

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 524**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/032600**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13151771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13715498 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2833918**

54 Título: **Composiciones inmunoestimuladoras y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

05.04.2012 US 201261620518 P

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

15.11.2019

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**IRVINE, DARRELL, J. y
LIU, HAIPENG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 731 524 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunoestimuladoras y métodos de uso de las mismas

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de la tecnología de vacunas, y más específicamente a los lípidos de unión a albúmina conjugados a la carga y que dirigen de manera eficiente la carga a los ganglios linfáticos.

10 **Antecedentes de la invención**

Las vacunas de subunidades presentan un antígeno al sistema inmunitario sin introducir partículas víricas en un esfuerzo por generar una respuesta inmunitaria que sea eficaz contra ese antígeno. Dichas vacunas de subunidades a menudo son poco inmunógenas y requieren la administración conjunta de uno o más adyuvantes para generar una respuesta inmunitaria eficaz (Perrie, Y., et al., *Int. J. Pharm.* 364, 272-280 (2008); Zepp, F. *Vaccine* 28S C14-C24 (2010)). Los oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como los que contienen motivos de citosina-fosfato-guanina no metilados ("CG" o "CpG"), se pueden usar como adyuvantes para estimular las respuestas inmunitarias humorales y celulares (Vollmer, J. y Krieg, A. M. *Adv. Drug Delivery Rev.* 61, 195-204 (2009); Klinman, D. M. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 249-259 (2004)). Un desafío para la aplicación clínica de oligonucleótidos como adyuvante de vacuna es la falta de un sistema eficiente con el cual dirigir los oligonucleótidos *in vivo* a las células inmunitarias del sistema linfático (Von Beust, B. R., et al. *Eur. J. Immunol.* 35, 1869-1876 (2005); Bourquin, C., et al., *J. Immunol.* 181, 2990-2998 (2008)).

El transporte de antígenos/adyuvantes desde la ubicación de la inyección a los ganglios linfáticos secundarios es un desafío y depende de la compleja fisiología del sistema linfático (Pal, I. & Ramsey, J. D. *Adv. Drug Delivery Rev.* 63, 909-922 (2011); Reddy, S. T., et al., *Nat. Biotechnol.* 25, 1159-1164 (2007)). Los antígenos/adyuvantes introducidos en el cuerpo pueden ser absorbidos por las células inmunitarias dendríticas (CD) en el lugar de la inyección y luego ser llevados al ganglio linfático a través del tráfico de CD (por ejemplo, antígeno asociado a células o partículas más grandes, >200 nm). Como alternativa, podrían entrar directamente en los vasos linfáticos y drenar a los órganos linfoides secundarios (por ejemplo, partículas pequeñas, <200 nm) donde reside una parte significativa de las células inmunitarias (Bachmann, M. F. y Jennings, G. T. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 787-796 (2010); Reddy, S. T., et al., *Nat. Biotechnol.* 25, 1159-1164 (2007); Singh, M. *Vaccine adjuvant and delivery system.* Wiley. (2007); Oyewumi, M. O., et al., *Expert Rev. Vaccines* 9, 1095-1107 (2010); Cai, S., et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 63, 901-908 (2011); Manolova, V., et al. *Eur. J. Immunol.* 38, 1404-1413 (2008)).

Los compuestos antigénicos/adyuvantes solubles son descargados de los ganglios linfáticos en cuestión de horas (Pape, et al., *Immunity* 26, 491-502 (2007)), lo que proporciona solo una breve exposición a la vacuna. Los intentos de mejorar el suministro de antígenos/adyuvantes a los ganglios linfáticos después de la inyección parenteral han incluido el uso de adyuvantes formadores de depósitos o portadores particulados que son internalizados preferentemente por las células presentadoras de antígenos (Johansena, et al., *Journal of Controlled Release*, 148, 56-62 (2010), Moon, et al., *Adv. Mater.*, 24, 3724-3746 (2012), Bachmann y Jennings, *Nat. Rev. Immunol.* 10, 787-796 (2010), Hubbel, et al., *Nature*, 462, 449-460 (2009), Pal, y Ramsey, J. D. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 63, 909-922 (2011), Reddy, et al., *J. A. Nat. Biotechnol.*, 25, 1159-1164 (2007), John, et al., *Nature Materials*, 11, 250-257 (2012)) pero estos enfoques no logran la potencia de la inyección directa de vacunas en tejidos linfoides (Senti, et al., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 9:537-543 (2009)). Las vacunas dirigidas molecularmente basadas en la conjugación de antígeno a anticuerpos u otros ligandos que se dirigen a las células dendríticas no solo alcanzan CD en los ganglios linfáticos drenantes, sino que también se drenan a la circulación sistémica y acceden a CD en tejidos distales (Keler, et al., *Oncogene*, 26, 3758-67 (2007), Tacke, et al., *Nat. Rev. Immunol.* 10, 790-802 (2007), Tenbusch, et al., *PLoS ONE*, 7, e39038 (2012)). Dicha administración sistémica puede promover la tolerancia, a menos que los adyuvantes inflamatorios también se coadministren de forma sistémica, un enfoque que probablemente genere una toxicidad inaceptable en las vacunas profilácticas.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de sistemas de administración eficientes para dirigir los antígenos/adyuvantes a las células presentadoras de antígenos que residen en el tejido linfático, especialmente las CD CD8+, una etapa que es importante para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC), ya que las CD CD8+ son las principales CD capaces de presentación cruzada (Smith, C. M., et al., *J. Immunol* 170, 4437-4440 (2003); Schnorrer, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10729-10734 (2006); Bedoui, S., et al., *Nat. Immunol.* 10, 488-495 (2009)), un proceso requerido para presentar antígenos extracelulares dentro de moléculas del MHC de clase I a linfocitos T CD8+.

Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporcionar composiciones y métodos para aumentar el suministro de adyuvantes de vacuna a los ganglios linfáticos.

También es un objetivo de la invención proporcionar composiciones y métodos para aumentar el suministro de antígenos de vacuna a los ganglios linfáticos.

Otro objetivo de la invención es proporcionar composiciones inmunógenas y métodos de uso de las mismas para aumentar el suministro de una combinación de adyuvantes y antígenos de vacunas a los ganglios linfáticos.

5 Es un objetivo adicional de la invención proporcionar composiciones inmunógenas y métodos de uso de las mismas para inducir una respuesta inmunitaria.

Es otro objetivo de la invención proporcionar composiciones y métodos para aumentar la retención de adyuvantes y antígenos de vacunas localmente, en el sitio de administración y ganglios linfáticos drenantes ipsolaterales.

10 Es un objetivo adicional de la invención proporcionar métodos para aumentar las respuestas inmunitarias locales.

Sumario de la invención

15 Se ha descubierto que los lípidos de unión a albúmina se pueden conjugar a la carga y dirigir la carga de manera eficiente a los ganglios linfáticos *in vivo*. Se cree que tras la introducción *in vivo*, los conjugados de lípidos se unen a albúmina endógena, lo que evita que los conjugados se descarguen rápidamente en el torrente sanguíneo y en su lugar los redirige al tejido linfático y ganglios linfáticos drenantes donde se acumulan debido al filtrado de la albúmina por células presentadoras de antígeno. Cuando el conjugado de lípidos incluye un inmunostimulante tal como un oligonucleótido inmunostimulador o un péptido antigénico, los conjugados pueden inducir o mejorar una respuesta
20 inmunitaria robusta.

La invención proporciona, de este modo, un adyuvante de vacuna como se define en la reivindicación 1.

25 La invención también proporciona un conjugado anfífilo como se define en la reivindicación 6.

Se desvelan conjugados de lípidos que incluyen conjugados de lípido-oligonucleótido y conjugados de lípido-péptido y su uso para estimular una respuesta inmunitaria.

30 El lípido se une a albúmina en condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, una pluralidad de conjugados de oligonucleótidos puede formar espontáneamente micelas en solución acuosa que puede romperse mediante la adición de un agente que contiene albúmina. En una realización específica, el 64 % o más de las micelas se rompen en presencia de un 20 % de suero fetal bovino.

35 En algunas realizaciones para dirigirse a los ganglios linfáticos, el enlazador nucleotídico u oligonucleotídico incluye 1 o 2 guaninas consecutivas. Por ejemplo, el conjugado puede tener la estructura L-5'-G_n-ON-3', en donde "L" es el lípido, "G" es una guanina, "n" es 1-2, y "ON" es el oligonucleótido inmunostimulador.

40 El lípido del conjugado se une a albúmina. Un lípido a modo de ejemplo es un diacil lípido, dicho diacil lípido en donde las cadenas incluyen C12 o más unidades de hidrocarburo.

El oligonucleótido inmunostimulador puede ser un ligando para un receptor de reconocimiento de patrones, tal como CpG, y tener un esqueleto modificado tal como un esqueleto de fosforotioato (PS). En algunas realizaciones, el oligonucleótido incluye 20 o más ácidos nucleicos.

