

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 251**

21 Número de solicitud: 201890010

51 Int. Cl.:

A61K 47/69 (2007.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

17.11.2016

30 Prioridad:

17.11.2015 EP EP15194864

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.06.2019

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

28.11.2019

Fecha de concesión:

31.08.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.09.2020

73 Titular/es:

**BIONCOTECH THERAPEUTICS, S.L (100.0%)
Parque Científico de la Universidad de Valencia
(PCUV), C/ Catedrático Agustín Escardino 9
46980 Paterna (Valencia) ES**

72 Inventor/es:

**POZUELO RUBIO, Mercedes;
QUINTERO ORTIZ, Marisol y
VILLANUEVA GARCÍA, Ana**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

54 Título: **NOVEDOSA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE PARTÍCULAS QUE COMPRENDEN UN COMPLEJO DE UN POLIRRIBONUCLEÓTIDO DE DOBLE CADENA Y UNA POLIALQUILENIMINA**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden partículas, comprendiendo cada una de dichas partículas un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, un ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] y al menos una polialquilenimina lineal. Las partículas se caracterizan también por su distribución de diámetro monomodal y un diámetro promedio Z dentro de intervalos específicos. La presente invención se refiere además al uso de dichas composiciones como medicamentos, en particular para el tratamiento de un trastorno del crecimiento celular caracterizado por un crecimiento anormal de células humanas o animales, así como a los procesos para la preparación de dichas composiciones.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 715 251 B1

DESCRIPCIÓN

NOVEDOSA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE
PARTÍCULAS QUE COMPRENDEN UN COMPLEJO DE UN
POLIRRIBONUCLEÓTIDO DE DOBLE CADENA Y UNA
POLIALQUILENIMINA

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas que comprenden partículas formadas por polirribonucleótidos y polímeros, a su producción y a su uso médico.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El uso de análogos sintéticos de ARN de doble cadena (ARNdc) que imitan el ARNdc viral se ha explorado en los últimos años para activar específicamente el sistema inmunológico contra los tumores con el alcance de la inhibición del crecimiento de las células cancerosas y la inducción de apoptosis de células cancerosas. En particular, el ácido poliinosínico-policitidílico de doble cadena (nombrado como poli(I:C) o pIC) se ha caracterizado como un tipo de ARNdc con varios efectos de interés terapéutico contra diversos tipos de cáncer (tales como melanoma, hepatoma, cáncer de colon, gástrico, y carcinoma oral, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, 15 cáncer de ovario, tumores del tracto urinario, cáncer de pulmón y cáncer de próstata) y su metástasis, de maneras que pueden ser dependientes o independientes de la activación del sistema inmunológico, actividades mediadas por células citolíticas y/o células dendríticas y/o cambios de la expresión génica tumoral y microambiente (Hafner A et al., 2013).

25 Desafortunadamente, estas evidencias preclínicas iniciales están poco confirmadas o no lo están en estudios clínicos con moléculas de poli(I:C) desnudas, que revelaron su baja estabilidad, mala homogeneidad, farmacocinéticas impredecibles y efectos antitumorales limitados debido a

diversos mecanismos, tales como la mala absorción celular o degradación por ARNasas citosólicas (Hafner A et al., 2013). De hecho, con el fin de lograr un efecto terapéutico o profiláctico eficaz, puede ser necesario redissolver moléculas de poli(I:C) inmediatamente antes o poco antes del uso, pueden
 5 estar disponibles en las formulaciones a concentraciones bajas, y/o pueden administrarse con frecuencia (por ejemplo, cada 2 horas).

Durante los últimos años, ha habido un progreso significativo en la formulación de moléculas de poli(I:C) con propiedades inmunomoduladoras y/o terapéuticas. Se han divulgado varios métodos de preparación y formulación de
 10 moléculas de poli(I:C) como polvo y/o integradas dentro de micropartículas a base de polímeros con o sin restos de direccionamiento y enlazadores químicos adicionales (CN103599071; CN102988303; WO2004045491; WO2008057696; WO2013164380; WO2015067632, WO2014057432; WO2014165296; Schaffert D et al, 201 1; WO2015173824, Kabilova T et al,
 15 2014; Kubler K et al, 201 1; Palchetti S et al, 2013; Saheki A et al, 2011). Se han formulado moléculas de poli(I:C) con polímeros vehículo y en formatos compatibles para administración nasal (documento WO2013164380), estabilizadas con polilisina y carboximetilcelulosa (documento WO2005102278), encapsulado dentro de nanopartículas de fosfato cálcico
 20 recubiertas con lípidos catiónicos, liposomas y otras estructuras vesiculares Chen L et al., 2013; US20091 17306; US201 1003883, o junto con ARN monocatenario y con péptidos catiónicos como protamina (documento WO2013087083). Como alternativa, las moléculas de poli(I:C) también se han inmovilizado en partículas sólidas y vehículos, tales como nanopartículas de
 25 óxido de hierro, con o sin agentes que ayudarían a dirigir las moléculas de poli(I:C) a células o tejidos específicos (McBain S et al., 2007; Cobaleda-Siles M et al., 2014).

Algunas publicaciones describen adicionalmente diversos complejos

ternarios o cuaternarios en el intervalo de submicrómetros que están formados por polímeros, poli(I:C) y/o ADN de doble cadena, con o sin otros componentes y específicos de genes (Kurosaki T et al, 2009.; documentos WO2013040552; WO2013063019; Tutin-Moeavin I et al., 2015

5 Sin embargo, estos enfoques tienen el objetivo de proporcionar agentes que administran esencialmente ADN a las células, al tiempo que mantienen su viabilidad, y no la muerte selectiva de células cancerosas.

Los inconvenientes que están limitando el desarrollo clínico de moléculas de poli(I:C) como un medicamento y su cumplimiento de los requisitos
 10 reglamentarios podrían superarse mediante la producción de complejos de anticancerosos estructuralmente complejos que comprenden moléculas de poli(I:C) junto con los sistemas de administración de fármacos para la terapia del cáncer que a menudo se basan en los polímeros catiónicos, tales como quitosano, polietilenimina (PEI), poli-L-lisina, polimetacrilatos, polímeros que
 15 contienen imidazol o ciclodextrina, poli(ésteres de beta-amino) y dendrímeros relacionados. Estos sistemas poliméricos (también denominados Polyplex) son estructural y funcionalmente distintos de los sistemas basados en lípidos (también denominados Lipoplex) y los sistemas híbridos (también denominados Lipopolyplex) que se utilizan de manera similar para la administración local o
 20 sistémica de ácidos nucleicos (Bilensoy E, 2010; Germershaus O y Nultsch K, 2015). Entre Polyplex, PEI es un polímero catiónico de particular interés que puede modificarse a nivel de estructura lineal/ramificada tamaño, enlace químico, degradabilidad y derivatización (Islam M et al., 2014) y que, a diferencia de la internalización de lipoplex por las células, se internaliza tanto
 25 por mediación de clatrina como por endocitosis mediada por caveolas (Shabani M et al., 2010).

Este enfoque terapéutico que implica la preparación y la administración de moléculas de poli(I:C) asociadas a PEI se ha ilustrado en la literatura mediante

el agente denominado BO-1 10 (Pozuelo-Rubio M et al, 2014; Tormo D et al.. 2009; WO201 1.003.883). Este complejo, también identificado como [pIC]^{PEI}, no solo se acopla a una doble inducción de la autofagia y la apoptosis en varias líneas celulares de melanoma y de otros tipos de tumores (tales como gliomas o carcinomas), sino tampoco tiene efecto o tiene un efecto limitado sobre la viabilidad de las células normales, tales como melanocitos. BO-110 inhibe el crecimiento del melanoma en modelos animales para demostrar la actividad antitumoral y antimetastásica *in vivo*, incluso en ratones severamente inmunocomprometidos. Por otra parte, un agente basado en [pIC]^{PEI} similar estimula la apoptosis en células de adenocarcinoma ductal pancreático sin afectar a las células epiteliales pancreáticas normales y la administración *in vivo* de [pIC]^{PEI} inhibió el crecimiento tumoral en modelos animales de tumores (Bhoopathi P et al., 2014). Un efecto adicional de la administración BO-110 se caracteriza en un modelo de endometriosis, en el que dicho agente reduce la angiogénesis y la proliferación celular y aumenta la apoptosis (Garcia-Pascual C y Gomez R, 2013).

Por tanto, BO-110 y agentes de [pIC]^{PEI} similares que comprenden polirribonucleótidos de doble cadena representan una estrategia novedosa contra el cáncer con un amplio espectro de acción, debido a la activación combinada de autofagia y apoptosis, de manera autónoma y de manera selectiva en células tumorales, mientras que mantiene la viabilidad de las células normales de diferentes linajes. Sin embargo, BO-110, como para otros agentes basados en polirribonucleótido de doble cadena a que han demostrado eficacia en varios modelos preclínicos cuando se asocia con vehículos, todavía tiene que proporcionarse en formulaciones que son estables en diferentes condiciones de almacenamiento, se fabrican y dimensionan de manera uniforme.

De hecho, la técnica anterior no proporciona enseñanzas apropiadas para

resolver los problemas relacionados con la combinación más eficaz de criterios estructurales y biofísicos que permiten la producción de composiciones que contienen poli(I:C) para el tratamiento de cáncer. Las agencias reguladoras también requieren que cumplan estrictamente las especificaciones de reproducibilidad, almacenamiento y uniformidad del tamaño y la concentración de partículas que contiene poli(I:C) que están incluidas en las composiciones para su uso en seres humanos. Por tanto, todavía son necesarios agentes, composiciones y procesos relacionados que proporcionen moléculas de polirribonucleótidos de doble cadena, tales como moléculas de poli(I:C), a concentraciones más altas y bien controladas, que permitan su desarrollo clínico y preclínico extenso como fármaco (en particular, contra el cáncer), al tiempo que mejora el cumplimiento de pacientes y reduce la frecuencia de la dosis de moléculas de polirribonucleótidos de doble cadena con un margen de seguridad bien definido y efectos terapéuticos.

15 **SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una composición que comprende partículas, en la que

(i) cada una de dichas partículas comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos una polialquilenimina, o una sal y/o solvato del mismo;

(ii) al menos 95 %, o al menos 90 %, de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 600 nm, preferentemente, menos de o igual a 300 nm (por ejemplo, entre 140 y 250 nm); y

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio z de menos de o igual a 200 nm, preferentemente de menos de o igual a 150 nm, en particular, tal como se mide según la norma ISO 22412.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a una composición acuosa que comprende partículas en las que

(i) cada una de dichas partículas comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos una polialquilenimina lineal, o una sal y/o solvato de la misma, en el que dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] y el peso molecular promedio de dicha polialquilenimina lineal es entre 17 y 23 kDa;

(ii) al menos el 90 % de dichas partículas tiene una distribución de diámetro mono-modal por debajo de 300 nm;

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio Z de menos de o igual a 150 nm, como se mide según la norma ISO 22412; y

(iv) dicha composición tiene un potencial zeta igual o superior a 30 mV, de acuerdo con la norma ISO 13099.

La presente invención también se refiere a una composición acuosa que comprende partículas como se describe en el presente documento, en la que:

(i) cada una de dichas partículas se forma preparando complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos una polialquilenimina lineal, o una sal y/o solvato de la misma, en el que dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] y el peso molecular promedio de dicha polialquilenimina lineal es entre 17 y 23 kDa; (ii) al menos el 90 % de dichas partículas tiene un diámetro mono-modal inferior a 300 nm;

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio Z de menos de o igual a 150 nm, como se mide según la norma ISO 22412; y

(iv) dicha composición tiene un potencial zeta igual o superior a 30 mV, de acuerdo con la norma ISO 13099;

en el que dichas partículas se forman siendo la relación del número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena en dicha composición igual o mayor

que 2,5.

La presente invención también se refiere a una composición obtenible mediante la liofilización de la composición acuosa como se divulga en el presente documento.

5 Además, la presente invención se refiere a una composición, como se divulga en el presente documento, para su uso como un medicamento.

Además, la presente invención se refiere a una composición, como se divulga en el presente documento, para su uso en el tratamiento de un trastorno del crecimiento celular caracterizado por un crecimiento anormal de
10 células humanas o animales.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un proceso para la fabricación de la composición, como se divulga en el presente documento, que comprende:

(i) preparar una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido de
15 doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y una solución acuosa de al menos una polialquilenimina, o una sal o solvato del mismo, en el que una o ambas soluciones opcionalmente comprenden además un vehículo farmacéuticamente vehículo aceptable, disolvente orgánico, excipiente y/o adyuvante;

20 (ii) filtrar de forma independiente cada solución a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 500 nm para formar soluciones esterilizadas;

(iii) mezclar las soluciones esterilizadas resultantes en una cámara de mezclado para formar una composición acuosa mediante la adición de una de
25 dichas soluciones en la otra solución en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad de más de o igual a 1 ml/min, o mediante la adición simultánea de cada una de dichas soluciones en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad

de más de o igual a 1 ml/min; y, opcionalmente, (iv) filtrar la composición acuosa resultante a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 600 nm para formar un filtrado o centrifugar la composición acuosa resultante a más de o igual a 22.480 m/s² para formar un sobrenadante; y/o

5 (v) liofilizar la composición acuosa, filtrado o sobrenadante resultante.

Preferentemente, la presente invención también se refiere a una composición que comprende partículas, en la que:

(i) cada una de dichas partículas comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos

10 una polialquilenimina, o una sal y/o solvato del mismo; en el que

(a) dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] o ácido poliadenínico-poliuridílico [poli (A:U)], en el que al menos el 60 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena tienen, por lo menos, 850 pares de bases, al menos el 70 % de dicha polirribonucleótidos de doble cadena tienen entre 400 y 5000 pares de bases, y entre el 20 % y el 45 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena tienen entre 400 y 850 pares de bases; y

15

(b) dicha polialquilenimina comprende al menos el 95 % de polietileniminas, en el que el peso molecular promedio en peso de dicha polialquilenimina está entre 17 y 23 kDa y el índice de polidispersidad es <1,5, y en el que la relación del número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena en dicha composición está entre 2,5 y 5,5;

20

(ii) al menos el 99 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 600 nm; y

25

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio z de entre 30 nm y 150 nm.

Más preferentemente, la presente invención también se refiere a una composición acuosa que comprende partículas, en la que:

(i) cada una de dichas partículas comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos

5 una polialquilenimina, o una sal y/o solvato del mismo; en el que

(a) dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] o ácido poliadenílico-poliuridílico [poli (A:U)], en el que al menos el 60 % de dicho poli(I:C) tiene al menos, 850 pares de bases, al menos el 70 % de dicho [poli (A:U)] tiene entre 400 y 5000 pares de bases y entre el 20 % y el 45 % de dicho poli(I:C) tiene entre 400 y 850 pares de bases; y

10

(b) dicha polialquilenimina es polietilenimina (PEI), en la que el peso molecular promedio en peso de dicha PEI está entre 17,5 y 22,6 kDa y el índice de polidispersidad es $<1,5$, y en el que la relación del número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena en dicha composición está entre 2,5 y 4,5;

15

(ii) al menos el 99 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 500 nm;

20

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio z de entre 60 nm y 130 nm; y

(iv) dichas partículas tienen una mediana del diámetro (D50%) de entre 75 nm y 150 nm.

25

Otras realizaciones relacionadas con la preparación de tales composiciones en forma de formulaciones BO-1 1 X, sus características, su análisis y sus usos se proporcionan en la descripción detallada y en los Ejemplos que figuran más adelante.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Actividad funcional de distintas preparaciones de BO-111 después de la filtración o centrifugación mediante análisis de la muerte celular en células de melanoma SK-Mel-103 después de una exposición de 48 horas. (A) Las moléculas poli(I:C) están asociadas con PEI para formar complejos de BO-111 de acuerdo con la descripción del procesamiento de fabricación de 2 viales en el Ejemplo 1 y la solución resultante se filtra usando membranas con diferentes tamaños de poro (y, después, usando la solución de flujo continuo para ensayos basados en células) o se centrifuga a diferentes velocidades (y, después, usando el sobrenadante para ensayos basados en células), generando distintas preparaciones de BO-111, cada una de las cuales contiene complejos basados en poli(I:C) con un tamaño más homogéneo y más bajo que se determina como el promedio Z (diámetro hidrodinámico, expresado como d.nm). Se generaron datos cualitativamente similares al analizar la muerte celular a las 24 horas. Los datos sobre muerte celular se comparan con muestras no tratadas con BO-111. (B) Actividad de respuesta a la dosis de una preparación de BO-111 que se obtiene filtrando a través de un filtro de 0,8 μm (barras sombreadas) en comparación con la preparación de BO-111 correspondiente no filtrada (barras blancas). Debido a que la centrifugación o filtración causa alguna pérdida de poli(I:C) debido a la sedimentación o retención de complejos mayores (respectivamente), la cantidad de poli(I:C) en cada preparación de BO-111 distinta se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 260 nm, con el fin de comparar correctamente los efectos de dicha preparación sobre las células diluyendo en consecuencia la preparación inicial a la concentración apropiada. Se generaron datos cualitativamente similares al analizar la muerte celular a las 12, 24 y 36 horas. La muerte celular se determina mediante ensayo con azul tripán como se describe en la literatura. La desviación estándar se calcula utilizando datos por triplicado para cada condición del mismo experimento.

Figura 2: Efectos de la PEI sobre la actividad funcional de BO-111, determinado usando el mismo ensayo basado en células y la concentración de BO-111 de la figura 1. (A) Se obtuvieron preparaciones distintas de BO-111 mediante el uso de preparaciones JetPEI comerciales que contienen polímeros lineales que tienen un peso molecular diferente (expresado en kiloDalton; NT: control, células no tratadas; tales preparaciones DE jetPEI presentan una distribución monomodal con UN índice de polidispersidad que es inferior a 1,5, en particular comprendido entre 1,1 y 1,4). (B) Se obtuvieron preparaciones de BO-111 distintas mediante la modificación de la relación N/P (1,2 a 5,3) que se calcula como: $\mu\text{l de PEI} \times 150 \text{ nM} / \mu\text{g de poli(I:C)} \times 3 \text{ nmol}$, en la que 150 nM se refiere a la concentración de restos de nitrógeno en PEI y 3 nmol se refiere al número de nanomoles de fosfato aniónico por 1 μg de poli(I:C). El efecto farmacológico de cada combinación se determina comparando los porcentajes de muerte celular tanto en células de melanoma como en melanocitos (células de control; NT: control, células no tratadas). Se usó la misma preparación de poli(I:C) como se describe en la figura 1 para todas las preparaciones de BO-111 que se describen en (A) y (B) pero, en lugar de aplicar el método de "pipeteado rápido", la solución de poli(I:C) se inyectó rápidamente en el vial que contiene la solución de PEI con una jeringa, aumentando la velocidad de mezclado (al menos como se puede determinar visualmente). La desviación estándar se calcula utilizando datos por triplicado para cada condición del mismo experimento.

Figura 3: Análisis de las moléculas de poli(I:C) dentro de las preparaciones de BO-111 mediante electroforesis. (A) Las preparaciones no marcadas de las moléculas iniciales de poli(I) o poli(I:C) se comparan con cantidades crecientes de preparaciones de BO-111 en gel de agarosa al 0,8 % (electroforesis de 1 hora). El tamaño molecular de las moléculas de poli(I:C) se determina en comparación con marcadores de tamaño. (B) Las moléculas de

poli(I:C) radiomarcadas se comparan con poli(I:C) sin marcar y a una preparación de BO-111 que incluye el mismo poli(I:C) radiomarcado, utilizando un gel de agarosa al 1 % (electroforesis de 1 hora) que se expone a una película fotográfica. Las moléculas de poli(I:C) dentro de las diferentes preparaciones de BO-111 que no son visibles en el panel (A) aparecen en el panel (B) como bloqueadas dentro del pocillo de gel de agarosa, ya que están asociados a las partículas formadoras de JetPEI que (debido a su tamaño y/o distribución de la carga), el campo eléctrico no se puede desplazar a través del gel de agarosa. (C) Las moléculas de poli(I:C) no marcadas se comparan con preparaciones distintas de BO-111 obtenidas mediante la modificación de la relación N/P (1,2, 3 y 5,3; este valor se calcula como en la figura 2) en gel de agarosa al 0,8 % (electroforesis de 1 hora). Cada muestra está sin tratar (C+) o tratada con una enzima específica de degradación (ARNasa; ARNasa A: 5 µg/ml durante 30 minutos) antes de cargar en el gel de agarosa, con el fin de evaluar la estabilidad de las moléculas de poli(I:C) en diferentes preparaciones de BO-111. Las moléculas de poli(I:C) parecen insensibles a dicha enzima cuando están formando complejos con JetPEI a una relación N/P mayor (mayor o igual a 3) y una mancha de moléculas de poli(I:C) parece liberarse cuando la relación N/P es inferior a 3. En los paneles (A) y (C), el tamaño molecular de las moléculas de poli(I:C) se determina en comparación con el marcador de tamaño.

Figura 4: La distribución del tamaño de los complejos de BO-111 en preparaciones que se obtienen usando el proceso de producción de 2-viales, tal como se determina mediante la comparación de la intensidad de la señal usando dispersión de luz dinámica mediante la tecnología ZS nano zeta sizer. (A) La comparación de la distribución del diámetro de partícula se realizó utilizando tres lotes de BO-111 diferentes obtenidos utilizando el mismo proceso de producción. (B) Comparación de preparaciones de BO-111 distintas al

exponer (o no, la muestra indicada como CONTROL) para una incubación a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. (C) Comparación de preparaciones de BO-111 distintas al exponer (o no, la muestra indicada como CONTROL) para una incubación a 50 °C durante un periodo de 30 minutos. (D)

- 5 Comparación de preparaciones de BO-111 distintas, fabricación del control como se sugiere en el Ejemplo 1 y la muestra de "mezclado lento", evaluadas mediante perfiles por triplicado, que se obtuvo mediante el enfoque gota a gota usando una velocidad de mezclado reducida. El tamaño de partícula se evalúa considerando el diámetro de partícula en nanómetros (d.nm).

- 10 **Figura 5:** Esquema de la fabricación GMP de compuestos BO-11X, como se ilustra con BO-112. (A) Diagrama de flujo que resume las etapas principales para la fabricación de compuestos BO-112 como una preparación farmacéutica que cumple las guías que comprende moléculas de poli(I:C), preparaciones comerciales de jetPEI y glucosa. (B) Cromatogramas de permeación para
15 muestras de BO-112, JetPEI y glucosa que se analizan usando la detección del índice de refracción (RI). La señal de BO-112 se solapa con la señal de la glucosa, mientras que el pico característico de JetPEI libre al volumen de retención de 13,75 ml desapareció, lo que sugiere que todo JetPEI inicial se incorporó en BO-112. (C) Modificación de la distribución del compuesto BO-112
20 debido a la mayor velocidad de la mezcla durante el proceso de fabricación a una velocidad de inyección baja (por debajo de 100 rpm) o alta (más allá de 100 rpm, hasta 550rpm), donde 550 rpm es la velocidad de referencia para las soluciones de mezcla en el proceso de fabricación de BO-112, es decir para la obtención de partículas con un diámetro promedio Z (d. nm) que va de
25 aproximadamente 100 nm a 73nm, 54 nm o menos (preparaciones de BO-122 funcionales presentan un diámetro promedio de entre 30 nm y 150 nm; el diámetro de partícula se define como en las figuras anteriores en d nm).

Figura 6: Análisis estructural de diferentes formulaciones de poli(I:C). (A)

El tamaño molecular de diferentes preparaciones de poli(I:C) se determina en gel de agarosa usando marcadores de tamaño. (B) La distribución del tamaño de complejos de BO-112 se compara con tres productos comerciales que contienen poli(I:C) (Poli-ICLC, LyoVec-HMW, y LyoVec-LMW; el tamaño de partícula se define como en las figuras anteriores en nm).

Figura 7: Los cambios en la distribución del tamaño después del almacenamiento a -20 °C se determinan para BO-112 (A), poli-ICLC (B), LyoVec-HMW (C), y LyoVec-LMW (D), como se determina mediante la comparación de la intensidad de la señal usando la tecnología Nanosizer (diámetro de partícula se define como en las figuras anteriores en nm).

Figura 8: Efecto de diferentes formulaciones de poli(I:C) sobre la viabilidad celular en dos modelos celulares de cáncer diferentes. BO-112 se compara con las células no tratadas y con las células tratadas con poli-ICLC, LyoVec-LMW o LyoVec-HMW, analizándose cada formulación a las concentraciones indicadas que se determinaron según el peso del complejo pero con un contenido similar de moléculas de poli(I:C), en un modelo de células de melanoma (A) o de cáncer de páncreas (B). Los datos de viabilidad celular se generaron utilizando el método de ensayo de cristal violeta después de 24 horas. (C) Efecto de diferentes formulaciones de poli(I:C) sobre las moléculas de señalización de interés terapéutico. La expresión de interferón-beta (IFN-beta) se evaluó por el método de RT-qPCR en células SK-MEL-103 que fueron expuestas a BO-112, Poli-ICLC (o sin tratar, NT) durante 8, 16 y 24 horas. Las formulaciones BO-112 y Poli-ICLC se usaron a una concentración que proporcionaba un contenido similar de moléculas de poli(I:C).

Figura 9: Efecto de la PEI lineal sola, poli(I:C) y dos formulaciones de PEI/poli(I:C) diferentes (BO-110 y BO-112) sobre la viabilidad de los melanocitos normales primarios (preparaciones n.º 1 y n.º 2) y cuatro líneas celulares de cáncer, lo que demuestra la citotoxicidad específica de tales

formulaciones de PEI/poli(I:C) contra líneas celulares de cáncer. El contenido de Poli(I:C) utilizado en la preparación de los tratamientos de poli(I:C) solamente, BO-110, y BO-112 administrados es idéntico (1 µg/ml por cada 40 horas de tratamiento).

5 **Figura 10:** Efecto sobre la administración de BO-112 en un modelo animal para el cáncer humano. (A) Programa que muestra el programa del tratamiento. A todos los ratones se inyectó por vía subcutánea células de melanoma murino B16-F10 el día 0. Después de aleatorizar a los ratones a cinco grupos que presentan tumores de tamaño promedio similar (80-100 mm³) el día 7, se trató
10 a los animales con una formulación de BO-112 (círculos dobles) mediante inyección directamente en el tejido del tumor (tratamiento i.t.) a 3 concentraciones diferentes en los grupos 2, 3 y 4 (G2, G3, G4) o, en los dos grupos restantes (G1 y G5), con solo vehículo. En los siguientes días de tratamiento (10, 14, 17, 21 y 24), todos los grupos menos G1 recibieron la
15 administración intraperitoneal (i.p.) de un anticuerpo murino anti-PD-L1 (150 µg/dosis), además de la administración intratumoral de la formulación de BO-112 a la misma concentración del día 7. Se controló la supervivencia todos los días y se puntuó a los ratones como muertos cuando se les encontró muertos o cuando el volumen del tumor alcanzó el tamaño máximo permitido. La
20 monitorización continuó después del último tratamiento hasta el día 45, cuando murió el último ratón y se terminó el experimento. (B) Curva de supervivencia de la comparación de los grupos de control G1 y G5 con los tres grupos en los que la formulación de BO-112 se administró a las tres concentraciones indicadas. Al comparar los grupos, hubo una diferencia estadística ($p < 0,0001$, prueba Log-rank de Mantel-Cox) entre los grupos de control y los grupos de
25 prueba, con G4 mostrando el mayor aumento de supervivencia en relación con el vehículo o anti-PD-L1 solo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición que comprende partículas, en la que:

(i) cada una de dichas partículas comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos una polialquilenimina, o una sal y/o solvato del mismo;

(ii) al menos el 95 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 600 nm, preferentemente, menor que o igual a 300 nm; y

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio $\bar{z}$ de menos de o igual a 200 nm, preferentemente de menos de o igual a 150 nm, en particular, tal como se mide según la norma ISO 22412.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a una composición acuosa que comprende partículas en las que

(i) cada una de dichas partículas comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos una polialquilenimina lineal, o una sal y/o solvato de la misma, en el que dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitídico [poli(I:C)] y el peso molecular promedio de dicha polialquilenimina lineal es entre 17 y 23 kDa;

(ii) al menos el 90 % de dichas partículas tiene una distribución de diámetro mono-modal por debajo de 300 nm;

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio $\bar{Z}$ de menos de o igual a 150 nm, como se mide según la norma ISO 22412; y

(iv) dicha composición tiene un potencial zeta igual o superior a 30 mV, de acuerdo con la norma ISO 13099

La presente invención también se refiere a una composición acuosa que comprende partículas como se describe en el presente documento, en la que:

(i) cada una de dichas partículas se forma preparando un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y

al menos una polialquilenimina lineal, o una sal y/o solvato de la misma, en el que dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] y el peso molecular promedio de dicha polialquilenimina lineal es entre 17 y 23 kDa;

5 (ii) al menos el 90 % de dichas partículas tiene una distribución de diámetro mono-modal por debajo de 300 nm;

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio Z de menos de o igual a 150 nm, como se mide según la norma ISO 22412; y

10 (iv) dicha composición tiene un potencial zeta igual o superior a 30 mV, de acuerdo con la norma ISO 13099;

en el que dichas partículas se forman siendo la relación del número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena en dicha composición igual o mayor que 2,5.

