

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 705**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2008 PCT/CA2008/001678**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009 WO09039628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2008 E 08800369 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2197497**

54 Título: **Uso de liposomas en un vehículo que comprende una fase hidrófoba continua para la entrega de polinucleótidos in vivo**

30 Prioridad:

27.09.2007 US 975602 P
13.06.2008 US 61303 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2016

73 Titular/es:

IMMUNOVACCINE TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
1344 Summer Street, Suite 412
Halifax, Nova Scotia B3H 0A8, CA

72 Inventor/es:

MANSOUR, MARC;
KARKADA, MOHAN y
WEIR, GENEVIEVE MARY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 588 705 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

Uso de liposomas en un vehículo que comprende una fase hidrófoba continua para la entrega de polinucleótidos *in vivo*

5

Campo de la invención

La presente solicitud se refiere al uso de una composición que comprende liposomas y una fase hidrófoba continua como un vehículo para entregar polinucleótidos *in vivo*.

10

Antecedentes de la invención

Ha habido mucha investigación sobre la introducción eficaz de ácidos nucleicos dentro de células y tejidos diana para su uso por ejemplo en terapia génica. Tales ácidos nucleicos pueden ser por ejemplo secuencias que codifican un producto génico o en su lugar secuencias de nucleótidos cortas que se corresponden con la secuencia sentido o antisentido de genes específicos o sus productos y por tanto tienen un efecto directo sobre la expresión de estos genes y/o sus productos.

15

Continúan existiendo problemas en la entrega de ácidos nucleicos al sitio diana correcto y a un número suficiente de células diana. Los ácidos nucleicos se someten al ataque de nucleasas y son frecuentemente incapaces de cruzar las membranas celulares. Se han propuesto una amplia variedad de procedimientos de entrega, que incluyen microinyección, carga de raspaduras y endocitosis mediada por receptor. Los sistemas de vehículo basados en lípidos, que incluyen aquellos que implican el uso de liposomas, se usan frecuentemente para encapsular los ácidos nucleicos terapéuticos. Sin embargo, el uso de liposomas puede plantear problemas tales como mala eficacia de encapsulación y rápida eliminación de la circulación. También puede haber problemas en encapsular nucleico suficiente sin aumentar el tamaño del liposoma hasta el punto en el que se altere la entrega a los tejidos diana. Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar sistemas de entrega basados en liposomas para dirigir ácidos nucleicos al tejido diana correcto.

20

25

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende: un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba; liposomas; y un polinucleótido.

35

En otro aspecto, la invención proporciona una composición como se ha definido anteriormente, para su uso como un medicamento para entregar un polinucleótido a un sujeto.

Otros aspectos y características de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos habituales en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención conjuntamente con las figuras adjuntas.

40

Breve descripción de las figuras

En las figuras, que ilustran realizaciones de la invención a modo de ejemplo solo:

45

La figura 1 ilustra el potencial de expresión de IL-12 en células aisladas de ganglios linfáticos 8 días después de la inyección.

La figura 2 ilustra el potencial de expresión de IL-12 en células aisladas de ganglios linfáticos 8 días después de la inyección. Se promediaron los niveles de proteína de IL-12 detectados a partir de cada grupo de ratones.

50

La figura 3 ilustra el potencial de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células aisladas de ganglios linfáticos 8 días después de la inyección. Las células de los ganglios linfáticos de animales del Grupo 1 (GFP en PBS), Grupo 2 (GFP/liposoma/vehículo hidrófobo), Grupo 3 (GFP/vehículo hidrófobo) y Grupo 4 (GFP/liposoma) contuvieron células que expresan GFP detectable por encima de la fluorescencia de fondo representada por una línea horizontal. La fluorescencia de fondo se estimó usando recuentos de fluorescencia de células de los ganglios linfáticos de animales de control del Grupo 5 (liposoma/vehículo hidrófobo, sin GFP) y el Grupo 6 (ratones sin tratar). Se calcularon valores de p usando la prueba de la t de Student.

55

La figura 4 ilustra células de los ganglios linfáticos CD11b/CD11c positivas que muestran expresión de GFP 8 días después de la vacunación. Los datos presentados en la figura 1 se re-analizaron para comparar el número de células CD11b/CD11c y GFP positivas en los ganglios linfáticos de animales de los Grupos 1-6 (descritos en la figura 1). El número de células CD11b/CD11c positivas, GFP positivas se calculó como un porcentaje de células de los ganglios linfáticos totales.

60

65

La figura 5 ilustra la inhibición de la expresión de proteínas IL-12 inducida por el plásmido de IL-12 en células

aisladas de ganglios linfáticos, tras la inyección de ARNip de IL-12. Se promediaron los niveles de proteína IL-12 detectados de cada grupo de ratones. Las células de los ganglios linfáticos son del Grupo 1 (plásmido pORF-mIL12 solo, sin ARNip), Grupo 2 (plásmido pORF-mIL12, IL12-ARNip en PBS), Grupo 3 (plásmido pORF-mIL12, IL12-ARNip en liposoma/vehículo hidrófobo) y Grupo 4 (ratones sin tratamiento previo sin tratar). Se calcularon valores de p usando la prueba de la t de Student.

La figura 6 ilustra la inhibición de la expresión de proteínas IL-12 inducida por ovoalbúmina en células aisladas de ganglios linfáticos, tras la inyección de ARNip de IL-12. Se promediaron los niveles de proteína IL-12 detectados a partir de cada grupo de ratones. Las células de los ganglios linfáticos son del Grupo 1 (ovoalbúmina en CFA en el día 0, sin ARNip), Grupo 2 (ovoalbúmina en CFA, IL12-ARNip en PBS, día menos 1), Grupo 3 (ovoalbúmina en CFA, IL12-ARNip en liposoma/vehículo hidrófobo, día menos 1), Grupo 4 (ovoalbúmina en CFA, IL12-ARNip en PBS, día más 1), Grupo 5 (ovoalbúmina en CFA, IL12-ARNip en liposoma/vehículo hidrófobo, día más 1) y Grupo 6 (ratones sin tratamiento previo sin tratar). Se calcularon valores de p usando la prueba de la t de Student.

Descripción detallada

La invención proporciona composiciones útiles para entregar un polinucleótido a un sujeto.

Polinucleótidos

El uso de polinucleótidos como se describe en el presente documento se refiere específicamente a polinucleótidos que contienen secuencias que se corresponden en gran medida con la secuencia sentido o antisentido de genes específicos o sus productos y por tanto tienen un efecto directo sobre la expresión de estos genes y/o sus productos. Por ejemplo, el uso de polinucleótidos que contienen secuencias codificantes de genes afecta la transcripción y/o traducción de los genes de interés en células que captan tales polinucleótidos. Similarmente, el uso de polinucleótidos de interferencia por ARN afecta la expresión de genes específicos de interés afectando directamente los niveles de ARNm en células que captan tales nucleótidos. Esto se diferencia significativamente de otras moléculas basadas en polinucleótidos tales como adyuvantes de CpG y polyIC, que no actúan mediante la presencia de secuencias específicas de genes. Además, se cree que los adyuvantes basados en polinucleótidos modulan una respuesta inmunitaria de una manera no específica y sus acciones empiezan en el sitio de vacunación donde interaccionan con receptores extracelulares para potenciar la actividad de células inmunitarias de una manera no específica. En algunos casos, los adyuvantes basados en polinucleótidos se internalizan por lo que ejercen sus efectos interaccionando con receptores intracelulares, que conducen similarmente a la activación de rutas aguas abajo y que producen conjuntamente la potenciación de la actividad de células inmunitarias para ayudar en la generación de una respuesta inmunitaria. Tales adyuvantes no afectan directamente la expresión de genes específicos que están siendo elegidos como diana por las construcciones polinucleotídicas como se contempla en el presente documento. Tales adyuvantes no interaccionan directamente con los productos de expresión de genes elegidos como diana, ni contienen secuencias que se correspondan con la secuencia sentido o antisentido de los genes elegidos como diana.

En una realización, la composición es útil para potenciar la expresión de un polinucleótido que codifica polipéptido *in vivo*. En otras realizaciones, el polinucleótido puede no codificar un polipéptido, pero puede en su lugar ser por ejemplo un polinucleótido que comprende o que codifica un ARN antisentido u otra molécula que no es un polipéptido. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden un polinucleótido de interés, opcionalmente operativamente ligado a secuencias reguladoras adecuadas para dirigir la expresión de proteínas del polinucleótido (por ejemplo un promotor), liposomas y un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. Se demostró que las composiciones de la invención aumentaban la expresión de polipéptidos a partir de ADN plasmídico, como se mide por ELISA, en un modelo murino, con respecto a ADN plasmídico suspendido en solución salina tamponada con fosfato. También se demostró que las composiciones de la invención aumentaban la expresión de polipéptidos a partir de ADN plasmídico, como se mide por inmunofluorescencia, en un modelo murino, con respecto al ADN plasmídico suspendido en solución salina tamponada con fosfato, adyuvante incompleto de Freund (IFA) o en liposomas sin aceite.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" engloba una cadena de nucleótidos de cualquier longitud (por ejemplo 9, 12, 18, 24, 30, 60, 150, 300, 600, 1500 o más nucleótidos) o número de cadenas (por ejemplo, monocatenaria o bicatenaria). Los polinucleótidos pueden ser ADN (por ejemplo, ADN genómico o ADNc) o ARN (por ejemplo, ARNm) o combinaciones de los mismos. Pueden existir de forma natural o ser sintéticos (por ejemplo, sintetizarse químicamente). Se contempla que el polinucleótido puede contener modificaciones de una o más bases nitrogenadas, azúcares de pentosa o grupos fosfato en la cadena de nucleótido. Tales modificaciones son muy conocidas en la técnica y pueden ser con el fin de por ejemplo mejorar la estabilidad del polinucleótido.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" o "proteína" significa cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud (por ejemplo, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 200, 500 o más aminoácidos) o después de la modificación traduccional (por ejemplo, glucosilación o fosforilación). Ambos términos se usan indistintamente.

Las composiciones de la invención son útiles para entregar polinucleótidos de todos los tipos a un sujeto *in vivo*. En

algunas realizaciones, el polinucleótido no se expresa como una proteína en el sujeto, sino que codifica, por ejemplo, un ARN antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico, o una ribozima. En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica un polipéptido que va a expresarse *in vivo* en un sujeto. La invención no se limita a la expresión de cualquier tipo de polipéptido particular. El polipéptido puede ser, simplemente a modo de ejemplos ilustrativos, un antígeno, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, una enzima, una citocina, una proteína terapéutica, una quimiocina, una proteína reguladora, una proteína estructural, una proteína química, una proteína nuclear, un factor de transcripción, una proteína vírica, una proteína TLR, un factor regulador de interferón, una proteína angiostática o angiogénica, una proteína apoptótica, un receptor gamma de Fc, una proteína hematopoyética, un supresor tumoral, un receptor de citocina, o un receptor de quimiocina.