45 También se desvelan conjugados para retención en sitios en o cerca del sitio de administración. Conocidos como conjugados estabilizadores de micelas, la carga y el lípido están normalmente enlazados por un enlazador oligonucleotídico que incluye al menos tres guaninas consecutivas. Normalmente, los conjugados forman espontáneamente micelas en solución acuosa que son resistentes a la interrupción por la albúmina. En una
50 realización particular, más del 36 % de las micelas están intactas en presencia de un 20 % de suero fetal bovino. En algunas realizaciones, el conjugado de oligonucleótidos tiene la estructura L-5'-G_n-ON-3', en donde "L" es el lípido, "G" es una guanina, "n" es 3-10, y "ON" es el oligonucleótido inmunostimulador.

También se desvelan conjugados de lípido-péptido. Normalmente, el conjugado incluye un antígeno peptídico que (i) está conjugado directamente con un lípido, o (ii) está enlazado a un enlazador que está conjugado con un lípido. El
55 lípido se une normalmente a albúmina en condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, el antígeno peptídico, el enlazador o el antígeno peptídico y el enlazador en combinación son suficientemente polares para reducir o inhibir la inserción del lípido en la membrana plasmática de una célula.

60 También se desvelan composiciones inmunógenas que incluyen conjugados de lípido-oligonucleótido, conjugados de lípido-péptido y combinaciones de los mismos. Las composiciones inmunógenas se pueden usar para aumentar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Normalmente, al sujeto se le administra una cantidad eficaz de la composición inmunógena para aumentar la respuesta de las células inmunitarias efectoras, por ejemplo, aumentar el número de linfocitos T CD8+ que expresan TNF-α o INF-γ en comparación con un control. Los métodos se pueden
65 usar para tratar sujetos con cáncer o enfermedades infecciosas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es un esquema que ilustra tres dominios de un conjugado de lípidos: carga conjugada a un bloque polar que promueve la solubilización conjugada a una cola lipófila. La figura 1B es un esquema que ilustra un conjugado de lípido-oligonucleótido a modo de ejemplo que incluye una carga de oligonucleótido inmunoestimulador (CpG) conjugada a una cola lipófila. La figura 1C es un esquema que ilustra un conjugado de lípido-péptido a modo de ejemplo que incluye una carga de péptido antigénico conjugada a un bloque polar que se conjuga a una cola lipófila. La figura 1D es un conjugado de lípido-oligonucleótido a modo de ejemplo que incluye una cola de diacil lípido conjugada a un enlazador de oligo-guanina que se conjuga a una carga oligonucleotídica. La figura 1E es un conjugado de lípido-péptido a modo de ejemplo que incluye una cola de diacil lípido conjugada a un enlazador de polietilenglicol (PEG) que se conjuga a una carga peptídica. La figura 1F es una serie de gráficos que muestran la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) de CpG libre marcado con fluoresceína sola (izquierda), CpG libre marcado con fluoresceína mezclada con albúmina de suero bovino (BSA) marcada con rodamina (centro), y marcada con rodamina sola (derecha). La figura 1G es una serie de gráficos que muestran la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) de Lipo-CpG marcado con fluoresceína sola (izquierda), Lipo-CpG marcado con fluoresceína mezclada con albúmina de suero bovino marcada con rodamina (BSA) (centro), y marcada con rodamina sola (derecha).

La figura 2A es un esquema que muestra el diseño de anfífilos dirigidos a los ganglios linfáticos a modo de ejemplo: la cola hidrófoba semejante a los lípidos (L) se conjuga al extremo 5' del ODN CpG, la secuencia CpG tiene un esqueleto completamente fosforotioado. Se muestran tres lípidos alternativos: colesterol, acilo (C18) y diacilo (C18). La figura 2B es un gráfico de líneas que muestra los resultados de los CpG conjugados con lípidos marcados con fluoresceína HPLC de exclusión por tamaño después de la incubación con suero fetal bovino (FBS) durante 2 horas a 37 °C. La figura 2C es son dos gráficos de barras que muestra la acumulación en los GL (ganglios inguinales en el gráfico de la izquierda y ganglios auxiliares en el gráfico de la derecha) *in vivo* en diferentes formulaciones marcadas con fluoresceína (CpG-F, C18-CpG-F, Cho-CpG-F, Lipo-CpG-F, CpG-F en IFA, CpG-F en liposoma) 24 horas después de la inyección subcutánea de 3,3 nmoles de CpG marcados con fluoresceína. La figura 2D es un gráfico de líneas que muestra la cinética de la fluorescencia de CpG (normalizada a la dosis de inyección) en GL después de la inyección con CpG-F (ganglios inguinales (-●-)) y ganglios auxiliares (-■-) o Lipo-CpG-F (ganglios inguinales (-▲-) y ganglios auxiliares (-▼-)). La figura 2E es un esquema que muestra un diseño generalizado de un ganglio linfático dirigido a un anfífilo que contiene un dominio de unión a albúmina, un espaciador polar y una carga enlazada en el extremo del espaciador. La figura 2F es una ilustración que muestra que la longitud del bloque polar controla la armonía del equilibrio de tres vías: micelas intactas, anfífilos unidos a albúmina y anfífilos insertados en la membrana celular. Las figuras 2G y H muestran el efecto de variar la longitud de un enlazador de poli(etilenglicol) (PEG) de conjugados de lipo-(PEG)_n-FITC sobre la inserción en la membrana celular y el direccionamiento a los ganglios linfáticos, donde n es el número de repeticiones de oligoetilenglicol de 4 unidades en el bloque de PEG. La figura 2G es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de la inserción celular de anfífilos con diferentes longitudes de PEG. La figura 2H son dos gráficos de barras que muestran la acumulación de anfífilos en GL *in vivo* (ganglios inguinales en el gráfico de la izquierda y ganglios auxiliares en el gráfico de la derecha) en diferentes formulaciones marcadas con fluoresceína (Lipo-(PEG)_n-F (n=1, 2, 4, 6, 8)) 24 horas después de la inyección subcutánea. La figura 2I es un gráfico de líneas que muestra la captación por GL de PEG₂₀₀₀ marcado con fluoresceína anfífila en función del peso molecular de los lípidos (es decir, la longitud). La figura 2J es un gráfico de líneas que muestra la captación por GL de conjugados de lípido-oligonucleótido en función de la longitud del oligonucleótido.

La figura 3A es un esquema que muestra la construcción generalizada y las caracterizaciones de los adyuvantes CpG estabilizados con G-cuádruple. Las micelas de CpG estabilizadas con G-cuádruple se autoensamblan a partir de un ODN compuesto por tres segmentos: un CpG-ODN inmunoestimulador, un bloque de repetición central contenía $n = 1-10$ guaninas formadoras de cuartetos G seguidas de $10 - n$ timidinas que no interactúan y una cola de diacil-lípidos. En tampón, el ODN se autoensambla en micelas esféricas tridimensionales con una corona de CpG y un núcleo lipídico. En presencia de K⁺, las repeticiones de guanina forman estructuras de G-cuádruple a través de los enlaces de hidrógeno de Hoogsteen y estabilizan la estructura de la micela. Las estabildades de las micelas de ODN en presencia de albúmina se pueden programar simplemente alterando el número de guaninas. La albúmina se une al resto lipídico de las micelas no estabilizadas ($n \leq 2$), en contraste, las micelas estabilizadas ($n > 2$) restringen la unión a albúmina y permanecen como conjuntos micelares. La figura 3B es un esquema (parte superior) y un gráfico de barras (parte inferior) que muestran construcciones fluorescentes de excímero de pireno usadas para evaluar las estabildades de las micelas de G-cuádruple en presencia de albúmina. La figura 3C es un gráfico de líneas que muestra los perfiles de estabilidad de las micelas de CpG G-cuádruple según se mide por cromatografía de exclusión por tamaño en presencia de suero fetal bovino (FBS). La figura 2D es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células B220+, células F4/80 + y células CD11c+ que fueron positivas para CpG según lo determinado por citometría de flujo. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

La figura 4A es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de linfocitos de sangre periférica aislados de ratones C57Bl/6 que son tetrámeros H-2K^b/SIINFEKL positivos por citometría de flujo 6 días después de completar un protocolo de inmunización que incluye inyecciones s.c. el día 0 y el día 14, con 10 µg de OVA y en combinaciones de 1,24 nmol de formulaciones de CpG como se indica. La figura 4B es un gráfico de barras que muestra las cuantificaciones de linfocitos T CD8 positivos para INF-γ y TNF-α después de reestimulación específica del antígeno durante 6 h. La figura 4C es un gráfico de líneas que muestra la correlación entre la

fluorescencia de CpG en el GL y la respuesta inmunitaria medida por tinción de tetrámero SIINFEKL. La figura 4D es un gráfico de barras que muestra el peso del bazo (mg/g de peso corporal) de CpG, Lipo-G₂-CpG y PBS como un indicador de toxicidad sistémica relativa de los diferentes tratamientos. La figura 4E es un esquema que muestra el diseño del ensayo. La figura 4F es un gráfico de puntos que muestra el impacto del direccionamiento a GL (título de IgG en suero anti-OVA 20 días después de la inmunización con diversas combinaciones de antígeno/adyuvante como se indica) sobre la respuesta inmunitaria.