15 Las partículas que están hechas y formadas por dichos complejos pueden presentar características adicionales, según la descripción siguiente, de manera que en realizaciones adicionales, dichas partículas pueden comprender componentes adicionales tales como excipientes como manitol o glucosa, o la ausencia de otros elementos, tales como funcionalidad de detección de cáncer

20 u otros restos y enlazadores. Se pueden definir características adicionales en realizaciones preferidas adicionales cuando las partículas se proporcionan y se analizan dentro de las composiciones [es decir dentro de las formulaciones líquidas (acuosas) o liofilizadas], tal como cuando se define que tiene una distribución del tamaño mono-modal dentro de intervalos específicos, por

25 ejemplo, entre 30 nm y 150 nm, o cuando la composición se caracteriza por la ausencia de moléculas de polirribonucleótidos de cadena sencilla (establecidas por un efecto hipercrómico bajo o ausente). Otras características que se definen de acuerdo con los estándares establecidos a nivel internacional que

se requieren para la aprobación reglamentaria y/o procesos de las buenas prácticas de fabricación se divulgan a continuación.

En una realización preferida de la composición de la presente invención, al menos el 40 % de los polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dicha composición tiene al menos 850 pares de bases y al menos el 50 % de los polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dichas partículas tienen entre 400 y 5000 pares de bases. Por otra parte, los polirribonucleótidos de doble cadena que están compuestos en los complejos pueden presentar intervalos específicos de longitudes que se definen por sus procesos de preparación y/o de acuerdo con el uso deseado. Por ejemplo, al menos el 40 %, 50 %, 60 %, o cualquier otro porcentaje más alto de los polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dichas partículas pueden tener al menos 850 pares de bases, y al menos el 50 %, 60 %, 70 % o cualquier otro porcentaje más alto de los polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dichas partículas pueden tener entre 400 y 5000 pares de bases. Intervalos adicionales que pueden definir polirribonucleótidos de doble cadena que están comprendidos en dichas partículas son:

- (i) entre el 5 % y el 60 % (y preferentemente entre el 10 % y el 30 %) de polirribonucleótidos de doble cadena que tienen menos de 400 pares de bases;
- (ii) entre el 20 % y el 45 % (o entre el 15 % y el 30 %, pero, preferentemente, entre el 20 % y el 30 %) de los polirribonucleótidos de doble cadena que tienen entre 400 y 850 pares de bases;
- (iii) entre el 20 % y el 70 % (y, preferentemente, entre el 50 % y el 60 %) de polirribonucleótidos de doble cadena que tienen entre 850 y 5000 pares de bases; y/o
- (iv) entre el 0 % y el 10 % (y, preferentemente, entre el 1 % y el 30 %) de polirribonucleótidos de doble cadena que tienen más de 5000 pares de bases.

Por tanto, en una realización más preferida de la composición de la

presente invención, al menos el 50 % de los polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dicha composición tiene al menos 850 pares de bases y al menos el 50 % de los polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dicha composición tienen entre 400 y 5000 pares de bases.

- 5 Aún más preferentemente, al menos el 60 % de los polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dicha composición tiene al menos 850 pares de bases, al menos el 70 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dicha composición tiene entre 400 y 5000 pares de bases, y entre el 20 % y el 45 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena tienen
- 10 entre 400 y 850 pares de bases. Incluso más preferentemente, al menos el 60 % de los polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dicha composición tiene al menos 850 pares de bases, al menos el 70 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena comprendidos en dicha composición tiene entre 400 y 5000 pares de bases, y entre el 20 % y el 30% de dichos
- 15 polirribonucleótidos de doble cadena tienen entre 400 y 850 pares de bases y entre el 10 % y el 30 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena tienen menos de 400 pares de bases.

En una realización de la presente invención, el polirribonucleótido de doble cadena es, preferentemente, moléculas de ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] o moléculas de ácido poliadenílico-poliuridílico [poli

20 (A:U)]. Más preferentemente, el polirribonucleótido de doble cadena es la molécula de ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)]. Dichas moléculas de polirribonucleótidos de doble cadena comprenden hebras de, por ejemplo, poli(I) y poli(A) que se emparejan con poli(C) y poli(U), respectivamente,

25 formando de este modo polirribonucleótidos de doble cadena, en el que cada cadena puede comprender hasta 5 % de ribonucleótidos diferentes de la mayoría de los ribonucleótidos en dicha cadena y/o comprenden hasta un 5 % de pares de bases desapareadas, más preferentemente hasta 1 % de

ribonucleótidos diferentes de la mayoría de los ribonucleótidos en dicha cadena y/o comprenden hasta 1 % pares de bases desapareadas. Dependiendo del polirribonucleótido seleccionado y/o el proceso para la generación de dichos complejos, una fracción de los polirribonucleótidos comprendidos en el
 5 complejo puede comprender también polirribonucleótidos de cadena simple (es decir, no apareados).

En una realización preferida, el contenido de polirribonucleótido de cadena sencilla dentro de estas partículas y las composiciones se evalúa sobre la base de la hipercromicidad (o efecto hipercrómico). Este efecto es debido al
 10 aumento de la densidad óptica (absorbancia) de los polinucleótidos de doble cadena cuando esta estructura dúplex se desnaturaliza. La absorción UV (ultravioleta) de polinucleótidos se incrementa cuando las dos cadenas simples se están separando, ya sea por calor o mediante la adición de un agente desnaturalizante o aumentando el nivel de pH. Por lo tanto hipercromicidad se
 15 puede utilizar para comprobar las estructuras de moléculas de poli(I:C) o poli(A:U) dentro de las partículas a medida que la temperatura (u otra condición) cambia, determinando de este modo, respectivamente, la separación entre las cadenas de poli(I) y las cadenas de poli(C) en las moléculas de poli(I:C) o la separación entre las cadenas de poli(A) y las
 20 cadenas de poli(U) en las moléculas de poli(I:C). Preferentemente, dicho contenido de moléculas de poli(I) de cadena sencilla y las moléculas de poli(C) o las moléculas de poli(A) de cadena sencilla y las moléculas de poli(U) en las partículas es tan bajo como sea posible, tal como se determina midiendo la absorbancia de la luz en la región de longitud de onda de 260 nm usando el
 25 equipo y los protocolos estándar. Por ejemplo, este efecto se puede medir usando un espectrofotómetro y, de acuerdo con la Farmacopea Europea (2.2.25; Espectrofotometría de absorción, ultravioleta y visible). En particular, las composiciones divulgadas en el presente documento exhiben menos de un

20 % de aumento en la absorción a 260 nm entre 20 °C y 80 °C, preferentemente menos de un 10 %, más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente, a menos de 1 % de aumento en la absorción a 260 nm entre 20 °C y 80 °C. Como alternativa, las composiciones divulgadas en el presente documento muestran un aumento de menos de 0,2 en la transmitancia entre la temperatura ambiente y 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C. Este valor se puede medir como la absorbancia a 260 nm (A) o la transmitancia (1/A) a temperatura ambiente y, después, calculando la diferencia con el valor respectivo de la absorbancia o transmitancia a las temperaturas más altas mencionadas anteriormente.

En una realización preferida de la composición de la presente invención, la polialquilenimina, o una sal y/o solvato del mismo, es lineal, ramificada y/o dendrítica, más preferentemente dicha polialquilenimina es una polialquilenimina lineal. En una realización más preferida, dicha polialquileniminas, una homo-polialquilenimina o heteropolialquilenimina. El homopolímero o heteropolímero policatiónico comprende, preferentemente, una unidad de repetición formada por un grupo amina y al menos un espaciador de dos carbonos, que comprende por lo tanto polímeros de homopolialquilenimina o de heteropolialquilenimina que son lineales o ramificadas y/o dendríticas. Ejemplos de polialquileniminas son polietilenimina, polipropilenimina, polibutilenimina y polipentilenimina, polímeros mixtos de cualquiera de estos homopolímeros, o cualquiera de los derivados disponibles comercialmente o descritos de otra manera. Este polímero de polialquilenimina es, preferentemente, soluble en agua. En una realización particularmente preferida de la presente invención, dicha polialquilenimina es una homopolialquilenimina o heteropolialquilenimina lineal soluble en agua. En una realización aún más preferida, dicha polialquilenimina comprende, en particular, una homopolialquilenimina lineal soluble en agua, más preferentemente comprende

al menos 75 % de polietileniminas lineales, aún más preferentemente un 95 % de polietileniminas lineales. En una realización aún más preferida de la composición de la presente invención, dicha polialquilenimina es polietilenimina (también conocida como PEI). Por tanto, en una realización especialmente preferida, dicha polialquilenimina es una polietilenimina lineal.

En otra realización preferida de la composición de la presente invención, el peso molecular promedio en peso de dicha polialquilenimina es de entre 17 y 23 kDa, aún más preferentemente entre 17,5 y 22,6 kDa, y tiene un índice de polidispersidad de peso molecular de $<1,5$. Dicho peso molecular promedio en peso y dicho índice de polidispersidad se determinaron para el precursor de óxido de polialquileno a dicha polialquilenimina de acuerdo con la norma ISO 16014:2012, preferentemente mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) según la norma ISO 16014-2:2012. El índice de polidispersidad se calcula como M_w/M_n (peso molecular promedio en peso/peso molecular promedio en número) y es inferior a 1,5.

En otra realización preferida de la composición de la presente invención, la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena en dicha composición es igual o mayor que 2,5, más preferentemente entre 2,5 y 5,5, aún más preferentemente entre 2,5 y 4,5, además, preferentemente, entre 2,5 y 3,5. Esta relación es particularmente importante cuando se forman las partículas dentro de la composición y proporcionan composiciones que tienen los efectos y propiedades deseadas.

Por lo tanto, como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a una composición acuosa que comprende partículas como se divulga en el presente documento, en la que:

(i) cada una de dichas partículas se forma preparando un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y

al menos una polialquilenimina lineal, o una sal y/o solvato de la misma, en el que dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] y el peso molecular promedio de dicha polialquilenimina lineal es entre 17 y 23 kDa;

5 (ii) al menos el 90 % de dichas partículas tiene una distribución de diámetro mono-modal por debajo de 300 nm;

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio Z de menos de o igual a 150 nm, como se mide según la norma ISO 22412; y

10 (iv) dicha composición tiene un potencial zeta igual o superior a 30 mV, de acuerdo con la norma ISO 13099;

en la que dichas partículas están formadas a la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena en dicha composición que es igual o mayor que 2,5, más preferentemente entre 2,5 y 5,5, aún más

15 preferentemente entre 2,5 y 4,5, además, preferentemente, entre 2,5 y 3,5. En una realización preferida adicional, dicha composición se forma haciendo un complejo de al menos 0,5 mg de ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] por ml del volumen total (es decir, final) de dicha composición, más preferentemente de al total de menos 2,0 mg de poli(I:C) por ml del volumen

20 total de dicha composición. Por tanto, en una realización particularmente preferida de la invención, el polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] o ácido poliadenílico-poliuridílico [poli (A:U)],

en el que al menos el 60 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena tienen al menos 850 pares de bases (pb), al menos el 70 % de dichos

25 polirribonucleótidos de doble cadena tienen entre 400 y 5000 pares de bases, y entre 20 % y 45 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena tienen entre 400 y 850 pares de bases; y la polialquilenimina comprende al menos 95 % de polietileniminas, en el que el peso molecular promedio en peso de dicha

polialquilenimina es de entre 17 y 23 kDa y el índice de polidispersidad es $<1,5$, y en el que la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena utilizado en la formación de dicha composición (es decir, la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena usado en la formación de dichas partículas) está entre 2,5 y 5,5.

En una realización particularmente preferida incluso más preferida de la invención, el polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-citidílico [poli(I:C)], en el que al menos el 60 % de las moléculas de poli (I:C) tienen al menos 850 bases pares, al menos el 70 % de dichas moléculas de poli(I:C) tienen entre 400 y 5000 pares de bases, entre el 20 % y el 30 % de dichas moléculas de poli(I:C) tienen entre 400 y 850 pares de bases, y entre el 10 % y el 30 % de dichas moléculas de poli(1: C) tienen menos de 400 pares de bases; y la polialquilenimina es polietilenimina, en el que el peso molecular promedio en peso de dicha polialquilenimina está entre 17,5 y 22,6 kDa y el índice de polidispersidad es $<1,5$ (tal como entre 0,1 y 0,6, medido dentro de la composición), y en el que la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polietilenimina y el número de moles de fósforo de dicha poli(I:C) usados en la formación de dicha composición (es decir, la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena usado en la formación de dichas partículas) está entre 2,5 y 4,5.

En la presente invención, el índice de diámetro promedio z y el índice de polidispersidad de los diámetros de las partículas comprendidos en la composición de la presente invención se determinan mediante técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS) según la suposición de que dichas partículas son isotrópicas y tienen una forma esférica. En particular, el diámetro promedio

z (diámetro promedio zeta) se refiere al diámetro hidrodinámico promedio aritmético ponderado con la intensidad de dichas partículas, tal como se determina según la norma industrial ISO 22412:2008. Además, la norma industrial ISO 22412:2008 proporciona una medida de la distribución del diámetro de partícula (tamaño) en forma de un índice de polidispersidad y permite el cálculo de los percentiles (valores D) conocidos como D50 % (el diámetro máximo de partícula por debajo del cual el 50 % de la intensidad de la muestra cae, también conocido como la mediana del diámetro), D90 % (el diámetro máximo de partícula por debajo del cual el 90 % de la intensidad de la muestra cae), D95 % (el diámetro máximo de partícula por debajo del cual el 95 % de la intensidad de la muestra cae) y D99 % (el diámetro máximo de partícula por debajo del cual 99 % de la intensidad de la muestra cae). Por lo tanto, basado en la metodología presentada en la norma ISO 22412, es posible determinar que al menos el 95 % (D95) o, preferentemente, el 90 % (D90) de las partículas comprendidas en la composición de la presente invención tiene un diámetro de menos de o igual a 600 nm, más preferentemente de menos de o igual a 300 nm, y que dichas partículas tienen un diámetro promedio Z de menos de o igual a 200 nm, más preferentemente menos de 150 nm.

En una realización preferida de la composición de la presente invención, dichas partículas tienen una distribución de diámetro monomodal, en particular dentro del intervalo de submicrómetros indicado anteriormente. De hecho, en un aspecto, la composición acuosa de la presente invención comprende partículas, en la que al menos el 90 % de dichas partículas tiene una distribución de diámetro monomodal por debajo de 300 nm, en el que dichas partículas tienen un diámetro promedio Z de menos de o igual a 150 nm, tal como se mide según la norma ISO 22412. Las partículas (o sus agregados) que tienen un tamaño superior a dichos valores (por ejemplo, en el intervalo de micrómetros, tal como superior a 10 μ m) que pueden estar todavía presentes

(pero, en cualquier caso por debajo de los límites indicados en la Farmacopea Europea) se puede retirar por filtración, al final de la fabricación y/o justo antes de la administración (por ejemplo, a través de un filtro de 0,8 micrómetros). De este modo, la totalidad o la gran mayoría de las partículas comprendidas en esta composición pueden presentar una distribución de diámetro monomodal dentro de la composición que, como se muestra en los Ejemplos, se establece durante su preparación y puede mantenerse y adaptarse según el uso deseado y/o almacenamiento.

En otra realización preferida de la presente invención, al menos el 95 % o el 90 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 600 nm (es decir, el diámetro máximo de partícula por debajo del cual el 95 % o el 90 % de la intensidad de la muestra cae = $D_{95} \%$ o $D_{90} \% = 600 \text{ nm}$), más preferentemente no superior al diámetro de 500 nm, todavía más preferentemente no superior al diámetro de 400 nm, y aún más preferentemente no superior al diámetro de 300 nm. Dentro de dichos límites, incluso más preferentemente, al menos el 99 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 600 nm, aún más preferentemente al menos el 99 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 500 nm, mucho más preferentemente al menos el 99 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 400 nm y aún más preferentemente no superior al diámetro de 300 nm. Por otro lado, en una realización preferida, dichas partículas tienen una mediana del diámetro ($D_{50\%}$) entre 75 y 150 nm, más preferentemente entre 80 y 130 nm, y un $D_{90\%}$ de entre 140 y 250 nm, más preferentemente entre 170 y 240 nm.

En otra realización preferida de la presente invención, dichas partículas tienen un diámetro promedio $\bar{z}$ por debajo de 150 nm, y, más preferentemente, en intervalos comprendidos entre 30 nm y 150 nm (tales como, además, preferentemente entre 50 nm y 150 nm, entre 75 nm y 150 nm, entre 50 nm y

100 nm, entre 100 nm y 150 nm, o entre 60 nm y 130 nm). Más preferentemente, dichas partículas de la composición acuosa de la presente invención tienen una distribución de diámetro monomodal entre 30 nm y 150 nm.

- 5 Por lo tanto, en realizaciones más particularmente preferidas: (i) al menos el 99 % de las partículas comprendidas en la composición de la presente invención tienen un diámetro de menos de o igual a 600 nm, por lo que dichas partículas tienen un diámetro promedio $\bar{z}$ de entre 30 nm y 150 nm; y (ii) al menos el 99 % de las partículas comprendidas en la composición de la
- 10 presente invención tienen un diámetro de menos de o igual a 500 nm, con lo que dichas partículas tienen un diámetro promedio $\bar{z}$ de entre 60 nm y 130 nm y tienen una mediana del diámetro (D50 %) entre 75 y 150 nm.

En una realización preferida de la presente invención, dicha composición es obtenible mediante la liofilización de las composiciones acuosas descritas

15 en el presente documento. Así, la composición de la invención puede ser una composición acuosa o liofilizada. Por tanto, la composición de la presente invención (en lo sucesivo formulación BO-11X, en la que X puede ser un número entero tal que una formulación BO-11X abarca, por ejemplo, una formulación BO-111 y BO-112) puede proporcionarse en un sólido (como una

20 forma liofilizada u otra altamente concentrada de las partículas), semisólido (como un gel) o en forma líquida, pero es preferible como una composición líquida (tal como una composición acuosa u otro tipo de suspensión de partículas que puede inyectarse o inhalarse). Las formulaciones BO-1 1X se pueden utilizar, enviar y almacenar como tales, o se pueden utilizar para la

25 obtención de una forma liofilizada para usos específicos, envío, almacenamiento, administración con otros compuestos, y/o más requisitos técnicos. Con respecto al proceso y el equipo de liofilización, la liofilización clásica o métodos más recientes (tal como electro-congelación, control con

ultrasonidos o niebla helada), puede adaptarse para la manipulación y fabricación de las formulaciones BO-11X, también cambiando parámetros tales como el pH, la velocidad de aire de secado, el tiempo, la humedad, la presión o la temperatura.

5 Por lo tanto, en una realización más preferida, la composición de la presente invención comprende partículas en las que:

(i) cada una de dichas partículas comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos una polialquilenimina, o una sal y/o solvato del mismo; en el que

10 (a) dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] o ácido poliadenílico-poliuridílico [poli (A:U)], en el que al menos el 60 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena tienen, por lo menos, 850 pares de bases, al menos el 70 % de dicha polirribonucleótidos de doble cadena tienen entre 400 y 5000 pares de bases, y entre el 20 % y el 45 % de dichos polirribonucleótidos de doble
15 cadena tienen entre 400 y 850 pares de bases; y

(b) dicha polialquilenimina comprende al menos el 95 % de polietileniminas, en el que el peso molecular promedio de dicha polialquilenimina está entre 17 y 23 kDa y el índice de polidispersidad es
20 <1,5, y en el que la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena utilizado en la formación de dicha composición (es decir, la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho
25 polirribonucleótido de doble cadena utilizado en la formación de dichas partículas) está entre 2,5 y 5,5;

(ii) al menos el 99 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 600 nm, preferentemente, al menos el 95 % de dichas partículas tiene

un diámetro de menos de o igual a 400 nm; y

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio z de entre 30 nm y 150 nm.

En otra realización más preferida, la composición de la presente invención es una composición acuosa que comprende partículas en las que:

(i) cada una de dichas partículas comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y al menos una polialquilenimina, o una sal y/o solvato del mismo; en el que

(a) dicho polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] o ácido poliadenílico-poliuridílico [poli (A:U)], en el que al menos el 60 % de dicho poli(I:C) tiene al menos, 850 pares de bases, al menos el 70 % de dicho [poli (A:U)] tiene entre 400 y 5000 pares de bases y entre el 20 % y el 45 % de dicho poli(I:C) tiene entre 400 y 850 pares de bases; y

(b) dicha polialquilenimina es polietilenimina (PEI), en la que el peso molecular promedio en peso de dicha PEI está entre 17,5 y 22,6 kDa y el índice de polidispersidad es $<1,5$, y en el que la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena utilizado en la formación de dicha composición (es decir, la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena utilizado en la formación de dichas partículas) está entre 2,5 y 4,5;

(ii) al menos el 99 % de dichas partículas tiene un diámetro de menos de o igual a 500 nm, preferentemente, al menos el 95 % o el 90 % de dichas partículas tiene una distribución del diámetro monomodal inferior a 300 nm;

(iii) dichas partículas tienen un diámetro promedio z de entre 60 nm y 130 nm; y

(iv) dichas partículas tienen una mediana del diámetro (D50%) de entre 75 nm y 150 nm.

Las formulaciones BO-11X pueden, en una realización preferida de la presente invención, proporcionarse como composiciones que comprenden
 5 además un vehículo, excipiente, disolvente orgánico y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable [tal como glicerol, etanol, glucosa o manitol, preferentemente glucosa o manitol, más preferentemente en una concentración de entre 1 y 10 % (peso/volumen)] [es decir, en el que dicha composición se
 10 forma añadiendo adicionalmente glucosa o manitol en una concentración de entre 1 y 10 % (peso/volumen total de dicha composición)] que se adapta mejor a la forma final preferida (como líquida o liofilizada), usos, envío , almacenamiento, administración con otros compuestos y/o requisitos técnicos adicionales. En una realización más preferida, dicha composición comprende además al menos un compuesto seleccionado de entre un compuesto
 15 orgánico, un compuesto inorgánico, un ácido nucleico, un aptámero, un péptido o una proteína.

En un aspecto, la composición acuosa de la presente invención tiene un potencial zeta igual o superior a 30 mV, preferentemente entre 35 y 50 mV o entre 38 y 45 mV, aún más preferentemente entre 40 y 45 mV, de acuerdo con
 20 la norma ISO 13099.

En otra realización de la composición de la presente invención, dicha composición es una composición acuosa que tiene:

- (i) un pH de entre 2 y 3,4;
- (ii) una osmolaridad de entre 200 y 600 mOsm/kg;
- 25 (iii) una rotación óptica específica de entre +1500 y +3750 grados.ml.g⁻¹.dm⁻¹ a una longitud de onda de 589 nm a 20 °C cuando dicha composición acuosa comprende 5 % (peso/volumen) de D-glucosa en agua, en relación con agua; y/o

(iv) un potencial zeta mayor o igual a 30 mV (por ejemplo, comprendido entre 35 y 50 mV). En una realización todavía más preferida de la presente invención, dicha composición es una composición acuosa que tiene:

- (i) un pH de entre 2 y 3,4;
- 5 (ii) una osmolaridad de entre 200 y 600 mOsm/kg; y/o
- (iii) un potencial zeta mayor o igual a 30 mV (por ejemplo, comprendido entre 35 y 50 mV).

En una realización especialmente preferible, dicha composición es una composición acuosa que comprende glucosa o manitol que tiene:

- 10 (i) un pH de entre 2 y 4; y/o
- (ii) una osmolaridad de entre 200 y 600 mOsm/kg.

En una realización adicionalmente preferente de la presente invención, dicha composición es una composición acuosa que comprende glucosa, que tiene:

- 15 (i) un pH de entre 2,7 y 3,4;
- (ii) una osmolaridad de entre 200 y 340 mOsm/kg; y/o
- (iii) un potencial zeta comprendido entre 35 y 50 mV o entre 38 y 45 mV, aún más preferentemente entre 40 y 45 mV.

En una realización alternativa adicionalmente preferible, dicha
20 composición es una composición acuosa que comprende manitol que tiene:

- (i) un pH de entre 2,7 y 3,4;
- (ii) una osmolaridad de entre 200 y 600 mOsm/kg; y/o
- (iii) un potencial zeta comprendido entre 35 y 50 mV o entre 38 y 45 mV, aún más preferentemente entre 40 y 45 mV.

25 Para los fines de la presente invención, los valores de osmolaridad notificados en el presente documento son valores estrictamente de osmolalidad, pero dado que la densidad del agua (el disolvente en el que se preparan las composiciones acuosas de la presente invención) se aproxima a

1,00 g/ml a 20 °C estos términos se usan indistintamente. Para los fines de la presente invención, la temperatura ambiente se refiere a una temperatura entre 20 y 25 °C. En la presente invención, el potencial zeta se mide de acuerdo con la norma ISO 13099, preferentemente 13099-2: 2012.

5 La presente invención se refiere también a una composición, como se divulga en el presente documento, para su uso como un medicamento. Análogamente, la presente invención, por lo tanto, también se refiere al uso de la composición, como se describe en la presente memoria, para la fabricación de un medicamento. Este uso puede lograrse proporcionando la composición
10 como una composición líquida (acuosa) o liofilizada en la que las moléculas de poli(I:C) y las partículas que la comprenden están en una forma altamente estable y a una concentración elevada (por ejemplo, en la que dicha composición se forma haciendo un complejo que usa al menos 0,5 mg, 0,7 mg/ml, 0,9 mg/ml, hasta 2,0 mg de ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] o
15 ácido poliadenílico-poliuridílico [poli(A:U)] o más por ml del volumen total (es decir, final) de dicha composición.

Estas composiciones están particularmente adaptadas para la administración directa a las células cancerosas, por ejemplo, mediante inyección intratumoral o peritumoral en la piel o un órgano o tejido interno que
20 comprende tales tumores y células cancerosas. En una realización preferente de la presente invención, dicho medicamento es inyectable. En una realización más preferente de la presente invención, dicho medicamento es una composición acuosa inyectable, que comprende opcionalmente un vehículo, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Esta composición
25 acuosa inyectable puede proporcionarse como tal o después de diluir una preparación concentrada de moléculas de poli(I:C) o poli(A:U) (a una concentración respectiva de al menos 0,5 mg de poli(I:C) o poli(A:U)/ml del volumen total de la composición que se va a preparar, o más, según se

establece al preparar las partículas en términos del peso respectivo de las moléculas de poli(I:C) o poli(A:U) que se agregan a un volumen dado de solución) o una composición liofilizada para formar un volumen total de la composición de la invención. Esto significa que dicha composición se

5 proporciona en las concentraciones anteriores determinadas en términos del peso de poli(I:C) o poli(A:U) empleado para preparar el complejo por volumen de la composición acuosa total, pero puede concentrarse cuando sea apropiado, especialmente para el almacenamiento a largo plazo y/o la administración intratumoral. En particular, la formulación BO-11X con moléculas

10 de poli(I:C) de doble cadena a concentraciones tan altas (es decir, las obtenidas a partir de partículas que comprenden un complejo formado formando un complejo de al menos 0,5 mg hasta 0,7 mg, preferentemente 0,9 mg, más preferentemente 2,0 mg o más, de poli(I:C) con PEI lineal por ml de la composición acuosa total) es la más apropiada para administración y uso como

15 medicamento. La inyección intratumoral o peritumoral de dicha composición (dependiendo también de la accesibilidad real y/o el tamaño de la masa tumoral evaluados por el médico) en una o más ubicaciones pequeñas o restringidas en las que los tumores y las células cancerosas están presentes, puede proporcionar un efecto terapéutico más fuerte y/o más a tiempo.

20 Además, la presente invención se refiere, adicionalmente, a una composición, como se divulga en el presente documento, para su uso en el tratamiento de un trastorno del crecimiento celular caracterizado por un crecimiento anormal de células humanas o animales. Tal tratamiento puede implicar la administración combinada de la composición de la presente

25 invención con otro tratamiento terapéutico, tal como otro fármaco específico para el cáncer (siendo un anticuerpo dirigido a un antígeno de cáncer o una vacuna contra el cáncer, por ejemplo) o un tratamiento de referencia (tal como radioterapia o quimioterapia). La administración combinada puede proporcionar

no solo un efecto terapéutico aditivo sino también otros efectos valiosos, tales como reducir la dosificación del otro fármaco necesario para lograr un beneficio terapéutico similar, reducir efectos secundarios o proporcionar un efecto de mayor duración y/o sinérgico sobre los tumores y las células cancerosas. De

5 forma análoga, la presente invención, por lo tanto, también se refiere al uso de la composición, tal como se divulga en el presente documento, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno del crecimiento celular caracterizado por un crecimiento anormal de células humanas o animales. Para los fines de la presente invención, el crecimiento
10 anormal se caracteriza por una división y/o diferenciación celular no controlada.