Antígenos representativos incluyen, sin limitación: aquellos derivados de toxoide del cólera, toxoide tetánico, toxoide diftérico, antígeno de superficie de la hepatitis B, hemaglutinina, neuraminidasa, proteína de la gripe M, PflHRP2, pLDH, aldolasa, MSP1, MSP2, AMA1, Der-p-1, Der-f-1, adipofilina, AFP, AIM-2, ART-4, BAGE, alfa-fetoproteína, BCL-2, Bcr-Abl, BING-4, CEA, CPSF, CT, ciclina D1Ep-CAM, EphA2, EphA3, ELF-2, FGF-5, G250, hormona liberadora de gonadotropina, HER-2, carboxil esterasa intestinal (iCE), IL13Ralfa2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MART-1, MART-2, M-CSF, MDM-2, MMP-2, MUC-1, NY-EOS-1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, p53, PBF, PRAME, PSA, PSMA, RAGE-1, RNF43, RU1, RU2AS, SART-1, SART-2, SART-3, SAGE-1, SCR1, SOX2, SOX10, STEAP1, survivina, telomerasa, TGFbetaRII, TRAG-3, TRP-1, TRP-2, TERT o WT1; aquellos derivados de un virus, tales como virus de la viruela vacuna, virus de la variolovacuna, virus de la paravacuna, virus del herpes 1 humano, virus del herpes 2 humano, citomegalovirus, adenovirus A-F humanos, virus del poliovirus, virus del papiloma humano, parvovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, Orthoreovirus, rotavirus, virus del Ébola, virus paragripal, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubeola, Pneumovirus, virus respiratorio sincitial humano, virus de la rabia, virus de la encefalitis de California, virus de la encefalitis japonesa, hantavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, coronavirus, enterovirus, rinovirus, virus de la poliomieltis, Norovirus, flavivirus, virus del dengue, virus del Nilo occidental, virus de la fiebre amarilla y varicela; aquellos derivados de una bacteria, tales como carbunco, Brucella, Candida, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia psittaci, Cholera, Clostridium botulinum, Coccidioides immitis, Cryptococcus, Diphtheria, Escherichia coli O157: H7, Escherichia coli enterohemorrágica, Escherichia coli enterotoxigénica, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Legionella, Leptospira, Listeria, Meningococcus, Mycoplasma pneumoniae, Mycobacterium, Pertussis, Pneumonia, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus pneumoniae y Yersinia enterocolitica; o aquellos derivados de un protozoo, por ejemplo, Plasmodium falciparum.

La interferencia por ARN (iARN) es un mecanismo de silenciamiento de genes postranscripcional específico de secuencia, que es desencadenado por ARN bicatenario tal como ARN interferente pequeño (o corto) (ARNip) y ARN intracelular monocatenario tal como microARN (miARN), ambos de los cuales pueden producir la degradación de ARNm homólogos en secuencia a ARNip o miARN (Fire et al, 1998, Nature, 391:806-811; Montgomery et al, 1998, PNAS, 95:15502-15507; Elbashir et al, 2001, Nature, 411:494-498). La iARN es una vía conservada común a plantas y mamíferos que suprimen la expresión de genes con secuencias complementarias (Hannon y Rossi, 2004, Nature, 431:371-378; Meister y Tuschl, 2004, Nature, 431, 343-349). La iARN se observó por primera vez en organismos inferiores, tales como plantas o nematodos. En estos sistemas, los ARNbc largos sirven de desencadenantes eficaces de iARN. Los ARNbc largos no son los desencadenantes reales, pero son degradados por la endorribonucleasa Dicer en moléculas efectoras pequeñas llamadas ARNip. En mamíferos, el procesamiento por Dicer se produce como un complejo con la proteína de unión a ARN TRBP. El ARNip naciente se asocia a Dicer, TRBP y Ago2 para formar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que media en el silenciamiento génico (Chendrimada et al, 2005, Nature, 436:740-744). Una vez en RISC, una hebra del ARNip (la hebra pasajero) es degradada o se desecha, mientras que la otra hebra (la hebra guía) sigue dirigiendo la especificidad de secuencia del complejo de silenciamiento. El componente de Ago2 de RISC es una ribonucleasa que escinde un ARN diana sometida a la dirección de la hebra guía.

Aunque los ARNbc largos (varios cientos de pb) se emplean comúnmente para desencadenar el iARN en *C. elegans* o *D. melanogaster*, estas moléculas activarán el sistema inmunitario innato y desencadenarán respuestas de interferón (IFN) en organismos superiores. La iARN puede realizarse en células de mamífero usando ARN cortos, que generalmente no inducen respuestas de IFN. Muchos investigadores emplean hoy en día dúplex de ARN 21-meros sintéticos como sus reactivos de iARN, que imitan a los ARNip naturales que resultan del procesamiento por Dicer de ARN de sustrato largos. Un enfoque alternativo es usar dúplex de ARN sintético que son mayores de 21-mero en longitud, que son sustratos para Dicer (Tuschl, T. 2002, Nature Biotechnology, 20:446).

Dicer-ARN de sustrato (D-ARNip) recientemente desarrollados son dúplex de ARN químicamente sintetizados que tienen potencia elevada en la interferencia por ARN (Kim et al, 2005, Nat Biotechnol, 23:222-226). Los D-ARNip se procesan por Dicer en ARNip 21-meros y se diseñan de manera que la escisión produzca un único producto deseado. Esto se logra mediante el uso de un diseño asimétrico novedoso en el que el dúplex de ARN tiene un único nucleótido protuberante en 3' de 2 bases en la cadena AS y es romo en el otro extremo; el extremo romo se modifica con bases de ADN. Este diseño proporciona Dicer con un único sitio de unión PAZ favorable que ayuda a dirigir la reacción de escisión. La polaridad funcional se introduce por este evento de procesamiento, que favorece la carga de cadena AS dentro de RISC y se cree que el aumento de potencia de estos reactivos se refiere al enlace

entre procesamiento por Dicer y carga de RISC (Rose et al, 2005, Nucleic Acids Res, 33:4140-4156). El enfoque de Dicer-sustrato puede producir reactivos que tienen como mucho una potencia 10 veces mayor que los ARNip 21-meros tradicionales en el mismo sitio.

5 El miARN, descrito por primera vez en 1993 (Lee et al, 1993, Cell 75:843-854), son moléculas de ARN monocatenario de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica. Los miARN están codificados por genes que se transcriben a partir de ADN, pero no se traducen en proteína (ARN no codificante); en su lugar se procesan a partir de transcritos primarios conocidos como *pri-miARN* dando estructuras de tallo-lazo cortas llamadas *pre-miARN* y dando finalmente miARN funcional. Las moléculas de miARN maduras son parcialmente complementarias a una o más moléculas de ARN mensajero (ARNm) y su función principal es regular por disminución la expresión génica. Aunque el miARN se genera dentro de la célula y está altamente conservado, raramente tiene complementariedad perfecta con secuencias de ARNm. Sin embargo, el miARN puede afectar la traducción de proteína y la degradación de ARNm uniéndose a sus sitios diana imperfectamente correspondientes en la región 3' UTR de ARNm, que también requiere la proteína Ago2 (no necesariamente Ago2 como se observa en ARNip). El comparar y contrastar el ARNip con el miARN muestra que si el ARNip alcanza una diana complementaria imperfecta en 3 UTR, se comporta similar a microARN y si un miARN alcanza una diana perfectamente complementaria sobre un ARNm, puede comportarse como un ARNip. Por lo tanto, aunque sean estructuralmente diferentes, tanto el ARNip como el miARN podrían poseer funciones biológicas similares en las células del animal huésped, con algunas diferencias en el mecanismo de acción.

20 Así, las moléculas de iARN, ARNip y/o miARN proporcionan una herramienta poderosa para inhibir la expresión de genes endógenos y así podrían proporcionar un medio para modular eficazmente respuestas biológicas. Estudios han mostrado que el iARN puede inducirse en células dendríticas presentadoras de antígeno (DC) para polarizar respuestas inmunitarias. Transfectando DC con ARNip sintético específico para la sub-unidad p35 de la citocina IL-12, fue posible inhibir IL-12 bioactiva que posteriormente condujo a la polarización de Th2 (Hill et al, J Immunology, 2003, 171:691). Similarmente, se ha usado la modificación de células presentadoras de antígenos profesionales con ARNip *in vivo* para potenciar la potencia de la vacuna del cáncer (Kim et al, Cancer Research, 2005, 65:309-316). En este estudio, se mostró que la co-administración de vacuna de ADN que codifica el virus del papiloma humano tipo 16 E7 con ARNip que se dirige a las proteínas pro-apoptóticas clave Bac y Bax prolongaba la vida de las DC que expresan antígeno en los ganglios linfáticos, mejorando las respuestas de linfocitos T CD8 específicas de antígeno que tenían potentes efectos antitumorales contra un modelo de tumor que expresa E7 en ratones vacunados. Así, hay una buena perspectiva del uso de ARNip para silenciar respuestas específicas no deseables durante la vacunación eficaz contra enfermedades infecciosas/autoinmunitarias, cáncer y durante el trasplante. La eficiente entrega de ARNip al compartimento intracelular de células de interés es crítica para el éxito de tales estrategias, requiriendo el uso de formulaciones de entrega mejoradas.

35 El ARNip puede ser una cadena de nucleótidos bicatenaria (ARN) que existe de forma natural o sintética de longitud variable. El ARNip puede ser dúplex, normalmente pero no siempre limitado a, 20 a 25 nt de longitud que tienen un dominio bicatenario central de 19 pares de bases con nucleótidos protuberantes en 3' de 2 bases terminales. El ARNip puede modificarse adicionalmente químicamente para potenciar su eficacia *in vivo*, inducir resistencia a nucleasa para impedir la degradación y potenciar la estabilidad. A este respecto, la hebra no codificante puede tener tanto un extremo 5'-OH como 5'-fosfato libre, el último produce procesamiento por Dicer natural y representa la forma activa de la molécula. El ARNip puede tener modificación por fosforioato o boranofosfato del enlace internucleosídico para mejorar la estabilidad de nucleasas y prolongar la vida del dúplex cuando se expone a suero y otras fuentes de nucleasa. El ARNip puede tener modificaciones en la posición 2', por ejemplo, incorporación en el residuo de ARN 2'-O-metilo para retener la potencia completa en comparación con el ARN no modificado, reteniendo la estabilidad en suero y reduciendo significativamente el riesgo de posibles respuestas de IFN en la célula. El ARNip puede también tener modificación de 2'-fluoro, que normalmente se incorpora selectivamente en bases de pirimidina, para mejorar la estabilidad y potencia.

50 El ARNip y el miARN usados como mediadores de iARN pueden usarse como dianas en, pero no se limitan a, diversas enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes/alérgicas, enfermedades cardíacas, trastornos metabólicos, tumores sólidos/cánceres, trastornos hematológicos/cánceres.

55 En realizaciones de la presente invención, el polinucleótido en la composición puede ser un polinucleótido para su uso en iARN, que incluye, sin limitación, un ARNip, un miARN, un ARNbc largo para la escisión por Dicer, o un D-ARNip, todos como se han descrito anteriormente.