La figura 5A es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células CD8+ aisladas de ratones C57Bl/6 que fueron positivas para E7₄₉₋₅₇ de VPH-16 por citometría de flujo 6 días después de completar un protocolo de inmunización que incluye inyecciones s.c. el día 0 y el día 14, con péptido mínimo E7 (E7₄₉₋₅₇) de VPH-16 y en combinaciones con 1,24 nmoles de CpG como se indica. La figura 5B es un gráfico de barras que muestra las cuantificaciones de linfocitos T CD8 positivos para INF- γ y TNF- α después de reestimulación específica de antígeno durante 6 h como medida de la magnitud de las respuestas de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno para péptidos mínimos (Al 11, Trp2 y E7 de VPH-16). La figura 5C es un gráfico de barras que muestra que el conjugado directo del lípido al péptido (lipopéptido) que no provoca una respuesta inmunitaria potente específica de antígeno, medida por la frecuencia de linfocitos T CD8 positivos para INF- γ y TNF- α después de la reestimulación. La figura 5D es un gráfico de barras que muestra la potencia de la vacuna anfífila evaluada mediante el experimento de citotoxicidad in vivo el día 7 después de la inmunización final de vacunas con el péptido Trp2. La figura 5E es una curva de Kaplan-Meier y la figura 5F es un gráfico de líneas que muestra el área del tumor para los ratones a lo largo del tiempo después del tratamiento, con tumores TC-1 subcutáneos (s.c.) tratados con vacuna peptídica anfífila E7 de VPH-16, vacuna soluble o sin vacuna el día 6, 13 y 19 después de la provocación con 3×10^5 células TC-1. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con vacuna anfífila y con vacuna soluble se indican mediante asteriscos. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$. Todos los datos se representan gráficamente como medias más o menos s.e.m. (n=3-8).

La figura 6A es un gráfico de barras que muestra el % de linfocitos T CD8+ específicos de OVA después del tratamiento con CpG y MPLA libres, Lipo-G₆-CpG-MPLA o Lipo-CpG-MPLA. La figura 6B es un gráfico de barras que muestra el % de linfocitos T CD8+ positivos para TNF- α e INF- γ después del tratamiento con CpG y MPLA libres, Lipo-G₆-CpG-MPLA o Lipo-CpG-MPLA. La figura 6C es un gráfico de líneas que muestra el % de linfocitos T CD8+ específicos de OVA después del tratamiento con CpG y MPLA libres, Lipo-G₆-CpG-MPLA o Lipo-CpG-MPLA a lo largo del tiempo. La figura 6D es un gráfico de barras que muestra el % de linfocitos T CD8+ específicos de OVA después del tratamiento con CpG y MPLA libres, Lipo-G₆-CpG-MPLA o Lipo-CpG-MPLA en la sangre, el bazo y el ganglio linfático.

La figura 7A es una representación esquemática de una micela a modo de ejemplo formada por autoensamblaje de conjugados inmunoestimuladores, que muestra la estructura de G-cuádruple formada por enlaces de hidrógeno de Hoogsteen. La figura 7B es un gráfico que muestra el perfil de tamaño de las micelas autoensambladas (diámetro (nm)). La figura 7C es un gráfico de líneas que muestra los resultados del análisis de difracción circular (CD (mgrad)) de micelas estabilizadas de G-cuádruple en 1xPBS/K⁺ 20 mM.

La figura 8A es un gráfico de barras que muestra la acumulación cuantitativa (eficiencia radiante) de diversas micelas basadas en CpG en los ganglios linfáticos inguinales (mitad izquierda del gráfico) y ganglios linfáticos axilares (mitad derecha del gráfico) 24 horas después de la inyección. La figura 8B es un gráfico de barras que muestra la acumulación cuantitativa (eficiencia radiante) de diversas micelas basadas en CpG en los ganglios linfáticos inguinales (mitad izquierda del gráfico) y ganglios linfáticos axilares (mitad derecha del gráfico) 72 horas después de la inyección.

La figura 9 es una representación esquemática de un conjugado de lípido-péptido.

Las figuras 10A-10D son gráficos de barras que muestran los resultados de los análisis Milliplex de citocinas proinflamatorias (INF- γ en la figura 10A; TNF- α en la figura 10B; IL6 en la figura 10C; IL12p40 en la figura 10D) desencadenados en sangre periférica de ratones inmunizados con una dosis única (6,2 nmol) de formulaciones de CpG, se recogieron muestras de sangre en diferentes intervalos de tiempo (2 horas y 24 horas) y se analizaron según las instrucciones del fabricante.

50 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Un oligonucleótido inmunoestimulador, como se usa en el presente documento, es un oligonucleótido que puede estimular (por ejemplo, inducir o mejorar) una respuesta inmunitaria.

Como se usa en el presente documento, los oligodesoxinucleótidos de CG (ODN de CG) son moléculas de ADN sintético monocatenario cortas que contienen un nucleótido de citosina (C) seguido de un nucleótido de guanina (G).

Por "célula inmunitaria" se entiende una célula de origen hematopoyético y que desempeña un papel en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias incluyen linfocitos (por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T), linfocitos citolíticos naturales y células mieloides (por ejemplo, monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos).

El término "linfocito T" se refiere a un linfocito T CD4+ o un linfocito T CD8+. El término linfocito T incluye linfocitos TH1, linfocitos TH2 y linfocitos TH17.

La expresión "citotoxicidad de los linfocitos T" incluye cualquier respuesta inmunitaria mediada por la activación de los linfocitos T CD8+. Las respuestas inmunitarias a modo de ejemplo incluyen la producción de citocinas, la proliferación de linfocitos T CD8+, la producción de granzimas o perforinas, y la eliminación de un agente infeccioso.

5 Como se usa generalmente en el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del buen criterio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos, órganos, y/o fluidos corporales de seres humanos y animales sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otros problemas o complicaciones compatibles con una proporción razonable de riesgo/beneficio.

10 Los términos "sujeto", "individuo", " " y "paciente" se refieren a cualquier individuo que sea la diana del tratamiento usando las composiciones desveladas. El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Por tanto, el sujeto puede ser un ser humano. Los sujetos pueden ser sintomáticos o asintomáticos. El término no indica una edad o género en particular. Por tanto, sujetos adultos y recién nacidos, sean macho o hembra, están destinados a estar cubiertos. Un sujeto puede incluir un sujeto de control o un sujeto de ensayo.

15 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, independientemente de la modificación (por ejemplo, fosforilación o glucosilación).

20 La expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una dosis suficiente para proporcionar tratamiento para un trastorno, enfermedad o afección que se está tratando, para inducir o mejorar una respuesta inmunitaria, o para proporcionar un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. La dosis precisa variará de acuerdo con varios factores, tales como las variables dependientes del sujeto (por ejemplo, edad, salud del sistema inmunitario, etc.), la enfermedad, el estadio de la enfermedad y el tratamiento que se está efectuando.

25 Los términos "individuo", "sujeto", y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, roedores, tales como ratones y ratas, y otros animales de laboratorio.

30 Los términos "oligonucleótido" o "polinucleótido" son polímeros de ácidos nucleicos sintéticos o aislados que incluyen una pluralidad de subunidades nucleotídicas.

II. Composiciones

35 Se han descubierto las características estructurales de un conjugado de lípidos que controla el direccionamiento del conjugado a los ganglios linfáticos. En condiciones fisiológicas, los conjugados de lípidos anfífilos existen en un equilibrio de 3 vías representado en la figura 2F. En agua pura, ciertos conjugados de lípidos forman micelas, pero en presencia de suero y células, estos anfífilos se equilibran entre la unión a albúmina y la inserción de sus colas lipófilas en las membranas celulares.

40 Como se analiza a continuación con más detalle, los conjugados de lípidos que se dirigen efectivamente a los ganglios linfáticos incluyen normalmente tres dominios: un dominio lipófilo que se une a albúmina, un dominio de bloque polar y una carga tal como un adyuvante molecular o un compuesto inmunoestimulador (tal como un oligonucleótido) o péptido antigénico. Dependiendo de la carga, la longitud y las composiciones del bloque polar se pueden adaptar a medida para impulsar el equilibrio hacia la unión a albúmina, la formación de micelas estables o la inserción celular. Las directrices de diseño y las composiciones desveladas a continuación se pueden usar para inducir o mejorar respuestas inmunitarias robustas con baja toxicidad sistémica porque los compuestos inmunoestimuladores se localizan en el ganglio linfático (es decir, conjugados que se dirigen a los ganglios linfáticos) o el tejido en el sitio local de administración (es decir, conjugado estabilizador de micelas).