En una realización más preferente, dicho trastorno de crecimiento celular es cáncer o un trastorno ginecológico caracterizado por un crecimiento anormal de células de los órganos reproductores de mamíferos hembra. El cáncer al que se hace referencia en la presente invención es, preferentemente, uno o
15 más de carcinoma de células basales; cáncer de vías biliares; cáncer de vejiga; cáncer de hueso; cáncer de cerebro y del sistema nervioso central; cáncer de mama; cáncer del peritoneo; coriocarcinoma; cáncer de tejido conectivo; cáncer del sistema digestivo (que incluye cáncer de esófago, estómago, colon, recto u otro cáncer gastrointestinal); cáncer de ojo; cáncer de la cabeza y cuello;
20 glioblastoma; carcinoma hepático; hepatoma; neoplasia intraepitelial; cáncer renal, suprarrenal o renal; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón); melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de la cavidad oral (por ejemplo, cáncer de
25 labio, laringe, lengua, boca o faringe); cáncer de páncreas; cáncer de próstata; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer del sistema respiratorio; carcinoma de glándula salival; cáncer de piel; cáncer de células escamosas; cáncer testicular; cáncer de tiroides; cáncer de útero, endometrial, cervical, vulvar,

ovárico u otro cáncer ginecológico; cáncer del sistema urinario; linfoma, incluyendo linfoma de células B, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin (LNH), incluyendo tipos específicos, tales como linfocítico de grado bajo/folicular, linfocítico pequeño, de grado intermedio/folicular, difuso de grado intermedio, 5 inmunoblástico de alto grado, linfoblástico de alto grado, células redondas no hendidas o NHL de enfermedad voluminosa); linfoma de células del manto y relacionado con el SIDA; leucemia linfocítica crónica; leucemia linfoblástica aguda; leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; así como otros carcinomas y sarcomas; trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), 10 así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis o edema (tales como los asociados con tumores cerebrales). Más preferentemente, dicho cáncer se selecciona de uno o más de cáncer de vejiga; cáncer de hueso; cáncer de cerebro y del sistema nervioso central; cáncer de mama; cáncer del sistema digestivo (incluyendo, cáncer de esófago, estómago, colon, recto u otro cáncer gastrointestinal); cáncer de cabeza y cuello; glioblastoma; 15 carcinoma hepático; hepatoma; cáncer renal, suprarrenal o renal; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer del sistema respiratorio; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; cáncer de útero, endometrial, 20 cervical, vulvar, ovárico u otro cáncer ginecológico; cáncer del sistema urinario; linfoma o leucemia. Aún más preferentemente, dicho cáncer se selecciona de uno o más de un carcinoma, glioma, melanoma o sarcoma, incluso más preferentemente melanoma, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de páncreas, o, como alternativa, melanoma o cáncer de 25 páncreas.

Los órganos reproductores de mamíferos hembra a los que se hace referencia en la presente invención son los órganos sexuales de mamíferos hembra localizados entre la vagina y las trompas de Falopio, ambos incluidos.

Dichos órganos reproductores de la presente invención son el útero, las trompas de Falopio (que comprenden la unión útero-tubárica), los ovarios, el cuello uterino y la vagina, preferentemente el útero, las trompas de Falopio y el cuello uterino, más preferentemente el útero de mamífero. Por lo tanto, el

5 trastorno ginecológico de la presente invención es una enfermedad que afecta al menos a una célula del tracto reproductor femenino de mamífero localizado entre la vagina y las trompas de Falopio, preferentemente el útero, las trompas de Falopio y el cuello uterino. En la presente invención, un trastorno ginecológico es, más preferentemente, una enfermedad que afecta al menos a

10 una célula en un tejido del útero de mamífero. En una realización más preferente, el trastorno ginecológico se selecciona entre endometriosis o leiomioma.

En la presente invención, el mamífero es, preferentemente, homínido, bovino, equino, canino, felino, ovino, porcino, camélido, caprino o cervino.

15 Además, preferentemente, dicho mamífero es un ser humano, perro, vaca, caballo o camello, incluso más preferentemente un ser humano o un perro, y de la forma más preferente un ser humano.

Por lo tanto, las formulaciones BO-11X pueden presentar una combinación de componentes y otras características fisicoquímicas que

20 proporcionan efectos de interés médico (tales como para tratar cánceres tales como melanoma o carcinomas) y que, preferentemente, se pueden obtener mediante la aplicación un proceso compatible con requisitos regulatorios e industriales, como los aplicables a la fabricación de medicamentos. En particular, las etapas de producción de BO-11X se llevan a cabo en estricto

25 cumplimiento con los requisitos de las buenas prácticas de fabricación vigentes en Europa (específicamente, el Anexo 13), EE.UU., Japón y/u otros países, y/o con los requisitos para la aprobación del Dossier de Medicamento en investigación (IMPD). Las formulaciones BO-11X deben superar las pruebas de

esterilidad, pureza, estabilidad y bioseguridad (ausencia o sustancialmente libre de endotoxinas, virus, bacterias, productos químicos, metales u otros contaminantes que sean incompatibles con el uso en seres humanos). Por ejemplo, el nivel de endotoxinas no debe ser mayor de 1,0 UE/mg o 1 µg/ml, utilizando kits de detección oficialmente aprobados.

Tales componentes y características que caracterizan adicionalmente las formulaciones BO-11X (como la composición o las partículas comprendidas en el presente documento), pueden ser uno o más de los siguientes:

(i) Una composición que comprende un vehículo, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, con o sin otro compuesto orgánico adicional (tal como disolvente), compuesto inorgánico, ácido nucleico, aptámero, péptido o proteína que tiene interés médico que está comprendido en las partículas mismas (por ejemplo, durante su fabricación) o más tarde añadido a la composición que comprende estas partículas;

(ii) Partículas formadas por una polialquilenimina (tal como PEI lineal), en particular que tiene un peso molecular promedio en peso entre 17 y 23 kDa, más preferentemente entre 17,5 y 22,6 kDa;

(iii) Una composición que comprende partículas formadas formando un complejo usando polirribonucleótidos de doble cadena a una concentración de al menos 0,5 mg/ml del volumen total (es decir, final) de dicha composición (por ejemplo, de 0,5 mg/ml a 0,7 mg/ml, 0,9 mg/ml, 2 mg/ml o más);

(iv) Partículas que comprenden una polialquilenimina y polirribonucleótidos de doble cadena que se forman en una relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena (es decir, la relación entre el número de moles de nitrógeno de dicha polialquilenimina y el número de moles de fósforo de dicho polirribonucleótido de doble cadena usado en la formación de dichas partículas) es igual o mayor que 2,5, más preferentemente

entre 2,5 y 5,5, aún más preferentemente entre 2,5 y 4,5, aún más preferentemente entre 2,5 y 3,5;

(v) Partículas que tienen una distribución del diámetro monomodal con un diámetro promedio Z, como se define en el presente documento y medido según la norma ISO 22412, preferentemente por debajo de 200 nm, más preferentemente por debajo de 150 nm e incluso más preferentemente en intervalos comprendidos entre 150 nm y 30 nm (tal como entre 150 nm y 50 nm, entre 150 nm y 75 nm, entre 100 nm y 50 nm, entre 150 nm y 100 nm, o entre 60 nm y 130 nm);

(vi) Partículas que tienen una distribución del diámetro monomodal, determinada a partir de la distribución de diámetros según la norma ISO 22412, que está representada por valores D de D50% (el diámetro máximo de partícula por debajo del cual cae el 50 % de la intensidad de la muestra, también conocido como la mediana del diámetro) entre 75 y 150 nm y D90 % (el diámetro máximo de partícula por debajo del cual cae el 90 % de la intensidad de la muestra) entre 140 y 250 nm;

(vii) Al menos el 95 % de las partículas tienen un diámetro de 600 nm, preferentemente un diámetro de 500 nm, más preferentemente un diámetro de 400 nm e incluso más preferentemente un diámetro de 300 nm. Aún más preferentemente, al menos el 90 % de dichas partículas tiene una distribución de diámetro monomodal por debajo de 300 nm;

(viii) Una composición que presenta una osmolaridad comprendida entre 200 y 600 mOsm/kg, preferentemente una composición acuosa que comprende 5 % (peso/volumen) de glucosa que presenta una osmolaridad comprendida entre 200 y 400 mOsm/kg, más preferentemente entre 260 y 340 mOsm/kg;

(ix) Una composición que presenta un pH comprendido entre 2,7 y 3,4;

(x) Una composición acuosa que comprende un 5 % (peso/volumen) de D-glucosa que presenta una rotación óptica específica de entre +1500 y +3750

grados.ml.g⁻¹.dm⁻¹ a una longitud de onda de 589 nm a 20 °C a una longitud de onda de 589 nm a 20 °C en agua, en referencia con el agua; y/o

(xi) Una composición que presenta un potencial zeta igual o superior a 30 mV, tal como 38 mV, preferentemente comprendido entre 35 y 50 mV, o, más
5 preferentemente, comprendido entre aproximadamente 40 y 45 mV (por ejemplo, 43 mV), como se define en el presente documento y medido de acuerdo con la norma ISO 13099.

En una realización preferente, la presente invención puede referirse a composiciones, en particular para uso farmacéutico, que comprenden
10 partículas en las que dichas partículas comprenden complejos de polinucleótidos de doble cadena con un homopolímero o heteropolímero policatiónico soluble en agua en el que dichas partículas se caracterizan por una distribución del diámetro monomodal que se define por tener un diámetro inferior o igual a 600 nm, preferentemente inferior o igual a 300 nm y un
15 diámetro promedio $\bar{z}$ inferior o igual a 200 nm, preferentemente inferior o igual a 150 nm.

En otra realización preferente, los polirribonucleótidos de doble cadena son moléculas de poli(I:C) que están presentes en las formulaciones de BO-11X son el resultado de la hibridación de las moléculas de ácido polinosínico
20 [poli(I)] y ácido policitidílico [poli(C)] de cadena sencilla que tienen intervalos específicos de porcentajes para tamaños por debajo de 0,4 kb, entre 0,4 Kb y 0,85 Kb, entre 0,85 Kb y 5,0 Kb, y por encima de 5,0 Kb, como se indica en los Ejemplos, que también proporciona medios para generar una solución acuosa de moléculas de poli(I:C) (que ya contiene o no un excipiente, tal como glucosa
25 o manitol) y tiene características apropiadas para mezclarse con una solución acuosa de una polialquilenimina (tal como polietilenimina) para producir las formulaciones de BO-11X. La formulación que contiene poli(I:C) resultante de mezclar estas dos soluciones acuosas se mantiene como una preparación

discontinua (preferentemente aún como una solución acuosa o en forma liofilizada) o se puede preparar directamente en alícuotas, cada una contenida en viales de un solo uso, jeringas u otro recipiente apropiado para el almacenamiento, un solo uso de tales alícuotas y/o liofilización. Las
5 formulaciones BO-11X (en forma líquida o liofilizada) se pueden almacenar a temperatura ambiente o a una temperatura inferior a 0 °C o inferior a -20 °C.

En dicha realización preferente, otros compuestos (tales como uno o más anticuerpos, hormona, péptido, excipiente, vehículo, inhibidor de una actividad enzimática, agente quimioterapéutico, antibiótico, agente estabilizante, agente
10 marcador, disolvente orgánico, conservantes, vehículos u otro fármaco) pueden añadirse en cada una de las dos soluciones acuosas (si no altera la formación correcta de las partículas o cualquier otra de las características enumeradas anteriormente para las formulaciones BO-11X) antes de su mezcla o después de producir dicha formulación de BO-11X mezclando las dos soluciones
15 acuosas (de polirribonucleótido de doble cadena polialquilenimina). Dichos componentes adicionales que se administran, en consecuencia, al mismo tiempo con componentes de BO-11X pueden proporcionar una composición con mejoras en la biodisponibilidad, eficacia, perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos, estabilidad, metabolización u otras
20 propiedades de interés farmacéutico que no se observan cuando cada una de las formulaciones iniciales de BO-11X o el componente adicional (otro compuesto de interés farmacéutico, por ejemplo) se administran solas, o cada una de las formulaciones iniciales de BO-11X o el componente adicional se administran por separado.

25 En una realización principal preferente adicional, la formulación de BO-11X es para su uso como un medicamento, tal como una composición farmacéutica que se formula (por ejemplo, como una composición acuosa inyectable, que comprende opcionalmente un vehículo, excipiente y/o

adyuvante farmacéuticamente aceptable) y se administra para la administración de polirribonucleótidos de doble cadena a un órgano o tejido en un estado saludable, presentando una enfermedad relacionada con un agente patógeno exógeno (tal como una bacteria o un virus) o presentando una alteración

5 debida a un trastorno de crecimiento celular caracterizado por un crecimiento anormal de células humanas o animales, por ejemplo, debido a cáncer (es decir, que implica transformación tumorigénica, metástasis, compuesto tóxico), o un trastorno ginecológico caracterizado por crecimiento anormal de células de los órganos reproductores femeninos de mamíferos). Por lo tanto, en una

10 realización preferente, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar la composición de la presente invención a un ser humano o animal. En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno de crecimiento celular caracterizado por el crecimiento anormal de

15 células humanas o animales, como se define en el presente documento, que comprende administrar la composición de la presente invención a un ser humano o animal.

Preferentemente, la formulación BO-11X se usa en métodos para inducir (directa o indirectamente) la muerte de la célula tumoral o suprimir el

20 crecimiento de la célula tumoral, en el ámbito del tratamiento, reducción, mejora o prevención del crecimiento del cáncer, supervivencia, metástasis, transición epitelio-mesenquimatoso, escape inmunitario o recurrencia. Más preferentemente, las formulaciones BO-11X se usan en métodos para tratar tumores sólidos, tales como carcinomas, gliomas, melanomas o sarcomas. En

25 particular, la formulación BO-11X se administra por vía sistémica o más directamente dentro o en un lugar cercano al tumor, tal como en el margen de la masa tumoral, en las células epiteliales circundantes, los vasos linfáticos o sanguíneos (por ejemplo, inyección intratumoral o peritumoral) o las células

que crecen anormalmente de los órganos reproductores femeninos de mamíferos.

En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X es la que se produce según los métodos de fabricación y, luego, se define estructural y funcionalmente, como se describe en los Ejemplos como formulaciones de BO-111 o BO-112. La formulación de BO-11X puede mostrar adicionalmente las actividades biológicas que se caracterizaron por BO-110 como se describe en el documento WO2011003883, concretamente la activación de una helicasa familiar MDA-5 o el nivel de expresión de NOXA, en combinación con la inducción de autofagia en células cancerosas o en una línea celular derivada de células cancerosas, preferentemente de origen humano, aunque en un grado mejorado. Ejemplos de líneas celulares para validar formulaciones de BO-11X son células SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103 y SK-Mel-147 humanas y las células B16 murinas, dichas líneas celulares de melanoma que se presentan una expresión aumentada de moléculas, tales como interferón Beta cuando se exponen a una formulación BO-11X. Además, la formulación BO-11X no presenta toxicidad contra las células normales que se usan como controles, tales como los melanocitos u otras células de la piel, así como las células del sistema inmunológico, que generalmente representan sitios de toxicidad secundaria en el tratamiento del cáncer. La formulación BO-11X también puede, después de la autofagia y la apoptosis de las células cancerosas (o cualquier otro efecto de interés terapéutico que esta formulación pueda inducir en tales células), inducen la liberación de antígenos de células cancerosas que pueden actuar como inductores de una respuesta inmunológica específica de tumor, en particular cuando se administra la formulación BO-11X localmente a células cancerosas o tumores (por ejemplo, mediante inyección peritumoral o intratumoral, administrando BO-11X al margen de la masa tumoral, en células epiteliales circundantes, vasos linfáticos

o vasos sanguíneos, o directamente dentro de la masa tumoral), con o sin la administración simultánea o administración secuencial de otro fármaco u otro tratamiento para la misma indicación.

La presente invención también se refiere a un proceso para la fabricación de la composición, como se divulga en el presente documento, que comprende:

(i) preparar una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y una solución acuosa de al menos una polialquilenimina, o una sal o solvato del mismo, en el que una o ambas soluciones opcionalmente comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable, disolvente orgánico, excipiente y/o adyuvante;

(ii) filtrar de forma independiente cada solución a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 500 nm para formar soluciones esterilizadas;

(iii) mezclar las soluciones esterilizadas resultantes en una cámara de mezclado para formar una composición acuosa mediante la adición de una de dichas soluciones a la otra solución en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad mayor o igual a 1 ml/min, o mediante la adición simultánea de cada una de dichas soluciones en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad mayor o igual a 1 ml/min; y, opcionalmente,

(iv) filtrar la composición acuosa resultante a través de un filtro que tiene un diámetro de poro menor o igual a 600 nm para formar un filtrado o centrifugar la composición acuosa resultante a una cantidad mayor o igual a 22480 m/s² para formar un sobrenadante; y/o

(v) liofilizar la composición acuosa, filtrado o sobrenadante resultante.

Por tanto, en una realización preferente, la presente invención puede hacer referencia a un proceso para la fabricación de la composición, como se

divulga en el presente documento, que comprende:

(i) preparar una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y una solución acuosa de al menos una polialquilenimina, o una sal o solvato del mismo, en el que una o
5 ambas soluciones opcionalmente comprenden además un vehículo farmacéuticamente vehículo aceptable, disolvente orgánico, excipiente y/o adyuvante;

(ii) filtrar de forma independiente cada solución a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 500 nm para formar
10 soluciones esterilizadas; y

(iii) mezclar las soluciones esterilizadas resultantes en una cámara de mezclado para formar una composición acuosa mediante la adición de una de dichas soluciones a la otra solución en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad mayor o igual a 1 ml/min, o
15 mediante la adición simultánea de cada una de dichas soluciones en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad mayor o igual a 1 ml/min; y,

(iv) liofilizar opcionalmente la composición acuosa resultante.

Además, en otra realización preferente, la presente invención puede
20 hacer referencia a un proceso para la fabricación de la composición, como se divulga en el presente documento, que comprende:

(i) preparar una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y una solución acuosa de al menos una polialquilenimina, o una sal o solvato del mismo, en el que una o
25 ambas soluciones opcionalmente comprenden además un vehículo farmacéuticamente vehículo aceptable, disolvente orgánico, excipiente y/o adyuvante;

(ii) filtrar de forma independiente cada solución a través de un filtro que

tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 500 nm para formar soluciones esterilizadas;

(iii) mezclar las soluciones esterilizadas resultantes en una cámara de mezclado para formar una composición acuosa mediante la adición de una de dichas soluciones a la otra solución en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad mayor o igual a 1 ml/min, o mediante la adición simultánea de cada una de dichas soluciones en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad mayor o igual a 1 ml/min; y,

(iv) filtrar la composición acuosa resultante a través de un filtro que tiene un diámetro de poro menor o igual a 600 nm para formar un filtrado o centrifugar la composición acuosa resultante a una cantidad mayor o igual a 22480 m/s² para formar un sobrenadante; y

(v) opcionalmente liofilizar el filtrado o sobrenadante resultante.

Más preferentemente, el procedimiento de la presente invención no comprende una etapa final de liofilización. En el proceso de la presente invención, dicho polirribonucleótido de doble cadena, dicha polialquilenimina y dicho vehículo farmacéuticamente aceptable, disolvente orgánico, excipiente y/o adyuvante son como se describen en el presente documento. La esterilización de cada solución para formar soluciones esterilizadas se lleva a cabo mediante el filtrado de manera independiente de dichas soluciones a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 500 nm, preferentemente filtrando independientemente dichas soluciones a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 300 nm, más preferentemente filtrando dicha soluciones a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 200 nm. Preferentemente, la mezcla de los filtrados resultantes se lleva a cabo a través del transporte convectivo a gran escala de contracorriente y, posteriormente, a través de la eliminación de

las diferencias de concentración a través de transporte puramente difusivo. La cámara de mezcla puede ser cualquier cámara o recipiente en el que comienza la mezcla de dichas soluciones, tal como un frasco, reactor o mezclador. Más preferentemente, dicha cámara de mezclado tiene un volumen fijo de entre 0,1 y 20 ml, además, preferentemente, entre 0,2 y 10 ml, mucho más preferentemente entre 0,5 y 8 ml. Más preferentemente, la mezcla se lleva a cabo mediante la adición, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad de entre 1 ml/min y 2000 ml/min, aún más preferentemente entre 10 y 1000 ml/min, además, preferentemente, a entre 20 y 500 ml/min. El filtrado opcional de la composición acuosa resultante para formar o recoger un filtrado puede llevarse a cabo posteriormente a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 600 nm, preferentemente no superior al diámetro de 500 nm, más preferentemente no superior al diámetro del 400 nm, aún más preferentemente no superior al diámetro de 300 nm. Como alternativa, la centrifugación opcional de la composición acuosa resultante para formar o recoger un sobrenadante puede realizarse, posteriormente, a más de 22480 m/s² (5000 rpm en un rotor que tiene un radio de 0,082 m), preferentemente a más de 27 202 m/s² (5500 rpm en un rotor que tiene un radio de 0,082 m), más preferentemente a más de 32372 m/s² (6000 rpm en un rotor que tiene un radio de 0,082 m), todavía más preferentemente de 44.062 m/s² (7000 rpm en un rotor que tiene un radio de 0,082 m). En una realización especialmente preferente, la etapa (iv) es obligatoria cuando la composición de la presente invención no se consigue mediante las etapas (i) a (iii) del procedimiento de la presente invención, a saber, cuando la adición se lleva a cabo a una velocidad tal que menos del 95 % de las partículas comprendidas en dicha composición acuosa tiene un diámetro de menos de o igual a 600 nm; y/o dichas partículas tienen un diámetro promedio $\geq$ mayor que 200 nm, más preferentemente cuando dichas partículas no tienen una distribución del diámetro monomodal.

Este puede ser el caso cuando la adición se lleva a cabo a una velocidad de entre 1 ml/min y 20 ml/min, en particular en una cámara de reacción de entre 0,5 y 20 ml. Finalmente, la composición acuosa, filtrado o sobrenadante resultante se pueden someter a liofilización para producir la composición de la presente invención como un sólido en partículas.

Por lo tanto, en una realización mucho más especialmente preferente del procedimiento de la presente invención, dicho procedimiento comprende

(i) preparar una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y una solución acuosa de al menos una polialquilenimina, o una sal o solvato del mismo, en el que una o ambas soluciones opcionalmente comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable, disolvente orgánico, excipiente y/o adyuvante;

(ii) filtrar de forma independiente cada solución a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 200 nm para formar soluciones esterilizadas;

(iii) mezclar las soluciones esterilizadas resultantes en una cámara de mezclado para formar una composición acuosa mediante la adición de una de dichas soluciones en la otra solución en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad de entre 20 ml/min y 100 ml/min, o mediante la adición simultánea de cada una de dichas soluciones en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad de entre 20 ml/min y 100 ml/min, en el que dicha cámara de mezclado tiene un volumen de entre 0,2 y 10 ml;

(iv) filtrar la composición acuosa resultante a través de un filtro que tiene un diámetro de poro menor o igual a 500 nm para formar un filtrado o centrifugar la composición acuosa resultante a una cantidad mayor o igual a 32.372 m/s² (6000 rpm en un rotor que tiene un radio de 0,082 m) para formar

un sobrenadante; y

(v) opcionalmente liofilizar el filtrado o sobrenadante resultante.

En otra realización aún mucho más especialmente preferente del procedimiento de la presente invención, dicho procedimiento comprende

5 (i) preparar una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y una solución acuosa de al menos una polialquilenimina, o una sal o solvato del mismo, en el que una o ambas soluciones opcionalmente comprenden además un vehículo farmacéuticamente vehículo aceptable, disolvente orgánico, excipiente y/o
10 adyuvante;

(ii) filtrar de forma independiente cada solución a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 200 nm para formar soluciones esterilizadas;

(iii) mezclar las soluciones esterilizadas resultantes en una cámara de
15 mezclado para formar una composición acuosa mediante la adición de una de dichas soluciones en la otra solución en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad de entre 30 ml/min y 100 ml/min, o mediante la adición simultánea de cada una de dichas soluciones en dicha cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad
20 de entre 30 ml/min y 100 ml/min, en el que dicha cámara de mezclado tiene un volumen de entre 0,5 y 8 ml; y

(vi) liofilizar opcionalmente la composición acuosa resultante.

En una realización adicional, la formulación BO-11X se produce según un proceso de fabricación que implica la mezcla de dos soluciones acuosas, una
25 primera que comprende los polirribonucleótidos de doble cadena (o una sal o solvato del mismo) y un segundo que comprende la polialquilenimina (o una sal o solvato del mismo) de modo que las partículas resultantes presentan las características definidas anteriormente, en particular con respecto al diámetro y

la distribución del diámetro monomodal, así la aparición como una solución coloidal esencialmente clara.

Como se describe con más detalles en los ejemplos, las formulaciones BO-11X se pueden proporcionar mediante la filtración y/o centrifugación de la composición farmacéutica que comprende partículas formadas por polirribonucleótidos de doble cadena y homopolímero o heteropolímero policatiónico, de modo que las formulaciones BO-11X se proporcionan como composiciones líquidas voluminosas o de un solo uso sin agregados visibles. Tal proceso para la fabricación de la composición comprende:

- 10 (i) preparar una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y una solución acuosa de al menos una polialquilenimina, o una sal o solvato del mismo, opcionalmente junto con un vehículo, disolvente orgánico, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable presente en cualquier solución;
- 15 (ii) mezclar dichas soluciones; y
- (iii) filtrar la mezcla resultante a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 600 nm o centrifugar a más de 22480 m/s².

Este proceso puede adaptarse adicionalmente para los componentes reales de la composición (polirribonucleótidos de doble cadena, la polialquilenimina, y los componentes adicionales opcionales), así como los métodos deseados de uso, almacenamiento, envío, embalaje, y/o administración de la composición, en particular si la composición requiere fabricarse inmediatamente antes del uso o, como es más habitual para composiciones farmacéuticas, fabricarse para el almacenamiento a largo plazo y/o en forma de múltiples recipientes cada uno para un solo uso (por ejemplo, en viales o jeringas estériles) y que contiene partículas que tienen el tamaño más uniforme, contenido de poli(I:C), estabilidad, solubilidad, y, finalmente, efectos biológicos cuando se administra.

En esta situación, las etapas de mezclado y filtrado (ii) y (iii) anteriores pueden adaptarse a nivel del orden de filtrado y/o mezclado, método de mezclado, la velocidad de mezclado y/o la cantidad de soluciones que se mezcla. En una realización preferente adicional, el procedimiento para la

5 fabricación de formulaciones de BO-11X comprende:

(i) preparar una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o solvato del mismo, y una solución acuosa de al menos una polialquilenimina, o una sal o solvato del mismo, opcionalmente junto con un vehículo, disolvente orgánico, excipiente y/o adyuvante

10 farmacéuticamente aceptable presente en cualquier solución;

(ii) esterilizar cada solución mediante su filtrado independientemente;

(iii) mezclar dichas soluciones en el recipiente para almacenar, liofilizar y/o usar la composición mediante la adición de cualquiera de las soluciones primero y, después, añadir la otra solución a una velocidad de inyección

15 superior a 50 rpm a una velocidad de flujo entre 1 ml/min y 50 ml/min; y

(iv) sellar el recipiente.

Combinaciones

Una composición de acuerdo con la presente invención se puede usar en combinaciones que incluyen otros compuestos o tratamientos con los que se

20 sabe que es compatible, si no proporciona un efecto aditivo o incluso sinérgico. Por ejemplo, las moléculas de poli(I:C) se pueden utilizar en combinación con diferentes fármacos contra el cáncer, anticuerpos, radioterapia o quimioterapia (Le U et al., 2008; Le U et al., 2009; Taura M et al., 2010; Matijevic T et al., 2011 ; Levitzki A, 2012; Yoshino H y Kashiwakura I, 2013; Hafner A et al., 2013) o

25 diferente longitud de moléculas de poli(I:C) (Zhou Y et al., 2013). También se han utilizado moléculas de poli(I:C) como un adyuvante o agente de acción sinérgica cuando se combina con otros agentes, tal como en la vacunación con antígenos de cáncer o lisados celulares (Ammi R et al., 2015), agentes

bloqueantes de la vía PD-1/PD-L1 (Nagato T y Celis E, 2014), otros agonistas de TLR, tales como el agonista de TLR9 CpG ODN (Zhang Y et al., 2014), dicloroacetato (Ohashi T et al., 2013), IL27 (Chiba Y et al., 2013), inhibidores de cinasa, tales como sorafenib (Ho V et al., 2015), proteínas proapoptóticas, tales como NS1 (Gupta S et al. 2016), ácido zoledrónico (Chen L et al., 2013), o ácido todo-trans retinoico (Szabo A et al., 2012). Otros usos de las formulaciones de BO-11X pueden hacerse evidentes a la vista de las actividades de las moléculas de poli(I:C) hacia tipos de células específicos recientemente demostrados, al menos utilizando ensayos *in vitro*, tales como en preadipocitos, inhibiendo la diferenciación y la diferenciación en adipocitos (Yu L et al., 2016), células madre mesenquimatosas, que potencian los efectos inmunosupresores (Cho K. et al., 2016; Vega-Letter A et al., 2016) o activación de células NK (Perrot I et al. , 2010).

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una formulación de BO-11X y una cantidad eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores, en particular agentes dirigidos a moléculas del punto de control inmunitario (tales como PD-1 , PD-L1 , PD-L2, CTLA-4, CD134, CD134L, CD137, CD137L, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, B7RP1 , LAG3, ICOS, TIM3, GAL9, CD28, AP2M1, SHP-2, PPP2R5A o OX-40), dichos compuestos denominados habitualmente inhibidores del punto de control (CPI).

Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones y métodos que son útiles en terapias y regímenes de combinación que comprenden la administración de formulaciones de BO-11X y otro agente terapéutico o tratamiento (incluyendo radioterapia, quimioterapia, crioterapia, ablación tumoral o terapia fotodinámica). En particular, la presente invención se refiere a un método para tratar, mejorar o prevenir el crecimiento del cáncer, la metástasis, la ulceración, el escape inmunológico o la recurrencia en un sujeto,

que comprende administrar una formulación de BO-11X y uno o más fármacos anticancerosos, preferentemente un agente inmunomodulador, en el que la administración es simultánea (como formulaciones separadas o en el contexto de una coformulación) o secuencial (en cualquier orden o en ciclos de administración consecutivos). En algunos aspectos, la presente invención se refiere a un método para tratar el cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de agente de formulación de BO-11X y una cantidad eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores a un sujeto que lo necesite, en particular en el que el sujeto está recibiendo terapia contra el cáncer con uno o más agentes inmunomoduladores.