60 Se ha demostrado en la presente invención que la inyección de secuencias de nucleótidos de ARNip de IL-12 *in vivo* cuando se formula en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo produjo mejor inhibición de la expresión de proteínas IL-12 inducida por el plásmido IL-12 que el ARNip de IL-12 formulado en un vehículo de PBS. Se lograron resultados similares en experimentos referentes a la inhibición de la expresión de proteínas IL-12 inducida por ovoalbúmina en células aisladas de ganglios linfáticos, tras la inyección de ARNip de IL-12. Nuevamente, el ARNip de IL-12 formulado en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo dio resultados superiores al ARNip de IL-12 formulado en un vehículo de PBS.

65

El sujeto puede ser cualquier sujeto al que se desea entregar un polinucleótido. El sujeto es preferentemente un vertebrado, tal como un ave, pez o mamífero, preferentemente un ser humano.

5 El polinucleótido puede entregarse en diversas formas. En algunas realizaciones, puede usarse un polinucleótido desnudo, tanto en forma lineal como insertado dentro de un plásmido, tal como un plásmido de expresión. En otras realizaciones, puede usarse un vector vivo tal como un vector vírico o bacteriano.

10 Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido y el uso previsto, pueden estar presentes una o más secuencias reguladoras que ayudan en la transcripción de ADN en ARN y/o la traducción de ARN en un polipéptido. Por ejemplo, si está previsto o no se requiere que el polinucleótido se transcriba o traduzca, tales secuencias reguladoras pueden estar ausentes. En algunos casos, tales como en el caso de un polinucleótido que es una molécula de ARN mensajero (ARNm), no se requieren secuencias reguladoras relacionadas con el proceso de transcripción (por ejemplo, un promotor) y la expresión de proteínas puede efectuarse en ausencia de un promotor. El experto puede incluir secuencias reguladoras adecuadas según lo requieran las circunstancias.

15 En algunas realizaciones, el polinucleótido está presente en un casete de expresión, en el que está operativamente ligado a secuencias reguladoras que permitirán que el polinucleótido se exprese en el sujeto al que se administra la composición de la invención. La elección del casete de expresión depende del sujeto al que se administra la composición, además de las características deseadas para el polipéptido expresado.

20 Normalmente, un casete de expresión incluye un promotor que es funcional en el sujeto y puede ser constitutivo o inducible; un sitio de unión a ribosoma; un codón de iniciación (ATG) si fuera necesario; el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés; un codón de terminación; y opcionalmente una región del extremo 3' (terminador de la traducción y/o transcripción). Pueden incluirse secuencias adicionales tales como una región que codifica un péptido señal. El polinucleótido que codifica el polipéptido de interés puede ser homólogo o heterólogo a cualquiera de las otras secuencias reguladoras en el casete de expresión. Secuencias que van a expresarse junto con el polipéptido de interés, tales como una región codificante del péptido señal, normalmente se localizan adyacentes al polinucleótido que codifica la proteína que va a expresarse y están puestas en el marco de lectura apropiado. El marco de lectura abierto constituido por el polinucleótido que codifica la proteína que va a expresarse únicamente o junto con cualquier otra secuencia que va a expresarse (por ejemplo, el péptido señal), se pone sometido al control de un promotor de manera que se producen la transcripción y la traducción en el sujeto al que se administra la composición.

35 Promotores adecuados para la expresión de polinucleótidos en un amplio intervalo de sistemas de huésped se conocen bien en la técnica. Promotores adecuados para la expresión de polinucleótidos en mamíferos incluyen aquellos que funcionan constitutivamente, ubicuamente o son específicos de tejido. Ejemplos de promotores no específicos de tejido incluyen promotores de origen vírico. Ejemplos de promotores víricos incluyen promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de la repetición terminal larga del virus de la inmunodeficiencia humana (LTR del VIH), virus de Moloney, virus de la leucosis aviar (ALV), promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV), promotores de virus adeno-asociados (AAV); promotores adenovíricos y promotores del virus de Epstein-Barr (EBV). La compatibilidad de promotores víricos con ciertos polipéptidos es una consideración, ya que su combinación puede afectar a los niveles de expresión. Es posible usar promotores/potenciadores sintéticos para optimizar la expresión (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. 2004/0171573).

45 Un ejemplo de un promotor específico de tejido es el promotor de desmina, que conduce la expresión en células de músculo (Li et al. 1989, Gene 78:243; Li y Paulin 1991, J. Biol. Chem. 266:6562 y Li y Paulin 1993, J. Biol. Chem. 268:10403). Otros ejemplos incluyen promotores artificiales tales como un promotor específico de músculo sintético y un promotor quimérico específico de músculo/del CMV (Li et al. 1999, Nat. Biotechnol. 17:241-245; Hagstrom et al. 2000, Blood 95:2536-2542).

Vectores útiles se describen en numerosas publicaciones, específicamente el documento WO 94/21797 y Hartikka et al. 1996, Human Gene Therapy 7:1205.

55 Como se observa anteriormente, el polinucleótido de interés, junto con cualquier secuencia reguladora necesaria, puede entregarse desnudo, por ejemplo, bien solo o bien como parte de un plásmido, o puede entregarse en un vector vírico o bacteriano o bacteriano.

60 Si se usa un vector de tipo plásmido, o un vector bacteriano o vírico, puede ser deseable que el vector sea incapaz de duplicarse o integrarse sustancialmente en el sujeto. Tales vectores incluyen aquellos cuyas secuencias están libres de regiones de identidad sustancial con el genoma del sujeto, como para minimizar el riesgo de recombinación huésped-vector. Una forma de hacer esto es usar promotores no derivados del genoma del receptor para conducir la expresión del polipéptido de interés. Por ejemplo, si el receptor es un mamífero, el promotor es preferentemente no derivado de mamífero, aunque debe poder ser capaz de funcionar en células de mamífero, por ejemplo, un promotor vírico.

65

Vectores víricos que pueden usarse para entregar el polinucleótido incluyen, por ejemplo, adenovirus y poxvirus. Vectores bacterianos útiles incluyen, por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus*, Bacille bilié de Calmette-Guerin (BCG) y *Streptococcus*.

5 Un ejemplo de un vector de adenovirus, además de un procedimiento de construcción de un vector de adenovirus capaz de expresar un polinucleótido, se describe en la patente de EE.UU. N.º 4.920.209. Los vectores de poxvirus incluyen virus de la variolovacuna y de la viruela del canario, descritos en la patente de EE.UU. N.º 4.722.848 y la
10 patente de EE.UU. N.º 5.364.773, respectivamente. También véase, por ejemplo, Tartaglia et al. 1992, *Virology* 188:217 para una descripción de un vector de virus de la variolovacuna y Taylor et al. 1995, *Vaccine* 13:539 para una referencia de una viruela de canario. Vectores de poxvirus capaces de expresar un polinucleótido de interés pueden obtenerse por recombinación homóloga como se describe en Kieny et al. 1984, *Nature* 312:163, de manera que el polinucleótido se inserta en el genoma vírico en condiciones apropiadas para la expresión en células de mamífero.

15 Con respecto a vectores bacterianos, se conocen cepas mutantes de *Vibrio cholerae* no toxicogénicas que son útiles para expresar un polinucleótido extraño en un huésped. Mekalanos et al. 1983, *Nature* 306:551 y la patente de EE.UU. N.º 4.882.278 describen cepas que tienen una cantidad sustancial de la secuencia codificante de cada uno de los dos alelos *ctxA* delecionados de manera que se produzca toxina de *cholerae* no funcional. El documento WO 92/11354 describe una cepa en la que el locus *irgA* se inactiva por mutación; esta mutación puede combinarse en
20 una única cepa con mutaciones *ctxA*. El documento WO 94/01533 describe un mutante de deleción que carece de secuencias de ADN de *ctxA* y *attRS1* funcionales. Estas cepas mutantes están genéticamente manipuladas para expresar proteínas heterólogas, como se describe en el documento WO 94/19482.

25 Cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*, genéticamente manipuladas para la expresión recombinante de proteínas heterólogas, se describen en Nakayama et al. 1988, *Bio/Technology* 6:693 y el documento WO 92/11361.

Otras cepas bacterianas que pueden usarse como vectores para expresar una proteína extraña en un sujeto se describen para *Shigella flexneri* en High et al. 1992, *EMBO* 11:1991 y Sizemore et al. 1995, *Science* 270:299; para *Streptococcus gordonii* en Medagliani et al. 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:6868; y para Bacille Calmette Guerin en Flynn 1994, *Cell. Mol. Biol.* 40 (suppl. I):31, documentos WO 88/06626, WO 90/00594, WO 91/13157, WO 92/01796 y WO 92/21376.

35 En vectores bacterianos, el polinucleótido de interés puede insertarse en el genoma bacteriano y seguir en un estado libre como parte de un plásmido.

Liposomas

Los liposomas son membranas bicapa de lípidos completamente cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas pueden ser vesículas unilaminares (que poseen una única membrana bicapa) o vesículas multilaminares caracterizadas por bicapas multimembrana, cada bicapa puede o puede no separarse de la siguiente por una fase acuosa. Una discusión general de liposomas puede encontrarse en Gregoriadis G. *Immunol. Today*, 11:89-97, 1990; y Frezard, F., *Braz. J. Med. Bio. Res.*, 32:181-189, 1999. Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, el término "liposomas" pretende englobar todas las estructuras vesiculares tales como se han descrito anteriormente, que incluyen, sin limitación, aquellas descritas en la técnica como "niosomas", "transfersomas" y "virosoomas".

45 Cualquier liposoma puede usarse en la presente invención, que incluye liposomas hechos de lípidos arqueobacterianos. Puede usarse cualquier lípido anfipático con al menos una cadena de ácido graso que contenga al menos 4 carbonos, normalmente aproximadamente 4 a 28 carbonos de longitud. La cadena de ácido graso puede contener cualquier número de enlaces saturados y/o insaturados. Los lípidos anfipáticos contemplados pueden ser fosfolípidos, esfingolípidos, esfingomielina, cerebrósidos, gangliósidos. Liposomas particularmente útiles usan fosfolípidos y colesterol no esterificado en la formulación liposomal. El colesterol se usa para estabilizar los liposomas y cualquier otro compuesto que estabilice los liposomas puede sustituir al colesterol. Otros compuestos estabilizadores de liposomas se conocen por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los fosfolípidos saturados producen liposomas con mayores temperaturas de transición que indican elevada estabilidad.

50 Los fosfolípidos que se usan preferentemente en la preparación de los liposomas son aquellos con al menos un grupo de cabeza seleccionado del grupo que consiste en fosfoglicerol, fosfoetanolamina, fosfoserina, fosfocolina y fosfoinositol. Son más preferidos los liposomas que comprenden lípidos que son aproximadamente el 94-100 % de fosfatidilcolina. Tales lípidos están disponibles comercialmente en la lecitina Phospholipon® 90 G (Phospholipid GmBH, Alemania) o en la lecitina S100 (Lipoid GmBH, Alemania). Otros fosfolípidos preferidos incluyen lípidos catiónicos tales como 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) y cloruro de 1-[2-(oleoiloxi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxi)imidazolinio (DOTIM).