50 La eficacia de cualquier conjugado de lípidos particular para dirigirse a los ganglios linfáticos puede analizarse en función de la capacidad de la albúmina para romper las micelas formadas por una pluralidad de conjugados en solución acuosa. Por ejemplo, si un agente que contiene albúmina tal como el suero fetal bovino puede romper el 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 por ciento o más de las micelas formadas en solución acuosa, el conjugado puede seleccionarse para dirigirse a los ganglios linfáticos. Sin embargo, si el 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 por ciento o más de las micelas formadas en solución acuosa permanecen intactas en presencia de albúmina, el conjugado puede seleccionarse como conjugado estabilizador de micelas.

A. Conjugados dirigidos a ganglios linfáticos

60 Se desvelan conjugados de lípidos tales como conjugados de lípido-oligonucleótido y lípido-péptido para su uso en composiciones inmunógenas. Los conjugados que se dirigen a los ganglios linfáticos pueden ser trasladados desde el sitio de administración a través de la linfa hasta el ganglio linfático donde se acumulan y activan las células inmunitarias. Se cree que la acumulación eficiente en ganglios linfáticos de los conjugados de lípidos depende de la capacidad del anfífilo para dividirse a partir de las micelas a un estado unido a proteínas del suero.

Los conjugados que se dirigen a los ganglios linfáticos suelen incluir tres dominios: un dominio altamente lipófilo, de unión a albúmina (por ejemplo, un lípido de unión a albúmina), una carga tal como un adyuvante molecular o un antígeno peptídico, y un enlazador de bloque polar, que promueve la solubilidad del conjugado y reduce la capacidad del lípido para insertarse en las membranas plasmáticas celulares. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la estructura general del conjugado es L-P-C, donde "L" es un lípido que de unión a albúmina, "P" es un bloque polar y "C" es una carga tal como un adyuvante molecular. En algunas realizaciones, la propia carga también puede servir como dominio de bloque polar, y no se requiere un dominio de bloque polar separado. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el conjugado es de solo dos dominios: un lípido de unión a albúmina y una carga. Por ejemplo, los conjugados de lípido-oligonucleótido pueden incluir un oligonucleótido inmunoestimulador que está conjugado directamente a un lípido, o está enlazado a un enlazador que está conjugado a un lípido. Los conjugados de lípido-peptido pueden incluir un péptido antigénico que está conjugado directamente a un lípido, o está enlazado a un enlazador que está conjugado a un lípido.

Los péptidos conjugados a lípidos son bien conocidos (lipopéptidos) como agentes de vacuna, pero en nuestras manos los lípidos conjugados directamente con el péptido NO exhiben direccionamiento a los ganglios linfáticos, porque los conjugados no son lo suficientemente solubles para dividirse preferentemente en albúmina en presencia de células; en su lugar, se insertan pesadamente en las membranas celulares y, por lo tanto, quedan atrapados en un sitio de inyección.

Los péptidos antigénicos directamente conjugados a lípidos (lipopéptidos) se han estudiado ampliamente como una modalidad para mejorar la eficacia de la vacuna (Jackson, et al in *New Generation Vaccines* (2011); Eriksson & Jackson *Curr Protein Pept Sci* 8, 412-417 (2007); BenMohamed, et al. *The Lancet Infectious Diseases* 2, 425-431 (2002)). Estas moléculas generalmente no exhiben direccionamiento a los ganglios linfáticos. Esto se ilustra mediante los datos de las figuras 2G y H, donde se muestra que un enlazador PEG muy corto unido a una cola de diacilo de unión a albúmina causa una inserción en membrana celular fuerte *in vitro* (2G) y no se acumula en un grado significativo en ganglios linfáticos *in vivo* después de inyección subcutánea (2H). Además, los antígenos peptídicos enlazados directamente a colas de diacilo de unión a albúmina producen respuestas inmunitarias apenas detectables *in vivo*, mientras que los lipo-PEG-péptidos provocan respuestas de linfocitos T robustas (figura 5C). Una segunda distinción de los lipopéptidos notificados anteriormente es que las colas de diacilo que promueven la unión de los lípidos y el direccionamiento a los ganglios linfáticos en este contexto no muestran actividad adyuvante directa por sí mismas, a diferencia de los lipopéptidos tales como los conjugados pam3cys-péptido, que se sabe que tienen actividad adyuvante a través de la unión a TLR-2 y otros receptores inmunoestimuladores.

1. Lípidos

Los conjugados de lípidos desvelados en el presente documento incluyen normalmente un lípido hidrófobo. El lípido puede ser lineal, ramificado o cíclico. El lípido tiene preferentemente una longitud de al menos 17 a 18 carbonos, pero puede ser más corto si muestra una buena unión a albúmina y un adecuado direccionamiento a los ganglios linfáticos.

Los conjugados que se dirigen a los ganglios linfáticos incluyen conjugados de lípido-oligonucleótido y conjugados de lípido-peptido que pueden ser trasladados desde el sitio de administración a través de la linfa al ganglio linfático. En realizaciones preferidas, la actividad se basa, en parte, en la capacidad del conjugado para asociarse con albúmina en la sangre del sujeto. Por lo tanto, los conjugados dirigidos a los ganglios linfáticos incluyen normalmente un lípido que puede unirse a la albúmina en condiciones fisiológicas. Los lípidos adecuados para dirigirse al ganglio linfático pueden seleccionarse en función de la capacidad del lípido o de un conjugado de lípidos que incluye el lípido para unirse a albúmina. Los métodos adecuados para ensayar la capacidad del lípido o del conjugado de lípidos para unirse a albúmina se conocen en la técnica y se analizan en los ejemplos a continuación.

Por ejemplo, en una realización, se permite que una pluralidad de conjugados de lípidos forme micelas espontáneamente en solución acuosa. Las micelas se incuban con albúmina, o una solución que incluye albúmina tal como suero fetal bovino (FBS). Las muestras pueden analizarse, por ejemplo, mediante ELISA, cromatografía de exclusión por tamaño u otros métodos para determinar si se ha producido la unión, como se ilustra en la figura 2B. Los conjugados lipídicos pueden seleccionarse como conjugados que se dirigen a los ganglios linfáticos si están en presencia de albúmina, o una solución que incluya albúmina tal como suero fetal bovino (FBS), las micelas se disocian y los conjugados de lípidos se unen a albúmina como se analizó anteriormente.

Los ejemplos de lípidos preferidos para su uso en conjugados de lípidos que se dirigen a ganglios linfáticos incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos con colas alifáticas de 8-30 carbonos, que incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos lineales e insaturados, ácidos grasos saturados e insaturados ramificados, y derivados de ácidos grasos, tales como ésteres de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos y tioésteres de ácidos grasos, diacil lípidos, colesterol, derivados de colesterol y ácidos esteroides tales como ácidos biliares; Lípido A o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el lípido es un diacil lípido o un lípido de dos colas. En algunas realizaciones, las colas en el diacil lípido contienen de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 carbonos y pueden estar saturadas,

insaturadas o combinaciones de las mismas. Las colas se pueden acoplar al grupo de la cabeza a través de enlaces por enlace éster, enlaces por enlace amida, enlaces por enlace tioéster, o combinaciones de los mismos. En una realización particular, los diacil lípidos son lípidos fosfatados, glucolípidos, esfingolípidos o combinaciones de los mismos.

5 Preferentemente, los conjugados que se dirigen a ganglios linfáticos incluyen un lípido que tiene 8 o más unidades de carbono de longitud. Se cree que aumentar el número de unidades lipídicas puede reducir la inserción del lípido en la membrana plasmática de las células, lo que permite que el conjugado de lípidos permanezca libre para unirse a albúmina y el tráfico hasta el ganglio linfático.

10 Por ejemplo, el lípido puede ser un diacil lípido compuesto por dos colas de hidrocarburos C18.

15 En algunas realizaciones, el lípido para su uso en la preparación de conjugados de lípidos que se dirigen a ganglios linfáticos no es un hidrocarburo monocatenario (por ejemplo, C18) o colesterol. Se ha explorado la conjugación de colesterol para mejorar la inmunomodulación de adyuvantes moleculares tales como CpG y la inmunogenicidad de péptidos, pero los conjugados de colesterol, que se asocian bien con las lipoproteínas pero mal con la albúmina, muestran un direccionamiento deficiente a los ganglios linfáticos y una baja inmunogenicidad en las vacunas en comparación con conjugados a unión óptima a albúmina (figura 2C).

20 2. Carga

La carga de los conjugados desvelados en el presente documento es normalmente un adyuvante molecular tal como un oligonucleótido inmunoestimulador, o un antígeno peptídico. Sin embargo, la carga también puede ser cualquier compuesto inmunomodulador, tal como un agonista del receptor de tipo Toll.

25 a. Adyuvantes moleculares

Se desvelan conjugados de lípido-oligonucleótido. Los conjugados de oligonucleótidos descritos en el presente documento contienen normalmente un oligonucleótido inmunoestimulador.

