enumerados tras la administración a un sujeto. Puede ser posible determinar cantidades de los ácidos nucleicos enumerados eficaces para generar una respuesta inmune utilizando estudios y técnicas convencionales de oscilaciones de dosis. Composiciones de la invención se pueden administrar en una diversidad de frecuencias. En una implementación preferida, al menos una administración de la composición de la invención es suficiente para generar una respuesta farmacológicamente relevante. En una implementación más preferida, se utilizan al menos dos administraciones, al menos tres administraciones o al menos cuatro administraciones de la composición de la invención para asegurar una respuesta farmacológicamente relevante.

45 Las composiciones y los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar para inducir, potenciar, modular, dirigir o redirigir una respuesta inmune. Las composiciones y los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones tales como cánceres, enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, enfermedades degenerativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunológicas, u otros trastornos y/o afecciones. Las composiciones y los métodos descritos en esta memoria también se pueden utilizar para la profilaxis o el tratamiento de una adicción tal como la adicción a la nicotina o un narcótico. Las composiciones y los métodos descritos en esta memoria también se pueden utilizar para la profilaxis y/o el tratamiento de una afección que resulta de la exposición a una toxina, sustancia peligrosa, toxina ambiental u otro agente dañino.

EJEMPLOSEjemplo 1: Ácidos Nucleicos

Existen tres tipos de moléculas de ácido nucleico CpG (tipos A, B y C). Ácidos nucleicos CpG de tipo A son fuertes inductores de IFN- α . Ácidos nucleicos CpG de tipo B son fuertes activadores de células B, e inducen la expresión de IL-6, pero son inductores deficientes de IFN- α . Moléculas de ácidos nucleicos CpG de tipo C tienen características de los ácidos nucleicos CpG de Tipo A y B. Ácidos nucleicos CpG de tipo C inducen la expresión de IL-6, e inducen la expresión de IFN- α . IFN- α activa APC e impulsa la activación y la diferenciación de células B. Ácidos nucleicos CpG de tipo C también estimulan las células dendríticas plasmacitoides que potencian el desarrollo de células B y de las células del plasma. Las características de las moléculas de ácido nucleico CpG de tipo C, por lo tanto, les hacen potencialmente superiores frente a los tipos A y B.

Selecta-7, un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene la secuencia de nucleótidos

5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCG-3' [SEQ ID NO: 1]

y que tiene una cadena principal fosforotioada fue diseñado para que tuviera características de moléculas de ácido nucleico CpG de tipo C y fue sintetizado utilizando técnicas de oligo-síntesis estándares (Beaucage, S.; Iyer, R. (1992). *Tetrahedron* 48: 2223. doi:10.1016/S0040-4020(01)88752-4; Brown, D. M. A brief history of oligonucleotide synthesis. *Methods in Molecular Biology* (Totowa, NJ, Estados Unidos) (1993), 20 (Protocols for Oligonucleotides and Analogs), 1-17; Reese, Colin B. (2005). "Oligo- and polynucleotides: 50 years of chemical synthesis". *Organic & Biomolecular Chemistry* 3: 3851. doi:10.1039/b510458k; Iyer, R. P.; Beaucage, S. L. 7.05. Oligonucleotide synthesis. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 7: DNA and Aspects of Molecular Biology. Kool, Eric T.; Compilador. Neth. (1999), 733 pp. Publisher: (Elsevier, Amsterdam, Holanda), 105-152).

Selecta-7 se comparó con 7909 fosforotioado anteriormente conocido (tipo B - véase, p. ej., Cooper *et al.* (2004) *J Clinical Immunology* 24(6):693-701) y 2395 (Tipo C - véase la descripción anterior) para la capacidad para inducir la expresión de IFN- α , IP-10 e IL-6 mediante ELISA (FIGs. 1A-1D). Células mononucleares de sangre periférica humana fueron aisladas y cultivadas en presencia o ausencia de CpG. 24 horas más tarde se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron mediante ELISA. Todos los CpGs testados fueron capaces de regular positivamente la expresión de IL-6 (FIGs. 1B, 1D). Sin embargo, CpG 7909 de tipo B no aumentó la expresión de IFN- α (FIG. 1A), o IP-10 (FIG. 1C), mientras que tanto Selecta-7 como 2395 sí lo hicieron (FIGs. 1A, 1C). En general, los datos sugieren que Selecta-7 es un nuevo CpG de tipo C.