En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es, preferentemente, un anticuerpo que incluye un anticuerpo monoclonal y otros formatos de anticuerpos, o cualquier otro agente disponible farmacéuticamente que se une a una proteína de la superficie celular que controla la respuesta inmune, de modo que actúa como un CPI. Este CPI puede bloquear, reducir y/o inhibir PD-1 y PD-L1 o PD-L2 y/o la unión de PD-1 con PD-L1 o PD-L2. Como alternativa, este CPI puede bloquear, reducir y/o inhibir, reduce y/o inhibe la actividad de otras moléculas del punto de control inmunitario, tal como CTLA-4, AP2M1, CD80, CD86, SHP-2, y/o PPP2R5A. Como una alternativa adicional, el CPI aumenta y/o estimula CD137 (4-1 BB) y/o la unión de CD137 (4-1 BB) con uno o más de los ligandos 4-1 de BB y TRAF2.

En diversas realizaciones, los métodos que implican terapias y regímenes de combinación para el tratamiento de cáncer, que comprenden la administración de formulaciones de BO-11X pueden definirse adicionalmente con respecto a un método de administración específico, en el que la formulación de BO-11X se administra por una ruta diferente a la del otro compuesto terapéutico, tal como agentes inmunomoduladores, y, preferentemente, un CPI. Este método puede implicar la administración de la

formulación de BO-11X mediante inyección intratumoral o peritumoral (dentro del tumor, en el margen de la masa tumoral, en las células epiteliales circundantes, los vasos linfáticos o sanguíneos) u otros medios que permiten la administración de la formulación de BO-11X directamente dentro de las células cancerosas u órgano que comprende las células cancerosas o en la proximidad de los mismos (y no indirectamente, por ejemplo, a través de la corriente sanguínea) y la administración sistémica de CPI u otro agente inmunoestimulador). La formulación de BO-11X mediante inyección intratumoral o peritumoral puede realizarse a nivel de la piel, es decir, en la piel (por ejemplo, para tratar el melanoma o en combinación con la combinación con una vacuna) o de un órgano o tejido interno, es decir, en dicho órgano o tejido interno (por ejemplo, mediante inyección intrahepática para tratar el cáncer de hígado o administración intravesicular para el cáncer de vejiga). Dicha administración local de la formulación de BO-11X preferentemente sigue o (preferentemente) es seguida por la administración del agente inmunoestimulador.

Efectos y usos adicionales

En una realización adicional, la presente invención proporciona usos y métodos farmacéuticos que implican la administración de una formulación de BO-11X para aumentar la respuesta inmunitaria contra un patógeno o agente biológico indeseable y, en particular, para mejorar una respuesta inmunitaria antitumoral, actuando potencialmente como agente inmunomodulador. Tal efecto puede controlarse midiendo la respuesta inmunitaria relacionada con el tumor en el sitio del tumor y el microambiente tumoral (o en el torrente sanguíneo, otros fluidos biológicos y tejidos) a nivel de tipos de células o subpoblaciones relevantes (por ejemplo, células dendríticas, células T reguladoras, células T y/o células NK) y/o biomarcadores inmunológicos (por ejemplo, quimiocinas, factores de crecimiento, citocinas y sus receptores).

Composiciones farmacéuticas

También se proporcionan métodos para preparar una composición farmacéutica de BO-111 o BO-112 (y/u otras formulaciones de BO-11X) mezclando una formulación de BO-11X y uno o más adyuvantes, diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichos componentes pueden adaptarse para la indicación médica específica (por ejemplo, un cáncer sólido o un cáncer hematológico) y/o los medios de administración, por ejemplo mediante inyección (inyección peritumoral, intratumoral, intrahepática, intrapancreática o subcutánea), por inhalación o por vía oral. Los tratamientos de combinación basados en la formulación de BO-11X pueden implicar las mismas o diferentes rutas de administración para la formulación de BO-11X y el otro compuesto. En particular, la formulación de BO-11X puede administrarse, como para otros agentes inmunoestimulantes de ARN, mediante inyecciones intratumorales o peritumorales que pueden activar el sistema inmunológico antes de la administración sistémica de un anticuerpo terapéutico que actúa como CPI, tal como los inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 (Bald T et al., 2014) o células T activadas (Amos SM et al., 2011). Como alternativa, la formulación de BO-11X junto con otros compuestos terapéuticos que son agonistas o ligandos de TLR, tales como moléculas de CpG o Resiquimod para potenciar el efecto de la vacunación contra el cáncer (Sajadian A et al., 2014) o células dendríticas (Fujimura T et al., 2006).

Agentes inmunomoduladores

La formulación de BO-11X puede combinarse con uno o más agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es una molécula coestimuladora o coinhibidora (por ejemplo, de una o más células inmunes, tales como, a modo de no limitación, células T y células NK). En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente que modula una célula T CD4 y/o CD8, por ejemplo actuando como agonista o antagonista

con respecto a CD3, CD4, CD8, PD-1 , PD-L1 , PD-L2, CTLA-4, CD137, CD96, CD73,

CD90, CD47, CD69, CD26, TIM3 y LAG 3. En otras realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente que modula las células NK, por ejemplo actuando como agonista o antagonista con respecto a CD3, NKp46, CD16, NKG2D, NKp44 y NKp30. En otras realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente que modula los biomarcadores de estroma y endotelio tumoral, por ejemplo, actuando como agonista o antagonista con respecto a CD45, PD-L1, PD-L2, PTEN y CD31.

El agente inmunomodulador se proporciona como un compuesto adicional en forma de un compuesto químico orgánico o inorgánico, un ácido nucleico, un aptámero, un péptido, una proteína, y, más particularmente, un anticuerpo que se une al objetivo relevante en los fluidos biológicos o en superficie celular. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal; intacto o truncado (por ejemplo, F(ab')₂, Fab, Fv); biespecífico o multiespecífico; formas xenogénicas, alogénicas, singénicas o modificadas de los mismos (por ejemplo, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado). Cuando el agente inmunomodulador es un anticuerpo monoclonal, puede ser un anticuerpo monoclonal derivado de mamífero no humano, un anticuerpo monoclonal quimérico recombinante, un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante o un anticuerpo monoclonal humano.

El anticuerpo que actúa como agente inmunomodulador puede comprender además los elementos estructurales normalmente requeridos para ejercer la actividad biológica requerida, tales como cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro que son capaces de unirse a uno o más antígenos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos) y presentar una región Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgA, IgG, IgE,

IgD o IgM) que puede interaccionar con los receptores Fc y activar una respuesta inmunitaria, lo que conduce a la depleción y/o muerte celular de las células inmunitarias u otras células. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas que se denominan regiones estructurales (FR). Cada región variable (VH o VL) contiene 3 CDR, denominadas CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región variable también contiene 4 subregiones marco, denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4. El término anticuerpo incluye todos los tipos de anticuerpos, incluidos, por ejemplo, IgA, IgG, IgD, IgE e IgM, y sus respectivas subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 y IgG-4; IgA-1 y IgA-2. Un anticuerpo, en algunas realizaciones, también se refiere a fragmentos de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno.

Los anticuerpos adecuados para practicar los métodos descritos en el presente documento pueden ser de diversos formatos de anticuerpos, por ejemplo, monoclonales, policlonales, biespecíficos, multiespecíficos, y pueden incluir, pero sin limitaciones, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, que comprenden anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab , Fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, y/o fragmentos de unión de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos también se refieren a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen al

menos dos antígenos o sitios de unión diana contra al menos dos dianas descritas en el presente documento. Las moléculas de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden ser de cualquier tipo (IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgG_Y), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Además, los anticuerpos (por ejemplo, monoespecíficos, biespecíficos y/o multiespecíficos) adecuados para poner en práctica la invención descrita en el presente documento se pueden proporcionar en cualquiera de los formatos alternativos que se describen en la bibliografía, por ejemplo diacuerpos; flexicuerpos; anticuerpos de camélido, inmunocuerpos; triomabs, pepbodies, vaccibodies, minicuerpos, Fcab, UniBodies o DuoBodies (Storz U 2011)

PD-1 (también conocido como CD279 o proteína 1 de la muerte celular programada) es un miembro de la familia de receptores B7. En algunas realizaciones, PD-1 se refiere a la secuencia de PD-1 humana (véase, por ejemplo, la secuencia de referencia de NCBI: NP_005009) y cualquier alelo natural, variante de corte y empalme y formas procesadas de los mismos (Keir M et al., 2008; UniProt: Q151 16). PD-1 se une a PD-L1 (también conocido como CD274 o B7-H1) y PD-L2 (también conocido como CD273 o B7-DC), que también son miembros de la familia B7. En algunas realizaciones, PD-L1 se refiere a PD-L1 humana (véase, por ejemplo, GenBank: AF233516), PD-L2 se refiere a PD-L2 humana (por ejemplo, secuencia de referencia de NCBI: NM_025239), junto con cualquier alelo de origen natural, variante de corte y empalme y formas procesadas de los mismos. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador está dirigido a uno o más de PD-1, PD-L1 y PD-L2. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es el inhibidor de PD-1. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo específico para uno o más de PD-1, PD-L1 y PD-L2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como, sin

limitaciones, nivolumab, (ONO-4538/BMS-936558, MDX1 106, OPDIVO), pembrolizumab (KEYTRUDA), pidilizumab (CT-011), MK-3475, BMS 936559, MPDL3280A.

En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más de BMS-936559 y MEDI4736 para el tratamiento de, por ejemplo, tumores sólidos avanzados. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más MPDL3280A (opcionalmente con vemurafenib) y MEDI4736 (opcionalmente con uno o más de dabrafenib y trametinib) para el tratamiento del melanoma. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más MPDL3280A (opcionalmente con erlotinib) y MEDI4736 (opcionalmente con tremelimumab) para el tratamiento del NSCLC. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más MPDL3280A (opcionalmente con uno o más de bevacizumab y sunitinib) para el tratamiento de RCC. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con MPDL3280A para el tratamiento de neoplasias malignas sólidas o hematológicas. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más MPDL3280A (opcionalmente con uno o más de bevacizumab, quimioterapia y cobimetinib); MEDI4736 (opcionalmente con tremelimumab) y MSB0010718C para el tratamiento de tumores sólidos. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con AMP-224 para el tratamiento de cáncer avanzado. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con nivolumab (opcionalmente con iliolumbar (anti-KIR)) para el tratamiento de tumores sólidos avanzados. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con nivolumab para el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración, melanoma, NSCLC y RCC. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con pembrolizumab para el tratamiento de cáncer de colon. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con

pembrolizumab para el tratamiento de cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, TNBC y cáncer urotelial. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con nivolumab (opcionalmente con ipilimumab) para el tratamiento de cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón microcítico y TNBC. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con nivolumab (opcionalmente con ipilimumab) para el tratamiento de glioblastoma. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con nivolumab para el tratamiento de cáncer hepatocelular. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con pembrolizumab para el tratamiento de linfoma de Hodgkin, mieloma, síndrome mielodisplásico y linfoma no Hodgkin. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con pidilizumab para el tratamiento de gliomas malignos. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más de nivolumab (opcionalmente con uno o más de ipilimumab, y múltiples péptidos de clase 1 y montanida ISA 51 VG y, opcionalmente secuencialmente, con ipilimumab) y pembrolizumab para el tratamiento de melanoma. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con pembrolizumab para el tratamiento de melanoma y NSCLC. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más de nivolumab (opcionalmente con uno o más de gemcitabina/cisplatino, pemetrexed/cisplatino, carboplatino/paclitaxel, bevacizumab, erlotinib e ipilimumab) y pembrolizumab para el tratamiento de NSCLC. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con pidilizumab (opcionalmente con gemcitabina) para el tratamiento de cáncer de páncreas. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con pidilizumab (opcionalmente con uno o más de sipuleucel-T y ciclofosfamida) para el tratamiento del cáncer de próstata. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más de nivolumab (opcionalmente con uno o más de sunitinib, pazopanib e ipilimumab),

pembrolizumab (opcionalmente con pazopanib) y pidilizumab (opcionalmente con célula de fusión de células dendríticas/RCC) vacuna) para el tratamiento de RCC. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más de anti-LAG3 (BMS-986016, opcionalmente con nivolumab), nivolumab (opcionalmente con interleucina-21) y AMP-554 para el tratamiento de tumores sólidos. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con pembrolizumab para el tratamiento de tumores sólidos.

En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador se dirige a uno o más de CD137 o CD137L. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo específico de uno o más de CD137 o CD137L. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como, a modo de no limitación, urelumab (también conocido como BMS-663513 y anticuerpo anti-4-1 BB). En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con urelumab (opcionalmente con uno o más de nivolumab, lirilumab y urelumab) para el tratamiento de tumores sólidos y/o linfoma no Hodgkin de células B y/o cáncer de cabeza y cuello y/o mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como, sin limitaciones, ipilimumab (MDX-010, MDX-101, Yervoy, BMS) y/o tremelimumab (Pfizer). En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con ipilimumab (opcionalmente con vituximab) para el tratamiento de de uno o más de melanoma, cáncer de próstata y cáncer de pulmón.

En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador está dirigido a CD20. En diversas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo específico de CD20. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como, sin limitaciones, ofatumumab, obinutuzumab (GAZYVA), AME-133v, ocrelizumab, TRU-015 y veltuzumab.

Validación de las formulaciones de BO-11X

La validación preclínica de la eficacia terapéutica de una formulación de BO-11X (de acuerdo con la presente invención y como se ilustra con BO-111 y BO-112 en los Ejemplos) puede realizarse en ensayos basados en células y, lo más interesante, en modelos animales en los que se pueden analizar y
5 comparar diferentes criterios experimentales para establecer las condiciones más apropiadas para lograr efectos terapéuticos de manera efectiva, usando la formulación de BO-11X sola o en combinación con un fármaco anticanceroso candidato o aprobado. Estos criterios incluyen las dosis, vía de administración, orden y/o frecuencia de administración de cualquiera de los compuestos en el
10 alcance para identificar cuáles son las mejores condiciones para el uso terapéutico de una formulación de BO-11X (solo o sinérgicamente con un fármaco anticanceroso candidato o aprobado) en términos de eficacia, seguridad y/o uso clínico.

Los efectos de diferentes dosis de una formulación de BO-11X, número
15 y/o sitio de administración (en particular, al inyectarlo en uno o más sitios), la vía de administración, la frecuencia y/o el punto de tiempo para la administración pueden estar asociados a criterios y parámetros fisiológicos relevantes que se miden en muestras biológicas obtenidas de células o (preferentemente) animales que están expuestos a los compuestos analizados,
20 solos o en combinación con otros fármacos. Una lista no limitante de tales parámetros incluye la regresión del tamaño tumoral, bloqueo del crecimiento tumoral y/o proliferación de células tumorales, apoptosis, vascularización reducida del tumor o metástasis, superación de la resistencia a un fármaco anticanceroso frecuente (o mejora de alguna otra forma la respuesta a tal
25 fármaco en la población tratada), acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento reducidos en tejidos y funciones normales, modulación de la respuesta inmunitaria y/o de células inmunitarias que tienen actividades y características específicas, identificación de biomarcadores o poblaciones

celulares específicas en materiales biológicos (por ejemplo, presentes en preparaciones de células cancerosas, biopsias tumorales o fluidos biológicos) cuyo aumento (o disminución) se conoce en la literatura que está asociado al efecto anticanceroso en general y, en particular, a la supervivencia de modelos animales y, posiblemente, de pacientes con cáncer. Siempre que sea posible, dichos criterios se miden en puntos de tiempo intermedios y finales después de la administración de cada compuesto de prueba, o una combinación de prueba de compuestos a una dosis y/o régimen dados, usando una vía de administración específica y/o formulaciones farmacéuticas.

La eficacia terapéutica y anticancerosa de una formulación de BO-11X puede analizarse de forma individual o en combinación con tratamientos de referencia convencionales (tales como radioterapia, quimioterapia, inhibidores de cinasas celulares, etc.) o tratamientos que implican mecanismos novedosos y/o nuevos candidatos a fármacos anticancerosos. De hecho, una categoría de nuevos compuestos anticancerosos que pueden analizarse en combinación con una formulación de BO-11X son aquellos que mejoran las respuestas inmunitarias antitumorales dentro del microambiente tumoral, proporcionando una inmunidad antitumoral sistémica que está dirigida a las células tumorales diseminadas que se eliminan. Este enfoque ha demostrado tener éxito en modelos animales y pacientes y puede mejorar el resultado de terapias convencionales, tales como la radioterapia o la quimioterapia (véase, por ejemplo, Galluzzi L et al., 2014; Vacchelli E et al., 2013; Van der Jeught K et al., 2015).

Este creciente panel de nuevos medicamentos contra el cáncer tiene como objetivo los mecanismos por los cuales las células cancerosas escapan de la detección y destrucción inmune por parte del cuerpo humano. Las inmunoterapias específicas de cáncer pueden proporcionar una serie de ventajas cuando se comparan con otras terapias contra el cáncer (por ejemplo,

especificidad de células tumorales). De hecho, la identificación de una serie de dianas moleculares para inmunoterapias del cáncer permite importantes avances en la definición de los mecanismos y compuestos que pueden proporcionar el efecto coestimulador (o coinhibidor) adecuado sobre las respuestas inmunitarias contra los tumores con respecto a su plasticidad, heterogeneidad, resistencia o microambiente.

Una lista no limitante de inmunizaciones activas o pasivas contra el cáncer, cada una actuando sobre diferentes objetivos y/o mecanismos moleculares, incluye orientación tumoral u otros anticuerpos monoclonales inmunomoduladores, virus oncolíticos, citocinas inmunoestimuladoras, transferencia de células adoptivas y otras terapias basadas en células, vacunas basadas en ADN o péptidos, inhibidores del metabolismo inmunosupresor o agonistas de receptores de reconocimiento de patrones. Entre estos mecanismos, objetivos moleculares contra los cuales los anticuerpos u otros compuestos tener actividad agonística o antagonista (dependiendo de su papel en la respuesta inmunitaria o escape del cáncer de la respuesta inmunitaria) incluye una serie de proteínas de la membrana celular tales como PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD137, CD38, OX-40, CD26, TIM3 y LAG 3 que son puntos de control para el desarrollo tumoral y contra los cuales diferentes anticuerpos agonistas o antagonistas se encuentran disponibles comercialmente o en repositorios científicos para caracterizar su especificidad y/o nivel de efecto anticanceroso contra el antígeno humano o (cuando se trata de modelos animales) el antígeno de roedor correspondiente.

A pesar de las impresionantes respuestas de los pacientes a agentes dirigidos a estas moléculas coestimuladoras o coinhibidoras (por ejemplo, terapias que se basan en un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1), la respuesta clínica a los inhibidores del punto de control inmunológico sigue siendo incompleta o logra de forma ineficiente el efecto terapéutico deseado en

demasiados pacientes con cáncer. Una formulación de BO-11X en una combinación apropiada con un compuesto, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o anti-CD 137, puede mejorar la reducción del crecimiento tumoral y la metástasis (o aumentar el número de sujetos que presentan dicha reducción),
5 en comparación con el efecto de la administración de uno de esos dos agentes anticancerosos solos, posiblemente más allá de los efectos aditivos que cabría esperar.

Los efectos terapéuticos de una formulación de BO-11X pueden evaluarse en uno de los varios modelos basados en células que se basan en cultivos
10 celulares aislados o mixtos, incluidas células cancerosas primarias o líneas celulares de cáncer establecidas, preferentemente de origen humano. Los ejemplos de líneas celulares de cáncer para validar formulaciones de BO-11X se pueden definir de acuerdo con el tipo de cáncer, tal como melanoma (células humanas SK-Mel-19, SK-Mel-103 y UACC62; células B16 murinas), carcinoma
15 (células Hepa 1-6 de ratón, células FAO de rata), cáncer de mama (células humanas BT483, HCC1 143, HCC1937, MDA-MB-231, MDA-MB-415, MDA-MB-468 y BT549), cáncer de páncreas (células MiaPaCa2, IMIM-PC2 , Panel, Panc0203, Panel 3.27 o BxPc3 humanas) u otras líneas celulares relevantes que están disponibles a través de la ATCC, otros repositorios oficiales o
20 académicos, o proveedores comerciales. Los efectos anticancerosos de las formulaciones de BO-11X pueden evaluarse a nivel de período de tiempo, frecuencia y/o dosis que se requiere para tener un bloqueo de la proliferación, la muerte, la expresión de biomarcadores y/o la liberación de moléculas de señalización (tales como quimiocinas o interferón beta) que indican un efecto
25 potencialmente relevante de la formulación de BO-11X para confirmarse en condiciones más fisiológicas.

Luego, los efectos de una formulación de BO-11X pueden evaluarse en modelos animales tumorales en los que la respuesta antitumoral debida a la

administración de una formulación de ejemplo, tal como BO-112, se evalúa en diferentes protocolos para monoterapia y tratamiento de combinación (por ejemplo, junto con un CPI, tal como un anticuerpo anti-PD-1) a lo largo de un período de tiempo más corto o más largo después de la administración. El estudio se puede realizar administrando BO-112 y/o anticuerpo anti-PD-1 en animales en un momento determinado del desarrollo del tumor debido a la proliferación de las células inyectadas, es decir, después de un número específico de días después de la inyección de células cancerosas o (preferentemente) que presentan el tamaño del tumor deseado (por ejemplo, un tamaño promedio de 80-100 mm³), o incluso después de su desaparición (para evaluar cualquier efecto de cada fármaco o combinación de fármacos sobre la recaída del tumor). El estudio también implicaría compuestos de control que son negativos (por ejemplo, solo vehículo) o controles positivos, tales como fármacos quimioterapéuticos u otros fármacos anticancerosos que están indicados en la literatura como referencia para la eficacia del fármaco para un tumor específico y/o en un modelo animal dado. Estas actividades de validación en modelos animales y células animales también pueden conducir al desarrollo de la formulación de BO-11X para uso veterinario.

El modelo animal es normalmente un modelo de ratón en el que el cáncer es consecuencia de la transferencia y el injerto de células cancerosas humanas (procedentes de una línea celular inmortalizada o una biopsia de cáncer que obtiene un paciente) o la inducción (o transferencia) de células tumorales de ratón en los animales. Las células pueden originarse por diferentes tipos de tumores (por ejemplo, carcinoma de pulmón, melanoma, linfoma) y pueden inyectarse por vía subcutánea en el flanco de los ratones para simplificar la detección del tumor y el análisis de su tamaño y/o composición durante el estudio. A continuación, se trata a los ratones aleatorizándolos en grupos de un tamaño que permita el análisis estadístico de los resultados (por ejemplo, 3, 5,

10, 12, 15, 20 o más animales para cada control o grupo de tratamiento).

Las características de que una formulación de BO-11X, tal como BO-112 y un inhibidor del punto de control, tal como un anticuerpo anti-PD-1 pueden mejorar en modelos animales con cáncer (en particular cuando se combinan
5 adecuadamente en términos de cantidad, orden u otros criterios de administración) puede incluir la supervivencia del animal después del tratamiento y/o desaparición del tumor, recaída tumoral reducida, toxicidad y/o efectos de resistencia limitados o retardados y respuesta a la reexposición de la inoculación del tumor después de la finalización del tratamiento con BO-112 y/o
10 el anticuerpo anti-PD-1.

La formulación de BO-11X de ejemplo que se identifica estructural y funcionalmente anteriormente como BO-112 y anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar (solo o en combinación, en dosis únicas o múltiples) en diferentes ubicaciones con respecto a las células tumorales y/o en una cantidad diferente.
15 Normalmente, BO-112 y el anticuerpo monoclonal específico para PD-1 de ratón (por ejemplo, el clon RMP1-14 de BioLegend o similares disponibles por otros proveedores) se inyectan por vía subcutánea, intravesicular, intraperitoneal, peritumoral o intratumoral (dependiendo del modelo y características moleculares y patológicas del tumor) a una concentración que
20 se determina con respecto al peso del animal (por ejemplo, entre 0,01 y 2,5 mg/kg), la concentración en el volumen inyectado (por ejemplo, entre 0,01 y 0,5 ml, y/o el contenido en cada dosis (por ejemplo, entre 0,01 y 250 µg por dosis). En particular, la dosis-respuesta de BO-112 en diferentes concentraciones, combinada con una dosis fija de anticuerpo anti-PD-1 (o viceversa), puede
25 permitir determinar cualquier efecto beneficioso consecuente a la reducción significativa en la cantidad de cualquier compuesto que se administra debido a la combinación con el otro compuesto (por ejemplo, un perfil de seguridad y eficacia sin modificar o incluso mejorado; efectos absolutos en tumores que

están en diferentes lugares sin tratamiento).

BO-112 se puede inyectar en uno o varios ciclos (por ejemplo, 2, 3, 4 o más) que están separados por un número determinado de días (1, 2, 3, 5, 7 o más). Como alternativa, cuando se coadministra BO-112 con el anticuerpo anti-
5 PD 1, se puede inyectar BO-112 inmediatamente antes (o después) del anticuerpo (o en una preparación inyectable única), nuevamente en uno o múltiples ciclos (que están separados por un número determinado de días). Todavía de forma alternativa, los dos agentes pueden formularse o administrarse en cualquier orden secuencial, pero separados por un período de
10 tiempo variable (por ejemplo, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas), 36 horas, 2 días o más). En particular, cuando se administra BO-112 después del anticuerpo anti-PD-1, su posterior administración (sola o adicional en combinación con el anticuerpo anti-PD-1) puede proporcionar un efecto de rescate antitumoral en animales en los que el anticuerpo anti-PD-1 fue ineficaz
15 contra las células tumorales, superando cualquier resistencia específica al tumor o mecanismo de escape. Al final del tratamiento, todos los animales supervivientes pueden dejarse sin tratar durante 1, 2, 3 o más semanas consecutivas para monitorizar si y cómo reaparecen las células tumorales, con o sin reexposición de todos los animales que tuvieron una regresión completa
20 del tumor con una inyección subcutánea adicional de células cancerosas.

Los efectos de BO-112, solos o en combinación con el anticuerpo anti PD1 como se ha mencionado anteriormente, pueden evaluarse como resultados intermedios que se informan durante el estudio sin sacrificar a los animales (por ejemplo, midiendo el tamaño del tumor, el porcentaje de ratones
25 todavía vivos, el peso corporal o los criterios de comportamiento) o después de sacrificar al animal (o en los ratones ya muertos) para determinar las características moleculares del tumor y/o células normales (incluyendo el número total y/o las subpoblaciones específicas de células NK, linfocitos

infiltrados en tumores, esplenocitos, incorporación de precursores radiomarcados y otras células que pueden estar implicadas en las respuestas inmunitarias locales o sistémicas antitumorales, tales como células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), células T reguladoras (Treg), neutrófilos asociados a tumores (TAN), Macrófagos M2 y macrófagos asociados a tumores (TAM). En paralelo, la presencia/ausencia de biomarcadores relevantes puede determinarse por amplificación por PCR de ARN relevantes, o a nivel de proteína en la superficie de células dentro de tejidos emite o circula en la sangre, tales como citocinas o quimiocinas mediante el uso de ensayos inmunológicos y kit estándar.

Este análisis de fenotipo global se puede realizar utilizando células aisladas de tumores, sangre, bazo, ganglios linfáticos u otros tejidos y ubicaciones relevantes para detectar cualquier cambio estadístico y/o terapéuticamente relevante en el número de células que expresan marcadores de superficie celular que se detectan mediante citometría de flujo y se describen, en la literatura tales como CD3, CD4, CD25, FoxP3, CD8, PD-1, PD-L1, PD-L2, PTEN, CTLA-4, CD137, CD96, CD73, CD90, CD47, CD69, CD26, TIM3, LAG3, Gr1, CD11b, Ly6C, Ly6G, NKp46, CD16, NKG2D, NKp44, NKp30, CD45 y CD31. Dichas células también pueden evaluarse a nivel de respuesta inmunitaria específica de antígeno tumoral, expresión de factores de transcripción relevantes, citocinas o quimiocinas (por ejemplo, IFN-gamma, IFN-beta, TNF-alfa, HIF1a, HIF2a, p53), o utilizando otros ensayos basados en células.

Además, el examen macroscópico de órganos y la piel y el análisis microscópico y patológico en modelos animales competentes completamente inmunes inmunodeficientes pueden proporcionar adicionalmente indicaciones sobre la eficacia de los compuestos del estudio (solos o en combinación) o sobre su toxicidad, tal como la inflamación de órganos y la necropsia. Los datos

cuantitativos que se generan en estudios similares se pueden comparar entre los diferentes grupos experimentales mediante el uso de las pruebas estadísticas apropiadas, con y sin correcciones para múltiples pruebas, con el fin de evaluar qué efectos terapéuticos (en particular, antitumorales) se proporcionan mediante la administración de una formulación de BO-11X, solo o en combinación con otro agente anticanceroso.

Métodos de tratamiento y selección de pacientes

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un método para tratar, reducir, mejorar o prevenir el crecimiento, supervivencia, metástasis, transición epitelial-mesenquimatosa, escape o recurrencia inmunológica, que comprende administrar mediante administración de una formulación de BO-11X y uno o más agentes inmunomoduladores. El cáncer puede ser una enfermedad oncológica. El cáncer puede ser un tumor latente, que puede ser el resultado de la metástasis de un cáncer. El tumor latente también puede ser un resto después de la extirpación quirúrgica de un tumor. La recurrencia del cáncer puede ser, por ejemplo, recrecimiento tumoral, metástasis pulmonar o metástasis hepática.