30 En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulador puede servir como un ligando para receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los ejemplos de PRR incluyen la familia de moléculas de señalización de tipo Toll que desempeñan un papel en el inicio de respuestas inmunitarias innatas y también influyen en estas últimas y en respuestas inmunitarias adaptativas más específicas de antígeno. Por lo tanto, el oligonucleótido puede servir como un ligando para una molécula de señalización de la familia de tipo Toll, tal como el receptor 9 de tipo Toll (TLR9).

40 Por ejemplo, los sitios CpG no metilados pueden ser detectados por TLR9 en células dendríticas plasmocitoides y linfocitos B en seres humanos (Zaida, et al., *Infection and Immunity*, 76(5):2123-2129, (2008)). Por lo tanto, la secuencia de oligonucleótidos puede incluir uno o más citosina-guanina no metilado (CG o CpG, usados indistintamente) como dinucleótidos. La "p" se refiere al esqueleto de fosfodiéster del ADN, como se analiza a continuación con más detalle, algunos oligonucleótidos que incluyen CG pueden tener un esqueleto modificado, por ejemplo, un esqueleto de fosforotioato (PS).

45 En algunas realizaciones, un oligonucleótido inmunoestimulador puede contener más de un dinucleótido CG, dispuesto de forma contigua o separado por uno o más nucleótidos intermedios. El o los motivos CpG pueden estar en el interior de la secuencia de oligonucleótidos. Numerosas secuencias de nucleótidos estimulan el TLR9 con variaciones en el número y la ubicación del o de los dinucleótidos de CG, así como las secuencias de bases precisas que flanquean los dímeros de CG.

50 Normalmente, los ODN de CG se clasifican basándose en su secuencia, estructuras secundarias y efecto sobre células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Las cinco clases son Clase A (Tipo D), Clase B (Tipo K), Clase C, Clase P y Clase S (Vollmer, J & Krieg, AM, *Advanced drug delivery reviews* 61(3): 195-204 (2009), incorporado en el presente documento como referencia). Los ODN de CG pueden estimular la producción de interferones de Tipo I (por ejemplo, IFN α) e inducir la maduración de las células dendríticas (CD). Algunas clases de ODN también son activadores potentes de linfocitos citolíticos naturales (NK) a través de la señalización indirecta de citocinas. Algunas clases son estimuladores potentes de la maduración de linfocitos B y monocitos humanos (Weiner, GL, *PNAS USA* 94(20): 10833-7 (1997); Dalpke, AH, *Immunology* 106(1): 102-12 (2002); Hartmann, G, *J of Immun.* 164(3): 1617-2 (2000), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia).

60 Otros receptores PRR de tipo Toll incluyen TLR3, y TLR7 que pueden reconocer ARN bicatenario, ARN monocatenario y bicatenario corto, respectivamente, y receptores tipo-(RIG-I) del gen I inducibles por ácido retinoico, concretamente RIG-I y gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5), que se conocen mejor como receptores de detección de ARN en el citosol. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el oligonucleótido contiene un ligando funcional para los receptores TLR3, TLR7 o de tipo RIG-I, o combinaciones de los mismos.

65

En la técnica se conocen ejemplos de oligonucleótidos inmunoestimuladores y métodos para prepararlos, véase por ejemplo, Boder, P. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 5(1):87-93 (2011), incorporado como referencia en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, la carga de oligonucleótidos incluye dos o más secuencias inmunoestimuladoras.

El oligonucleótido puede tener entre 2-100 bases nucleótídicas de longitud, incluyendo, por ejemplo, 5 bases nucleótídicas de longitud, 10 bases nucleótídicas de longitud, 15 bases nucleótídicas de longitud, 20 bases nucleótídicas de longitud, 25 bases nucleótídicas de longitud, 30 bases nucleótídicas de longitud, 35 bases nucleótídicas de longitud, 40 bases nucleótídicas de longitud, 45 bases nucleótídicas de longitud, 50 bases nucleótídicas de longitud, 60 bases nucleótídicas de longitud, 70 bases nucleótídicas de longitud, 80 bases nucleótídicas de longitud, 90 bases nucleótídicas de longitud, 95 bases nucleótídicas de longitud, 98 bases nucleótídicas de longitud, 100 bases nucleótídicas de longitud o más.

15 El extremo 3' o el extremo 5' de los oligonucleótidos pueden conjugarse al bloque polar o el lípido. En una realización preferida, el extremo 5' del oligonucleótido está enlazado al bloque polar o al lípido.

Los oligonucleótidos pueden ser nucleótidos de ADN o ARN que incluyen normalmente una base heterocíclica (base de ácido nucleico), un resto de azúcar unido a la base heterocíclica y un resto de fosfato que esterifica una función hidroxilo del resto de azúcar. Los principales nucleótidos de origen natural comprenden uracilo, timina, citosina, adenina y guanina como bases heterocíclicas y azúcar de ribosa o desoxirribosa enlazada mediante enlaces fosfodiéster.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos están compuestos por análogos de nucleótidos que se han modificado químicamente para mejorar la estabilidad, la semivida o la especificidad o afinidad por un receptor diana, en relación con un homólogo de ADN o ARN. Las modificaciones químicas incluyen la modificación química de nucleobases, restos de azúcar, enlaces nucleotídicos, o combinaciones de los mismos. Como se usa en el presente documento, "nucleótido modificado" o "nucleótido modificado químicamente" define un nucleótido que tiene una modificación química de uno o más de los constituyentes de la base heterocíclica, el resto de azúcar o el resto de fosfato. En algunas realizaciones, la carga del nucleótido modificado se reduce en comparación a oligonucleótidos de ADN o ARN de la misma secuencia de nucleobases. Por ejemplo, el oligonucleótido puede tener una carga negativa baja, ninguna carga o carga positiva.

Normalmente, los análogos de nucleósidos soportan bases capaces de formar enlaces de hidrógeno mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick con las bases polinucleotídicas estándar, donde el esqueleto del análogo presenta las bases de una manera que permite dicho enlace de hidrógeno de una manera específica de secuencia entre la molécula de análogo de oligonucleótido y las bases en un polinucleótido estándar (por ejemplo, ARN monocatenario o ADN monocatenario). En algunas realizaciones, los análogos tienen un esqueleto que contiene fósforo, sustancialmente no cargado.

40

i. Bases heterocíclicas

Los principales nucleótidos de origen natural incluyen uracilo, timina, citosina, adenina y guanina como las bases heterocíclicas. Los oligonucleótidos pueden incluir modificaciones químicas en sus constituyentes de nucleobase. Las modificaciones químicas de las bases heterocíclicas o los análogos de bases heterocíclicas pueden ser eficaces para aumentar la afinidad o estabilidad de unión en la unión a una secuencia diana. Las bases heterocíclicas modificadas químicamente incluyen, pero sin limitación, inosina, 5-(1-propinil)uracilo (pU), 5-(1-propinil)citosina (pC), 5-metilcitosina, 8-oxo-adenina, pseudocitosina, pseudoisocitosina, 5 y 2-amino-5-(2'-desoxi-beta.-D-ribofuranosil)piridina (2-aminopiridina), y diversos derivados de pirrolo- y pirazolopirimidina. Se podrían usar dinucleótidos cíclicos que se sabe que activan sensores de peligro citosólico tales como STING.

ii. Modificaciones de azúcar

Los oligonucleótidos también pueden contener nucleótidos con restos de azúcar modificados o análogos de restos de azúcar. Las modificaciones de los restos de azúcar incluyen, pero sin limitación, 2'-O-aminoetilo, 2'-O-amonioetilo (2'-OAE), 2'-O-metoxi, 2'-O-metilo, 2-guanidoetilo (2'-OGE), 2'-O,4'-C-metileno (ANB), 2'-O- (metoxietilo) (2'-OME) y 2'-O-(N-(metil)acetamido) (2'-OMA). Las sustituciones de restos de azúcar 2'-O-aminoetilo son especialmente preferidas porque están protonadas a pH neutro y, por lo tanto, suprimen la repulsión de la carga entre el TFO y el dúplex diana. Esta modificación estabiliza la conformación endo-C3 de la ribosa o desoxirribosa y también forma un puente con el fosfato i-1 en la cadena de purina del dúplex.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido es un oligonucleótido de morfolino. Los oligonucleótidos de morfolino están compuestos normalmente por dos monómeros de morfolino más que contienen restos de emparejamiento de bases de purina o pirimidina eficaces para unirse, mediante enlaces de hidrógeno específicos de base, a una base en un polinucleótido, que están enlazados entre sí por enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de largo, que unen el nitrógeno morfolino de un monómero al carbono exocíclico 5' de un monómero adyacente. El resto de

emparejamiento de bases de purina o pirimidina es normalmente adenina, citosina, guanina, uracilo o timina. La síntesis, las estructuras y las características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las patentes de Estados Unidos N.º 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063 y 5.506.337.