65 Cuando también se usa colesterol no esterificado en la formulación de liposomas, el colesterol se usa normalmente en una cantidad equivalente a aproximadamente el 10 % de la cantidad de fosfolípido. Si se usa un compuesto

distinto de colesterol para estabilizar los liposomas, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad necesaria en la composición.

Las composiciones de liposoma pueden obtenerse, por ejemplo, usando lípidos naturales, lípidos sintéticos, esfingolípidos, lípidos de éter, esteroides, cardiolipina, lípidos catiónicos y lípidos modificados con poli(etilenglicol) y otros polímeros. Los lípidos sintéticos pueden incluir los siguientes constituyentes de ácidos grasos: lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, araquidoilo, oleoilo, linoleoilo, erucoilo, o combinaciones de estos ácidos grasos.

Vehículos

El vehículo de la composición comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, preferentemente una sustancia hidrófoba líquida. La fase continua puede ser una sustancia hidrófoba esencialmente pura o una mezcla de sustancias hidrófobas. Además, el vehículo puede ser una emulsión de agua en una sustancia hidrófoba o una emulsión de agua en una mezcla de sustancias hidrófobas, siempre que la sustancia hidrófoba constituya la fase continua. Además, en otra realización, el vehículo puede funcionar como adyuvante.

Sustancias hidrófobas que son útiles en las composiciones como se describen en el presente documento son aquellas que son farmacéuticamente y/o inmunológicamente aceptables. El vehículo es preferentemente un líquido, pero ciertas sustancias hidrófobas que no son líquidas a temperatura atmosférica pueden licuarse, por ejemplo, calentando y también son útiles en la presente invención. En una realización, el vehículo hidrófobo puede ser una emulsión de PBS/FIA.

Aceite o emulsiones de agua en aceite son vehículos particularmente adecuados para su uso en la presente invención. Los aceites deben ser farmacéuticamente y/o inmunológicamente aceptables. Ejemplos preferidos de aceites son aceite mineral tal (especialmente aceite mineral ligero o de baja viscosidad), aceite vegetal (por ejemplo, aceite de soja), aceite de nuez (por ejemplo, aceite de cacahuete). En algunas realizaciones se prefiere un aceite mineral de baja viscosidad tal como Drakeol[®] 6VR. En otra realización, el aceite es un oleato de manida en solución de aceite mineral, comercialmente disponible como Montanide[®] ISA 51. También pueden usarse grasas animales y materiales poliméricos hidrófobos artificiales, particularmente aquellos que son líquidos a temperatura atmosférica o que pueden licuarse relativamente fácilmente. Pueden usarse mezclas de diferentes sustancias hidrófobas, tales como mezclas que incluyen uno o más aceites, grasas animales o materiales poliméricos hidrófobos artificiales diferentes.

Componentes adicionales

La composición puede comprender además uno o más componentes adicionales que pueden complementar o potenciar la función del polipéptido que va a expresarse en el sujeto. Por ejemplo, si el polipéptido codificado es un antígeno de vacuna, puede estar presente un componente adicional, tal como un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que no potencia específicamente la respuesta inmunitaria (Hood et al, Immunology, 2d ed., Benjamin/Cummings: Menlo Park, C.A., 1984; véase Wood y Williams, en: Nicholson, Webster y May (eds.), Textbook of Influenza, Capítulo 23, páginas 317-323). Frecuentemente, una exposición primaria a un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, dejará de provocar una respuesta inmunitaria humoral. Debe observarse que el polinucleótido de interés que va a entregarse al sujeto puede por sí mismo funcionar como un adyuvante, o puede codificar un polipéptido que constituye un adyuvante (por ejemplo, IL-12, IFN-gamma, o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF")).

En algunas realizaciones, adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, alumbre, otros compuestos de aluminio, Bacillus de Calmette y Guérin (BCG), TiterMax[®], Ribi[®], adyuvante incompleto de Freund (IFA), saponina, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, Corynebacterium parvum, QS-21 y adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvantes de la familia de los agonistas de TLR tales como CpG, polyIC, falgelina, lipopéptidos, peptidoglicanos, imidazoquinolinas, ARN monocatenario, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de choque térmico (HSP) y ceramidas y derivados tales como alfa Gal-cer. Adyuvantes adecuados también incluyen citocinas o quimiocinas en sus formas codificantes de polipéptido o de ADN tales como, pero no limitadas a, GM-CSF, TNF-alfa, IFN-gamma, IL-2, IL-12, IL-15, IL-21.

La cantidad de adyuvante usada depende de la cantidad de antígeno y del tipo de adyuvante. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de adyuvante necesaria en una aplicación particular.

Se conocen en la técnica una amplia gama de adyuvantes, excipientes, etc. farmacéuticamente aceptables y pueden usarse en las composiciones de la invención: véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985) y The United States Pharmacopoeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada en 1999.

Si un componente adicional en la composición es un polipéptido, en su lugar puede proporcionarse un polinucleótido

que codifica el polipéptido adicional, del mismo modo que para el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés primario. Tales polipéptidos podrían expresarse a partir de los mismos vectores de expresión o de vectores de expresión distintos, o podrían expresarse en forma de una proteína de fusión.

5 Formulación de composiciones

Los procedimientos de preparación de liposomas son muy conocidos en la técnica: véase, por ejemplo, Gregoriadis (1990) y Frezard (1999), ambos citados previamente. Cualquier procedimiento adecuado para preparar liposomas puede usarse en la práctica de la invención. Los liposomas normalmente se preparan hidratando los componentes liposomales que formarán la bicapa de lípido (por ejemplo, fosfolípidos y colesterol) con una solución acuosa, que puede ser agua pura o cualquier otra solución fisiológicamente compatible tal como solución salina, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una realización, un componente de liposoma o mezcla de componentes de liposoma, tal como un fosfolípido (por ejemplo, Phospholipon[®] 90G) y colesterol, puede solubilizarse en un disolvente orgánico, tal como una mezcla de cloroformo y metanol, seguido de filtrar (por ejemplo, un filtro de 0,2 µm de PTFE) y secar, por ejemplo, mediante evaporación rotatoria, para eliminar los disolventes.

La hidratación de la mezcla de lípidos resultante puede efectuarse, por ejemplo, inyectando la mezcla de lípido dentro de una solución acuosa o sonicando la mezcla de lípido y una solución acuosa. Durante la formación de liposomas, los componentes de liposoma forman bicapas individuales (unilaminares) o bicapas múltiples (multilaminares) que rodean un volumen de la solución acuosa con la que se hidratan los componentes del liposoma.

En algunas realizaciones, los liposomas se hidratan entonces, tal como por secado por congelación o liofilización y posteriormente se reconstituyen con una solución acuosa.

Los liposomas se combinan con el vehículo que comprende una fase hidrófoba continua. Esto puede hacerse en una variedad de formas.

Si el vehículo está esencialmente libre de agua y está compuesto únicamente de una sustancia hidrófoba o una mezcla de sustancias hidrófobas (por ejemplo, uso de un vehículo de aceite mineral al 100 %), los liposomas pueden simplemente mezclarse con la sustancia hidrófoba, o si hay múltiples sustancias hidrófobas, mezclarse con una cualquiera o una combinación de ellas.

Si en lugar de comprender el vehículo una fase continua de una sustancia hidrófoba contiene una fase acuosa discontinua, el vehículo normalmente tomará la forma de una emulsión de la fase acuosa en la fase hidrófoba, tal como una emulsión de agua en aceite. Tales composiciones pueden contener un emulsionante para estabilizar la emulsión y para promover una distribución uniforme de los liposomas. A este respecto, los emulsionantes pueden ser útiles aunque se use vehículo libre de agua, con el fin de promover una distribución uniforme de los liposomas en el vehículo. Emulsionantes típicos incluyen oleato de manida (Arlacel[™] A), lecitina, Tween[™] 80 y Spans[™] 20, 80, 83 y 85. Normalmente, la relación de peso con respecto a volumen (peso/volumen) de la sustancia hidrófoba con respecto al emulsionante está en el intervalo de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, prefiriéndose con una relación de aproximadamente 10:1.

Los liposomas pueden añadirse a la emulsión acabada, o pueden estar presentes tanto en la fase acuosa como en la fase hidrófoba antes de la emulsión.

El polinucleótido que va a expresarse puede introducirse en diversas etapas diferentes del proceso de formulación. En esta sección, el término "polinucleótido" incluye el polinucleótido en forma desnuda que se incluye en un plásmido tal como un plásmido de expresión, o en un vector vivo tal como una bacteria o virus.

Más de un polinucleótido puede incorporarse en la composición. Por ejemplo, dos o más polinucleótidos que codifican diferentes proteínas pueden incorporarse en la composición, o puede estar presente un polinucleótido que codifica una proteína, además de un polinucleótido que codifica un ARN antisentido o ARN interferente. Las proteínas pueden expresarse como el producto de fusión de dos polinucleótidos diferentes. Más de un polinucleótido puede estar sometido al control de los mismos elementos reguladores, por ejemplo, dos o más polinucleótidos sometidos al control transcripcional de un único promotor.

En algunas realizaciones, el polinucleótido está presente en la solución acuosa usada para hidratar los componentes que se usan para formar las bicapas de lípido de los liposomas (por ejemplo, fosfolípido(s) y colesterol). En este caso, el polinucleótido se encapsulará en el liposoma, presente en su interior acuoso. Si los liposomas resultantes no se lavan o secan, de forma que haya solución acuosa residual presente que en último lugar se mezcla con el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, es posible que el polinucleótido adicional pueda estar presente fuera de los liposomas en el producto final. En una técnica relacionada, el polinucleótido puede mezclarse con los componentes usados para formar las bicapas de lípido de los liposomas, antes de la hidratación con la solución acuosa.

En un enfoque alternativo, el polinucleótido puede en su lugar mezclarse con el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, antes, durante o después de combinar el vehículo con los liposomas. Si el vehículo es una emulsión, el polinucleótido puede mezclarse con cualquiera o ambos de la fase acuosa o fase hidrófoba antes de la emulsión. Alternativamente, el polinucleótido puede mezclarse con el vehículo después de la emulsión.

La técnica de combinar el polinucleótido con el vehículo puede usarse junto con la encapsulación del polinucleótido en los liposomas como se ha descrito anteriormente, de forma que el polinucleótido esté presente tanto dentro de los liposomas como en el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

Generalmente, la composición puede comprender aproximadamente 0,1 a 5 mg de polinucleótido por ml de la composición y aproximadamente 1 mg a 300 mg de liposomas por ml de la composición.

Si la composición contiene uno o más componentes adicionales (por ejemplo, un adyuvante), el (los) componente(s) adicional(es) puede(n) incorporarse en la composición junto con el polinucleótido en la misma etapa de procesamiento, o por separado, en una etapa de procesamiento diferente. Por ejemplo, el polinucleótido y el componente adicional pueden ambos estar presentes en la solución acuosa usada para hidratar los componentes que forman la bicapa de lípido, de forma que tanto el polinucleótido como el componente adicional lleguen a encapsularse en los liposomas. Alternativamente, el polinucleótido puede encapsularse en los liposomas y el componente adicional mezclarse con el vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. Se apreciará que son posibles muchas de tales combinaciones.