Moléculas de ácido nucleico CpG estimulan a las células a través de TLR9, mientras que el agonista de moléculas pequeñas R848 señala a través de los TLRs 7 y 8. Debido a que los TLRs 7 y 9 se expresan en células dendríticas plasmacitoides, mientras que el TLR8 se expresa en células dendríticas mieloides la respuesta entre R848 (Resiquimod) y Selecta-7 debería ser diferente. Para testar esto, células mononucleares de sangre periférica humana fueron aisladas y cultivadas en presencia o ausencia de R848 o Selecta-7. 24 horas más tarde se recogieron los sobrenadantes y se evaluados mediante análisis multiplex de citoquinas y quimioquinas. Los analitos fueron las citoquinas: IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-2, IL-13, IFN- γ , IL-12p40, IL23, IL-5, IP-10, RANKL, IL-4; y las quimioquinas: MDC, RANTES, IP-10 y MIP-1 α . Los datos demuestran una respuesta diferencial entre R848 y Selecta-7. R848 es un potente inductor de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-6, MIP-1 α , RANTES, IFN- γ , IL-1 β , IL-12p40, TNF- α e IL-23, mientras que Selecta-7 era un potente inductor de IFN- α , IP-10 e IL-5 (FIG. 2). Los datos demuestran que R848 y Selecta-7 tienen una respuesta celular sustancialmente diferente con diferentes perfiles de citoquinas de las PBMCs estimuladas.

Ejemplo 2: Nanosoportes Sintéticos con Ácidos Nucleicos Acoplados

Una composición de la invención que comprende nanosoportes sintéticos que componen el ácido nucleico aislado inmunoestimulante Selecta-7 enumerado se prepara como sigue:

Selecta-7, un nuevo ácido nucleico de cadena sencilla aislado inmunoestimulante que tiene la secuencia de desoxirribonucleótidos:

5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCG-3' [SEQ ID NO: 1]

con un ion conjugado de sodio se adquiere de Oligo Factory (Holliston, MA).

5 PLGA con un contenido de 76% de lactida y 24% de glicolida y una viscosidad inherente de 0,49 dL/g se adquiere de SurModics Pharmaceuticals (Birmingham, AL; Código del producto 7525 DLG 5A.) El copolímero de bloques PLA-PEG con un bloque de PEG de aproximadamente 5.000 Da y un bloque de PLA de aproximadamente 20.000 Da se obtiene de Selecta Biosciences (Watertown MA). Poli(alcohol vinílico) (PM = 11.000 - 31.000, 87-89% hidrolizado) se adquiere de J.T. Baker (Número de pieza U232-08).

Las disoluciones se prepararon como sigue:

Disolución 1: ácido nucleico aislado inmunoestimulante de [SEQ ID NO: 1] en 100 mg/mL se prepara en agua purificada.

10 Disolución 2: 0,49-IV 7525 PLGA @ 75 mg/mL y PLA-PEG @ 25 mg/ml en diclorometano. La disolución se hace preparando primero dos disoluciones separadas a temperatura ambiente: 0,49-IV 7525 PLGA @ 100 mg/mL en diclorometano puro y PLA-PEG @ 100 mg/mL en diclorometano puro. La disolución final se prepara añadiendo 3 partes de disolución de PLGA por cada parte de disolución de PLA-PEG.

Disolución 3: Poli(alcohol vinílico) @ 50 mg/mL en tampón fosfato 100 mM pH 8.

15 Disolución 4: tampón de fosfato 70 mM, pH 8

Primero se crea una emulsión primaria (W1/O) utilizando la Disolución 1 y la Disolución 2. La Disolución 1 (0,1 mL) y la Disolución 2 (1,0 mL) se combinan en un pequeño tubo de presión de vidrio y se someten a ultrasonidos a 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonificador Branson Digital 250.

20 A continuación se forma una emulsión secundaria (W1/O/W2) añadiendo Disolución 3 (3,0 mL) a la emulsión primaria y sometiendo a ultrasonidos a 30% de amplitud durante 60 segundos utilizando el sonificador Branson Digital 250.

25 La segunda emulsión se añade a un vaso de precipitados que contiene solución tampón fosfato 70 mM (30 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evapore y que los nanosopores formen una suspensión. Una parte de los nanosopores suspendidos se lava mediante la transferencia de la suspensión de nanosopores a un tubo de centrifuga, centrifugando a 21.000 rcf durante 45 minutos, separando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este proceso de lavado se repite y, a continuación, el sedimento se resuspende en solución salina tamponada con fosfato para lograr la suspensión de nanosopores final que tiene una concentración nominal de 10 mg/mL sobre una base de polímero.

30 La cantidad de oligonucleótido en el nanosopore se determina mediante análisis RP-HPLC. La masa total de nanosopores secos por mL de suspensión se determina por un método gravimétrico. La concentración final de nanosopores se logra mediante la dilución de 5 mg/mL con solución salina tamponada con fosfato adicional.