En varias realizaciones, el cáncer es uno o más de carcinoma de células basales; cáncer de vías biliares; cáncer de vejiga; cáncer de hueso; cáncer de cerebro y del sistema nervioso central; cáncer de mama; cáncer del peritoneo; coriocarcinoma; cáncer de tejido conectivo; cáncer del sistema digestivo (que incluye cáncer de esófago, estómago, colon, recto u otro cáncer gastrointestinal); cáncer de ojo; cáncer de la cabeza y cuello; glioblastoma; carcinoma hepático; hepatoma; neoplasia intraepitelial; cáncer renal, suprarrenal o renal; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón); melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de la cavidad oral (por ejemplo, cáncer de

labio, laringe, lengua, boca y faringe); cáncer de páncreas; cáncer de próstata; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer del sistema respiratorio; carcinoma de glándula salival; cáncer de piel; cáncer de células escamosas; cáncer testicular; cáncer de tiroides; cáncer de útero, endometrial, cervical, vulvar, 5 ovárico u otro cáncer ginecológico; cáncer del sistema urinario; linfoma, incluyendo linfoma de células B, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin (LNH), incluyendo tipos específicos, tales como linfocítico de grado bajo/folicular, linfocítico pequeño, de grado intermedio/folicular, difuso de grado intermedio, inmunoblástico de alto grado, linfoblástico de alto grado, células redondas no 10 hendidas o NHL de enfermedad voluminosa); linfoma de células del manto y relacionado con el SIDA; leucemia linfocítica crónica; leucemia linfoblástica aguda; leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; así como otros carcinomas y sarcomas; trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis o edema 15 (tales como los asociados con tumores cerebrales). En diversas ocasiones, el cáncer es un cáncer del tracto biliar. En algunas ocasiones, el cáncer del tracto biliar se selecciona entre cáncer de vesícula, cáncer de vesícula biliar, cáncer del conducto biliar y cáncer de la ampolla de Vater. En diversas realizaciones, el cáncer es cáncer de hígado. En diversas realizaciones, el cáncer es cáncer 20 de colon. En algunas ocasiones, el cáncer del tracto biliar es colangiocarcinoma y/o un adenocarcinoma.

En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X y/o el agente de inmunomodulación se usan para tratar cánceres en varios estadios (por ejemplo, estadios I o II o III o IV). A modo de ejemplo no limitativo, utilizando la 25 agrupación de estadios global, los cánceres en estadio I se localizan en una parte del cuerpo; los cánceres en estadio II son localmente, al igual que los cánceres en estadio III. Que se designe que un cáncer está en estadio II o estadio III puede depender del tipo específico de cáncer. En un ejemplo no

limitante, la enfermedad de Hodgkin en estadio II indica que los ganglios linfáticos están afectados en un solo lado del diafragma, mientras que el estadio III indica ganglios linfáticos afectados por encima y por debajo del diafragma. Por tanto, los criterios específicos para los estadios II y III difieren de
 5 acuerdo con el diagnóstico. Los cánceres en estadio IV a menudo han producido metástasis o se han diseminado a otros órganos o partes del cuerpo.

En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X (y/o el agente inmunomodulador) reduce los efectos secundarios de las terapias que un paciente puede experimentar. Por ejemplo, la terapia de combinación de una
 10 formulación de BO-11X y uno o más agentes inmunomoduladores puede permitir una dosis menor de la formulación de BO-11X y/o uno o más agentes de inmunomodulación (por ejemplo, en comparación con la monoterapia) y, por lo tanto, aumenta la ventana terapéutica de cualquiera de los agentes. En algunas realizaciones, la menor dosis mitiga uno o más efectos secundarios sin
 15 pérdida de la eficacia (o con una pérdida mínima). En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador se usa para tratar un sujeto que tiene un cáncer refractario al tratamiento. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se utiliza para tratar a un sujeto que es refractario a uno o más agentes inmunomoduladores, en particular aquel que realmente
 20 está combinado con la formulación de BO-11X.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sujeto es refractario a un agente PD-1 y/o PD-L1 y/o PD-L2, incluyendo, por ejemplo, pacientes resistentes a nivolumab (ONO-4538/BMS-936558, MDX1 106, OPDIVO), pembrolizumab (KEYTRUDA), pidilizumab (CT-01 1), MK-3475, BMS-936559, ibrutinib y/o
 25 MPDL3280A. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sujeto es resistente a un agente anti-CTLA-4, por ejemplo pacientes resistentes a ipilimumab (Yervoy) (por ejemplo, pacientes de melanoma). En algunas realizaciones, el sujeto es resistente a una formulación de BO-11X. En consecuencia, en diversas

realizaciones la presente invención proporciona métodos de tratamiento del cáncer que rescatan a los pacientes que no son sensibles a diversas terapias, incluyendo la monoterapia de una formulación de BO-11X o uno o más agentes inmunomoduladores.

5 En diversas realizaciones, los términos "paciente" y "sujeto" se usan de forma intercambiable. En algunas realizaciones, el sujeto y/o animal es un mamífero, por ejemplo, por ejemplo un ser humano, ratón, rata, cobaya, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, conejo, oveja o primate no humano, tal como un mono (por ejemplo, babuino) o chimpancé.

10 En diversas realizaciones, los métodos de la invención son útiles en el tratamiento de un sujeto humano. En algunas realizaciones, el ser humano es un ser humano pediátrico. En otras realizaciones, el ser humano es un ser humano adulto. En otras realizaciones, el ser humano es un ser humano geriátrico. En otras realizaciones, el ser humano puede denominarse paciente o
15 sujeto. En algunas realizaciones, el ser humano es una mujer. En algunas realizaciones, el ser humano es un varón.

Regímenes de tratamiento y terapias de combinación

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona regímenes terapéuticos específicos del cáncer con formulaciones de BO-11X y agentes
20 inmunomoduladores (y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la formulación DE BO-11X, por ejemplo, BO-111 O BO-112, se administra a un paciente primero para normalizar la vascularización del tumor, opcionalmente mediante la reducción o anulación de la hipoxia. Dicha primera administración de la formulación de BO-
25 11X, por ejemplo, BO-111 o BO-112 , puede estimular y/o aumentar los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+ y CD8+) y/o células NK del tumor y/o inhibir y/o disminuir el reclutamiento de células inmunosupresores (por ejemplo, células supresoras derivadas de linaje mieloide (MDSC), células T

reguladoras (Treg); neutrófilos asociados a tumores (TAN), macrófagos M2 y macrófagos asociados a tumores (TAM) al tumor. En algunas realizaciones, las presentes terapias pueden alterar la relación de los macrófagos M1 frente a M2 en el sitio del tumor para favorecer a los macrófagos M1. Cabe destacar que, a diferencia de, por ejemplo, las moléculas anti-angiogénicas, las formulaciones de BO-11X, en algunas realizaciones, inducen una normalización vascular de larga duración (es decir, mayor que transitoria). Por ejemplo, la normalización vascular de la formulación de BO-11X puede durar más de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 o 14 días o 21 días. Por consiguiente, en algunas realizaciones, esta normalización vascular de la formulación de BO-11X de larga duración permite un microambiente tumoral permisivo sostenible que es muy probable que sea sensible a uno o más agentes inmunomoduladores. Es decir, en algunas realizaciones, la formulación de BO-11X potencia la terapia con el agente inmunomodulador.

Como alternativa, la formulación de BO-11X, por ejemplo, BO-111 O BO-112, se administra a un paciente tras el tratamiento con uno o más agentes inmunomoduladores. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunomodulador está dirigido a una o más moléculas coinhibidoras y reduce o elimina la inmunosupresión. En este contexto favorable, es decir, tras la eliminación de la supresión, la formulación de BO-11X, Por ejemplo BO-111 O BO-112 se administra para estimular el sistema inmunológico. O el agente inmunomodulador se dirige a una o más moléculas coestimuladoras primero y la formulación de BO-11X, por ejemplo, BO-111 O BO-112, se administra en segundo lugar para reforzar este efecto, por ejemplo, de forma sinérgica.

Además, como se divulga en el presente documento, la formulación de BO111X y/o agente inmunomodulador se pueden combinar con un agente terapéutico adicional en el contexto de, por ejemplo, la coadministración, un régimen de tratamiento o una coformulación.

En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador, opcionalmente con un agente terapéutico adicional, se pueden administrar de forma secuencial. El término "secuencialmente", como se usa en el presente documento, significa que el agente terapéutico adicional y la formulación de BO-11X y/o agente inmunomodulador se administran con una separación de tiempo de más de aproximadamente 60 minutos. Por ejemplo, el tiempo entre la administración secuencial del agente terapéutico adicional y la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador puede ser superior a aproximadamente 60 minutos, superior a aproximadamente 2 horas, superior a aproximadamente 5 horas, superior a aproximadamente 10 horas, superior a aproximadamente 1 día, superior a aproximadamente 2 días, superior a aproximadamente 3 días, o superior a aproximadamente 1 semana de diferencia. Los tiempos de administración óptimos pueden depender de las velocidades de metabolismo, excreción, y/o la actividad farmacodinámica del agente terapéutico adicional y la formulación de BO-11X y/o agente inmunomodulador que se esté administrando. El agente terapéutico adicional o los presentes agentes se pueden administrar primero.

En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador, opcionalmente con un agente terapéutico adicional, se pueden administrar de forma simultánea. El término "simultáneamente" tal como se usa en el presente documento, significa que el agente terapéutico adicional y la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador se administran con una separación temporal de no más de aproximadamente 60 minutos, tal como no más de aproximadamente 30 minutos, no más de aproximadamente 20 minutos, no más de aproximadamente 10 minutos, no más de aproximadamente 5 minutos, o no más de aproximadamente 1 minuto. La administración del agente terapéutico adicional y la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador puede ser mediante administración simultánea

de una única formulación (por ejemplo, una formulación que comprende el agente terapéutico adicional y la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador) o de formulaciones separadas (por ejemplo, una primera formulación, incluyendo el agente terapéutico adicional y una segunda
5 formulación que incluye la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador).

La coadministración tampoco requiere que los agentes terapéuticos adicionales se administren al sujeto por la misma vía de administración. En su lugar, cada agente terapéutico se puede administrar al sujeto por cualquier vía
10 de administración adecuada, véase, por ejemplo, por vía parenteral o no parenteral.

Dicha combinación puede conducir a sinergia y/o efectos aditivos y/o potentes a una dosis inferior de la formulación de BO-11X y/o agente inmunomodulador. Por ejemplo, cuando la formulación de BO-11X se combina
15 con uno o más agentes inmunomoduladores, la cantidad efectiva de la formulación de BO-11X puede ser más baja de lo que sería en una monoterapia. En algunas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con un agente inmunomodulador y la cantidad efectiva de la formulación de BO-11X es una dosis subterapéutica, por ejemplo, cuando el agente de
20 inmunomodulador se combina con una formulación de BO-11X, la cantidad eficaz del agente inmunomodulador puede ser menor de lo que sería en una monoterapia. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador se combina con una formulación de BO-11X y la cantidad eficaz del agente inmunomodulador es una dosis subterapéutica. En diversas realizaciones, el
25 agente inmunomodulador se combina con una formulación de BO-11X y un agente terapéutico adicional y la cantidad eficaz del agente terapéutico adicional es una dosis subterapéutica. El término "dosis o cantidad subterapéutica" significa que una dosis o cantidad de una sustancia

farmacológicamente activa está por debajo de la dosis o cantidad de esa sustancia que se administra, como la única sustancia, para lograr un efecto terapéutico. La dosis subterapéutica de dicha sustancia puede variar dependiendo del sujeto y la enfermedad que se esté tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración y similares, un experto en la técnica puede determinar fácilmente. En una realización, la dosis o cantidad subterapéutica del agente quimioterapéutico es inferior al 90 % de la dosis completa aprobada del agente quimioterapéutico, tal como la proporcionada en la información de la ficha técnica aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. para el agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, la dosis o cantidad subterapéutica del agente quimioterapéutico es inferior al 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o incluso 10 % de la dosis completa aprobada, tal como de 20 % a 90 %, 30 % a 80 %, 40 % a 70 % u otro intervalo dentro de los valores proporcionados en el presente documento.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del agente inmunomodulador es menor que una cantidad eficaz utilizada en monoterapia para el mismo cáncer y/o una terapia de combinación con un agente además de una formulación de BO-11X para el mismo cáncer. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la formulación de BO-11X es menor que una cantidad eficaz utilizada en monoterapia para el mismo cáncer o estado clínico y/o una terapia de combinación con un agente (tal como un agente inmunomodulador) para el mismo cáncer o estado clínico.

En diversas realizaciones, la formulación de BO-11X se combina con uno o más agentes inmunomoduladores (por ejemplo, 1, o 2, o 3, o 4, o 5 agentes inmunomoduladores) y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, 1, o 2, o 3, o 4, o 5 agentes terapéuticos adicionales). Dichas combinaciones pueden conducir a sinergia y/o efectos aditivos y/o

potentes a una dosis inferior de la formulación de BO-11X y/o agente inmunomodulador y/o el uno o más agentes terapéuticos adicionales. La coadministración puede ser simultánea o secuencial. Además, las composiciones farmacéuticas que incluyen la formulación de BO-11X y/o el

5 agente inmunomodulador pueden comprender el agente terapéutico adicional (por ejemplo, a través de la coformulación). Es decir, en algunas realizaciones, dos o más de cualquiera de los agentes descritos en el presente documento pueden formularse conjuntamente. Además, en algunas realizaciones, la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador se pueden administrar

10 a un paciente que está en tratamiento con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Además, en algunas realizaciones, la formulación de BO-11X y/o el agente inmunomodulador puede suplantar el tratamiento actual de un paciente con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

La terapia adyuvante, también llamada atención adyuvante, es un

15 tratamiento que se administra además del tratamiento primario, principal o inicial. A modo de ejemplo no limitante, la terapia adyuvante puede ser un tratamiento adicional generalmente administrado después de la cirugía en el que se ha eliminado toda la enfermedad detectable, pero en el que queda un riesgo estadístico de recaída debido a enfermedad oculta. En algunas

20 realizaciones, los agentes descritos en el presente documento se usan como una terapia adyuvante en el tratamiento de un cáncer. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos descritos en el presente documento se administran como terapia neoadyuvante antes de la resección. En ciertas realizaciones, la terapia neoadyuvante se refiere a la terapia para retraer y/o

25 reducir el tamaño del tumor antes de cualquier cirugía. En algunas realizaciones, la terapia neoadyuvante significa que un agente terapéutico descrito en el presente documento se administra a pacientes con cáncer antes de la cirugía u otra técnica que permita la ablación del tumor.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos descritos en el presente documento son útiles como terapia de mantenimiento después de un tratamiento inicial con una terapia de primera línea, incluyendo, sin limitaciones, cualquiera de los agentes terapéuticos adicionales de la presente divulgación.

5 En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un régimen de tratamiento o un método para tratar cáncer o tumores en un sujeto que incluye administrar de forma simultánea o secuencial una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de BO-11X y/o un agente inmunomodulador y uno o más de los agentes terapéuticos adicionales
10 descritos en el presente documento. En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un régimen de tratamiento o un método para tratar cáncer o tumores en un sujeto que incluye administrar de forma simultánea o secuencial una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de BO-11X y/o un agente inmunomodulador y uno o más de los agentes
15 anticancerosos descritos en el presente documento, incluyendo, sin limitaciones, agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en los métodos de la presente invención pueden incluir los descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es uno o más de 5-fluorouracilo (5-FU), doxorrubicina,
20 gemcitabina, paclitaxel y cisplatino. A modo de ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona combinar una formulación de BO-11X y/o un agente inmunomodulador con uno o más regímenes de tratamiento de cáncer habituales (a modo de ilustración no limitante, FOLFOX, FOLFIRI, IFL, FL (Mayo), QUASAR, calendario de Machover, CAF, CMF, ECF y
25 FEC).

En diversas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente antihiperproliferativo. Los agentes antihiperproliferativos incluyen, pero no se limitan a los mismos, doxorrubicina, daunorrubicina, mitomicina, actinomicina

D, bleomicina, cisplatino, VP16, enediyina, taxol, vincristina, vinblastina, carmustina, melfalán, ciclofosfamida, clorambucilo, busulfán, lomustina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, BCNU o camptotecina.

Adicionalmente, el agente terapéutico adicional puede incluir además el uso de radiación. Adicionalmente, los métodos de tratamiento pueden incluir el uso de la terapia fotodinámica.

Sales, composiciones farmacéuticas y dosis

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona los agentes descritos en el presente documento y ésteres farmacéuticamente aceptables, profármacos, sales, solvatos, enantiómeros, estereoisómeros, metabolitos activos, cocristales, y otros derivados fisiológicamente funcionales de los mismos.

En un aspecto, la presente invención proporciona agentes descritos en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada que sea apropiada para el uso y la vía de administración deseados. Los excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos pueden ser, por ejemplo, solución salina, goma arábica, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. En una realización, los excipientes farmacéuticamente aceptables son estériles cuando se administran a un sujeto. El agua es un excipiente útil cuando cualquier agente descrito en el presente documento se administra por vía intravenosa. Como excipientes líquidos, concretamente se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, específicamente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados también incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina,

malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Otros ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (editado por

5 Allen, Loyd V., Jr; 22^a edición, 2012). Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, y agentes dispersantes. Además, se pueden incluir agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. La
10 prevención de la acción de los microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenes, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares.

15 Cuando sea necesario, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir un agente solubilizante. Asimismo, los agentes se pueden liberar con un dispositivo de liberación o vehículo adecuado como se conoce en la técnica. Las composiciones para la administración pueden incluir, opcionalmente, un anestésico local, tal como, por ejemplo, lidocaína para disminuir el dolor en el
20 sitio de la inyección.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, gotas, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles,
25 pulverizaciones, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Por lo tanto, la composición descrita en el presente documento puede estar comprendida en una cápsula, comprimido, píldora, comprimido oblongo, botella, ampolla, sobre, jeringa, cartucho, nebulizador u otro recipiente. En una

realización, la composición farmacéutica está en forma de una cápsula. En otra realización, la composición farmacéutica está en forma de un comprimido.

En algunas realizaciones, la administración de cualquiera de los agentes y composiciones descritos es una cualquiera de vía oral, intravenosa y
 5 parenteral. En diversas realizaciones, las vías de administración incluyen, por ejemplo: oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, sublingual, intranasal, intracerebral, intrahepática, intrapancreática, intravesicular, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación, o por vía tópica, por ejemplo, en los oídos, nariz, ojos o piel. En
 10 algunas realizaciones, la administración se efectúa por vía oral o por inyección parenteral. El modo de administración puede dejarse a la discreción del médico, y depende en parte del sitio de la enfermedad médica y/o los tratamientos concurrentes (siendo, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, o en combinación con anticuerpos, vacunas y otros fármacos dirigidos al cáncer).
 15 En diversas realizaciones, la administración da como resultado la liberación de cualquier agente descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo.

Cualquier agente y/o composición farmacéutica descritos en el presente documento se puede administrar por vía oral. Tales agentes y/o composiciones farmacéuticas también se pueden administrar cualquier otra vía conveniente,
 20 por ejemplo, mediante infusión intravenosa o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal etc.) y se pueden administrar junto con un agente terapéutico adicional. La administración puede ser sistémica u oral. Se conocen diversos sistemas de liberación, por ejemplo, encapsulación en
 25 liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y pueden usarse. En realizaciones específicas, puede que sea deseable administrar localmente en la zona en necesidad de tratamiento.

En una realización, un agente descrito en el presente documento y/o

composición farmacéutica descrita en el presente documento se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición adaptada para la administración oral a seres humanos. Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, 5 polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el agente activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o a) cargas o expansores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, celulosa microcristalina y azúcar especial para panadería; b) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina, alginatos, 10 gelatina, polivinilpirrolidona, etc.; c) humectantes, tales como glicerol etc.; d) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, polímeros reticulados, tales como crospovidona (polivinilpirrolidona reticulada), croscarmelosa sódica (carboximetilcelulosa sódica reticulada), almidón glicolato de sodio, etc.; e) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina, etc.; f) aceleradores de la absorción, tales como agentes de amonio cuaternario, etc.; g) agentes humectantes, tales como, por ejemplo alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, etc.; h) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita, etc.; e i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, glicerilbehenato, 20 etc.; y mezclas de dichos excipientes. Un experto en la técnica reconocerá que los excipientes particulares pueden tener dos o más funciones en la forma de dosificación oral. En el caso de una forma de dosificación oral, por ejemplo, una cápsula o un comprimido, la forma de dosificación también puede comprender 25 agentes tampón.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente

aceptables. Además de los agentes activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyente inerte de uso habitual en la técnica, tal como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular aceites de algodón, aceite de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol,, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Las formas de dosificación adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular, intrahepática, intrapancreática, intraperitoneal, subcutánea e intraarticular e infusión) incluyen, por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, y similares. También se pueden fabricar en forma de composiciones sólidas estériles (por ejemplo, composición liofilizada), que pueden disolverse o suspenderse en un medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Pueden contener, por ejemplo, agentes de suspensión o dispersión conocidos en la materia. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para inyección parenteral comprenden soluciones acuosas o no acuosas, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de usar. Ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicero, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de la misma, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de

partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Cualquier agente descrito en el presente documento y/o composición farmacéutica descrita en el presente documento pueden administrarse por
5 medios de liberación controlada o de liberación sostenida o mediante dispositivos de liberación que son conocidos por los expertos en la técnica. Dichas formas de dosificación pueden ser útiles para proporcionar la liberación controlada o sostenida de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidropropilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, Eudragit, otras
10 matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, revestimientos multicapa, micropartículas, liposomas, microesferas o una combinación de los mismos, para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Las formulaciones de liberación controlada o sostenida adecuadas se pueden seleccionar fácilmente para su uso con los
15 ingredientes activos de los agentes descritos en el presente documento. Por tanto, la invención proporciona formas de dosificación monodosis para administración oral, tales como, entre otros, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina y comprimidos oblongos que están adaptados para la liberación controlada o sostenida.

20 Las formulaciones que comprenden los agentes descritos en el presente documento y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden presentar convenientemente en formas de dosificación unitarias y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de la farmacia. Por lo general, dichos métodos incluyen la etapa de llevar los
25 agentes terapéuticos en asociación con un vehículo, que constituye uno o más ingredientes auxiliares. Normalmente, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el agente terapéutico con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y, después, si es necesario, dando

forma al producto en formas de dosificación de la formulación deseada (por ejemplo, granulación en húmedo o en seco, mezclas en polvo, etc., seguido de formación de comprimidos usando métodos convencionales conocidos en la materia).

5 Se apreciará que la dosis real de los agentes descritos en el presente documento y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención que se administrarán de acuerdo con la presente invención pueden variar de acuerdo con el agente en particular, la forma de dosificación en particular y el modo de administración. Los expertos en la materia pueden tener en cuenta
10 muchos factores que pueden modificar la acción de las formulaciones de BO-11X (por ejemplo, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, el estado del sujeto, las combinaciones de fármacos, la disposición genética y las sensibilidades de reacción). La administración puede llevarse a cabo de forma
15 continua o en una o más dosis discretas dentro de la dosis máxima tolerada. Los expertos en la materia pueden determinar las tasas de administración óptima para un conjunto dado de condiciones usando pruebas de administración de dosis convencionales.

Las dosis individuales de los agentes descritos en el presente documento
20 y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en formas de dosificación unitarias (por ejemplo, comprimidos o cápsulas) que contienen, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg de poli(I:C)], incluidos todos los valores e intervalos entremedias. En algunas realizaciones, los agentes descritos en el presente
25 documento y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg de moléculas de poli(I:C) dentro de la formulación de BO-11X diaria o de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg de moléculas diarias

[por ejemplo, en la que dicha formulación de BO-11X diaria individual se forma preparando un complejo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a 10 mg de poli(I:C)], incluidos todos los valores e intervalos entremedias.

- 5 En algunas realizaciones, una dosificación adecuada de los agentes y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención está en un intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg de moléculas de poli(I:C) dentro de la formulación de BO-11X/kg de peso corporal de el sujeto, preferentemente de 0,003 a aproximadamente 10 mg de moléculas de poli(I:C)
- 10 dentro de la formulación de BO-11X/kg de peso corporal del sujeto, más preferentemente de 0,005 a aproximadamente 10 mg de moléculas de poli(I:C) dentro de la formulación de BO-11X/kg de peso corporal del sujeto e, incluso más preferentemente, de 0,01 a aproximadamente 10 mg de moléculas de poli(I:C) dentro de la formulación de BO-11X por kg de peso corporal del sujeto
- 15 [por ejemplo, en el que dicha formulación de BO-11X individual administrada se forma preparando un complejo de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 10 mg de poli(I:C)] por kg de peso corporal del sujeto, preferentemente de aproximadamente 0,003 mg a aproximadamente 10 mg de poli(I:C)] por kg de peso corporal del sujeto, más preferentemente de
- 20 aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 10 mg de poli(I:C)] por kg de peso corporal del sujeto, incluidos todos los valores e intervalos entremedias. En otras realizaciones, una dosificación adecuada de la formulación de BO-11X y/o agente inmunomodulador y/o agente terapéutico adicional está en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de
- 25 peso corporal, o en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, los agentes y/o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden

administrar, por ejemplo, más de una vez al día, aproximadamente una vez al día, aproximadamente en días alternos, aproximadamente cada tres días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada dos meses, aproximadamente una vez cada tres meses, aproximadamente una vez cada seis meses o aproximadamente una vez al año,

Kits

La invención también proporciona kits que pueden simplificar la administración de los agentes y/o composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento. El kit es un conjunto de materiales o componentes, incluyendo al menos uno de los agentes descritos en el presente documento. La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit depende de su finalidad prevista. En una realización, el kit está configurado con el propósito de tratar a sujetos humanos.

En el kit se pueden incluir instrucciones de uso. Las instrucciones de uso normalmente incluyen una expresión tangible que describe la técnica a utilizar cuando se usan los componentes del kit para afectar a un resultado deseado, tal como para tratar, por ejemplo, el cáncer, la diabetes o la obesidad. Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles, tales como, diluyentes, tampones, vehículos farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, filtros, (micro)agujas, herramientas de pipeteado o medición, materiales de vendaje u otra parafernalia útil tal como los expertos en la materia pueden reconocer fácilmente.

Los materiales y componentes montados en el kit se pueden proporcionar a la tienda practicante en cualquier forma de conveniencia y adecuada que conserve su operabilidad y utilidad. Por ejemplo, los componentes se pueden proporcionar a temperaturas ambiente, refrigeradas o de congelación. Los componentes están normalmente contenidos en los materiales de envasado

adecuados. En diversas realizaciones, el material de envasado se construye mediante métodos bien conocidos, preferentemente para proporcionar un ambiente estéril, libre de contaminantes. El material de envase puede tener una etiqueta externa que indica el contenido y/o propósito del kit y/o sus componentes.

Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que se pueden realizar modificaciones adicionales y esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, uso, o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación que caigan dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la materia a la que pertenece la invención y como puede aplicarse a las características esenciales indicadas anteriormente en el presente documento y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Efectos del tamaño del complejo sobre los efectos anticancerosos de distintas preparaciones de poli(I:C) basadas en jetPEI (I:C) (formulaciones de BO-111)

Materiales y métodos

20 Formulaciones de BO-111 (proceso de 2 viales)

Las moléculas de ácido poliinosínico [poli (I)] y ácido policitidílico [poli(C)] de cadena sencilla que se utilizaron para la generación de moléculas de ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] de doble cadena] se obtuvieron de proveedores comerciales tales como Tide Group, Carbogen o Invivogen.

25 Dependiendo del proveedor y el lote, la distribución del tamaño de las moléculas de poli(C) se definen como: <400 bases, 20-82% (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo, 33 %, 43 % o 50 %); 400-850 bases, 15-40 % (con pruebas adicionales realizadas

usando preparaciones que presentan, por ejemplo, 27 %, 30 % o 37 %); 850-5000 bases, 3-50 % (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo 13 %, 30 % o 34 %); >5000 bases, 1 % o menos (generalmente ausentes). Dependiendo del proveedor y el lote, la distribución del tamaño de las moléculas de poli(I) se definen como: <400 bases, 80-95% (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo, 86 % y 91 %); 400-850 bases, 5-20 % (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo, 8 % o 12 %); 850-5000 bases, 0-5 % (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo 1 % o menor); >5000 bases, 1 % o menos (generalmente ausentes). Los criterios de aceptación para la fabricación de formulaciones de BO-111 que se aplican a poli(I) y poli(C) en polvo o soluciones también incluyen máximo de absorción (a una longitud de onda de 248 ± 1 nm y de 268 ± 1 nm para poli(I) y poli(C), respectivamente), un contenido de endotoxinas (≤ 10 UE/mg), pH (6,0-8,0) y un coeficiente de sedimentación ($\geq 4S$).