En algunas realizaciones, el polinucleótido y el componente adicional pueden estar en forma de un complejo, en el que están en contacto íntimo, al menos antes de la incorporación dentro de la composición. La complejación puede implicar pero no necesita necesariamente implicar un enlace químico, tal como enlace covalente.

Las composiciones como se describen en el presente documento pueden formularse en una forma que es adecuada para la administración oral, nasal, rectal o parenteral. La administración parenteral incluye modos de administración intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, transepitelial, intrapulmonar, intratecal y tópica. Las vías preferidas son intramuscular, subcutánea e intradérmica para lograr un efecto de depósito. En la práctica, se logra un efecto de depósito cuando el agente terapéutico sigue en el sitio de inyección durante más de aproximadamente una hora.

El sitio de inyección puede estar, por ejemplo, en cualquier sitio próximo a, o directamente dentro de, un ganglio linfático. Alternativamente, el sitio de inyección puede estar directamente dentro de un bazo, un tumor u otro tejido enfermo. El volumen que puede inyectarse está dentro del criterio profesional del profesional clínico. El volumen depende del dispositivo de inyección usado y del sitio de inyección. Cuando la inyección es por vía intramuscular o subcutánea, el volumen de inyección puede ser aproximadamente 2 ml. Cuando se usa inyección sin aguja, el volumen puede ser de tan solo 0,05 ml. El volumen puede aumentarse inyectando múltiples sitios.

Kits y reactivos

La presente invención se proporciona opcionalmente a un usuario como un kit. Por ejemplo, un kit de la invención contiene una o más de las composiciones de la invención. El kit puede comprender además uno o más reactivos adicionales, material de envasado, recipientes para contener los componentes del kit y un conjunto de instrucciones o manual de usuario detallando procedimientos preferidos de uso de los componentes del kit para un fin deseado.

Usos

La invención encuentra aplicación en cualquier caso en el que se desee la entrega de un polinucleótido a un sujeto. Muchas de tales aplicaciones estarán en el tratamiento o la prevención de enfermedad. Aplicaciones representativas de la invención incluyen tratamiento y prevención del cáncer, terapia génica, terapia auxiliar, tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas, tratamiento y prevención de alergias, tratamiento y prevención de enfermedades autoinmunitarias, tratamiento de enfermedades degenerativas de las neuronas y tratamiento de aterosclerosis.

La prevención o el tratamiento de enfermedad incluye obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, reducción del grado de enfermedad, estabilización del estado de enfermedad, prevención del desarrollo de la enfermedad, prevención de la diseminación de la enfermedad, retraso o ralentizamiento de la progresión de la enfermedad, retraso o ralentizamiento de la aparición de la enfermedad, conferir inmunidad protectora contra un agente causante de enfermedad y mejora o paliación del estado de enfermedad. La prevención o el tratamiento también puede significar prolongar la supervivencia de un paciente más allá de la esperada en ausencia de tratamiento y también puede significar inhibir la progresión de la enfermedad temporalmente, aunque más preferentemente, implica impedir la aparición de enfermedad tal como impidiendo la

infección en un sujeto.

El experto puede determinar pautas de tratamiento, vías de administración, dosificaciones, etc., adecuadas para cualquier aplicación particular con el fin de lograr el resultado deseado. Factores que pueden tenerse en cuenta incluyen, por ejemplo: la naturaleza de un polipéptido que va a expresarse; el estado de enfermedad que va a impedirse o tratarse; la edad, condición física, peso corporal, sexo y dieta del sujeto; y otros factores clínicos.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Con el fin de demostrar la capacidad para potenciar la expresión de una secuencia de nucleótidos codificante de proteínas *in vivo* usando una formulación que comprende liposomas y un vehículo hidrófobo continuo, se seleccionó un plásmido de expresión modelo manipulado con la secuencia codificante completa de IL-12. El plásmido de IL-12 se formuló en el liposoma primero y la preparación de plásmido de IL-12/liposoma resultante se emulsionó en una emulsión de agua en aceite modelo con el vehículo hidrófobo continuo que consiste en aceite mineral. Se determinó la expresión *in vivo* examinando el potencial de expresión de IL-12 en células aisladas de ganglio linfático en la proximidad del sitio de inyección.

Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra, libres de patógenos, de 6-8 semanas de edad, de Charles River Laboratories (St Constant, Quebec, Canadá) y se alojaron según la directriz institucional con agua y comida a voluntad, con circulación de aire controlada con filtro.

Se adquirió plásmido de IL-12 murina, pORF-mIL-12 de InvivoGen, San Diego, California, EE.UU. El plásmido, suministrado como liofilizado en bacterias GT100 de *E. coli* transformadas por pORF-mIL-12, se reconstituyó en medio LB y se extendió sobre una placa de ampicilina-agar LB y se incubó durante la noche a 37 °C. Se cultivaron bacterias a partir de una única colonia en medio TB complementado con uso de ampicilina. Se purificó ADN plasmídico de cultivos bacterianos a gran escala usando kits de Maxi- o Mega-prep libres de endotoxinas (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá) para garantizar la eliminación completa de LPS.

Se prepararon liposomas multilaminares hidratando una mezcla 10:1 (PESO/PESO) de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) y colesterol usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía plásmido de IL-12 a una concentración final de 1 miligramo/mililitro. Los liposomas se extrudieron luego a través de una membrana de policarbonato de 200 nm usando una prensa extrusora manual (Avanti lipids, Alabaster, AL, EE.UU.). La preparación de liposoma final se emulsionó posteriormente en adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Oakville, Ontario, Canadá), un vehículo de aceite basado en aceite mineral, mezclando un volumen igual de liposomas que contienen el plásmido de IL-12 y adyuvante incompleto de Freund.

Tres grupos de ratones que contenían tres ratones cada uno (n=3) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho por encima de la base de la cola del siguiente modo: el Grupo 1 se inyectó con solución salina tamponada con fosfato, el Grupo 2 con 50 microgramos de plásmido de IL-12 en PBS y el Grupo 3 con 50 microgramos de plásmido de IL-12 formulado como se ha descrito anteriormente en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo. Todas las inyecciones fueron de 100 microlitros de volumen. Se recogieron los ganglios linfáticos drenantes de todos los ratones 8 días después de la inyección. Los ganglios linfáticos se diseccionaron y se cultivaron suspensiones de células individuales *in vitro* a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI complementado con 10 % de FBS, penicilina/estreptomina, 2-β-mercaptoetanol y L-glutamina en placas de 6 pocillos durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se guardaron congelados en alícuotas hasta que se usaron para la cuantificación de la proteína IL-12.

Se determinó la eficacia de la expresión génica de IL-12 en los ganglios linfáticos cuantificando los niveles de proteína IL-12 secretada en los sobrenadantes de cultivo celular. Se realizó la cuantificación de la proteína IL-12 por ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA), usando un kit de ELISA específico de IL-12 comercial (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.). Brevemente, se recubrió anticuerpo de captura anti-IL-12 durante la noche sobre placas de ELISA y se añadieron muestras e IL-12 patrón. Después de lavados minuciosos, se añadió anticuerpo de detección anti-IL-12 biotinilado y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó. Tras la incubación con conjugados de avidina-HRP y lavados, se usó sustrato líquido ABTS (Sigma, St Louis, MO) para el desarrollo de color. Las absorbancias se leyeron a 405 nm usando un lector de placas de microtitulación y las concentraciones de IL-12 se extrapolaron usando una curva patrón que se generó usando patrones de IL-12 suministrados en el kit.

Los niveles de IL-12 secretada por las células de los ganglios linfáticos aisladas de los Grupos 1-3 se muestran en la figura 1. Las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones inyectados con PBS (Grupo 1) no secretaron proteína IL-12 detectable en los sobrenadantes de cultivo. Se secretaron niveles bajos de proteína IL-12 por las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones inyectados con plásmido de IL-12 en PBS. Sin embargo, células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones inyectados con el plásmido de IL-12 en una formulación que

comprende liposomas en un vehículo hidrófobo continuo secretaron un nivel significativamente mayor de IL-12, sugiriendo una entrega mejorada de las secuencias de nucleótidos codificantes de proteína *in vivo* y produciendo expresión potenciada de proteínas.

5 Ejemplo 2

Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra libres de patógenos, de 6-8 semanas de edad, de Charles River Laboratories (St Constant, Quebec, Canadá) y se alojaron según la directriz institucional con agua y comida a voluntad, con circulación de aire controlada con filtro.

10 Se adquirió plásmido de IL-12 murina, pORF-mIL-12 de InvivoGen, San Diego, California, EE.UU. El plásmido, suministrado como liofilizado en bacterias GT100 de *E. coli* transformadas por pORF-mIL-12, se reconstituyó en medio LB y se extendió sobre una placa de ampicilina-agar LB y se incubó durante la noche a 37 °C. Se cultivaron bacterias a partir de una única colonia en medio TB complementado con uso de ampicilina. Se purificó ADN plasmídico de cultivos bacterianos a gran escala usando kits de Maxi- o Mega-prep libres de endotoxinas (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá) para garantizar la eliminación completa de LPS.

20 Se prepararon liposomas multilaminares hidratando una mezcla 10:1 (PESO/PESO) de mezcla derivada de soja purificada de fosfolípidos (fosfolípido S100, proporcionado por Lipoid GmbH) y colesterol usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía el plásmido de IL-12 a una concentración final de 0,8 miligramos/mililitro. Luego los liposomas se extrudieron a través de una membrana de policarbonato de 200 nm usando una prensa extrusora manual (Avanti lipids, Alabaster, AL, EE.UU.). La preparación de liposoma final se emulsionó posteriormente en adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Oakville, Ontario, Canadá), un vehículo de aceite basado en aceite mineral, mezclando un volumen igual de liposomas que contienen el plásmido de IL-12 y de adyuvante incompleto de Freund. El volumen inyectado final para cada ratón fue 100 microlitros.

30 Seis grupos de ratones que contenían cinco ratones cada uno (n=5) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho por encima de la base de la cola del siguiente modo: los ratones del Grupo 1 se inyectaron con 40 microgramos de plásmido de IL-12 en PBS, los ratones del Grupo 2 con 40 microgramos de plásmido de IL-12 formulado como se ha descrito anteriormente en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo, los ratones del Grupo 3 con 40 microgramos de plásmido de IL-12 formulado en un vehículo hidrófobo continuo (emulsión de agua en aceite de adyuvante incompleto de Freund) sin liposomas, los ratones del Grupo 4 con 40 microgramos de plásmido de IL-12 formulado en liposomas como se ha descrito anteriormente pero sin un vehículo hidrófobo continuo, los ratones del Grupo 5 con una formulación de control que consiste en liposoma/vehículo hidrófobo continuo sin plásmido de IL-12 y los ratones del Grupo 6 permanecieron sin tratar. Todas las inyecciones fueron de 100 microlitros de volumen. Se recogieron los ganglios linfáticos drenantes de todos los ratones 8 días después de la inyección. Los ganglios linfáticos se diseccionaron y las suspensiones de células individuales se cultivaron *in vitro* a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI complementado con 10 % de FBS, penicilina/estreptomina, 2- β -mercaptoetanol y L-glutamina en placas de 6 pocillos durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se guardaron congelados en alícuotas hasta que se usaron para la cuantificación de la proteína IL-12.