Ejemplo 3: Soportes de Proteína con Ácidos Nucleicos Acoplados Covalentemente

35 Ácido nucleico modificado con sulfhidrilo fosforotioado de SEQ ID NO: 1 se prepara mediante síntesis en fase sólida. Ovoalbúmina (OVA, albúmina de huevo de pollo, calidad de VI de Sigma (St. Louis, MO)) se activa con un exceso 20-molar de éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-sulfo-succinimida (sulfo-MBS, Pierce) en un tampón de EDTA-PBS 5-mM pH 7,0 durante 2,5 h a temperatura ambiente. Los grupos amino de residuos de L-lisina en la OVA se modifican con grupos maleimida. Sulfo-MBS no unido se separa por cromatografía en una columna de gel Bio-Econo P6 (Bio-Rad, Munich, Alemania). El ácido nucleico modificado con sulfhidrilo de SEQ ID NO: 1 se reduce a 40 continuación en una disolución 50 mM de 1,4-ditiotreititol-PBS a temperatura ambiente durante 2 h y los reactivos residuales se separan por cromatografía en una columna de gel Bio-Econo P6.

El ácido nucleico resultante se incuba a continuación con OVA modificada en una relación molar de 5:1 durante 3 horas a temperatura ambiente y a continuación se añade L-cisteína para inactivar grupos maleimida reactivos. Ácido nucleico libre se separa mediante diálisis frente a PBS (MWCO10000, Pierce). El producto dializado se desala mediante cromatografía en una columna de desalación PD-10, seguido de liofilización. Los conjugados de ácido

nucleico-Ova resultantes se analizan en un gradiente de SDS-PAGE al 6-20% (tinción de plata) y un gradiente de PAGE (bromuro de etidio) no desnaturalizante, no reductor al 4-15%. La concentración de proteínas se determina utilizando el método de Lowry (Pierce).

Ejemplo 4: Ácidos Nucleicos

- 5 Ácidos nucleicos aislados inmunoestimulantes adicionales que incluyen las siguientes secuencias se sintetizan utilizando técnicas de síntesis en estado sólido convencionales. Las cadenas principales de las secuencias son cadenas principales de fosfodiéster.

5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCGAACGTT- 3' [SEQ ID NO: 2]

5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCGAACGTTAACGTT-3' [SEQ ID NO: 3]

- 10 5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCGTCGTCGAACGTTTCGCGAACGTTTCG- 3' [SEQ ID NO: 4]

5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCGTTTCGAA-3' [SEQ ID NO: 5]

5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCGGACGTC-3' [SEQ ID NO: 6]

5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCGATCGAT-3' [SEQ ID NO: 7]

- 15 Las secuencias anteriores también se sintetizan con cadenas principales fosforotioadas para estabilizar el ADN. Cualquiera de las secuencias anteriores se combinan con excipiente(s) adecuado(s) para formar composiciones de la invención.

Ejemplo 5. Preparación de Nanosoportes con Ácidos Nucleicos

Una composición que comprende nanosoportes sintéticos que comprenden el ácido nucleico aislado inmunoestimulante descrito se preparó como sigue:

- 20 Selecta-7, un nuevo ácido nucleico de cadena sencilla aislado inmunoestimulante que tiene la secuencia de desoxirribonucleótidos:

5'-TCGTGGAACGTTTCGCGAACGTTTCG-3' [SEQ ID NO: 1]

se adquirió de Oligo Factory (Holliston, MA).

Las disoluciones se prepararon como sigue:

- 25 Disolución 1: el ácido nucleico aislado inmunoestimulante de SEQ ID NO: 1 a 40 mg/mL en KCl 150 mM.

Disolución 2: 0,50 mL de 7525 PLGA (Lakeshore Biomateriales) @ 100 mg/mL, 0,25 mL de 5050 PLGA (Lakeshore Biomateriales) @ 100 mg/mL y 0,25 mL de PLA-PEG-nicotina (Selecta Biosciences) @ 100 mg/mL en diclorometano.

Disolución 3: Poli(alcohol vinílico) (Lakeshore Biomateriales) @ 5% en tampón fosfato 100 mM pH 8.

- 30 Disolución 4: tampón fosfato 70 mM, pH 8

Primero se creó una emulsión primaria (W1/O) utilizando la Disolución 1 y la Disolución 2. La Disolución 1 (0,25 mL) y la Disolución 2 (1,0 mL) se combinaron en un pequeño tubo de presión de vidrio y se sometieron a ultrasonidos a 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonificador Branson Digital 250.

A continuación se formó una emulsión secundaria (W1/O/W2) añadiendo Disolución 3 (3,0 mL) a la emulsión primaria y sometiendo a ultrasonidos a 30% de amplitud durante 60 segundos utilizando el sonificador Branson Digital 250.

5 La segunda emulsión se añadió a un vaso de precipitados que contenía solución tampón fosfato 70 mM (30 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evapore y que los nanosoportes formen una suspensión. Una parte de los nanosoportes suspendidos se lavó mediante la transferencia de la suspensión de nanosoportes a un tubo de centrifuga, centrifugando a 21.000 rcf durante 45 minutos, separando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este proceso de lavado se repitió y, a continuación, el sedimento se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato para lograr la
10 suspensión de nanosoportes final que tiene una concentración nominal de 8,1 mg/mL sobre una base de polímero.