Se obtuvieron preparaciones de lotes de poli(I) disolviendo polvo de poli(I) (1,0 eq., 23,99 g) a 50 °C en PBS 1 x (2,4 l) con agitación continua en un matraz de 6 litros. Las preparaciones de lotes de poli(C) se obtuvieron por separado utilizando polvo de poli(C) de la misma manera y a la misma concentración. Se pudieron emplear etapas adicionales de filtración para mejorar aún más la calidad de las soluciones de partida utilizando membranas con un corte de 300 kDa o un punto de corte de 500 kDa (casete Pellicon 2, Millipore). Los permeados de estas etapas de filtración se concentran y se liberan de impurezas de pequeño tamaño, tales como monómeros, a través de una membrana de 30 kDa (casete Pellicon 2, Millipore). La fracción retenida resultante para cada solución se mezcla con una solución tampón concentrada (tal como PBS 10X). Para ambas soluciones, se determinó la densidad óptica

para calcular la concentración como base para una estequiometría 1:1 para la siguiente etapa de hibridación, ajustando en consecuencia el volumen total antes de la etapa de hibridación. La solución de poli(I) se mezcla y se agita con moléculas de solución de poli(C) a 55 - 62 °C durante 30 minutos. La solución
5 resultante se enfrió lentamente a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas para hibridar las moléculas monocatenarias y generar moléculas de poli(I:C), y, finalmente, se filtra sobre un filtro de poro de vidrio G3 (tamaño del poro de aproximadamente 15 a 40 µm).

Este proceso de hibridación genera una solución que contiene un
10 conjunto de moléculas de poli(I:C) de doble cadena diferentes, que se aplica a continuación en una columna cromatográfica GPC. La cromatografía se realiza con una columna de vidrio de Omnifit de 5 cm de diámetro que estaba cargada con una suspensión de 700 ml de Toyopearl HW-65F en tampón de fosfato de sodio 40 mM. La suspensión se dejó sedimentar lentamente, seguido de lavado
15 con tampón de fosfato sódico 40 mM (pH = 6,9) a un caudal creciente de 10 ml/min a 60 ml/min. La columna se instaló en un dispositivo de HPLC preparativa que compuesta por dos bombas de alimentación, un detector de UV, válvulas de muestreo y un ordenador. La mezcla de reacción desde la hibridación se cargó en la columna y se eluyó con tampón fosfato sódico 40
20 mM (flujo = 50 ml/min, pH = 6,9). Se tomaron fracciones objetivo cuando la señal de UV estaba entre 100 mV y 1250 mV, y se juntaron para el posterior procesamiento usando cuatro ciclos de desalado de dilución y concentración usando un dispositivo de flujo tangencial (TFF, Millipore, Pellicon 2, celulosa regenerada, equipado con tres casete de membrana de 0,1 m² cada uno, 300
25 kDa de corte). Se conectaron una entrada y salida a la primera botella de vidrio con las fracciones de cromatografía agrupadas. La fracción retenido final y la solución de lavado se filtraron sobre una membrana para dar una solución transparente e incolora que se desaló usando isopropanol, se secó por

congelación y se liofilizó a temperatura ambiente (a 1 mbar durante aproximadamente 5 días).

Se obtuvieron diferentes In vivo-JetPEI comerciales [que tenían un peso molecular promedio comprendido entre 8,3 y 22,5 kDa, y un índice de polidispersidad <1,5, determinado a partir del de PEOX (óxido de polietileno, precursor de la PEI) mediante cromatografía de permeación en gel (GPC:SOP GPC-0044) y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 µm] en PolyPlus (n.º de catálogo 201-50G). El proceso de 2 viales implica mezclar el contenido de un vial 1 que contenía moléculas de poli(I:C) (volumen de 1,0 ml o menos, cuando se pipetea rápido las soluciones, o hasta 5,5 ml, cuando se usa una jeringa) con un Vial 2 que contenía solución de PEI (volumen de 1,0 o menos ml, cuando se pipetea rápido las soluciones, o hasta 5,5 ml, cuando se usa una jeringa). Como alternativa, el contenido de Vial 1 se aspira con una jeringa (10 ml) y una aguja (G20-0.9 µm) y rápidamente se inyecta sobre la superficie del líquido en el Vial 2. A continuación, la preparación de BO-111 resultante se filtra a través de una membrana que tiene un tamaño de poro en el intervalo de 1-5 µm, asegurando la eliminación de las partículas más grandes y visibles. Se incluyó glucosa (o manitol) como excipiente en el Vial 1 para llegar a una concentración del 5 % (p/v) en la preparación final de BO-111 [es decir, dicha composición se forma añadiendo adicionalmente glucosa (o manitol) a una concentración de 5 % (peso/volumen total de dicha composición)]. La glucosa se ha utilizado ampliamente como un excipiente que promueve una osmolalidad aceptable de BO-111 (302 mOsm/Kg) sin comprometer las características funcionales o físico-químicas y evitar posibles efectos secundarios no deseados debido a la administración de manitol en altas concentraciones.

Se produjeron preparaciones de BO-111 distintas filtrando una o dos veces la solución de BO-111 inicial a través de una membrana de acetato de

celulosa de diferentes tamaños de poro (filtros de jeringa Minisart® NML, Sartorius) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Alternativamente, la preparación inicial de BO-111 se centrifugó durante 15 minutos a la velocidad indicada usando un rotor de ángulo fijo FA-45-24-1 1 para centrífugas 5415 D/5415 R (Eppendorf). El flujo a través de la filtración en membrana y el sobrenadante de centrifugación, respectivamente, se almacenaron hasta su uso a 4 °C a una concentración de poli(I:C) de 0,5 - 0,8 mg/ml, según lo determinado por UV. A continuación se vuelve a calcular la concentración de poli(I:C) antes de cada experimento, generando una muestra con la misma dosis para cada estado.

El tamaño de las moléculas de poli(I:C) en las preparaciones de BO-111 se determinó usando geles de agarosa y preparaciones de poli(I) y poli(I:C) no marcadas o marcadas con [³²P]. Brevemente, se cargaron 1 µg de poli(I) y poli(I:C) (PBS) en el gel de agarosa y se realizó la electroforesis durante 1 hora a 80 voltios en tampón TBE. Dependiendo de la distribución de tamaños de las moléculas de poli(C) y poli(I) iniciales, la distribución del tamaño de las moléculas de poli(I:C) que están presentes en las preparaciones de BO-111 se determinó como: <400 bases, 7-57% (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo, 15 % o 21 %); 400-850 bases, 20-45% (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo, 25 % o 27 %); 850-5000 bases, 20-70 % (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo 52 % o 53 %); >5000 bases, 0-9 % (con pruebas adicionales realizadas usando preparaciones que presentan, por ejemplo, 1 % o 0 %).

Tecnologías analíticas

El valor para el diámetro promedio zeta (promedio z) y el índice de polidispersidad de las partículas de JetPEI/poli(I:C) en distintas preparaciones de BO-111 (entre 0,5-0,8 mg/ml, para diluir para ensayos basados en células y

otros a una concentración de poli(I:C) de 1,0 µg/ml) se determinó usando Zetasizer Nano ZS de acuerdo con las instrucciones del fabricante y de acuerdo con la norma ISO 22412, en función de la suposición de que dichas partículas son esféricas. En general, la dispersión de luz dinámica (tecnología
 5 Nanosizer) se aplica utilizando el software v7.1 1.

Caracterización funcional de las preparaciones de BO-111

Las diferentes preparaciones de BO-111 se analizaron usando células de melanoma humano, células pancreáticas humanas o melanocitos humanos de acuerdo con la literatura que describe las propiedades de los complejos de BO-
 10 110 (Pozuelo-Rubio M et al., 2014; Tormo D et al., 2009; documento WO201 1003883). Brevemente, los ensayos de viabilidad celular se realizaron en células adherentes al menos 12 horas antes del tratamiento. El porcentaje de muerte celular en los tiempos indicados y las concentraciones de tratamiento se estimaron mediante ensayos de exclusión de azul tripán en células flotantes
 15 y adherentes que se agruparon, se tiñeron con una solución de azul tripán al 0,4 % (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EE. UU.) y se puntuaron con un microscopio óptico (se contó un mínimo de 100 -500 células por tratamiento). Cada preparación se analizó durante un período comprendido entre 12 horas y 48 horas y a concentraciones de moléculas de poli(I:C) en las diferentes
 20 preparaciones que estaban comprendidas entre 0,1 y 2,5 µg/ml.

Resultados

El proceso existente para la preparación de complejos de BO-110 como se describe en la literatura (Pozuelo-Rubio Met al., 2014; Tormo D et al., 2009; documento WO201 1003883) se ha establecido a escala de laboratorio y tiene
 25 algunas limitaciones importantes con respecto a los requisitos para la generación de materiales que pueden analizarse en una escala preclínica más amplia, y, después, para la evaluación clínica: concentración limitada (no superior a 0,05 mg/ml) y posibilidad limitada para aumentar la escala y, al

mismo tiempo, realizar el proceso de fabricación cumpliendo con las GMP. En particular, el proceso de fabricación debería permitir producir lotes de formulación que comprendan partículas que contengan poli(l: C) que tengan características físico-químicas (tales como esterilidad, distribución del tamaño de partícula, estabilidad, ausencia de partículas visibles y subvisibles, y concentración de al menos 0,5 mg/ml) lo más uniforme posible entre distintas preparaciones para evaluar correctamente sus efectos biológicos y uso médico en modelos preclínicos pertinentes y ensayos farmacoterapéuticos.

Una primera etapa para alcanzar estos objetivos fue sustituir la etapa de agregar gota a gota una solución de poli(l:C) a la solución de JetPEI (o de otro modo, como en las preparaciones iniciales de BO-110, documento WO201 1003883) e incubar la mezcla a temperatura ambiente. La velocidad de mezclado se identificó como un factor potencialmente importante, aunque no evaluado, para resolver el problema de fabricación. En este ámbito, se estableció un nuevo tipo de formulación de poli(l:C)-PEI, denominada BO-111, sustituyendo el enfoque de la mezcla a granel de soluciones para liofilizar y envasar en viales, con el objetivo de producir dos viales, cada uno de ellos con la cantidad deseada de moléculas de JetPEI y poli(l:C). El contenido de los dos viales se mezcla rápidamente mediante inyección (o por otros medios para mezclar rápidamente líquidos, tal como pipeteado rápido), teniendo las dos soluciones un volumen similar. La solución resultante tiene un volumen compatible con ensayos y usos posteriores (por ejemplo, una preparación de 1,2 ml de BO-111 a 0,5 mg/ml, que resulta de mezclar 2 soluciones, cada una de ellas con un volumen de 0,6 ml).

La jeringa y la aguja utilizadas para la mezcla generan suficiente turbulencia para promover la mezcla rápida y la formación rápida de partículas en preparaciones de BO-111, con partículas visibles limitadas (o ausentes). Los detalles técnicos específicos del proceso de fabricación de BO-111 pueden

adaptarse para proporcionar un mayor nivel de actividad, reproducibilidad, estabilidad y/u homogeneidad de las preparaciones de BO-111, por ejemplo, extrayendo sales, eliminando residuos de producción, filtrando las soluciones con filtros con tamaños de poro grandes (por ejemplo, en el intervalo de 1 a 5 μm), pipeteado rápido o agitación vorticial de las dos soluciones, seleccionando el tamaño/diámetro de la jeringa, añadiendo rápidamente solución de poli(l:C) a la solución JetPEI y no lo contrario, o liofilizando preparaciones usando compuestos como glucosa o manitol como excipiente.

Sin embargo, tales detalles difícilmente pueden transferirse de volúmenes pequeños para uso único o inmediato a preparaciones de mayor escala de formulaciones farmacéuticas compatibles con las GMP que se basan en JetPEI como vehículo y contienen moléculas de poli(l:C) a una concentración suficientemente alta (al menos 0,5 mg/ml) y concentraciones uniformes que son requeridas para probar dosis altas durante la evaluación farmaco-toxicológica u otra evaluación preclínica. Además, la etapa de mezclar componentes de BO-111 justo antes de la administración se deja en el las manos del técnico la buena calidad del material final, en particular con respecto a la formación de soluciones claras, no turbias que contienen partículas de BO-111 que tienen un intervalo de diámetro (tamaño) mayor, y no totalmente controlado.

En este contexto, el objetivo en la siguiente etapa fue evaluar diferentes medios y efectos de la estandarización del diámetro de la mezcla de partículas de BO-111. La preparación inicial de BO-111 que se obtuvo por el proceso de 2 viales de pipeteado rápido se usó para generar y comparar preparaciones alternativas en las que la concentración y/o tamaño del soluto, tal como complejos de BO-111, se alteran dentro de la solución mediante el uso de tecnologías comunes, tales como centrifugación a alta velocidad (por ejemplo, a más de 5000 rpm) y filtración (por ejemplo, con tamaño de poro en el intervalo de 1-5 μm o en un intervalo submicromolar).

Este análisis inicial muestra que, mediante la aplicación de cualquiera de las tecnologías, las preparaciones resultantes de BO-111 no solo presenta una reducción en el diámetro promedio de partícula de BO-111, sino también un sorprendente aumento de la citotoxicidad de estas preparaciones contra las células cancerosas que es proporcional al diámetro promedio disminuido de los complejos de BO-111 (Fig. 1A). Este mayor efecto anticanceroso también se confirmó en un estudio de respuesta a la dosis que muestra que la solución BO-11 de flujo continuo, obtenida por filtración de la solución inicial de BO-111 con el tamaño de poro submicromolar más grande, presenta un aumento ya importante de los efectos anticancerosos de los complejos de BO-111, especialmente a concentraciones bajas de de BO-111 (Fig. 1 B). Un incremento similar de la citotoxicidad también se confirma mediante el uso de preparaciones de BO-110 que se filtran a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,8 μm .

Otros criterios que pueden evaluarse son los relacionados con las características de jetPEI y la relación con respecto a las moléculas de poli(I:C). A nivel estructural, las preparaciones de jetPEI que incluye PEI lineal dentro de un intervalo de peso molecular promedio se analizaron usando el procedimiento de 2 viales. La comparación de la citotoxicidad de tales preparaciones de BO-111 (Fig. 2A) demostró que la PEI lineal de peso molecular más alto (por ejemplo, entre 17 y 23 kDa) proporcionan preparaciones de BO-111 anticancerosas que son más eficaces que las que incluyen PEI lineal que tiene un peso molecular más bajo (por ejemplo 8,3 kDa).

Además de definir un intervalo de tamaños de PEI lineal que son adecuados para la fabricación de BO-111 que tiene las propiedades anticancerosas deseadas, el efecto de la diferente proporción de concentración entre aminas de PEI y fosfato aniónico de las moléculas de poli(I:C) se ensayó

en el contexto de la fabricación de BO-111. El equilibrio iónico entre las moléculas de JetPEI y poli(I:C) puede proporcionar complejos que presentan diferentes niveles de interacciones con los componentes celulares (por ejemplo, para la entrada eficaz en la célula). Este equilibrio se calcula como la

5 relación N/P, que define el número de residuos de nitrógeno de JetPEI por fosfato de polirribonucleótido, un valor que, para los experimentos de liberación de polirribonucleótidos in vivo, se recomienda entre 6 y 8 (evitando los problemas de toxicidad más allá de 8, es decir 0,16 μ l de JetPEI por μ g de moléculas de poli(I:C) de doble cadena). Distintas preparaciones de BO-111

10 mostraron un efecto citotóxico de dosis-respuesta en células de melanoma y en melanocitos normales al aumentar dicha relación N/P de 1,8 a 5,2. De hecho, solo en un intervalo intermedio (alrededor de la relación N/P de 3), la citotoxicidad frente a las células de melanoma es muy superior a aquella contra melanocitos normales, estando afectada la viabilidad de las últimas células solo

15 marginalmente por esta preparación específica BO-111 cuando se compara las células no tratadas (Fig. 2B).

También se han analizado preparaciones de BO-111 para determinar el contenido de moléculas de poli(I:C) usando de poli(I:C) marcados o sin marcar. La preparación de lotes de poli(I:C) inicial comprende moléculas de poli(I:C) de

20 doble cadena que, en consecuencia a su fabricación y su hibridación, tienen una distribución de tamaño de hasta 5 kilobases de longitud (o más), con al menos 40 % o 50 % de tales de doble cadena con un tamaño mayor que 0,85 kb y al menos el 70 % de tales polirribonucleótidos de doble cadena con un tamaño comprendido entre 0,4 y 5 kb (en una preparación representativa, <400

25 pares de bases (pb): 21 %, 400-850 pb: 27 %, 850-5000 pb 52 %). Cuando las moléculas de poli(I:C) se asocian a JetPEI en complejos con preparaciones de BO-111 utilizando el proceso de 2 viales, la totalidad de moléculas de poli(I:C) se asocia con JetPEI, como se muestra mediante análisis en gel de agarosa

con preparaciones de BO-111 no marcadas o marcadas (Fig 3A y 3B.). Por electroforesis también se ha determinado que, en las preparaciones de BO-111 a una relación N/P por debajo de 3, las moléculas de poli(I:C) no están completamente asociadas con JetPEI, como se puede observar con una
 5 relación de N/P mayor (3 o superior; Fig. 3C). Por lo tanto, un proceso de fabricación adecuado permite la incorporación eficiente de moléculas de poli(I:C) con una distribución del tamaño amplia en preparaciones de BO-111 biológicamente funcionales sin añadir un procedimiento específico para eliminar las moléculas de poli(I:C) o JetPEI sin formar complejo.

10 Se evaluaron las características estructurales de BO-111 también mediante el uso de tecnologías para el establecimiento de la distribución del tamaño de partículas en el intervalo de submicrómetros cuando el proceso de fabricación se repite o se modifica o cuando las preparaciones de BO-111 se analizan para determinar su estabilidad. La reproducibilidad de este proceso de
 15 fabricación se demuestra dado que distintas preparaciones de BO-111 siempre están presentando una distribución monomodal del tamaño de partícula, con diámetros que se concentran en su mayoría alrededor de 100 nm, con mayor frecuencia entre 50 y 90 nm (diámetro promedio (d. nm) de 85-90 nm), con una gran mayoría de partículas que tienen un tamaño inferior a 100 nm, o 200 nm,
 20 pero no superior a 400 nm, pero habitualmente incluso no superior a 300 nm (Fig. 4A). Cuando esta preparación de BO-111 de referencia está expuesta a variaciones de temperatura o tiempo de incubación, la distribución del diámetro puede cambiar, pero todavía es monomodal, alcanzando un máximo entre 100 y 150 nm (diámetro promedio (d. nm) de 105-110 nm), con una gran mayoría
 25 de partículas todavía con un diámetro inferior a 300 nm y no superior a 600 nm (Fig. 4B y 4C). Las preparaciones de BO-111 correspondientes todavía presentan un nivel de citotoxicidad similar cuando se analizaron como se divulga para la Figura 1 y 2, lo que demuestra que este procedimiento de

mezcla puede proporcionar formulaciones consistentes con los requisitos para el desarrollo farmacéutico. Sin embargo, las modificaciones del proceso, tales como la reducción de la velocidad de mezclado o la no introducción de procedimientos de filtrado puede alterar la distribución del tamaño de los complejos de BO-111, convirtiéndose en bimodal, con un tamaño promedio (d.nm) mal controlado y mayor y una gran mayoría de partículas superiores a 500 nm (Fig. 4D).

Estos experimentos muestran que el proceso de fabricación y formulación del complejo nombrado BO-110 se puede mejorar mediante la aplicación de una mezcla rápida y controlada de componentes a pequeña escala antes de su uso, lo que lleva a una preparación basada en poli(I:C) más uniforme, concentrada y eficaz denominada BO-111. Sin embargo, se necesitan mejoras adicionales para generar preparaciones que presenten preparaciones que cumplen totalmente con las GMP para características de mayor estabilidad y eficacia independientemente de un procedimiento que se ha establecido justo antes de uso médico. En particular, el método de "pipeteado rápido" u otras variaciones del proceso de 2 viales todavía pueden proporcionar una cantidad considerable de partículas que tienen un diámetro superior a 200 nm (hasta 1 μ m o varios micrómetros). La etapa de filtración adicional (y posiblemente solo parcialmente eficaz) que sería necesaria con el fin de proporcionar las preparaciones de BO-111 estériles y concentradas deseadas (que presenten complejos funcionales de un diámetro menor, uniforme y distribuido más estrechamente alrededor de 100 nm) puede tener la consecuencia de la pérdida de una gran cantidad de material que queda retenido en el filtro de membrana. Por tanto, aunque el enfoque inicial ha permitido establecer preparaciones de BO-111 a pequeña escala con una relación inversa entre el diámetro del complejo de BO-111 y su actividad terapéutica, se necesitan más mejoras técnicas para el establecimiento y la mezcla de moléculas de poli(I:C) y

soluciones de jetPEI de una manera que sea conveniente para la fabricación a granel de formulaciones farmacéuticas estables que cumplan las GMP que comprenden complejos basados en poli(I:C) con una distribución del tamaño estrecha y controlada que se puede usar después para producir varios viales, cada uno de ellos con características controladas y comparables [tal como el contenido de poli(I:C), estabilidad del complejo y las actividades biológicas de las formulaciones].

Ejemplo 2: Proceso de 1 vial para la producción de preparaciones de BO-11X conforme a las condiciones de las GMP (formulación de BO-112)

10 **Materiales y métodos**

Fabricación de preparaciones de BO-112 (proceso de 1 vial)

Se producen preparaciones de poli(I:C) como soluciones que tienen la concentración, la distribución del tamaño de molécula, y de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. No obstante, se obtuvo un lote de poli(I:C) para el siguiente proceso de ejemplo: la solución de poli(C) se calentó a 61 a 66 °C durante 1,5 horas antes de mezclar esta con la solución de poli(I) y agitar a 55 a 58 °C durante 70 minutos, después de lo cual la mezcla se enfrió y se filtró a través de una membrana de 0,2 µm. Algunas condiciones aplicables a la etapa de cromatografía y/o filtración, ausencia o presencia de una etapa de congelación, junto con tampón y tiempo de hibridación, se adaptaron para reducir aún más la viscosidad en solución o precipitación de complejos. Como excipiente en la formulación final se usa manitol o glucosa. La solución 1 que contiene JetPEI se obtiene usando JetPEI en una preparación líquida concentrada o preparaciones a granel sólidas solubilizantes de JetPEI (que tienen un peso molecular comprendido entre 17 y 23 kDa) en una cantidad de agua estéril para inyectables para llegar a 150 mM, y mezclando para obtener una solución homogénea. Se realiza una etapa de dilución adicional para alcanzar una concentración de 11,25 mM, antes de la dilución final a 5,62 mM

en el vial final. La solución 2 contiene moléculas de poli(I:C) y monohidrato de glucosa en una cantidad que, después de mezclar con JetPEI, proporciona una solución formada por la adición de 5 % de glucosa (peso/volumen total de dicha composición) y poli(I:C) a 0,5-0,7 mg/ml del volumen total de dicha
 5 composición, de modo que se forman dichos complejos de poli(I:C) con dicha JetPEI, que dan como resultado una composición de BO-112 que tiene de 10^8 a 10^{10} partículas en solución por vial.

Solución 1 y 2 se esterilizan de forma independiente usando una doble filtración a través de filtros de 0,2 μm (Sartopore[®] 2150 0,2 μm , validados
 10 completamente como filtros de calidad para esterilización (conforme a la norma ASTM F-838-05) usando una bomba Watson Marlon (velocidad 30 rpm). La mezcla automática de las dos soluciones se realiza en cada vial utilizando un proceso secuencial: (i) Se añade la solución 1 al vial con una bomba Watson-Marlow para dosificar de 5,95 a 6,05 g (6 ml; densidad: 1 g/ml), (ii) la solución 2
 15 se añade sobre la solución 1 usando un tubo de 1,8 mm de diámetro interno conectado a una aguja G20-0,9 μm usando una bomba Flexicon a una velocidad de 550 rpm para dosificar 6,08-6,40 g (6 ml). Los resultados se pueden mejorar utilizando un mezclador de piezas en T. En el caso de agregados de partículas (por ejemplo, con un tamaño en el intervalo de 1-100
 20 μm o mayor) que pueden estar todavía presentes por inspección visual al final del proceso de fabricación (o durante su almacenamiento) debido a interacciones electrostáticas, el producto puede filtrarse sobre un filtro de 0,8 μm antes de su uso (por ejemplo, antes de su inyección), sin alterar por ello las propiedades biológicas ni la distribución del diámetro monomodal de las
 25 partículas dentro de la composición. Por ejemplo, la formulación de BO-112 puede filtrarse a través de un filtro de jeringa Minisart (Sartorius) con un tamaño de exclusión de 0,8 μm . Los viales se sellan con tapones de goma estériles libres de pirógenos y se engarzan con cápsulas de aluminio y se

etiquetan individualmente.

Formulaciones que contienen poli(I: C) comercialmente disponibles

Poli-ICLC es una preparación de poli(I:C) que se estabiliza con polilisina y carboximetilcelulosa (Ewel C et al., 1992; documento WO2005102278). LyoVec-
 5 HMW (n.º cat. tlrI-piclv) y LyoVec-LMW (n.º cat tlrI-picwlv), y preparaciones de poli(I:C) correspondientes con un peso molecular alto (HMW; Cat. Name tlrI-pic) y de peso molecular bajo (LMW; Cat. Name tlrI-picw) están disponibles en Invivogen.

Pruebas analíticas

10 El análisis del diámetro y la distribución de BO-112 se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1 usando un equipo estándar de Dispersión de Luz Dinámica.

Resultados

La definición de preparación de BO-11X se aplica a las composiciones farmacéuticas que se obtienen mezclando apropiadamente una solución que
 15 contiene un polímero como PEI con una solución que contiene moléculas de poli (I:C) para generar complejos que tienen un intervalo de diámetro de partícula pequeño y estrechamente distribuido (como se define por un diámetro promedio Z que alcanza un máximo entre 50 y 100 nm y que no supera 300 nm, o incluso 200 nm, como se muestra en el Ejemplo 1). Si las preparaciones
 20 de BO-111 resultan de una etapa de mezclado que se realiza manualmente justo antes del uso posterior (es decir, "proceso de 2 viales"), se han tenido en cuenta los requisitos relacionados con las GMP y otros requisitos industriales (por ejemplo, para automatizar el proceso) para establecer un "proceso de 1 vial" que proporcione una formulación de BO-11X que cumpla con las
 25 especificaciones farmacéuticas requeridas y lista para ser inyectada. En este ámbito, las dos soluciones se preparan por separado (y, en el caso de una solución poli(I:C), que incluye también uno o más excipientes) y se esterilizan mediante filtración antes de mezclarlas en un sistema automatizado en el que

se controlan la velocidad y el tiempo de mezclado y mantenido para cada vial.

La Figura 5A proporciona una visión general de tal proceso para generar un primer tipo de preparaciones de BO-11X que se denomina formulaciones de BO-112 en las que la sustancia farmacológica (es decir, moléculas de poli(I:C) de doble cadena que se generan mediante la hibridación de moléculas de poli(I) y de poli(C) de cadena sencilla) se mezclan primero con un excipiente como la glucosa en una solución que se esteriliza por filtración, por separado de la solución que contiene un polímero que tiene la función de vehículo (es decir, JetPEI). A continuación, estas dos preparaciones a granel se mezclan apropiadamente en cada vial para generar un gran número de formulaciones farmacéuticas comparables estructural y funcionalmente que se requieren para estudios farmacotoxicológicos y aplicaciones clínicas.

Este enfoque aprovecha los hallazgos descritos en el Ejemplo 1 y puede automatizarse para proporcionar preparaciones de BO-112 con características incluso más uniformes. Este procedimiento de mezcla permite no solo incorporar todas las moléculas de glucosa, JetPEI y poli(I:C) disponibles en los complejos dentro de las preparaciones de BO-112 (Fig. 5B) sino también modular el diámetro promedio y la distribución del diámetro monomodal de los complejos dentro de las preparaciones BO-112, de modo que el promedio Z se puede modular entre 30 y 150 nm (figura 5C). Las preparaciones de BO-112 resultantes presentan complejos de BO-112 que tienen una distribución de diámetro monomodal, sin partículas visibles incluso si la solución final no se filtra a través de 5 μm después de mezclar las soluciones 1 y 2. Las condiciones de mezcla pueden adaptarse, en particular modificando la velocidad de mezcla entre 50 rpm y 600 rpm y/o la velocidad de flujo para una solución de poli(I:C) o de JetPEI entre 1 ml/min y 50 ml/min.

En general, las preparaciones de BO-11X (y en particular las preparaciones de BO-112) presentan las siguientes características principales:

partículas incoloras, no visibles, una osmolaridad comprendida entre 260 y 340 mOsm/kg, un pH comprendido entre 2,7 y 3,4, una rotación óptica entre + 1500 y +3750, un potencial zeta igual o superior a 30 mV, una distribución de diámetro monomodal de partícula con diámetro promedio Z (nm) entre 30 y 150 nm, pero, preferentemente, entre 60 nm y 130 nm, y que comprende moléculas de poli(I:C), en las que al menos el 40 % o el 50 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena con un tamaño superior a 0,85 Kb y al menos el 70 % de dichos polirribonucleótidos de doble cadena tienen un tamaño comprendido entre 0,4 y 5 Kb. Las características tales como la distribución del diámetro de las partículas pueden modificarse utilizando una mezcladora de pieza en T en combinación con una velocidad de flujo diferente para la solución 1 y la solución 2. Cuando dicha velocidad es superior a 20 ml/min (por ejemplo, 30 ml/min), la turbidez de la preparación de BO-112 resultante se reduce en paralelo con la reducción del diámetro de partícula promedio Z y la distribución del diámetro alrededor de este valor, mientras se mantiene la monomodalidad, posiblemente debido al cambio en el régimen de flujo.