45 Se determinó la eficacia de la expresión génica de IL-12 en los ganglios linfáticos cuantificando los niveles de proteína IL-12 secretada en los sobrenadantes de cultivo celular. Se realizó la cuantificación de la proteína IL-12 por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), usando un kit de ELISA específico de IL-12 comercial (Peptrotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.). Brevemente, se recubrió anticuerpo de captura anti-IL-12 durante la noche sobre placas de ELISA y se añadieron muestras e IL-12 patrón. Después de lavados minuciosos, se añadió anticuerpo de detección anti-IL-12 biotinilado y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó. Tras la incubación con conjugados de avidina-HRP y lavados, se usó sustrato líquido ABTS (Sigma, St Louis, MO) para el desarrollo de color. Las absorbancias se leyeron a 405 nm usando un lector de placas de microtitulación y las concentraciones de IL-12 se extrapolaron usando una curva patrón que se generó usando patrones de IL-12 suministrados en el kit.

55 Los niveles de IL-12 secretada por las células de los ganglios linfáticos aisladas de los Grupos 1-6 se muestran en la figura 2. Las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones inyectados con el plásmido de IL-12 en PBS (Grupo 1) no secretaron proteína IL-12 detectable en los sobrenadantes de cultivo. Sin embargo, las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones inyectados con el plásmido de IL-12 en una formulación que comprende liposomas en un vehículo hidrófobo continuo (Grupo 2) secretaron un nivel considerablemente mayor de IL-12. Las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones del Grupo 3, Grupo 5 y Grupo 6 secretaron niveles significativamente más bajos de proteína IL-12 y las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones del Grupo 4 no secretaron proteína IL-12 detectable en los sobrenadantes de cultivo. En este experimento, se logró expresión de proteínas IL-12 superior usando una formulación de liposoma/vehículo hidrófobo con respecto a las formulaciones que carecen de cualquiera o ambos de los liposomas y el vehículo hidrófobo continuo.

65 Ejemplo 3

Con el fin de demostrar la capacidad para potenciar la expresión de una secuencia de nucleótidos codificante de proteínas *in vivo* usando una formulación que comprende liposomas y un vehículo hidrófobo continuo, se seleccionó

un plásmido de expresión modelo manipulado con la secuencia codificante completa de la proteína verde fluorescente (GFP). El plásmido de GFP se formuló en el liposoma primero y la preparación de plásmido de GFP/liposoma resultante se emulsionó en una emulsión de agua en aceite modelo con el vehículo hidrófobo continuo que consiste en aceite mineral. Se determinó la captación y la expresión *in vivo* examinando el potencial de expresión de GFP en células aisladas de ganglio linfático en la proximidad del sitio de inyección.

Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra libres de patógenos, de 6-8 semanas de edad, de Charles River Laboratories (St Constant, Quebec, Canadá) y se alojaron según la directriz institucional con agua y comida a voluntad, con circulación de aire controlada con filtro.

Se adquirió plásmido de GFP sintético, pMOD-GFPSh (nombre de catálogo, pmod-zgfpsh) de InvivoGen, San Diego, California, EE.UU. El plásmido se transformó en la cepa XL1 de bacterias *E. coli*, se cultivó en medio LB y se extendió sobre una placa de ampicilina-agar LB y se incubó durante la noche a 37 °C. Se cultivaron bacterias a partir de una única colonia en medio TB complementado con ampicilina. Se purificó ADN plasmídico de cultivos bacterianos a gran escala usando kits de Maxi- o Mega-prep libres de endotoxinas (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá) para garantizar la eliminación completa de LPS.

Se prepararon liposomas multilaminares hidratando una mezcla 10:1 (PESO/PESO) de mezcla derivada de soja purificada de fosfolípidos (fosfolípido S100, proporcionado por Lipoid GmbH) y colesterol usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía el plásmido de GFP a una concentración final de 0,8 miligramos/mililitro. Luego los liposomas se extrudieron a través de una membrana de policarbonato de 200 nm usando una prensa extrusora manual (Avanti lipids, Alabaster, AL, EE.UU.). La preparación de liposoma final se emulsionó posteriormente en adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Oakville, Ontario, Canadá), un vehículo de aceite basado en aceite mineral, mezclando un volumen igual de liposomas que contienen el plásmido de GFP y adyuvante incompleto de Freund. El volumen inyectado final para cada ratón fue 100 microlitros que entregó 40 microgramos de plásmido por dosis por ratón.

Seis grupos de ratones que contenían cuatro ratones cada uno (n=4) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho por encima de la base de la cola del siguiente modo: los ratones del Grupo 1 se inyectaron con 40 microgramos de plásmido de GFP en PBS, los ratones del Grupo 2 con 40 microgramos de plásmido de GFP formulado como se ha descrito anteriormente en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo, los ratones del Grupo 3 con 40 microgramos de plásmido de GFP formulado en un vehículo hidrófobo continuo (emulsión de agua en aceite de adyuvante incompleto de Freund) sin liposomas, los ratones del Grupo 4 con 40 microgramos de plásmido de GFP formulado en liposomas como se ha descrito anteriormente, pero sin un vehículo hidrófobo continuo, los ratones del Grupo 5 con una formulación de control que consiste en liposoma/vehículo hidrófobo continuo sin plásmido de GFP y los ratones del Grupo 6 permanecieron sin tratar. Todas las inyecciones fueron de 100 microlitros de volumen. Se recogieron los ganglios linfáticos drenantes de todos los ratones 8 días después de la inyección. Los ganglios linfáticos se diseccionaron y se prepararon suspensiones de células individuales. Se determinó la eficacia de la expresión génica de GFP en los ganglios linfáticos por tinción de inmunofluorescencia de dos colores para detectar células GFP-positivas. Las células se tiñeron con anticuerpos CD11b y CD11c conjugados con ficoeritrina para identificar células presentadoras de antígenos en el canal FL2 junto con la detección de GFP en el canal FL1. Las muestras se ejecutaron a través de un citómetro de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, San José, CA). Se recogieron al menos 3×10^5 eventos para cada muestra para potenciar la exactitud de detección de las células GFP positivas.

Se muestran en la figura 3 el número de células de los ganglios linfáticos aisladas del Grupo 1 al Grupo 6, que expresan GFP (y así se identifican positivamente en el análisis de citometría de flujo). Los ganglios linfáticos aislados de ratones inyectados con el plásmido de GFP en PBS (Grupo 1) mostraron bajo nivel de células que expresan proteína GFP (<10). Sin embargo, los ganglios linfáticos aislados de ratones inyectados con plásmido de GFP en una formulación que comprende liposomas en un vehículo hidrófobo continuo (Grupo 2) mostraron un aumento de casi cuatro veces en las células GFP positivas. Además, las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones del Grupo 3 y Grupo 4 mostraron un número significativamente más bajo de células que expresan proteína GFP en comparación con ratones en el Grupo 2. Entre los ratones en el Grupo 5 y el Grupo 6, se detectó fluorescencia mínima, que se atribuyó a los eventos de auto-fluorescencia de fondo ya que estos ratones no recibieron inyecciones de plásmido de GFP. Además, la mayoría de las células GFP positivas se detectaron en la población de células de los ganglios linfáticos CD11b/CD11c positivas. Los resultados de un re-análisis de las células de los ganglios linfáticos que se dirigen específicamente a células que son CD11b/CD11c y GFP doble positivas se correlacionan con el hallazgo presentado en la figura 3, con al menos un aumento de 4 veces en la expresión de GFP en células CD11b/CD11c positivas del Grupo 2 (figura 4). Este re-análisis también confirmó que puede detectarse fluorescencia no específica en las células de los ganglios linfáticos de los Grupos 5 y 6 de control. Esta observación confirmó la especificidad de la detección de células GFP positivas en este experimento. Así, en el presente experimento, se logró captación de plásmido de GFP y expresión de proteínas superior usando una formulación de liposoma/vehículo hidrófobo con respecto a formulaciones que carecen de cualquiera o ambos de los liposomas y el vehículo hidrófobo continuo.

Ejemplo 4

Con el fin de demostrar la capacidad para inhibir la expresión de una secuencia de nucleótidos codificante de proteínas *in vivo* por ARNip contra la secuencia de nucleótidos codificante de proteínas dada, usando una formulación que comprende liposomas y un vehículo hidrófobo continuo, se seleccionó un plásmido de expresión modelo manipulado con secuencia codificante completa de IL-12 y secuencia de ARNip para IL-12. El plásmido de IL-12 se formuló en el liposoma primero y la preparación de plásmido de IL-12/liposoma resultante se emulsionó en una emulsión de agua en aceite modelo con el vehículo hidrófobo continuo que consiste en aceite mineral. Un día antes de la inyección del plásmido de IL-12, se inyectó ARNip bien en PBS o bien en liposoma/emulsión de agua en aceite con el vehículo hidrófobo continuo que consiste en aceite mineral. Se determinó la actividad de ARNip *in vivo* funcional examinando el potencial de expresión de IL-12 en células aisladas de ganglio linfático en la proximidad del sitio de inyección.

Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra libres de patógenos, de 6-8 semanas de edad, de Charles River Laboratories (St Constant, Quebec, Canadá) y se alojaron según la directriz institucional con agua y comida a voluntad, con circulación de aire controlada con filtro.

Se adquirió plásmido de IL-12 murina, pORF-mIL-12 de InvivoGen, San Diego, California, EE.UU. El plásmido, suministrado como liofilizado en la cepa GT100 de bacterias *E. coli* transformadas por pORF-mIL-12, se reconstituyó en medio LB y se extendió sobre una placa de ampicilina-agar LB y se incubó durante la noche a 37 °C. Se cultivaron bacterias a partir de una única colonia en medio TB complementado con ampicilina. Se purificó ADN plasmídico de cultivos bacterianos a gran escala usando kits de Maxi- o Mega-prep libres de endotoxinas (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá) para garantizar la eliminación completa de LPS.

Se adquirió ARNip contra IL-12 murina de Ambion Applied Biosystems, Austin, TX, EE.UU. Este producto liofilizado fue >95 % puro por HPLC analítica y contuvo menos de 10 UE de endotoxina por ensayo de LAL. Se disolvió ARNip en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril antes de formular para inyección.

Se prepararon liposomas multilaminares hidratando una mezcla 10:1 (PESO/PESO) de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) y colesterol usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía plásmido de IL-12 a una concentración final de 1,6 miligramos/mililitro. Los liposomas se extrudieron luego a través de una membrana de policarbonato de 200 nm usando una prensa extrusora manual (Avanti lipids, Alabaster, AL, EE.UU.). Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/IL-12, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide™ ISA 51, Seppic, Francia) para formar una emulsión de agua en aceite con la suspensión de liposoma contenida en la fase acuosa de la emulsión y el aceite que forma la fase continua, que actúa de vehículo hidrófobo.