5 Las propiedades importantes de las subunidades basadas en morfolino incluyen normalmente: la capacidad de enlazarse en una forma oligomérica por enlaces del esqueleto estables y sin carga; la capacidad de soportar una base nucleotídica (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo o inosina) de modo que el polímero formado pueda hibridar con un ácido nucleico diana de base complementaria, incluyendo ARN diana, con T_m alta, incluso con oligómeros tan cortos como 10-14 bases; la capacidad del oligómero para ser transportado activamente a células de mamíferos; y la capacidad de un oligómero:heterodúplex de ARN para resistir la degradación por ARNasa.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos emplean subunidades basadas en morfolino que portan restos de emparejamiento de bases, unidos por enlaces no cargados, como se ha descrito anteriormente.

iii. Enlaces internucleotídicos

Oligonucleótidos conectados por un enlace internucleotídico que se refiere a un enlace químico entre dos restos de nucleósidos. Las modificaciones al esqueleto de fosfato de los oligonucleótidos de ADN o ARN pueden aumentar la afinidad de unión o la estabilidad de los oligonucleótidos, o reducir la susceptibilidad de los oligonucleótidos a la digestión con nucleasa. Las modificaciones catiónicas, incluyendo, pero sin limitación, dietil-etilendiamida (DEED) o dimetilaminopropilamina (DMAP) pueden ser especialmente útiles debido a la disminución de la repulsión electrostática entre el oligonucleótido y una diana. Las modificaciones del esqueleto de fosfato también pueden incluir la sustitución por un átomo de azufre de uno de los oxígenos que no forman puentes en el enlace fosfodiéster. Esta sustitución crea un enlace internucleosídico de fosforotioato en lugar del enlace fosfodiéster. Se ha demostrado que los oligonucleótidos que contienen enlaces internucleosídicos de fosforotioato son más estables *in vivo*.

Los ejemplos de nucleótidos modificados con carga reducida incluyen enlaces internucleotídicos modificados, tales como análogos de fosfato que tienen enlaces intersubunitarios aquirales y no cargados (por ejemplo, Sterchak, E. P. et al., *Organic Chem.*, 52:4202, (1987)), y polímeros a base de morfolino no cargados que tienen enlaces intersubunitarios aquirales (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.034.506), como se ha analizado anteriormente. Algunos análogos del enlace internucleotídico incluyen morfolidato, acetal y heterociclos unidos a poliamida.

En otra realización, los oligonucleótidos están compuestos por ácidos nucleicos bloqueados. Los ácidos nucleicos bloqueados (ANB) son nucleótidos de ARN modificados (véase, por ejemplo, Braasch, et al., *Chem. Biol.*, 8(1):1-7 (2001)). Los ANB forman híbridos con ADN que son más estables que los híbridos de ADN/ADN, una propiedad similar a la de los híbridos de ácido nucleico peptídico (ANP)/ADN. Por lo tanto, el ANB se puede usar tal como lo serían las moléculas de ANP. La eficiencia de enlace de ANB puede aumentarse en algunas realizaciones añadiéndole cargas positivas. Los sintetizadores comerciales de ácidos nucleicos y la química estándar de la fosforamidita se usan para elaborar los ANB.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos están compuestos por ácidos nucleicos peptídicos. Los ácidos nucleicos peptídicos (ANP) son imitadores de ADN sintéticos en los cuales el esqueleto de fosfato del oligonucleótido se reemplaza en su totalidad por unidades de N-(2-aminoetil)glicina repetitivas y los enlaces fosfodiéster se reemplazan normalmente por enlaces peptídicos. Las diversas bases heterocíclicas están unidas al esqueleto por enlaces carbonilo de metileno. Los ANP mantienen un espaciamiento de las bases heterocíclicas que es similar a los oligonucleótidos de ADN convencionales, pero son moléculas aquirales y con carga neutra. Los ácidos nucleicos peptídicos están compuestos por monómeros de ácidos nucleicos peptídicos.

Otras modificaciones del esqueleto incluyen variaciones y modificaciones de péptidos y aminoácidos. Por tanto, los constituyentes del esqueleto de los oligonucleótidos, tales como APN, pueden ser enlaces peptídicos o, como alternativa, pueden ser enlaces peptídicos-no peptídicos. Los ejemplos incluyen caperuzas de acetilo, espaciadores de amino tales como ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (denominados en el presente documento enlazadores O), aminoácidos tales como lisina son particularmente útiles si se desean cargas positivas en el ANP, y similares. Los métodos para el ensamblaje químico de ANP son bien conocidos. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.539.082, 5.527.675, 5.623.049, 5.714.331, 5.736.336, 5.773.571 y 5.786.571.

Los oligonucleótidos incluyen opcionalmente uno o más residuos o modificaciones terminales en uno o ambos extremos para aumentar la estabilidad y/o la afinidad del oligonucleótido por su diana. Los restos cargados positivamente usados comúnmente incluyen los aminoácidos lisina y arginina, aunque otros restos cargados positivamente también pueden ser útiles. Los oligonucleótidos pueden modificarse adicionalmente para ser recubiertos en el extremo para prevenir la degradación usando un grupo propilamina. Los procedimientos para los oligonucleótidos de cobertura 3' o 5' son bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido es ADN monocatenario, ARN monocatenario o ARN bicatenario.

b. Antígenos peptídicos

Se desvelan conjugados de lípido-péptido. Los conjugados de péptidos descritos en el presente documento incluyen normalmente una proteína o polipéptido antigénico.

5 El péptido puede ser de 2-100 aminoácidos (aa), incluyendo, por ejemplo, 5 aminoácidos, 10 aminoácidos, 15 aminoácidos, 20 aminoácidos, 25 aminoácidos, 30 aminoácidos, 35 aminoácidos, 40 aminoácidos, 45 aminoácidos o 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, un péptido puede tener más de 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido puede ser > 100 aminoácidos.

10 Una proteína/péptido puede ser lineal, ramificado o cíclico. El péptido puede incluir D-aminoácidos D, L-aminoácidos o una combinación de los mismos. El péptido o proteína puede conjugarse al bloque polar o lípido en el extremo N o el extremo C del péptido o proteína.

15 La proteína o polipéptido puede ser cualquier proteína o péptido que pueda inducir o aumentar la capacidad del sistema inmunitario para desarrollar anticuerpos y respuestas de linfocitos T a la proteína o péptido. Los ejemplos de antígenos peptídicos y proteicos específicos que pueden usarse en los conjugados de lípido-péptido desvelados en el presente documento se analizan con más detalle a continuación con respecto a antígenos preferidos que pueden usarse en formulaciones de vacunas.

20 Las micelas basadas en lípidos-proteínas pueden formarse en una solución acuosa por autoensamblaje de conjugados que contienen un antígeno peptídico enlazado (unido) a un resto o derivado de polietilenglicol (PEG) o análogo del mismo, que está enlazado a lípidos hidrófobos.

c. Otras cargas

En general, la carga puede incluir agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. Por ejemplo, los fármacos quimioterapéuticos son interesantes para atacar tumores, ya que se sabe que la albúmina se acumula en los tumores por el efecto EPR y también por el metabolismo rápido en los tumores.

30 En algunas realizaciones, los conjugados de lípidos descritos en el presente documento incluyen una marca de detección, por ejemplo, un fluoróforo tal como fluoresceína o rodamina, colorantes de Alexa Fluor, colorantes de DyLight Fluor, colorantes de Quasar y Cal Fluor, colorantes de cianina (Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7) u otros colorantes fluorescentes.

3. Bloque polar/enlazador

35 Para que el conjugado sea trasladado de manera eficiente al ganglio linfático, el conjugado debe permanecer soluble. Por lo tanto, se puede incluir un enlazador de bloque polar entre la carga y el lípido para aumentar la solubilidad del conjugado. El bloque polar reduce o evita la capacidad del lípido para insertarse en la membrana plasmática de las células, tales como células en el tejido adyacente al sitio de la inyección. El bloque polar también puede reducir o evitar la capacidad de la carga, tal como oligonucleótidos sintéticos que contienen un esqueleto de PS, de asociarse no específicamente con proteínas de la matriz extracelular en el sitio de administración. El bloque polar aumenta la solubilidad del conjugado sin impedir su capacidad de unirse a albúmina. Se cree que esta combinación de características permite que el conjugado se una a albúmina presente en el suero o el líquido intersticial, y permanezca en circulación hasta que la albúmina sea trasladada a y retenida en un ganglio linfático.

40 La longitud y la composición del bloque polar se pueden ajustar basándose en los lípidos y la carga seleccionados. Por ejemplo, para los conjugados de oligonucleótidos, el propio oligonucleótido puede ser suficientemente polar para garantizar la solubilidad del conjugado, por ejemplo, oligonucleótidos que tienen una longitud de 10, 15, 20 o más nucleótidos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, no se requiere un enlazador de bloque polar adicional. Sin embargo, dependiendo de la secuencia de aminoácidos, algunos péptidos lipidados pueden ser esencialmente insolubles. En estos casos, puede ser deseable incluir un bloque polar que imite el efecto de un oligonucleótido polar.