La preparación de ejemplo de BO-112 presenta una composición similar a BO-111 (formada con 6,924 mg de poli(I:C), 5,625 mM de JetPEI, 5 % de glucosa), pero cada vial comprende partículas que tienen un diámetro promedio Z de entre 45 +/- 5 nm y 81 +/- 5 nm (por ejemplo, 73 +/- 5 nm), con al menos un 50 % de partículas menores de 85 +/- 20 nm, potencial zeta de 38 mV y pH 3,1. Estas propiedades estructurales que se mantienen después del ciclo de congelación/descongelación a -20 °C o una exposición extensa a temperatura ambiente pueden modificarse en lotes distintos, manteniendo los criterios de aceptación dentro de intervalos de valores específicos (por ejemplo, las formulaciones de BO-112 pueden presentar un diámetro promedio z de 100 +/- 50 nm (por ejemplo, 89 nm), con un potencial z comprendido entre

aproximadamente 40 y 45 mV (por ejemplo, 43 mV). Estos valores pueden modificarse después de la crioconservación, pero aún pueden permanecer dentro de estos intervalos.

Al menos algunos de dichos criterios de reproducibilidad y aceptación se pueden comparar con los de otras formulaciones que contienen poli(I:C) para las que se conoce actividad anticancerosa. En el nivel del tamaño de las moléculas de poli(I:C), las moléculas de poli(I:C) que se incluyen en el Lyovec-HMW y Lyovec-LMW comerciales cubren intervalos de tamaño que son claramente distintos de los del proceso de fabricación BO-11X, que en realidad se utiliza (con HMW casi por completo por encima de 0,85 kb y LMW casi por completo por debajo de 0,85 kb; Fig. 6A). Esta diferencia de tamaño en las moléculas de poli(I:C) puede depender de los diferentes procesos de fabricación y/o vehículos que están asociados en los complejos con moléculas de poli(I:C). Los valores promedio Z de complejos dentro de complejos basados en poli(I:C) dentro de poli-ICLC (que comprende polilisina y carboximetilcelulosa) y LyoVec-HMW/LyoVec-LMW (según el fabricante, que comprende los reactivos de transfección basados en lípidos catiónicos cloruro de di-tetradecilfosforilo-N,N,N-trimetilmetanaminio o DTCPTA y el lípido neutro 1,2-dipfitanoil-sn-Glicero-3-fosfoetanolamina, o DiPPE) se compararon con una de las formulaciones de BO-112, de modo que se mostró que estas formulaciones comerciales contenían complejos que eran mucho más grandes (en gran mayoría mayores de 200 nm) y, al menos para Lyovec-LMW, con una distribución bimodal (figura 6B).

Si este análisis se realiza después de un ciclo de congelación/descongelación, estas preparaciones comerciales también parecen menos estables, con una variabilidad no observada para BO-112 (Fig. 7A-D). De hecho, si la formulación de BO-112 tiene un diámetro promedio Z (d.nm) de 100 +/- 50 nm (por ejemplo, 82,5 nm), y sin exceder los 400 nm, como en las

formulaciones de BO-111 (véase la Fig. 4 y Fig. 6B), formulaciones de Poli-
ICLC basadas en LyoVec que tienen un valor promedio Z muy por encima de
300 nm, lo que confirma que se proporcionan poli(I:C) comercialmente
disponibles como preparaciones que son heterogéneas en su composición o
5 incluyen partículas grandes que están mal caracterizado funcionalmente y cuyo
tamaño se modifica durante un ciclo de congelación/descongelación.

La hipercromicidad también se puede usar para evaluar la formulación de
BO-112 y, en particular, la estabilidad de las moléculas de poli(I:C) de doble
cadena dentro de las partículas como consecuencia de los cambios en la
10 temperatura (u otra condición) que determina la separación entre cadenas de
poli(I) y cadenas de poli(C). La formulación de BO-112 mostró un efecto
hipercromático muy bajo con diferencias en la transmitancia a 260 nm por
debajo de 0,2 o 0,1. La estabilidad de los viales de BO-11X congelados a -20
°C para diferentes tiempos también se ha evaluado y confirmado.

15 La filtración, liofilización y congelación de la formulación de BO-112 antes
de la administración no promueve modificaciones sustanciales a las
propiedades citotóxicas, la estabilidad o las características estructurales de las
partículas dentro de la composición con respecto a la formulación original de
BO-112. Por ejemplo, las composiciones mantienen D90 % por debajo de 250
20 nm, el potencial zeta entre 40 mV y 50 mV, el diámetro hidrodinámico con un
promedio Z entre 30 y 150 nm, la compatibilidad con el uso de glucosa como
excipiente, valores de polidispersidad comprendidos entre 0,1 y 0,6, y otros
criterios aplicables de la Farmacopea Europea).

Por lo tanto, Preparaciones de BO-11X, tales como preparaciones de BO-
25 112, son formulaciones que presentan el alto nivel de estabilidad y
reproducibilidad para las partículas formadas por complejos de poli(I:C)-JetPEI
que tienen un diámetro promedio Z (d.nm) por debajo de 200 nm (cuando no
por debajo de 100 nm) que no se observó para las formulaciones de poli(I:C)

que se basan en otros vehículos y métodos de fabricación.

Ejemplo 3: Caracterización funcional de las preparaciones de BO-11X en modelos basados en células

Materiales y métodos

5 *Formulaciones de poli(l:C)*

Las preparaciones de poli(l C) se han obtenido como se describe en el Ejemplo 2.

Análisis de la viabilidad celular

La línea celular de melanoma humano SK-MEL-103 y la línea celular de
10 cáncer pancreático humano PANC 02,03 se han utilizado como se divulga en el Ejemplo 1 y la bibliografía que se cita en el presente documento, utilizando las formulaciones de el poli(l:C) a concentraciones que contienen moléculas de poli(l:C) en un intervalo entre 0,3 y 2,5 g/ml (siendo 0,85 mg/ml el valor de referencia más relevante) y la exposición de las células durante un período
15 comprendido entre 12 y 48 horas.

La actividad inductora de muerte de BO-112 se ensayó en melanocitos normales y líneas celulares de melanoma y glioblastoma y se comparó con componentes aislados, es decir, moléculas de poli(l:C) y PEI lineal (Jet PEI; Polyplus). Se aislaron melanocitos normales de prepucios de donantes
20 asintomáticos. Las células de melanoma SK-MEL-28, SK-Mel-103, y UACC62 (con mutaciones en p53, NRAS y BRAF respectivamente) se obtuvieron de colecciones establecidas en la ATCC o el Memorial Sloan Kettering Cancer Center (EE.UU.) y fueron objeto de perfilado de repetición en tándem corta (STR) (GenePrint® 10 System) para la autenticación de la línea celular. Las
25 células se sembraron en placas de 96 pocillos (6000 células/pocillo). En triplicado por experimento, con poli(l:C) solamente, formulaciones de BO-110 o BO-112 a 0,5 o 1 µg/ml para un tratamiento de 24 h o 40 h.

Resultados

Los ejemplos 1 y 2 muestran los datos experimentales sobre el desarrollo inicial y la caracterización de las formulaciones de BO-11X, lo que lleva a un aumento de la citotoxicidad de las formulaciones de BO-11X contra las células cancerosas en comparación con BO-110. Estos datos se pueden integrar
5 adicionalmente mediante la comparación de del proceso de fabricación de BO-11X y las preparaciones que contienen poli(I:C) resultantes con los procesos y preparaciones que se describen en la literatura.

En el ejemplo 2 se ha demostrado que Lyovec-HMW y Lyovec- LMW comerciales tienen una distribución sustancialmente diferente. Sin embargo, se
10 puede evaluar en qué medida el diferente tamaño de las moléculas de poli(I:C) en las correspondientes preparaciones de HMW y LMW de poli(I:C) también pueden afectar a la actividad de los complejos generados usando el proceso de fabricación de BO-11X y poli(I:C) HMW y LMW. Si la actividad citotóxica de la formulación de BO-112 se compara con formulaciones comerciales, estas
15 últimas parecen mucho menos eficaces en la destrucción de las células de cáncer en al menos dos modelos *in vitro* (Fig. 8A y B). La actividad citotóxica de BO-11X se puede medir en diferentes tipos de líneas celulares de cáncer, representativas de diferentes indicaciones clínicas de cáncer, para evaluar qué indicaciones de cáncer se tratan de manera más eficiente con BO-11X . Estos
20 efectos también se pueden estudiar midiendo la expresión y/o secreción de proteínas que se sabe que modifican, y posiblemente mejoran, la respuesta celular contra las células cancerosas. Por ejemplo, una formulación de BO-112 induce, con mucha más eficiencia que el poli-ICLC, la expresión de interferón-beta en una línea celular de melanoma durante un período de al menos 24
25 horas (Fig. 8C). Esta evidencia *in vitro* se puede utilizar para evaluar no solo qué tipos de cáncer se pueden tratar de manera más eficiente mediante la administración de una formulación de BO-11X, sino también para la evaluación de qué otros tratamientos para el cáncer (tales como vacunas, adyuvantes,

anticuerpos, fármacos quimioterapéuticos, radioterapia, inmunoterapia, o inhibidores de las actividades enzimáticas tales como quinasas) puede actuar de una manera más eficaz cuando se administra en combinación con una formulación de BO-11X (por ejemplo, reduciendo la dosis, la frecuencia y/o el periodo de tratamiento con este otro enfoque).

De hecho, la especificidad de tales efectos citotóxicos contra líneas celulares de cáncer y no contra células primarias normales, mediante formulaciones de BO-11X (como se ha descrito previamente para las formulaciones de BO-110 a escala de laboratorio; Tormo D et al, 2009) se confirmó *in vitro* mediante la comparación de las actividades con compuestos apropiados y controles de células (fig. 9). Ni PEI_L lineal ni las moléculas de poli(I:C) individualmente afectan de manera significativa a la viabilidad de las células tumorales (melanoma o glioma). Solo cuando las moléculas de PEI lineal y poli(I:C) forman complejos, se observa una destrucción significativa de las células tumorales, sin afectar a la viabilidad de los melanocitos normales. Se han usado enfoques similares basados en células para la validación de la formulación de BO-11X y de BO-112 en particular, que han sido expuestas a filtración, liofilización, y/o congelación, confirmando que los efectos citotóxicos se mantienen cualitativa y cuantitativamente en las preparaciones de BO-112 después de tales procesos. Se pueden realizar análisis más profundos de estos datos *in vitro* para guiar el desarrollo clínico utilizando diferentes modelos pre-clínicos que implican la producción y la comparación de diferentes formulaciones de BO-11X, diferentes regímenes de administración, y/o afecciones asociadas a una enfermedad tal como el cáncer.

Ejemplo 4: Caracterización funcional de las preparaciones de BO-11X en modelos animales

Materiales y métodos

Formulaciones de BO-11X y otros compuestos

Las formulaciones de BO-112 se han obtenido como se divulga en el Ejemplo 2 y se diluyeron con una solución de PBS al 5 % de glucosa (vehículo; ref: BE14-516F, Lonza, Francia) en tres concentraciones diferentes de acuerdo con una cantidad de dosificación por kilo de peso corporal del animal de, respectivamente, 0,05 mg/kg, 0,5 mg/kg y 2,5 mg/kg.

Se eligió el anticuerpo anti-PD-L1 murino (InVivoPlus, clon 10F.9G2) como compuesto de inmunoterapia de combinación. Cada día de la inyección a los ratones, el anticuerpo anti-PD-1 se diluyó con vehículo a concentraciones finales de 1,5 mg/ml.

10 Resultados

Se investigó la eficacia anticancerosa *in vivo* de la formulación de BO-112 en una cepa de ratón inmunocompetente al que se le implantaron células de melanoma de ratón. Se trató a los ratones con una solución de PBS o una formulación de BO-112 a tres concentraciones diferentes (0,05, 0,5, o 2,5 mg/kg, administradas preferentemente por vía intratumoral), en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 murino (administrado preferentemente por vía intravenosa) y se comparó con el vehículo solo a lo largo de 3 semanas (Fig. 10A). El anticuerpo anti-PD-L1 en combinación con el vehículo no aumentó significativamente la supervivencia en comparación con vehículo solo. Las tres combinaciones de las formulaciones de BO-112 analizadas con anticuerpo anti-PD-L1 (y posiblemente forman independientemente tal anticuerpo) aumentaron significativamente la supervivencia de los ratones en comparación con el vehículo o anti-PD-L1 de forma individual. Además, la supervivencia aumentó significativamente en la combinación de 2,5 mg/kg de la formulación de BO-112 + anti-PD-L1 en comparación con las dosis más bajas de Formulación de BO-112. Estos resultados correlacionaron con tamaños de tumor medidos en estos grupos.

El anticuerpo anti-PD-L1 es un fármaco anticanceroso importante y

validado y mediador de una respuesta inmune eficaz contra las células cancerosas. El experimento de los inventores demuestra que los complejos de BO-11X se pueden usar en combinación con otros agentes anticancerosos y que la combinación de compuestos de BO-11X con otros agentes anticancerosos, tales como anti-PD1, tiene una potencia superior a la del agente anticanceroso solo, dando lugar a un aumento significativo de la supervivencia y la eficacia antitumoral. Por otra parte, la mejora en la supervivencia se correlaciona con un aumento de la dosis de formulación de BO-11X a la combinación, lo que apoya que el beneficio añadido en la supervivencia está mediado a través de la formulación de BO-11X.

Por lo tanto, se pueden usar formulaciones de BO-11X (solas o en combinación con otros agentes anticancerosos, tales como anticuerpos, la inmunoterapia o quimioterapia, que se pueden administrar usando la misma vía o una diferente) en el tratamiento del melanoma y otras indicaciones de cáncer, en particular las que permiten la inyección peritumoral o intratumoral, tal como cáncer pancreático, de endometrio, de ovario, o cáncer colorrectal. En este ámbito, la identificación de vías biológicas y mecanismos de acción específicos puede guiar a las dosis más adecuadas, los regímenes, la combinación con otros fármacos o terapias, y las indicaciones para formulaciones de BO-11X, como se muestra para los efectos combinados de anticuerpos monoclonales inmunomoduladores dirigidos a PD -1 o CD137 y poli(I:C) que potencian las actividades de las células dendríticas (Sánchez-Paulete AR et al, 2015). Con este fin, Duewell P et al., 2015 divulgan un modelo animal alternativo de enfermedad que se puede usar para analizar la composición de la presente invención.

El efecto terapéutico de B011X sobre el crecimiento tumoral (localmente y/o en lugares distales) y la respuesta inmunitaria antitumoral se pueden medir mediante la realización de estudios *in vivo* sobre la administración intratumoral

(i.t.) a través de en un intervalo de concentración de moléculas de poli(I:C) (tales como 0,5, 1, 2, 2,5, o 5 mg/kg) para evaluar cómo tal tratamiento mejora la supervivencia del ratón en un modelo relevante, tal como un modelo de melanoma de ratón, con o sin coadministración de un fármaco adicional o una
 5 vacuna. Al mismo tiempo, los estudios de dosis-respuesta sobre las actividades biológicas específicas inducidas por tratamiento con BO-11X puede evaluarse en paralelo ex vivo, utilizando muestras de humanos o animales en el nivel de inducción de apoptosis (mediante el brillo relacionado con la caspasa), secreción de quimiocinas/citocinas en el líquido biológico (por ejemplo, la
 10 secreción de IL-6 e IP-10), en la activación y/o proliferación celular *in vitro* (por ejemplo, asociada a la regulación por incremento de CD40, CD86, CD69 en tipos de células relevantes). Estos estudios se pueden realizar usando células que están directamente involucradas en la enfermedad (por ejemplo, células tumorales, células epiteliales, endoteliales o epiteliales) o implicadas
 15 indirectamente, realizando algunas actividades inmunitarias o inmunorreguladores (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica humana, células NK, células B, células T CD4+/CD8+, células dendríticas). Estos estudios se pueden asociar además a la identificación de moléculas que puede usarse como biomarcador para predecir la respuesta a BO-11X (o falta
 20 de la misma) con el fin de estratificar etapas de la enfermedad y/o poblaciones de pacientes para tratamiento con BO-11X.

REFERENCIAS

- Ammi R et al. , 2015. Pharmacol. Ther. ; 146: 1 20-31 .
- Amos SM et al. ,201 1 . Cancer Immunol. Immunother. ; 60: 671 -83.
- 25 Bald T et al. , 2014. Cancer Discov.; 4: 674-87.
- Bhoopathi P et al., 2014. Cancer Res. ; 74: 6224-35.
- Bilensoy E, 2010. Expert Opin. Drug Deliv. ; 7: 795-809.
- Chen L et al. , 2013. Int. J. Nanomed. ; 8: 137-145.

- Chiba Y et al. , 2013. PLoSOne. ; 8: e76159.
- Cho K. et al. , 2016, Immunobiology. pii: S0171 -2985(16)30359-X. doi: 10.1016/j.imbio.2016.08.012.
- Cobaleda-Siles M et al., 2014. Small. ; 10: 5054-67.
- 5 Duewell P et al. , 2015., OncoImmunol. ; 4(10): e 1029698.
- Ewel C et al., 1992. Cancer Res. ; 52: 3005-10.
- Fujimura T et al., 2006. Eur. J. Immunol. ; 36: 3371 -80.
- Galluzzi L et al. , 2014. Oncotarget; 5: 12472-508.
- Garcia-Pascual C and Gomez R, 2013. J. Endometr.; 5(suppl.1):S13 (SP-
10 04).
- Germershaus O and Nultsch K, 2015. Asi J Pharm Sci. 10: 159-175.
- Gupta S et al. 2016. Tumor Biol. 37: 12089 - 12102.
- Hafner A et al. , 2013. Advanced Drug Delivery Rev. ; 65 (10): 1386-1399.
- Ho V et al. ,2015. Oncotarget. 6: 27252 - 27266).
- 15 Islam M et al. , 2014. Journal of Controlled Release; 193: 74-89.
- Kabilova T et al., 2014. BMC Cancer.; 14: 338.
- Keir M et al. , 2008. Annu. Rev. Immunol. ; 26: 677-704.
- Kubler K et al., 201 1 . Eur. J. Immunol. ; 41 : 3028-39.
- Kurosaki T et al. , 2009. Biomaterials,30: 2846-2853.
- 20 Le U et al., 2008. Cane. Biol. Ther.; 7: 440-447.
- Le U et al., 2009. Radiother. Oncol.; 90: 273-279.
- Levitzki A, 2012. Front. Oncol.; 2: 4.
- Matijevic T et al., 201 1. Chemotherapy; 57: 460-7.
- McBain S et al., 2007. J. Mater. Chem.; 17: 2561 -2565.
- 25 Nagato T and Celis E, 2014. Oncoimmunology; 3: e28440.
- Ohashi T et al., 2013. Int. J. Cancer; 133: 1 107-18.
- Palchetti S et al., 2013. RSC Adv.; 3: 24597-24604.
- Perrot I et al., 2010. J. Immunol. 185:2080-2088.

Pozuelo-Rubio M et al., 2014. Nano-Oncologicals in Adv. Del. Sci. Tech., Springer, pp. 453-470.

Saheki A et al., 201 1. Int. J. Pharm.; 406: 1 17-21.

Sajadian A et al., 2014. Arch. Virol.; 159: 1951-1960.

5 Sanchez-Paulete AR et al., 2015. Cancer Discov.; pii: CD-15-0510.

Schaffert D et al., 201 1 . Pharm. Res., 28: 731-741.

Shabani M et al., 2010. Avicenna J. Med. Biotech.; 2: 123-130.

Storz U, 201 1. MAbs.; 3: 310-7.

Szabo A et al., 2012. Melanoma Res.; 22: 351-361.

10 Taura M et al., 2010. Cancer Sci.; 101 : 1610-7.

Tormo D et al., 2009. Cancer Cell; 16: 103-1 14.

Tutin-Moeavin I et al., 2015.Org & Biomol Chem. 13: 9005-901 1.

Vacchelli E et al., 2013. Oncoimmunology; 2: e25396, e23510, e25595.

Van der Jeught K et al., 2015. Oncotarget; 6: 1359-81.

15 Vega-Letter A et al., 2016. Stem Cell Res. & Ther. 7: 150

Yoshino H and Kashiwakura I, 2013. Blood; 122: 4721.

Yu L et al., 2016. Immunol Cell Biol. 94:875-885.

Zhang Y et al., 2014.Cancer Lett. 355: 76-84.

Zhou Y et al., 2013. Innate Immun.; 19: 184-192.

20 WO2004045491.

WO2005102278.

WO201 1003883.

Remington's Pharmaceutical Sciences (editado por Allen, Lloyd V., Jr; 22^a edición, 2012.

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende una o más partículas, en la que

5 (a) cada partícula comprende un complejo de al menos un polirribonucleótido de doble cadena, o una sal o un solvato del mismo, y al menos una polialquilenimina, o una sal y/o un solvato de la misma, en donde

(i) el polirribonucleótido de doble cadena es ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)],

10 en donde al menos el 60 % de los polirribonucleótidos de doble cadena tienen al menos 850 pares de bases, al menos el 70 % de los polirribonucleótidos de doble cadena tienen entre 400 y 5000 pares de bases y entre el 20 % y el 45 % de los polirribonucleótidos de doble cadena tienen entre 400 y 850 pares de bases; y

15 (ii) la polialquilenimina comprende al menos un 95 % de polietileniminas lineales,

en donde el peso molecular promedio de la polialquilenimina lineal está entre 17 y 23 kDa y el índice de polidispersidad es <1,5 y

20 en donde la relación del número de moles de nitrógeno de la polialquilenimina y el número de moles de fósforo del polirribonucleótido de doble cadena en la composición está entre 2,5 y 5,5; y

(b) las partículas tienen un diámetro promedio z medido según la norma ISO 22412 de entre 30 nm y 150 nm.

25

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos el 99 % de las partículas tienen una distribución de diámetro monomodal por debajo de 600 nm.
- 5 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición tiene un potencial zeta de entre 35 y 50 mV.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la polialquilenimina lineal es una homo-polialquilenimina o una
10 hetero-polialquilenimina solubles en agua.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición de polirribonucleótido contiene ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] a una concentración de al menos 0,5 mg/ml.
15
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende además
- (a) al menos un vehículo, un disolvente orgánico, un excipiente y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptables; y/o
- 20 (b) al menos un compuesto seleccionado de un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico, un ácido nucleico, un aptámero, un péptido y una proteína.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la
25 composición comprende además glucosa o manitol en una concentración de

entre el 1 y el 10 % en peso/volumen de la composición.

8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende además:

- 5 (a) un pH de entre 2 y 4; y/o
(b) una osmolaridad de entre 200 y 600 mOsm/kg.

9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición se forma haciendo el complejo de al
10 menos 0,5 mg de ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] por ml del volumen total de la composición.

10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición se forma añadiendo adicionalmente
15 glucosa o manitol en una concentración de entre el 1 y el 10 % en peso/volumen de la composición.

11. Una composición obtenida mediante liofilización de la composición acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20

12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como un medicamento, opcionalmente en donde el medicamento es una composición acuosa inyectable, que comprende opcionalmente además un vehículo, un excipiente y/o un adyuvante
25 farmacéuticamente aceptables.

13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno del crecimiento celular caracterizado por un crecimiento anormal de células humanas o animales, en donde el trastorno de crecimiento celular es cáncer o un trastorno ginecológico
5 caracterizado por un crecimiento anormal de células de los órganos reproductores de mamíferos hembra.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición se administra mediante inyección intratumoral o
10 peritumoral o mediante inyección en la piel o en un órgano o un tejido internos.
15. Un proceso para fabricar la composición acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:
- (a) proporcionar (i) una solución acuosa de al menos un polirribonucleótido
15 de doble cadena, o una sal o un solvato del mismo, y (ii) una solución acuosa de al menos una polialquilenimina lineal, o una sal o un solvato de la misma, en donde una o ambas soluciones opcionalmente comprenden además un vehículo, un disolvente orgánico, un excipiente y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptables;
- 20 (b) filtrar cada solución acuosa respectiva de la etapa (a) de forma independiente a través de un filtro que tiene un diámetro de poro de menos de o igual a 500 nm para formar una solución esterilizada respectiva; y
- (c) mezclar cada solución esterilizada respectiva resultante en una cámara de mezclado para formar la composición acuosa de la reivindicación 1
25 mediante la adición simultánea de cada solución esterilizada respectiva a la

cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad mayor o igual a 1 ml/min, o mediante la adición secuencial de una solución esterilizada a la otra solución esterilizada en la cámara de mezclado, opcionalmente mediante inyección, a una velocidad mayor o igual a 1 ml/min; y opcionalmente

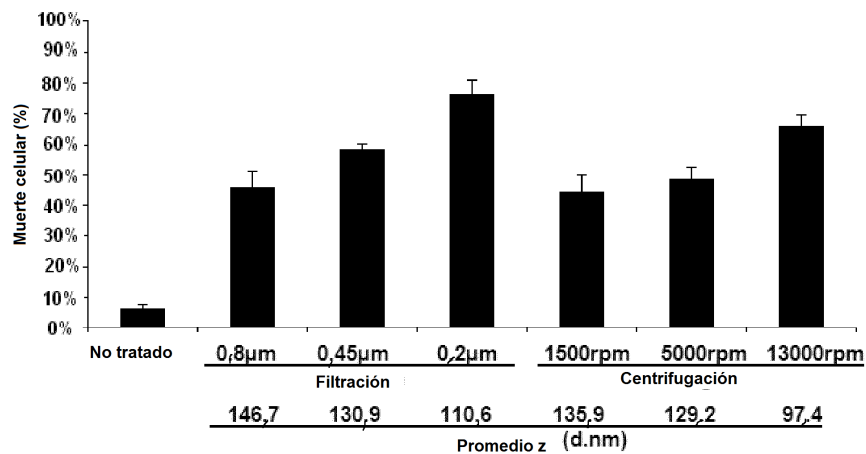
(d) filtrar la composición acuosa resultante de la etapa (c) a través de un filtro que tiene un diámetro de poro menor o igual a 600 nm para formar un filtrado o centrifugar la composición acuosa resultante a más de o igual a 22480 m/s² para formar un sobrenadante.

16. El proceso de la reivindicación 15, que comprende además:

(e) liofilizar la composición acuosa, el filtrado o el sobrenadante resultantes.