Con el fin de inducir niveles eficaces de expresión de IL-12, tres grupos de ratones que contenían tres ratones cada uno (n=3) se inyectaron todos por vía subcutánea en el flanco derecho por encima de la base de la cola en el día -0 con 40 microgramos de plásmido de IL-12 formulado como se ha descrito anteriormente en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo en 50 microlitros de volumen. Adicionalmente, en el día menos 1, los ratones del Grupo 1 se inyectaron con vehículo solo, los ratones del Grupo 2 se inyectaron con 40 microgramos de ARNip de IL-12 en PBS y los ratones del Grupo 3 se entregaron con 40 microgramos de ARNip de IL-12 en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo, similar a la formulación usada para entregar el plásmido de IL-12. Todas las inyecciones se entregaron por vía subcutánea en el flanco derecho por encima de la base de la cola en un volumen de 50 microlitros.

Se recogieron los ganglios linfáticos drenantes de todos los ratones inyectados y ganglios linfáticos correspondientes de tres ratones sin tratamiento previo (Grupo 4) 8 días después de la inyección. Se diseccionaron los ganglios linfáticos y las suspensiones de células individuales se cultivaron *in vitro* a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI complementado con 10 % de FBS, penicilina/estreptomicina, 2-β-mercaptoetanol y L-glutamina en placas de 24 pocillos durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se guardaron congelados en alícuotas hasta que se usaron para la cuantificación de la proteína IL-12.

Se determinó la eficacia del ARNip inyectado en diversas formulaciones midiendo el grado de inhibición en la expresión de proteínas IL-12 inducida por el plásmido de IL-12 por células de los ganglios linfáticos. La cuantificación de la proteína IL-12 en sobrenadante de cultivo celular se realizó por ensayo de inmunoadsorción (ELISA), usando un kit de ELISA específico de IL-12 comercial (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.). Brevemente, se recubrió anticuerpo de captura anti-IL-12 durante la noche sobre placas de ELISA y se añadieron muestras e IL-12 patrón. Después de lavados minuciosos, se añadió anticuerpo de detección anti-IL-12 biotinilado y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó. Tras la incubación con conjugados de avidina-HRP y lavados, se usó sustrato líquido ABTS (Sigma, St Louis, MO) para el desarrollo de color. Las absorbancias se leyeron a 405 nm usando un lector de placas de microtitulación y las concentraciones de IL-12 se extrapolaron usando una curva patrón que se generó usando patrones de IL-12 suministrados en el kit.

Los niveles de IL-12 secretada por las células de los ganglios linfáticos aisladas de los Grupos 1-4 se muestran en la figura 5. Las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones inyectados con plásmido de IL-12 solo, pero no ARNip contra IL-12 (Grupo 1), secretaron 270,4 picogramos por mililitro de IL-12 en los sobrenadantes de cultivo. En los ratones del Grupo 2, inyectados con ARNip de IL-12 en PBS, no se observó inhibición significativa en la

secreción de proteína IL-12. En contraste, cuando el ARNip se entregó en liposoma/barrera hidrófoba continua, se observó una marcada disminución en la IL-12 secretada, que fue tan baja como la observada con ratones sin tratamiento previo. Además, las células de los ganglios linfáticos de los ratones en el Grupo 3 secretaron significativamente menos IL-12 en comparación con los ratones en el Grupo 2 que recibieron ARNip en PBS. Esto demostró una entrega mejorada de las secuencias de nucleótidos de ARNip *in vivo* cuando se inyectaron en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo que produjo mejor inhibición de la expresión de proteínas IL-12 inducida por el plásmido de IL-12.

Ejemplo 5

Como otro ejemplo, para probar la capacidad de ARNip de IL-12 entregado en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo para inhibir la secreción de IL-12, se usó antígeno de ovoalbúmina en adyuvante completo de Freund (CFA) para inducir la secreción de IL-12 por células de los ganglios linfáticos. Se ha mostrado previamente que el antígeno de proteína ovoalbúmina indujo la secreción de la citocina IL-12 en ratones (Yotsumoto et al, 2007, *Vaccine*, 25:5256-5262), que podría inhibirse usando ARNip específico para IL-12 p35 (Hill et al, *Journal of Immunology*, 2003, 171:691; Ichim et al, *Journal of Translational Medicine*, 2006, 4:2, 1-11). En este ejemplo, los ratones inyectados con ovoalbúmina en CFA por vía subcutánea se inyectaron con ARNip de IL-12 por vía subcutánea (bien en PBS o bien en liposoma/vehículo hidrófobo continuo) un día antes o un día después de la inyección de ovoalbúmina.

Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra libres de patógenos, 6-8 semanas de edad, de Charles River Laboratories (St Constant, Quebec, Canadá) y se alojaron según la directriz institucional con agua y comida a voluntad, con circulación de aire controlada con filtro.

Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea en el flanco derecho por encima de la base de la cola con 5 microgramos de ovoalbúmina emulsionada en CFA (Difco Laboratories, Detroit, MI) en un volumen de 50 microlitros.

Se prepararon liposomas multilaminares hidratando una mezcla 10:1 (PESO/PESO) de mezcla derivada de soja purificada de fosfolípidos (fosfolípido S100, proporcionado por Lipoid GmbH) y colesterol usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene ARNip de IL-12 a una concentración final de 1,6 miligramos/mililitro. Los liposomas se extrudieron luego a través de una membrana de policarbonato de 200 nm usando una prensa extrusora manual (Avanti lipids, Alabaster, AL, EE.UU.). Por cada 500 microlitros de una suspensión de liposoma/IL12-ARNip, se añadió un volumen igual de un vehículo de aceite mineral (Montanide™ ISA 51, Seppic, Francia) para formar una emulsión de agua en aceite con la suspensión de liposoma contenida en la fase acuosa de la emulsión y el aceite que forma la fase continua, que actúa de vehículo hidrófobo.

Cinco grupos de ratones (n=4) se inmunizaron todos por vía subcutánea en el día 0 con ovoalbúmina formulada en adyuvante completo de Freund (CFA) y cada grupo se trató por vía subcutánea en el flanco derecho por encima de la base de la cola del siguiente modo: los ratones del Grupo 1 no se trataron, los ratones del Grupo 2 con 40 microgramos de ARNip de IL-12 en PBS en el día menos uno, el Grupo 3 con ARNip formulado como se ha descrito anteriormente en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo en el día menos uno, el Grupo 4 con ARNip en PBS en el día más uno y el Grupo 5 con ARNip en liposoma/vehículo hidrófobo continuo en el día más uno, mientras que el Grupo 6 consistió en ratones no vacunados y sin tratamiento previo no tratados. Todas las inyecciones fueron 50 microlitros de volumen. Se recogieron los ganglios linfáticos drenantes de todos los ratones 8 días después de la inyección de ovoalbúmina. Se diseccionaron los ganglios linfáticos y se cultivaron suspensiones de células individuales *in vitro* a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI complementado con 10 % de FBS, penicilina/estreptomina, 2-β-mercaptoetanol y L-glutamina en placas de 24 pocillos durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se guardaron congelados en alícuotas hasta que se usaron para la cuantificación de proteína IL-12.

Se determinó la eficacia del ARNip inyectado en dos formulaciones diferentes midiendo el grado de inhibición en la expresión de proteínas IL-12 inducida por ovoalbúmina por células de los ganglios linfáticos. La cuantificación de la proteína IL-12 se realizó por ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA), usando un kit de ELISA específico de IL-12 comercial (Peptrotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.). Brevemente, se recubrió anticuerpo de captura anti-IL-12 durante la noche sobre placas de ELISA y se añadieron muestras e IL-12 patrón. Después de lavados minuciosos, se añadió anticuerpo de detección anti-IL-12 biotinilado y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó. Tras la incubación con conjugados de avidina-HRP y los lavados, se usó sustrato líquido ABTS (Sigma, St Louis, MO) para el desarrollo de color. Las absorbancias se leyeron a 405 nm usando un lector de placas de microtitulación y las concentraciones de IL-12 se extrapolaron usando una curva patrón que se generó usando patrones de IL-12 suministrados en el kit.

Los niveles de IL-12 secretada por las células de los ganglios linfáticos aisladas de los Grupos 1-6 se muestran en la figura 6. Las células de los ganglios linfáticos aisladas de ratones en el Grupo 1, que no recibieron inyección de ARNip contra IL-12, secretaron más de 300 picogramos por mililitro de IL-12 en los sobrenadantes de cultivo. En los ratones del Grupo 2, inyectados con ARNip de IL-12 en PBS en el día menos uno o en los ratones del Grupo 4 inyectados con ARNip de IL-12 en PBS en el día más uno con respecto a la inmunización con ovoalbúmina, no se

observó inhibición significativa en la secreción de proteína IL-12. En contraste, cuando se entregó ARNip en liposoma/barrera hidrófoba continua bien en el día menos uno (Grupo 3) o bien en el más uno (Grupo 5), se observó una marcada disminución en la IL-12 secretada ($p=0,003$ y $p=0,004$ respectivamente), que fue tan baja como la observada con las células de los ganglios linfáticos de ratones sin tratamiento previo. Además, las células de los ganglios linfáticos de los ratones en el Grupo 3 y el Grupo 5 secretaron significativamente menos IL-12 en comparación con los ratones en el Grupo 2 y el Grupo 4 que recibieron ARNip en PBS. Esto muestra una entrega eficaz y mejorada de secuencias de nucleótidos de ARNip *in vivo* cuando se inyectan en un liposoma/vehículo hidrófobo continuo que produjo la inhibición completa de la expresión de proteínas IL-12 inducida por el antígeno de ovoalbúmina.

5

10

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencia plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
- 5 un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba;
liposomas; y
un polinucleótido capaz de afectar la expresión de un gen y/o el nivel de un polipéptido.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, en la que el vehículo es un aceite o una emulsión de agua en aceite.
3. La composición según la reivindicación 2, en la que el aceite es un aceite natural o un aceite sintético.
- 15 4. La composición según la reivindicación 3, en la que el aceite es aceite mineral, un aceite vegetal o un aceite de nuez.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el vehículo comprende una mezcla de aceites.
- 20 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los liposomas comprenden un fosfolípido y/o colesterol.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que los liposomas comprenden dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) y colesterol.
- 25 8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el polinucleótido codifica un ARN antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico, una ribozima, o un polipéptido.
- 30 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el polinucleótido codifica el polipéptido.
10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además un adyuvante.
11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el polinucleótido está operativamente ligado a un promotor funcional en células de mamífero.
- 35 12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicho polinucleótido se inserta en un plásmido de expresión.
- 40 13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende un vector bacteriano o vírico que contiene dicho polinucleótido.
14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicho polinucleótido está presente:
- 45 (a) encapsulado dentro de dichos liposomas;
(b) exterior a dichos liposomas; o
- 50 (c) tanto encapsulado dentro de dichos liposomas como exterior a dichos liposomas.
15. La composición según la reivindicación 10, en la que dicho adyuvante está presente:
- (a) dentro de dichos liposomas;
- 55 (b) exterior a dichos liposomas; o
- (c) tanto dentro de dichos liposomas como exterior a dichos liposomas.
- 60 16. Un kit, que comprende: una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15; e instrucciones para usar dicha composición para entregar un polinucleótido a un sujeto.
17. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso como un medicamento.
- 65 18. La composición según la reivindicación 17, para su uso como un medicamento en un mamífero, preferentemente un ser humano.