45 Se puede usar un bloque polar como parte de cualquiera de los conjugados de lípidos descritos en el presente documento, por ejemplo, conjugados de lípido-oligonucleótido y conjugados de lípido-péptido, que reducen la inserción de la membrana celular/la división preferencial sobre albúmina. Los bloques polares adecuados incluyen, pero sin limitación, oligonucleótidos, tales como los analizados anteriormente, un polímero hidrófilo que incluye, pero sin limitación, poli(etilenglicol) (MW: 500 Da a 20.000 Da), poli(acrilamida) (MW: 500 Da a 20.000 Da), ácido poli(acrílico); una cadena de aminoácidos hidrófilos tales como serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina o combinaciones de los mismos; polisacáridos, incluyendo, pero sin limitación, dextrano (MW: 1.000 Da a 2.000.000 Da), o combinaciones de los mismos.

65 El lípido hidrófobo y el enlazador/carga están enlazados covalentemente. El enlace covalente puede ser un enlace no escindible o un enlace escindible. El enlace no escindible puede incluir un enlace amida o un enlace fosfato, y el

enlace escindible puede incluir un enlace disulfuro, enlace escindible con ácido, enlace éster, enlace anhídrido, enlace biodegradable o enlace escindible con enzima.

i. Enlazadores de etilenglicol

5 En una realización preferida, el bloque polar es una o más unidades de etilenglicol (EG), más preferentemente 2 o más unidades de EG (es decir, polietilenglicol (PEG)). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un conjugado de péptidos incluye una proteína o péptido (por ejemplo, antígeno peptídico) y un lípido hidrófobo enlazado por una molécula de polietilenglicol (PEG) o un derivado o análogo del mismo.

10 En algunas realizaciones, los conjugados de proteína descritos en el presente documento contienen antígeno de proteína enlazado a PEG que a su vez está enlazado a un lípido hidrófobo, o conjugados de lípido-Gn-ON, ya sea covalentemente o mediante la formación de conjugados de proteína-oligo que hibridan con micelas de oligos.

15 El número preciso de unidades de EG depende del lípido y la carga, sin embargo, normalmente, un bloque polar puede tener entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 80, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70, o entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 unidades de EG. En algunas realizaciones, el bloque polar tiene entre aproximadamente 45 y 55 unidades de EG. Por ejemplo, en una realización preferida, el bloque polar tiene 48 unidades de EG.

ii. Enlazadores oligonucleotídicos

25 Como se analizó anteriormente, en algunas realizaciones, el bloque polar es un oligonucleótido. El enlazador de bloque polar puede ser cualquier secuencia, por ejemplo, la secuencia del oligonucleótido puede ser una secuencia aleatoria, o una secuencia elegida específicamente por sus propiedades moleculares o bioquímicas (por ejemplo, altamente polar). En algunas realizaciones, el enlazador de bloque polar incluye una o más series de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), uracilo (U) o un análogo de los mismos consecutivos. En algunas realizaciones, el enlazador de bloque polar consiste en una serie de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), uracilo (U) o un análogo de los mismos consecutivos.

30 En una realización, el enlazador es una o más guaninas, por ejemplo entre 1-10 guaninas. Se ha descubierto que la alteración del número de guaninas entre una carga, tal como un oligonucleótido de CpG, y una cola lipídica, controla la estabilidad de la micela en presencia de proteínas séricas. Por lo tanto, el número de guaninas en el enlazador se puede seleccionar basándose en la afinidad deseada del conjugado por proteínas séricas tales como la albúmina. Como se ilustra en los siguientes ejemplos, cuando la carga es un oligonucleótido inmunoestimulador de CpG y la cola lipídica es un diacil lípido, el número de guaninas afecta a la capacidad de las micelas formadas en solución acuosa para disociarse en presencia de suero: el 20 % de las micelas no estabilizadas (lipo-G₀T₁₀-CG) estaban intactas, mientras que el 80 % restante se rompió y se unió con los componentes de FBS. En presencia de guaninas, el porcentaje de micelas intactas aumentó del 36 % (lipo-G₂T₈-CG) al 73 % (lipo-G₄T₆-CG), y finalmente alcanzó el 90 % (lipo-G₆T₄-CG). El aumento del número de guaninas a ocho (lipo-G₈T₂-CG) y diez (lipo-G₁₀T₀-CG) no mejoró aún más la estabilidad de la micela.

45 Por lo tanto, en una realización preferida, el enlazador en un conjugado que se dirige a ganglios linfáticos puede incluir 1 o 2 guaninas. Como se analiza a continuación con más detalle, los enlazadores que incluyen 3 o más guaninas consecutivas se pueden usar para formar conjugados estabilizadores de micelas con propiedades que son muy adecuadas para aplicaciones locales en o cerca del sitio de administración.

B. Conjugados estabilizadores de micelas

50 Los conjugados estabilizadores de micelas incluyen conjugados tales como conjugados de lípido-oligonucleótido y conjugados de lípido-péptido que se acumulan en el tejido que rodea el sitio de administración. Los conjugados normalmente no se unen a albúmina. En algunas realizaciones, el lípido usado para preparar un conjugado de lípidos estabilizador de micelas es el mismo que el lípido usado en los conjugados de lípidos que se dirigen a los ganglios linfáticos analizados anteriormente, y la capacidad de resistir la unión a albúmina está controlada por las propiedades moleculares o bioquímicas de la carga, el enlazador, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los lípidos que no serían eficaces para su uso en conjugados dirigidos a ganglios linfáticos son útiles en conjugados estabilizadores de micelas porque los conjugados estabilizadores de micelas no tienen necesariamente que unirse a la albúmina.

60 Los conjugados estabilizadores de micelas pueden seleccionarse basándose en la capacidad para formar espontáneamente micelas en solución acuosa que no son rotas por componentes séricos tales como la albúmina, como se analizó anteriormente. Los métodos adecuados para ensayar la capacidad del lípido o de los conjugados de lípidos para unirse a albúmina se conocen en la técnica y se analizan en los ejemplos a continuación. Por ejemplo, en una realización, se permite que una pluralidad de conjugados de lípidos forme micelas espontáneamente en solución acuosa. Las micelas se incuban con albúmina, o una solución que incluye albúmina tal como suero fetal bovino (FBS). Las muestras pueden analizarse, por ejemplo, mediante ELISA, cromatografía de separación por

tamaño u otros métodos para determinar si se ha producido la unión. Los conjugados lipídicos pueden seleccionarse como conjugados estabilizadores de micelas si están en presencia de albúmina, o una solución que incluya albúmina tal como suero fetal bovino (FBS), las micelas permanecen intactas y los conjugados de lípidos no se unen a albúmina.

5 Los ejemplos de lípidos preferidos para su uso en conjugados de lípidos estabilizadores de micelas incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos con colas alifáticas de 8-30 carbonos, que incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos lineales e insaturados y saturados, ácidos grasos saturados e insaturados ramificados, y derivados de ácidos grasos, tales como ésteres de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos y tioésteres de ácidos grasos, diacil lípidos, colesterol, derivados de colesterol y ácidos esteroides tales como ácidos biliares; Lípido A o combinaciones de los mismos.

15 En algunas realizaciones, el lípido es un diacil lípido o un lípido de dos colas. En algunas realizaciones, las colas en el diacil lípido contienen de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 carbonos y pueden estar saturadas, insaturadas o combinaciones de las mismas. Las colas se pueden acoplar al grupo de la cabeza a través de enlaces por enlace éster, enlaces por enlace amida, enlaces por enlace tioéster, o combinaciones de los mismos. En una realización particular, los diacil lípidos son lípidos fosfatados, glucolípidos, esfingolípidos o combinaciones de los mismos.

20 Como se analizó anteriormente, en algunas realizaciones, la estabilidad de las micelas en presencia de albúmina se ve afectada por el enlazador. Por ejemplo, un oligonucleótido, tal como un oligonucleótido inmunoestimulador, y el lípido pueden estar enlazados por tres o más nucleótidos de guanina intermedios. Los nucleótidos pueden estar situados en el extremo 5' del oligonucleótido. Las secuencias de ADN ricas en guanina pueden formar estructuras de cuádruple a través de enlaces de hidrógeno, donde las oligoguaninas "pegan" molecularmente entre sí cuatro secuencias de ADN ricas en guanina individuales. Por tanto, los conjugados de oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden autoensamblarse en "G-cuádruples", que después se ensamblan para formar micelas que tienen un núcleo lipídico hidrófobo y una corona de ácido nucleico. Como se ilustra en los siguientes ejemplos, la estabilidad cinética de una micela puede controlarse alterando el número de nucleótidos de guanina que enlazan el lípido hidrófobo con el oligonucleótido inmunoestimulador. En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulador y el lípido hidrófobo están enlazados por una única guanina en el extremo 5' del oligonucleótido, mientras que en otras realizaciones el oligonucleótido inmunoestimulador y el lípido hidrófobo están unidos por dos guaninas en el extremo 5' del oligonucleótido. En algunas realizaciones, la oligoguanina (Gn) intermedia contiene de tres a diez guaninas ($n=3-10$).