Figura 1

A)



B)

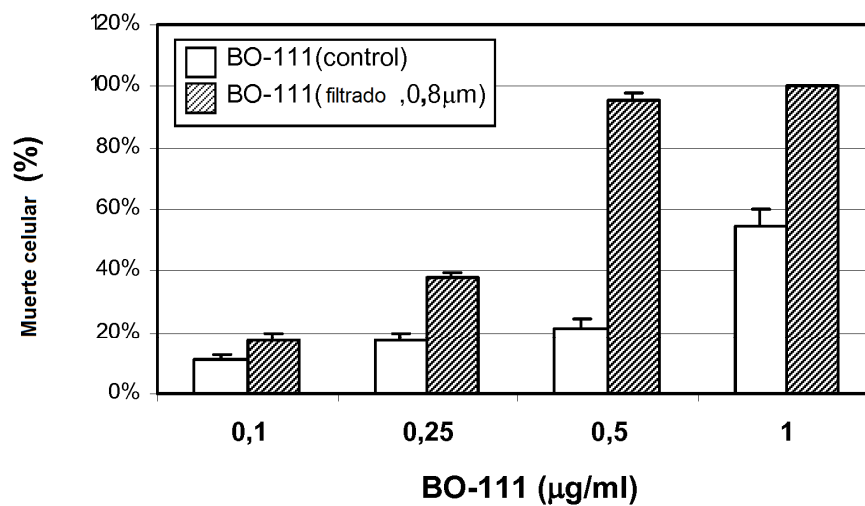
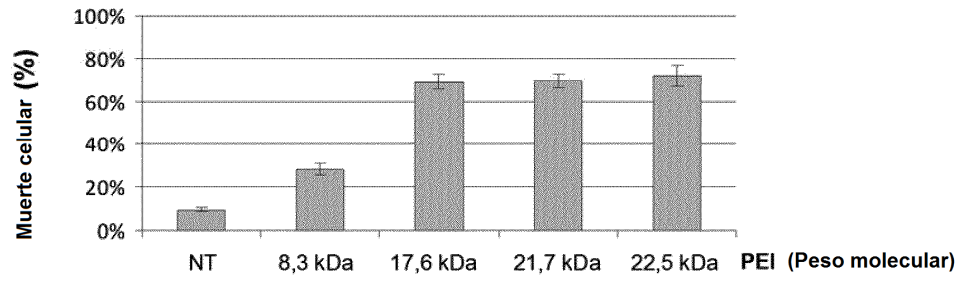


Figura 2

A)



B)

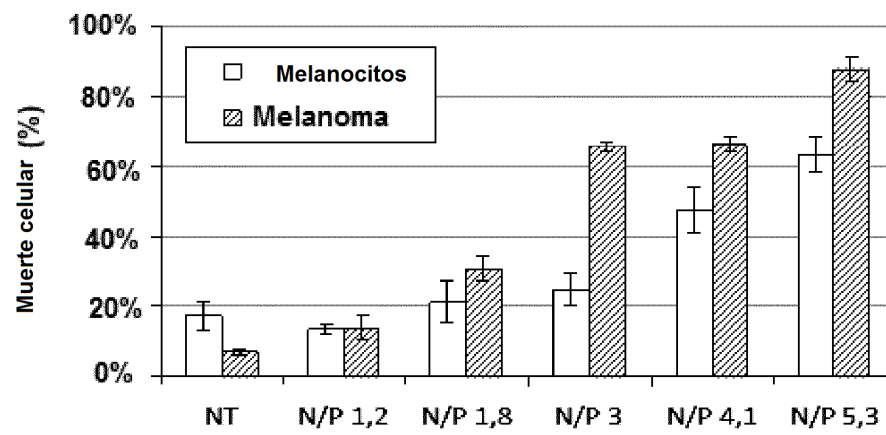


Figura 3

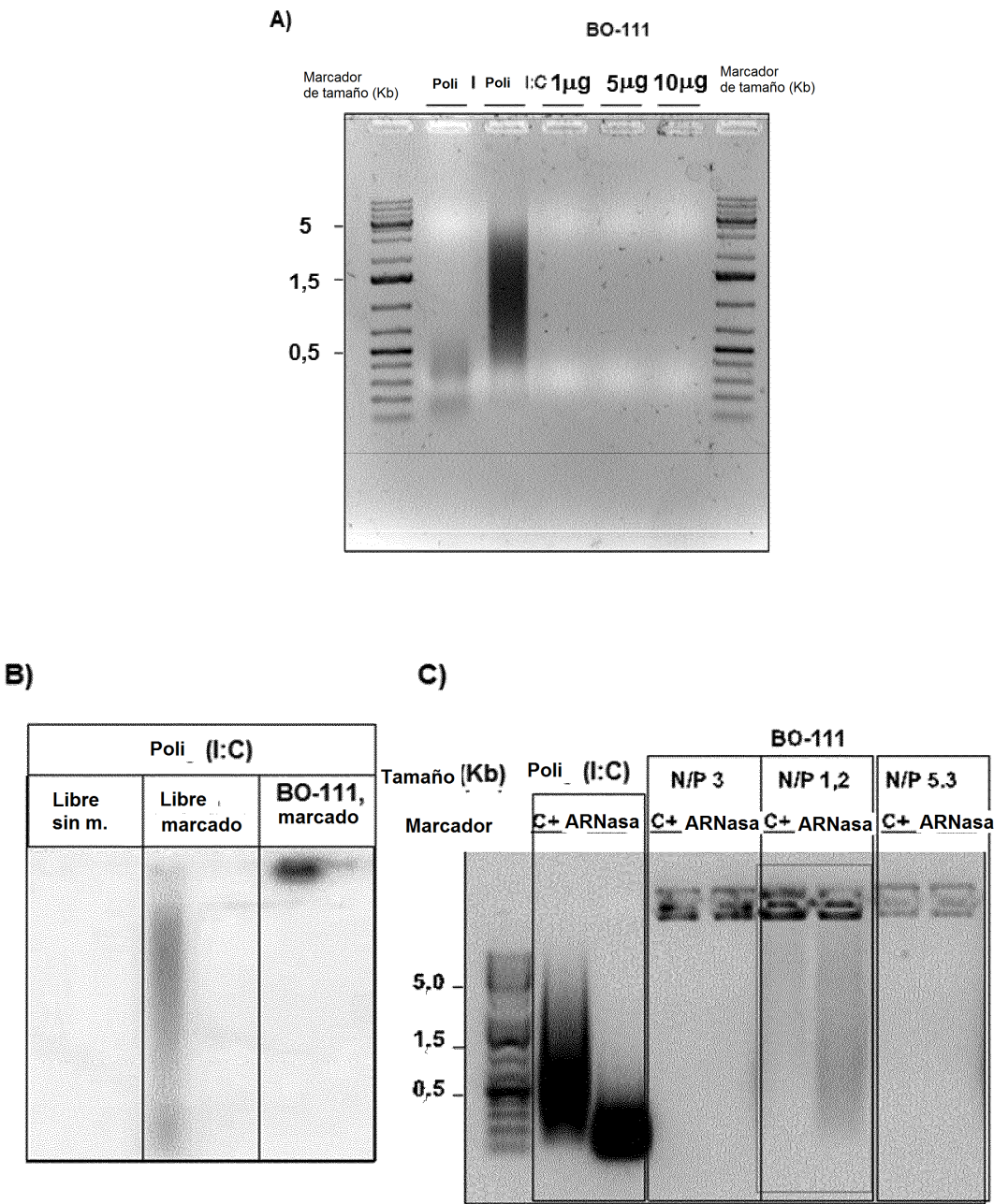


Figura 4

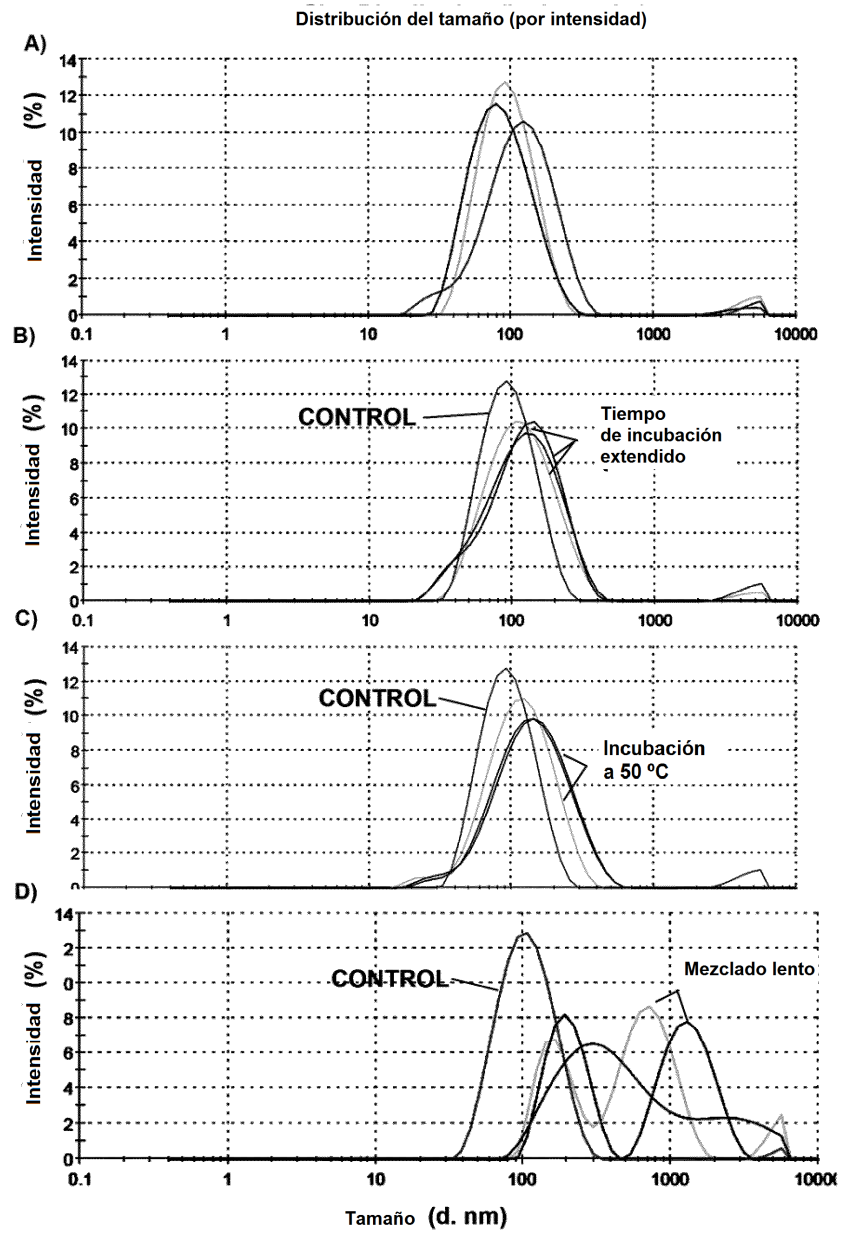


Figura 5

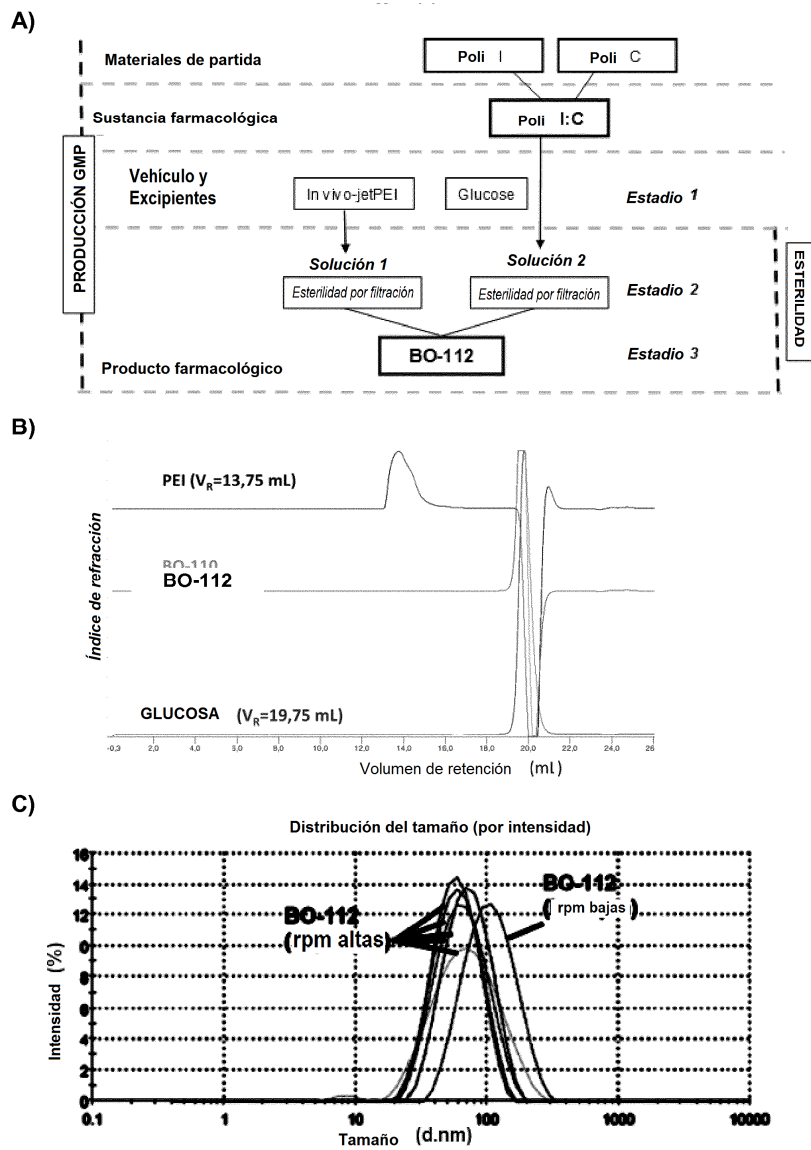
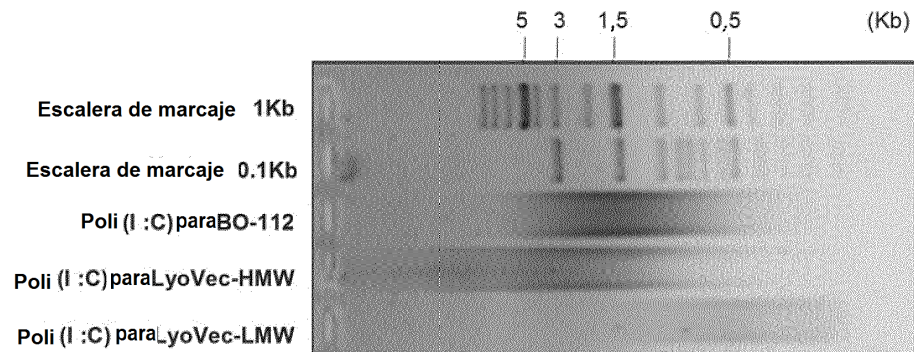


Figura 6

A)



B)

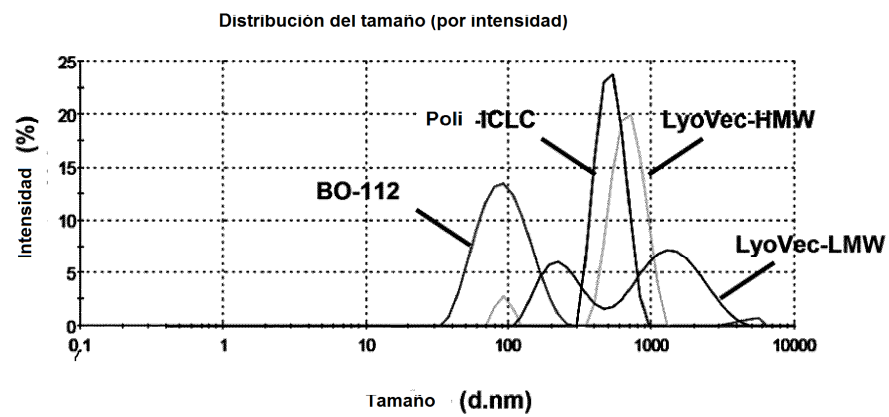


Figura 7

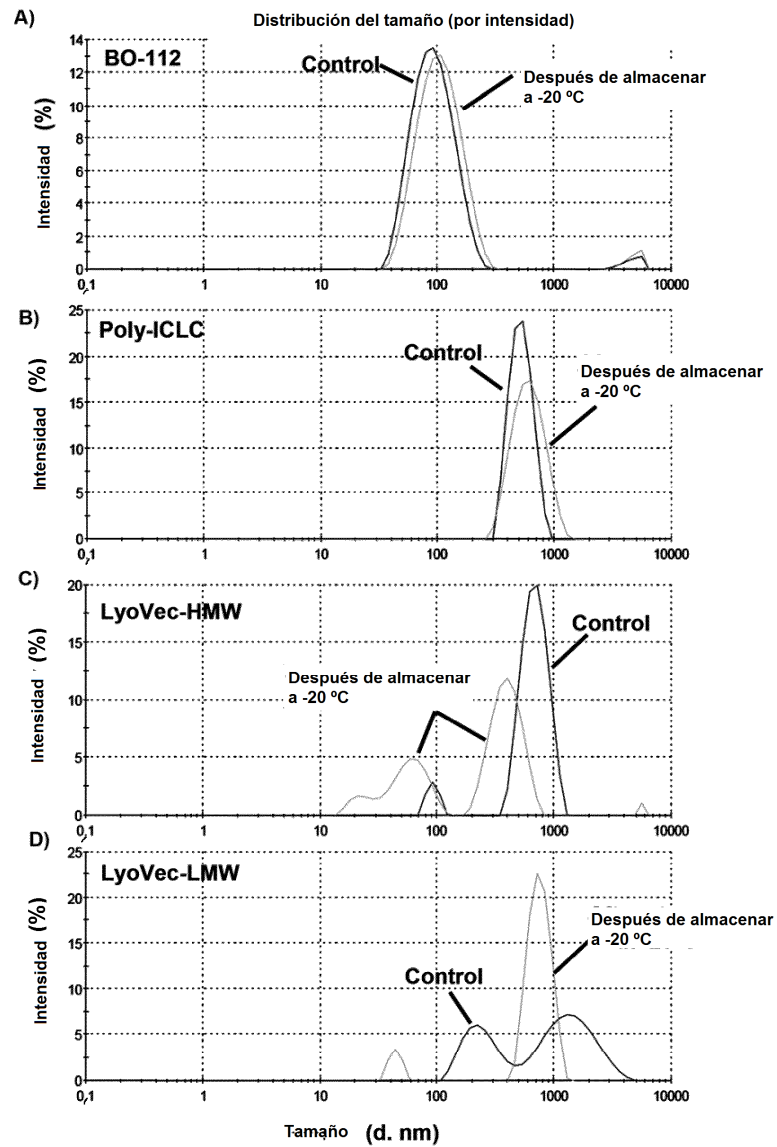
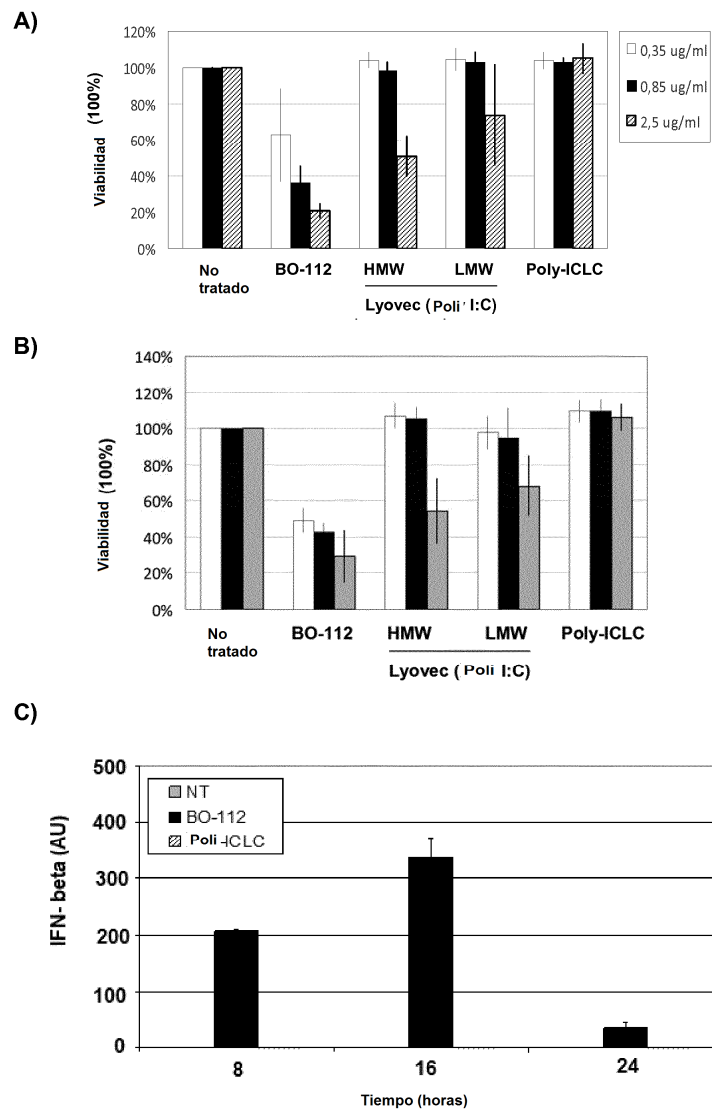


Figura 8



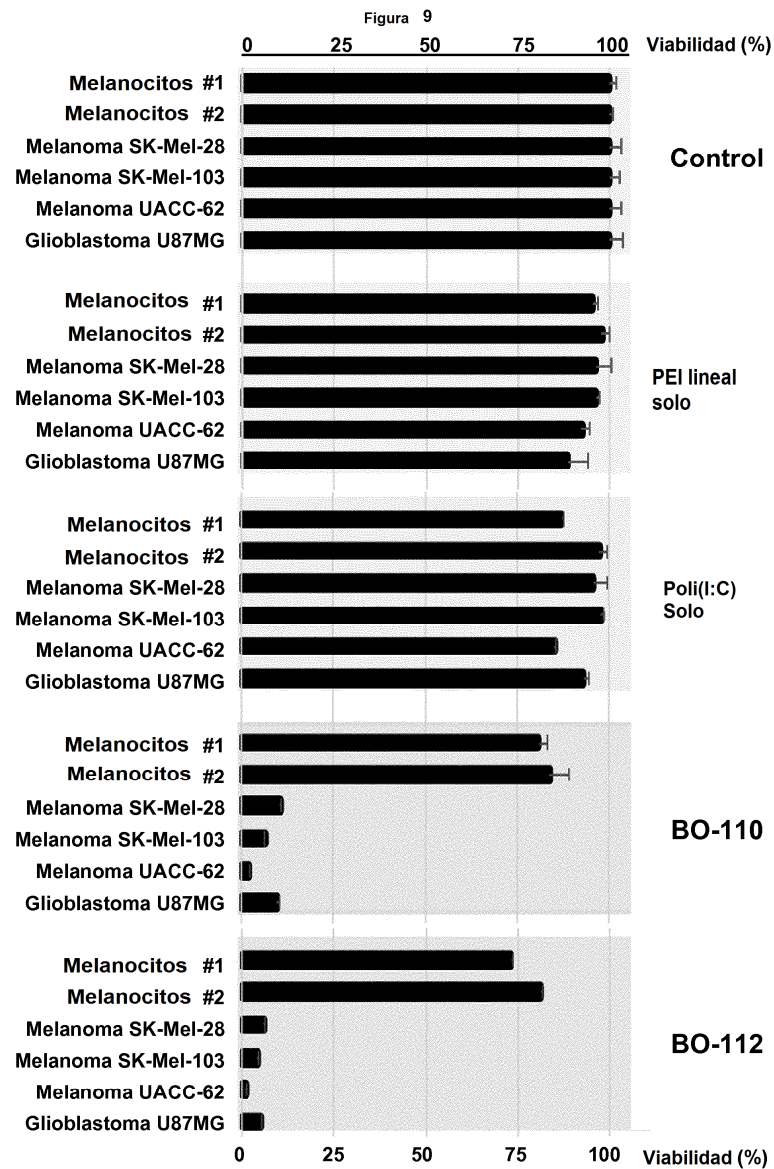
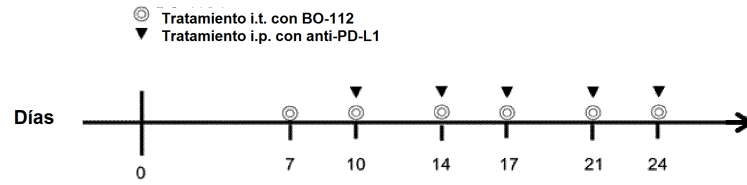
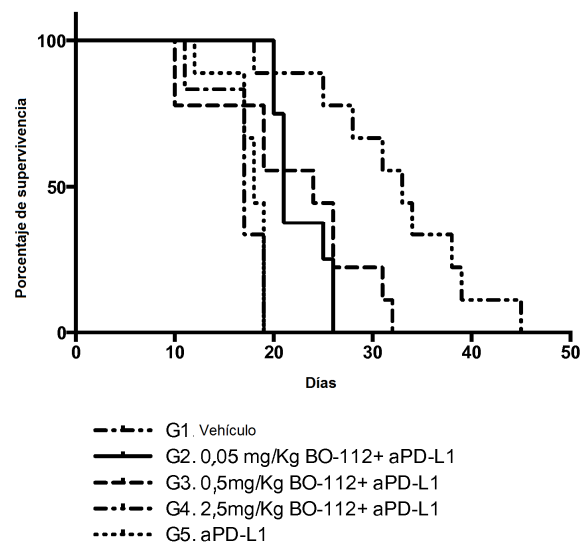


Figura 10

A)



B)





- ②① N.º solicitud: 201890010
②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.11.2016
③② Fecha de prioridad: **17-11-2015**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
P, X	WO 2015173824 A1 (ALEX LEVITZKI MAN AND HOLDINGS LTD) 19/11/2015, todo el documento	1-16
X	Schaffert D. et al. POLY(I:C)-MEDIATED TUMOR GROWTH SUPPRESSION IN EGF-RECEPTOR OVEREXPRESSING TUMORS USING EGF-POLYETHYLENE GLYCOL-LINEAR POLYETHYLENIMINE AS CARRIER. Pharm Res, 06/08/2010, Vol. 28, Páginas 731-741, <DOI: 10.1007/s11095-010-0225-4>, todo el documento	1-16
X	WO 2011003883 A1 (FUNDACION CT NAC INVESTIGACIONES ONCOLOGICAS CARLOS III) 13/01/2011, páginas 11- 51; páginas 57 - 60;	1-16
X	US 2012021006 A1 (LEVITZKI et al) 26/01/2012, Todo el documento	1-16
X	Pradhan P. et al. THE EFFECT OF COMBINED IL10 SIRNA AND CPG ODN AS PATHOGENMIMICKING MICROPARTICLES ON TH1/TH2 CYTOKINE BALANCE IN DENDRITIC CELLS AND PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST B CELL LYMPHOMA. Biomaterials,08/04/2014, Vol. 35, Páginas 5491-5504, todo el documento	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.11.2019

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/6



- ②① N.º solicitud: 201890010
②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.11.2016
③② Fecha de prioridad: **17-11-2015**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Kurosaki T. et al. TERNARY COMPLEXES OF PDNA, POLYETHYLENIMINE, AND γ -POLYGLUTAMIC ACID FOR GENE DELIVERY SYSTEMS. Biomaterials, 20/02/2009, Vol. 30, Páginas 2846-2853, todo el documento	1-16
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 08.11.2019	Examinador M. Cumbreño Galindo	Página 2/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K47/69 (2017.01)

A61K31/7115 (2006.01)

A61K9/19 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.11.2019

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Schaffert D. et al. Pharm Res , Vol. 28, Páginas 731-741, <DOI: 10.1007/s11095-010-0225-4>	06.08.2010
D02	WO 2011003883 A1	13.01.2011
D03	US 2012021006 A1	26.01.2012
D04	Pradhan P. et al. Biomaterials, Vol. 35, Páginas 5491-5504	08.04.2014
D05	Kurosaki T. et al. Biomaterials, Vol. 30, Páginas 2846-2853	20.02.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

D01 desarrolla un nuevo vehículo polimérico a base de polietilenimina (PEI) para la liberación selectiva en células tumorales de ácido poliinosínico-policitidílico de doble cadena (poli(I:C)). La eficacia de estos conjugados, que comprenden PEI lineal de 22 kDa, se evaluó tanto *in vitro* como *in vivo*. La relación del número de moles de nitrógeno de la polialquilenimina y el número de moles de fósforo del polirribonucleótido de doble cadena (N / P) es 6, correspondiente a una relación peso/peso de PEI/ARN de 0,8. Los sistemas poliméricos con PEI sin modificar presentan un tamaño de partícula de 120 nm y un potencial zeta $\geq +30$ mV, que disminuye con la introducción de PEG, mientras que la introducción de EGF induce un aumento de dicho potencial. Se obtienen mediante dilución en medio HBG, que contiene glucosa, a pH 7,1.

D02 divulga un compuesto (BO-110) constituido por la combinación de un ARN de doble cadena y un policación, preferiblemente la combinación de ácido poliinosínico-policitidílico (pIC) con polietilenimina (PEI), y su uso en el tratamiento del cáncer. Los reactivos utilizados son los mismo que se mencionan en la presente solicitud. La relación N/P es de 1 a 5.

D03 divulga un vector para el tratamiento de aquellos tipos de cáncer caracterizados por presentar células que sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este vector está constituido por un ARN de doble cadena conocido por su citotoxicidad y capacidad de penetración celular, el ácido poliinosínico-policitidílico (poliIC), y un péptido o polipéptido de unión a EGFR capaz de dirigir el vector a células tumorales que sobreexpresan EGFR, la polietilenimina (PEI). Ésta es lineal, preferiblemente, y con un peso molecular entre 1 y 25 kDa, preferiblemente entre 15 y 25 kDa.

D04 expone que CpG ODN, un agonista de TLR9, y Poli (I:C), un agonista de TLR3, se han estudiado ampliamente en inmunoterapia contra el cáncer, ya sea individualmente o en conjunto, debido a los efectos de polarización Th1 potencialmente sinérgicos que presentan. Detalla que la administración dual de siRNA silenciador de IL10 junto con CpG ODN, en células dendríticas y usando micropartículas que simulan patógenos (PMPs), mejora significativamente la relación de citocinas Th1/Th2. Para ello, micropartículas PLGA-PEI se cargaron superficialmente con diferentes moléculas inmunomoduladoras basadas en ácido nucleico, como Poli (I:C). Las partículas presentaban un diámetro promedio de $1,18 \pm 0,28$ μm y un potencial zeta promedio de $34,13 \pm 3,85$ mV.

D05 desarrolla un vector no viral preparando varios complejos ternarios construidos con pDNA, polietilenimina (PEI) y varios polianiones, como el ácido poliinosínico-policitidílico. Esos polianiones cambiaron el potencial z positivo del complejo pDNA/PEI a negativo, aunque no afectaron el tamaño. Se utilizó un PEI de 25.000 de peso molecular medio y los complejos ternarios presentaban una relación de carga teórica: fosfato de pDNA: nitrógeno de PEI: fosfato o carboxilato de polianión 1: 8: 6. Así mismo, se determinó el potencial zeta y el tamaño de los complejos ternarios formados.

NOVEDAD (ART. 6.1 LP 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 LP11/1986)

Según indica el solicitante, todas las preparaciones del tipo BO-11X presentan las mismas características en cuanto a osmolaridad, pH, potencial zeta o diámetro promedio, por lo que no se trata de parámetros que puedan distinguir el objeto de la presente invención de la técnica anterior.

Además, en el caso del peso molecular de la polietilenimina (PEI) se analizó cómo influye en la citotoxicidad de BO-111, pero no de BO-112, objeto de la presente solicitud. Y en cuanto a la relación del número de moles de nitrógeno de la PEI y el número de moles de fósforo de poli(I:C) sucede lo mismo, se estudia la muerte celular con BO-111. Incluso se expone que con una relación N/P inferior a 3 hay una parte que no forma complejo.

Por otro lado, el solicitante no concreta cual es el ácido poliinosínico y el ácido policitidílico utilizados para la generación de moléculas de poli(I:C) puesto que alude a varias marcas comerciales como posibles proveedoras de tales compuestos.

Así mismo, en la descripción se indica que las condiciones de mezcla (velocidad de mezcla y velocidad de flujo) influyen en el diámetro de los complejos BO-112 obtenidos, aunque esto no es demostrado. Ni tampoco se demuestra que BO-112 presente una mayor efectividad que BO-110 en el único estudio expuesto que realiza una comparación con otros compuestos BO-11X.

También se reivindica que PEI sea lineal, sin embargo, en la descripción sólo se menciona que debe ser "preferiblemente lineal" sin justificar qué ventajas presenta frente a la forma ramificada.

En definitiva, los documentos mencionados anticipan composiciones acuosas que comprenden partículas las cuales, a su vez, comprenden polietilenimina y ácido poliinosínico-policitidílico, destinadas a ser utilizadas en el tratamiento de procesos tumorales. Por consiguiente, las reivindicaciones 1 a 16 no son nuevas y, por tanto, carecen de actividad inventiva.