- 5 19. Un procedimiento de preparación de una composición que comprende combinar liposomas, un polinucleótido capaz de afectar la expresión de un gen y/o el nivel de un polipéptido y un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicho polinucleótido está encapsulado en dichos liposomas.
- 10 21. El procedimiento según la reivindicación 19 o 20, en el que los liposomas se deshidratan antes de combinarse con dicho vehículo.
22. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que dicho polinucleótido es un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 15 23. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que dichos liposomas son liposomas como se definen en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 20 24. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el vehículo es un vehículo como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
25. Una composición producida por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24.

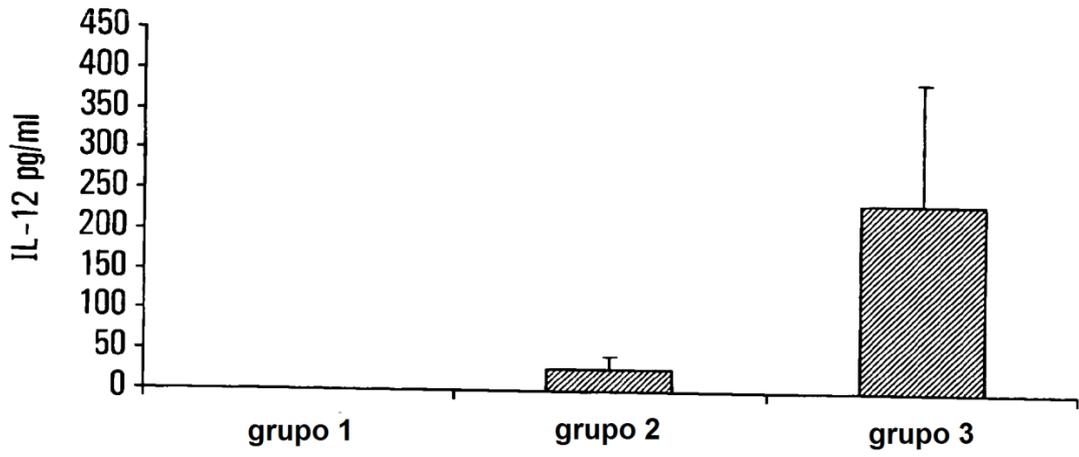


FIG. 1

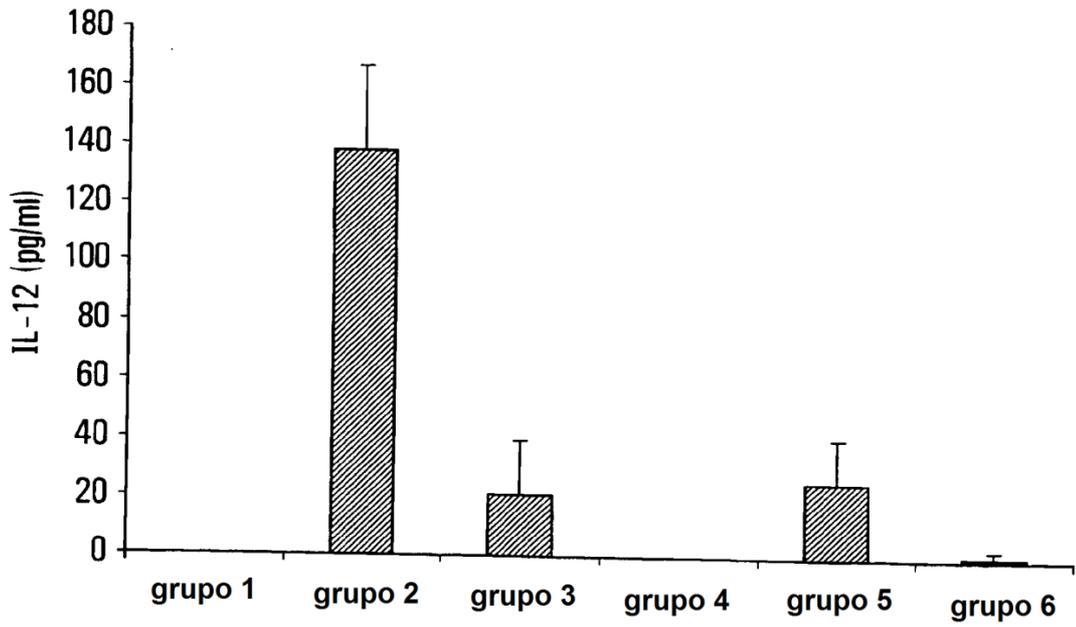


FIG. 2

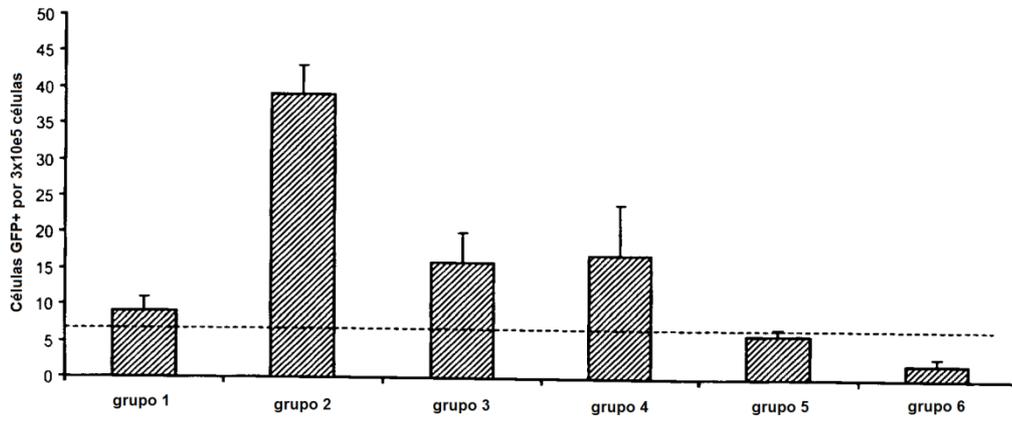


FIG. 3

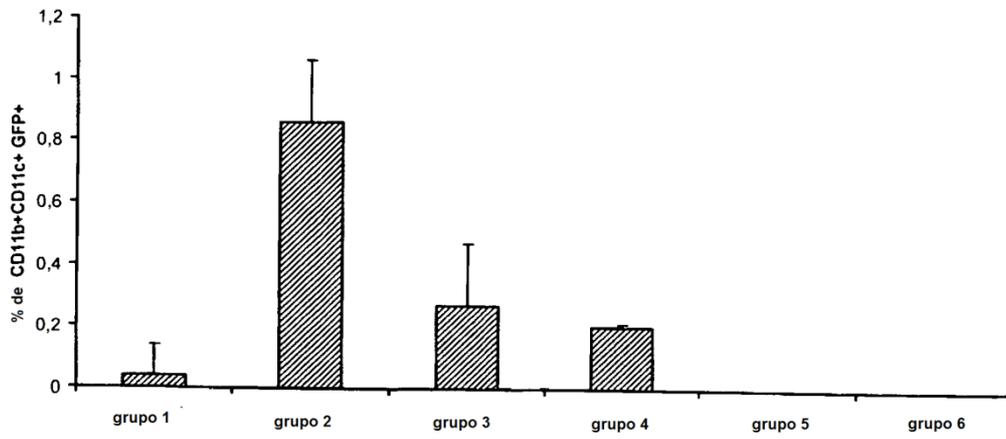


FIG. 4

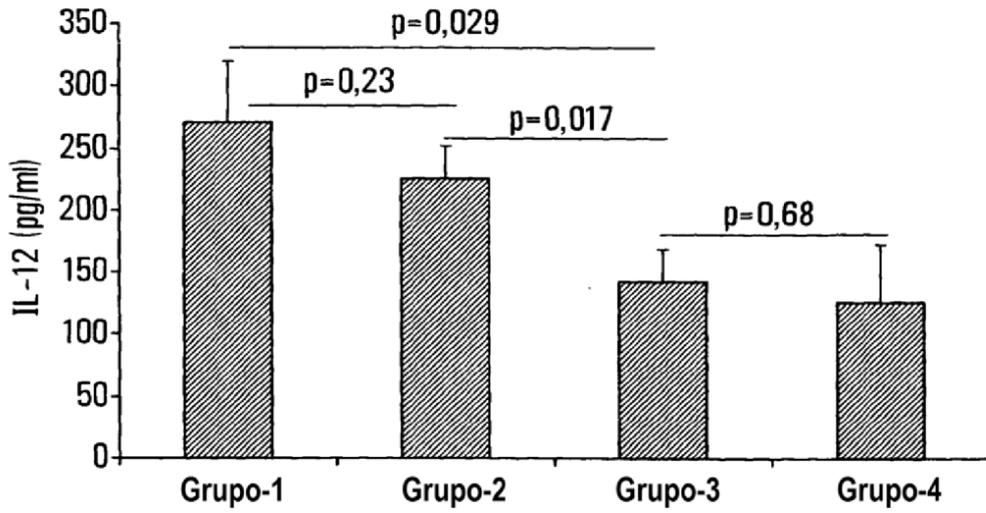


FIG. 5

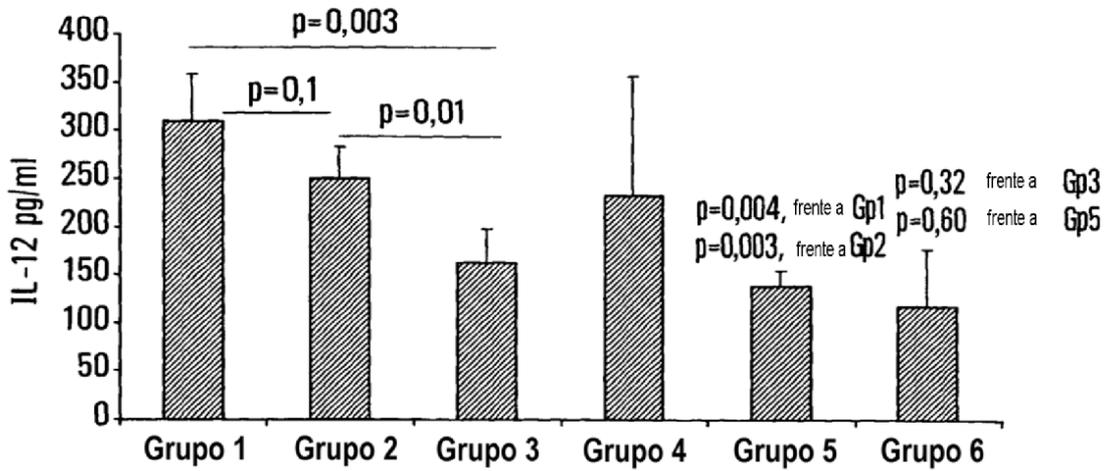


FIG. 6