Las nanopartículas que contenían ácido nucleico se mezclaron con nanopartículas que contenían péptido de células T cooperadoras (TCHP; SEQ ID NO: 13 del documento US 2011/0110965) preparado como sigue:

Las disoluciones se prepararon como sigue:

Disolución 1: TCHP (Bachem) a 30 mg/mL se preparó en ácido láctico al 60% v/v.

15 Disolución 2: 0,75 mL de PLA (Lakeshore Biomateriales) @ 100 mg/mL y 0,25 mL de PLA-PEG-nicotina (Selecta Biosciences) @ 100 mg/mL en diclorometano.

Disolución 3: Poli(alcohol vinílico) (JT Baker) @ 5% en tampón fosfato 100 mM pH 8.

Disolución 4: tampón de fosfato 70 mM, pH 8

20 Primero se creó una emulsión primaria (W1/O) utilizando la Disolución 1 y la Disolución 2. La Disolución 1 (0,25 mL) y la Disolución 2 (1,0 mL) se combinan en un pequeño tubo de presión de vidrio y se sometieron a ultrasonidos a 50% de amplitud durante 40 segundos utilizando un sonificador Branson Digital 250.

A continuación se formó la emulsión secundaria (W1/O/W2) añadiendo Disolución 3 (3,0 mL) a la emulsión primaria y sometiendo a ultrasonidos a 30% de amplitud durante 60 segundos utilizando el sonificador Branson Digital 250.

25 La segunda emulsión se añadió a un vaso de precipitados que contenía solución tampón fosfato 70 mM (30 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evapore y que los nanosoportes formen una suspensión. Una parte de los nanosoportes suspendidos se lavó mediante la transferencia de la suspensión de nanosoportes a un tubo de centrifuga, centrifugando a 21.000 rcf durante 45 minutos, separando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este proceso de lavado se repitió y, a continuación, el sedimento se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato para lograr la
30 suspensión de nanosoportes final que tiene una concentración nominal de 8,1 mg/mL sobre una base de polímero.

Las dos suspensiones de nanopartículas a 8,1 mg/mL cada una se mezclaron en la relación 1:1 para formar una mezcla de nanosoportes sintética (NP-7) para estudios posteriores.

Ejemplo 6. Los Ácidos Nucleicos Aumentan la Respuesta de Anticuerpos In Vivo

35 La inmunización con una mezcla de nicotina NP con Selecta-7 atrapado (SEQ ID NO:1), la mezcla de nanosoportes sintética NP-7 tal como se preparó en el Ejemplo 5, se comparó con la inmunización con una mezcla similar de nicotina NP que no contenía un adyuvante (NP [NIC,Ø,Ø] + NP [NIC,Ø,S-320]). Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea los días 0, 14 y 28 con 100 µg de NP-7 o con control NP NP [NIC,Ø,Ø] + NP [NIC,Ø,S-320]. Para cada dosis de inmunización, NP-7 contenía 7,4 µg de Selecta-7. Los títulos de anticuerpos anti-nicotina en suero se midieron mediante ELISA el día 26 (FIG. 3). La adición de nicotina NP con Selecta-7 atrapado aumentó la respuesta
40 de anticuerpos a la nicotina en un factor de 25. Por lo tanto, los ácidos nucleicos descritos son activos in vivo y NP-7 incluyendo Selecta-7 inducía una fuerte respuesta de anticuerpos a la nicotina en ratones.

Ejemplo 7. Nanopartículas que Contienen Ácidos Nucleicos Inducen Respuestas de Anticuerpos en Primates No humanos

Una mezcla de nicotina NP con Selecta-7 atrapado (SEQ ID NO: 1, NP-7) tal como se preparó en el Ejemplo 5, se administró a primates no humanos para estudiar la inducción de respuestas de anticuerpos. Los animales recibieron un total de tres vacunaciones con un intervalo de 4 semanas entre inyecciones de NP-7 (véase el programa detallado a continuación). En cada momento del proceso, los animales fueron sedados con 10 mg/kg de ketamina-HCl administrada por vía intramuscular. Se administró 1 ml de la sustancia de ensayo por vía subcutánea. Brevemente, se afeitó la piel de los cuádriceps, se limpió con alcohol y se dejó secar. El material inmunizante se administró a continuación a través de una aguja de calibre 23, de 1 pulgada. Los animales fueron controlados y devueltos a sus jaulas cuando se despertaron. Los animales se pesaron cuando fueron sedados para cada proceso. Muestras de sangre y 5 ml de suero (utilizado para el análisis de anticuerpos) se recogieron a intervalos de aproximadamente dos veces por semana de acuerdo con el siguiente calendario:

Pre sangrado: día -14
 Primera vacunación: día 0
 Flebotomía: día 14
 Segunda vacunación: día 28
 Flebotomía: día 42
 Tercera vacunación: día 56
 Flebotomía: día 70
 Flebotomía: día 84

Las muestras de suero se convirtieron en partes alícuotas, se almacenaron a -20°C y se ensayaron para anticuerpos anti-nicotina y anti-soportes mediante ELISA. Para la medición de anticuerpos anti-nicotina, placas ELISA de 96 pocillos fueron recubiertas con polilisina-nicotina y se incubaron durante la noche a 4°C. Para la medición de anticuerpos anti-soporte, placas ELISA de 96 pocillos se recubrieron con polilisina-PEG diluido en la relación 1:100 o nanopartículas base diluidas en la relación 1:1000 (misma formulación que la utilizada para inyecciones, excepto nanopartículas base que no contienen nicotina) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron y se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con FBS al 10% en PBS. Las placas se lavaron y se añadieron muestras de suero a la fila superior de las placas ELISA y se diluyeron en FBS al 10% en PBS 3 veces debajo de la placa. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-nicotina como control positivo estándar en dos columnas en cada una de las placas para placas recubiertas con polilisina-nicotina. Para placas cubiertas con polilisina-PEG y con nanopartículas base, un anticuerpo anti-PEG de conejo monoclonal se utilizó como control positivo. Para los controles negativos, se utilizaron anticuerpos de control de isotipo o suero de animales no inmunizados. Después de la adición de la muestra de suero, las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y a las placas se añadió anti-IgG biotinilada de mono. Para patrones de anticuerpo de ratón se añadió Ig (total) anti-ratón de cabra biotinilada a las placas. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron y se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP) a las placas. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió sustrato TMB. Las placas se incubaron en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadió disolución de parada (H₂SO₄ 2N) a las placas, y las lecturas de la DO a 450 y 570 nm fueron tomadas utilizando un lector de placas. La concentración máxima media eficaz (CE₅₀) de anticuerpo anti-nicotina en base al gráfico de la curva de ajuste logístico de cuatro parámetros generado se calculó para cada una de las muestras.

Las afinidades de los anticuerpos de suero a la nicotina se midieron mediante ensayos de diálisis en equilibrio utilizando la nicotina marcada con ³H. K_d (afinidad de anticuerpos) y B_{max} (concentración de anticuerpos) se determinaron sobre la base de una curva de saturación de ligando libre frente a ligado. Las mediciones de afinidad en monos se realizaron el día 70, 14 días después del segundo refuerzo.

NP-7 (0,9 - 8,1 mg) indujo anticuerpos contra la nicotina en una forma dependiente de la dosis. Persistían títulos considerables (50.000-150.000) en los animales inmunizados con las tres dosis más altas de NP-7 al menos durante 2 meses después del último refuerzo. La respuesta de anticuerpos NP-7 era dependiente de la dosis a lo largo de la duración del experimento (FIG. 4). Los datos demuestran que NP-7, que contiene Selecta-7 como adyuvante, era capaz de inducir una fuerte respuesta de anticuerpos dependiente de la dosis en primates no humanos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende:
un ácido nucleico aislado inmunoestimulante que comprende una secuencia:

5' - TCGTCGAACGTTTCGCGAACGTTTCG-3' [SEQ ID NO: 1]; y

5 un excipiente farmacéuticamente aceptable;
en donde C no está metilado.

10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico aislado inmunoestimulante comprende, además,
una modificación estabilizante, p. ej., modificaciones de grupos 3' OH o 5' OH, modificaciones de bases de
nucleótidos, modificaciones de componentes de azúcar o modificaciones de grupos fosfato tal como la cadena
principal de fosforotioato.

3. La composición de la reivindicación 1, que comprende, además, un antígeno.

4. La composición de la reivindicación 3, en donde el antígeno comprende una antígeno de células B, en particular
nicotina, o un antígeno de células T.

15 5. La composición de la reivindicación 4, en donde el antígeno de células T comprende un antígeno de células T
cooperadoras.

6. La composición de la reivindicación 1, que comprende, además, un soporte acoplado al ácido nucleico aislado
inmunoestimulante.

7. La composición de la reivindicación 6, en donde el soporte comprende un nanosoporte sintético.

20 8. La composición de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico aislado inmunoestimulante consiste
esencialmente en:

5' - TCGTCGAACGTTTCGCGAACGTTTCG-3' [SEQ ID NO: 1].

9. La composición de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico aislado inmunoestimulante no comprende una
modificación estabilizante.

25 10. La composición de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico aislado inmunoestimulante consiste
esencialmente en SEQ ID NO: 1.

11. Una composición que comprende una vacuna que comprende la composición de cualquiera de las
reivindicaciones 1-10.

30 12. Un ácido nucleico aislado, que comprende SEQ ID NO: 1 y, opcionalmente, en donde el ácido nucleico aislado
se sintetiza *in vitro* y, opcionalmente, en donde el ácido nucleico tiene una longitud total de 24 nucleótidos a 1500
nucleótidos.

13. Una composición inmunoestimulante que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-
10.

14. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en inducir la producción de IL-6,
interferón-alfa o IP-10 en un sujeto.

35 15. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 para uso en inducir una respuesta de
anticuerpo contra el antígeno en un sujeto.

16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y 13-15, en donde el ácido nucleico aislado inmunoestimulante se sintetiza *in vitro*.

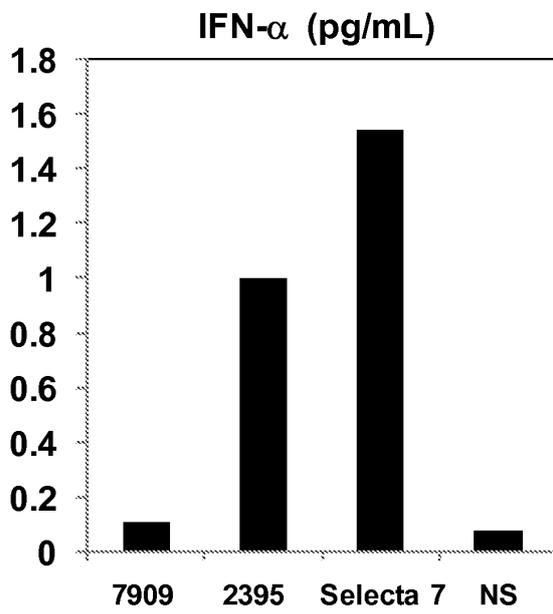


FIG. 1A

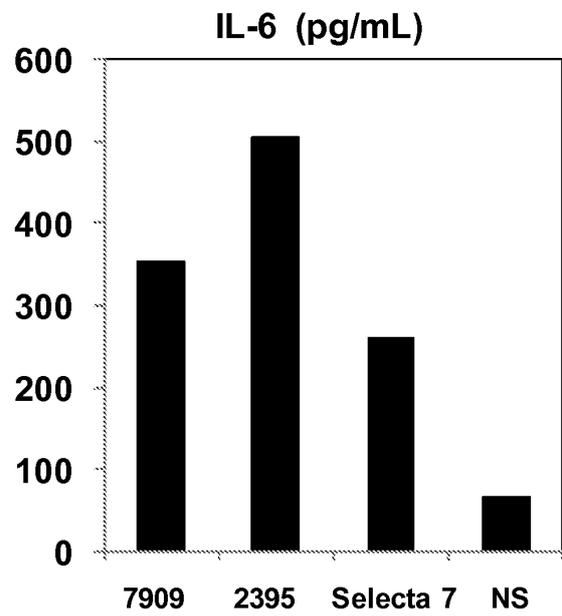


FIG. 1B

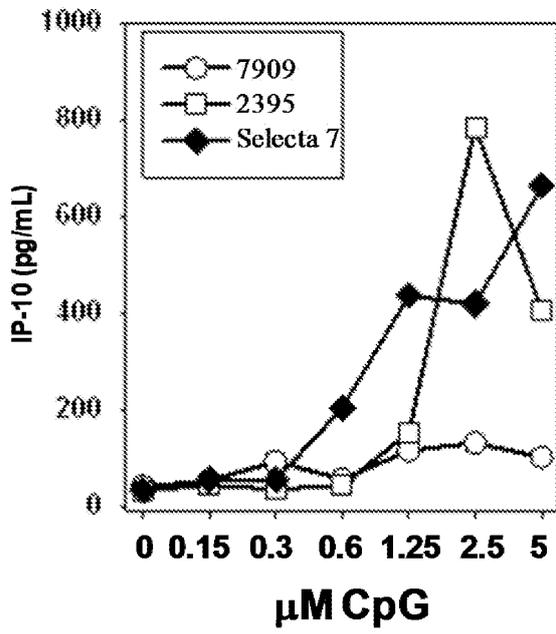


FIG. 1C

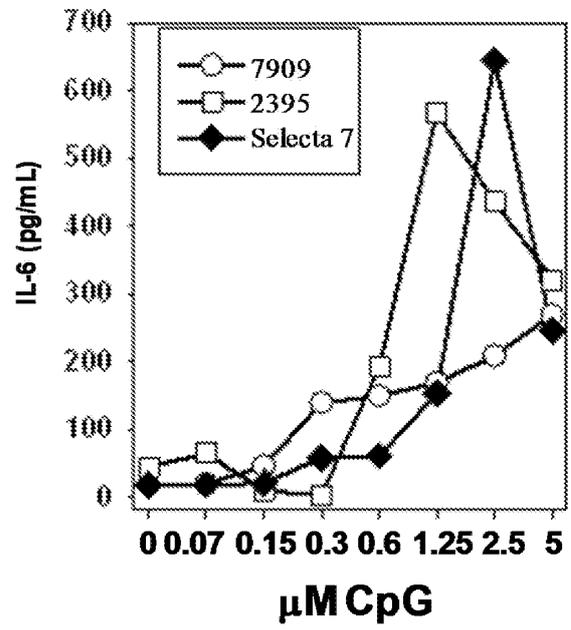


FIG. 1D

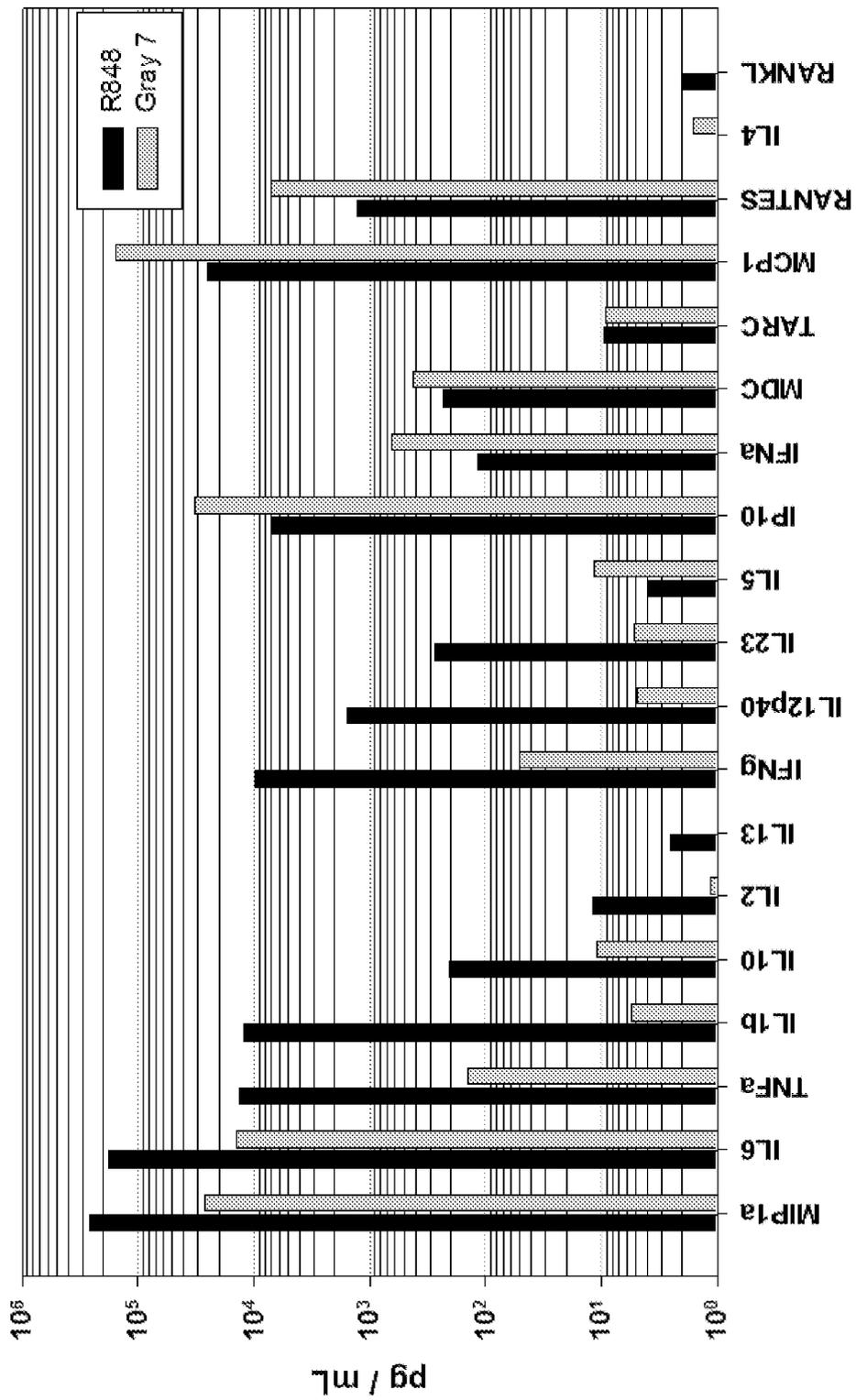


FIG. 2

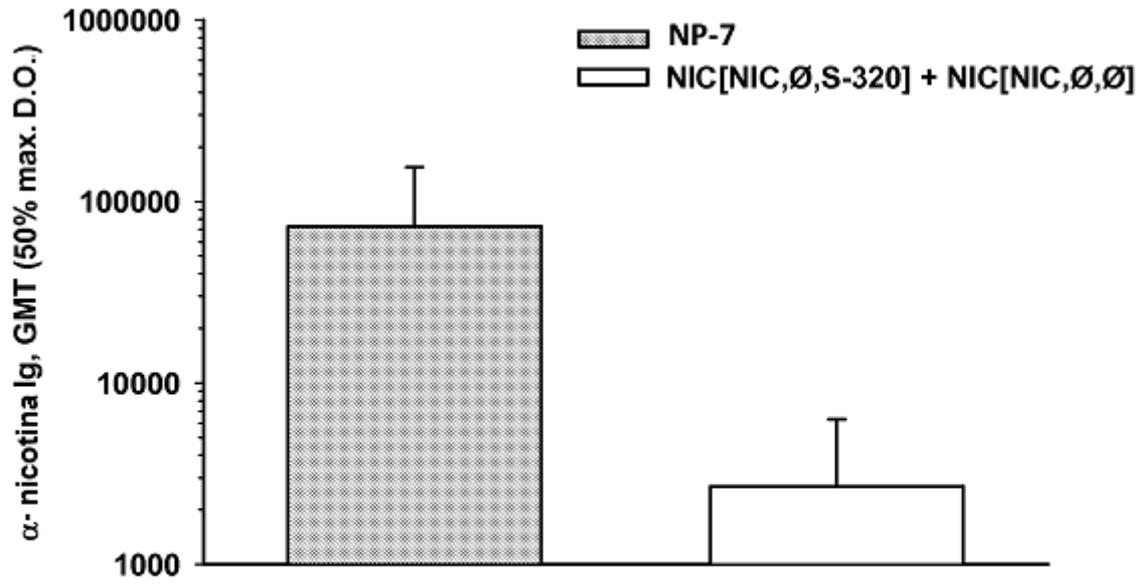


FIG. 3

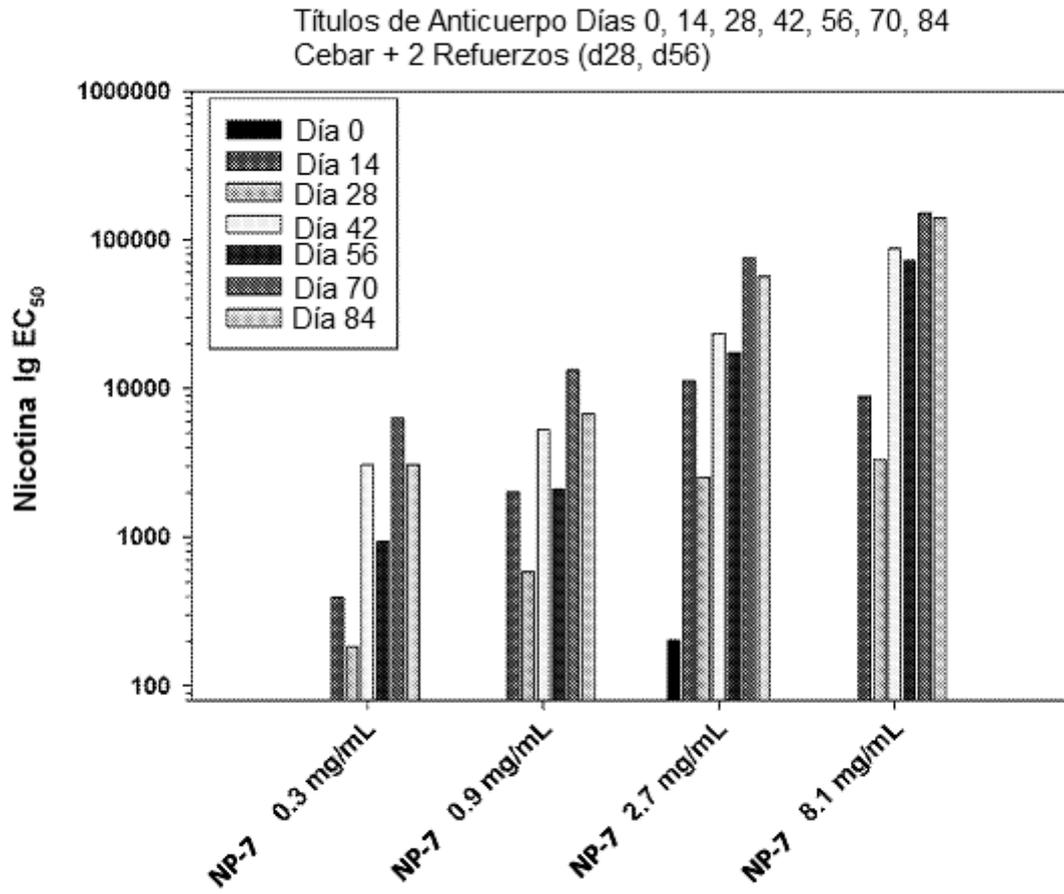


FIG. 4