35 La carga de conjugados estabilizadores de micelas puede incluir cualquier carga analizada anteriormente con respecto a los conjugados dirigidos a los ganglios linfáticos, así como moléculas pequeñas, oligonucleótidos o agentes terapéuticos peptídicos (es decir, cualquier carga que un experto en la materia seleccionaría para) acumulación en un sitio de administración local).

40 Los conjugados estabilizadores de micelas pueden formar micelas espontáneamente en solución acuosa por autoensamblaje. La micela tiene un núcleo lipídico hidrófobo y una superficie hidrófila. La formación de una micela en un entorno acuoso (por ejemplo, agua, tampón) es impulsada por interacciones hidrófobas, y la micela se estabiliza por la formación de los G-cuádruples, como se ha descrito anteriormente. Una micela se estabiliza aún más por la presencia de un catión, tal como potasio (K^+), en el entorno acuoso. El catión conecta dos G-cuádruples y minimiza las interacciones electrostáticas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores. Las secuencias de oligonucleótidos ricas en guanina pueden plegarse en diversos tipos de estructuras (por ejemplo, intramolecular, intermolecular, paralela y antiparalela) (Davis, J. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43, 668-698 (2004)). Para facilitar el autoensamblaje de las micelas y para minimizar el plegamiento de los oligonucleótidos, los conjugados de lípidos-oligonucleótidos pueden suspenderse en agua pura para permitir el ensamblaje de la micela, y después se puede añadir un tampón que contiene potasio para estabilizar los G-cuádruples.

55 En algunas realizaciones, las micelas de una población de micelas homogénea son de tamaño sustancialmente uniforme. Como se usa en el presente documento, las micelas de una población "homogénea" están compuestas de manera similar por el mismo tipo de conjugado de lípido-oligonucleótido (por ejemplo, un conjugado L-5'-G_n-CG-ODN-3').

60 Como se analizó anteriormente, la estabilidad de la micela puede controlarse alterando el número de nucleótidos de guanina en el bloque polar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el conjugado incluye uno o más nucleótidos de guanina en el extremo 5' del oligonucleótido y el lípido hidrófobo unidos a la mayoría de la guanina 5'. La "estabilidad" de las micelas, como se usa en el presente documento, se refiere a la resistencia al desensamblaje o cambios en el tamaño de las micelas en presencia de suero, albúminas u otras proteínas o lípidos, y/o resistencia de las micelas a cambios en el tamaño o la composición en presencia de células.

65 El diámetro de una micela como se describe en el presente documento puede ser de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, el diámetro de una micela es de 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 11 nm, 12 nm, 13 nm, 14 nm, 15 nm, 16 nm, 17 nm, 18 nm, 20 nm, 21 nm, 22 nm, 23 nm, 24 nm,

25 nm, 26 nm, 27 nm, 28 nm, 29 nm, 30 nm, 31 nm, 32 nm, 33 nm, 34 nm, 35 nm, 36 nm, 37 nm, 38 nm, 39 nm, 40 nm, 41 nm, 42 nm, 43 nm, 44 nm, 45 nm, 46 nm, 47 nm, 48 nm, 49 nm, 50 nm, 51 nm, 52 nm, 53 nm, 54 nm, 55 nm, 56 nm, 57 nm, 58 nm, 59 nm, 60 nm, 61 nm, 62 nm, 63 nm, 64 nm, 65 nm, 66 nm, 67 nm, 68 nm, 69 nm, 70 nm, 71 nm, 72 nm, 73 nm, 74 nm, 75 nm, 76 nm, 77 nm, 78 nm, 79 nm, 80 nm, 81 nm, 82 nm, 83 nm, 84 nm, 85 nm, 86 nm, 87 nm, 88 nm, 89 nm, 90 nm, 91 nm, 92 nm, 93 nm, 94 nm, 95 nm, 96 nm, 97 nm, 98 nm, 99 nm o 100 nm. En algunas realizaciones, el diámetro de una micela es de aproximadamente 20 nm o aproximadamente 50 nm.

III. Formulaciones

A. Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen conjugados de lípidos. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante vías de administración parenteral (intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), transdérmica (ya sea de forma pasiva o usando iontoforesis o electroporación) o transmucosa (nasal, vaginal, rectal o sublingual) o usando insertos bioerosionables y pueden formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía sistémica, por ejemplo, mediante administración intravenosa o intraperitoneal, en una cantidad eficaz para la administración de las composiciones a células diana. Otras vías posibles incluyen transdérmica u oral.

En determinadas realizaciones, las composiciones se administran localmente, por ejemplo mediante inyección directamente en un sitio a tratar. En algunas realizaciones, las composiciones se inyectan o se administran de otro modo directamente a uno o más tumores. Normalmente, la inyección local provoca un aumento de la concentración localizada de las composiciones que es mayor que la que puede lograrse mediante la administración sistémica. En algunas realizaciones, las composiciones se administran localmente a las células apropiadas usando un catéter o jeringa. Otros medios para administrar dichas composiciones localmente a las células incluyen usar bombas de infusión (por ejemplo, de Alza Corporation, Palo Alto, California) o incorporar las composiciones en implantes poliméricos (véase, por ejemplo, P. Johnson y JG Lloyd-Jones, eds., *Drug Delivery Systems* (Chichester, Inglaterra: Ellis Horwood Ltd., 1987), que puede efectuar una liberación sostenida de los nanolipogeles en la zona inmediata del implante.

A medida que se realicen más estudios, irá emergiendo información con respecto a los niveles de dosificación adecuados para el tratamiento de diversas dolencias en diversos pacientes, y el especialista normalmente experto, considerando el contexto terapéutico, la edad y la salud general del receptor, será capaz de discernir la dosificación adecuada. La dosis seleccionada depende del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración y de la duración del tratamiento deseado. Generalmente se administran niveles de dosificación de 0,001 a 10 mg/kg de peso corporal diariamente a los mamíferos. En general, para la inyección o infusión intravenosa, la dosis puede ser menor.

1. Formulaciones para administración parenteral

En una realización preferida, los conjugados de lípidos se administran en una solución acuosa, por inyección parenteral. En algunas realizaciones, la composición incluye albúmina u otras proteínas séricas.

La formulación puede estar en forma de una suspensión o emulsión. En general, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz del conjugado e incluyen opcionalmente diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluir diluyentes de agua estéril, solución salina tamponada con diversos contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; y opcionalmente, aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, TWEEN® 20, TWEEN® 80 también denominados polisorbato 20 u 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio) y conservantes (por ejemplo, timersol, alcohol bencílico) y sustancias volumétricas (por ejemplo, lactosa, manitol). Ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Las formulaciones se pueden liofilizar y redissolver/resuspender inmediatamente antes de su uso. La formulación puede esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retenga bacterias, incorporando agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composiciones.

2. Formulaciones para la administración tópica y mucosa

Los conjugados de lípidos pueden aplicarse por vía tópica. La administración tópica puede incluir la aplicación a los pulmones (pulmonar), nasal, oral (sublingual, bucal), vaginal o mucosa rectal. En algunos casos, los conjugados pueden ser transcitosados sobre albúmina a través de las barreras mucosas

Las composiciones pueden administrarse a los pulmones mientras se inhalan y atraviesan el revestimiento epitelial del pulmón al torrente sanguíneo cuando se administran como un aerosol o partículas secadas por pulverización que tienen un diámetro aerodinámico de menos de aproximadamente 5 micras.

- 5 Se puede usar una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la materia. Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles en el mercado son el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt Inc., St. Louis, Mo.); el nebulizador Acorn® II (Marquest Medical Products, Englewood, Colorado); el inhalador de dosis medida Ventolin® (Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.); y el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons Corp., Bedford, Mass.). Nektar, Alkermes y Mannkind tienen preparaciones de insulina en polvo inhalables aprobadas o en ensayos clínicos en las que la tecnología podría aplicarse a las formulaciones descritas en el presente documento.

- 15 Las formulaciones para administración a la mucosa serán normalmente partículas de fármaco secadas por pulverización, que pueden incorporarse en un comprimido, gel, cápsula, suspensión o emulsión. Los excipientes farmacéuticos estándar están disponibles de cualquier formulador. Las formulaciones orales pueden estar en forma de chicle, tiras de gel, comprimidos, cápsulas o pastillas para chupar.

- 20 También se pueden preparar formulaciones transdérmicas. Normalmente, estas serán pomadas, lociones, pulverizados o parches, todos los cuales se pueden preparar usando tecnología estándar. Las formulaciones transdérmicas pueden incluir potenciadores de la penetración.

B. Composiciones inmunógenas

- 25 Los conjugados desvelados en el presente documento se pueden usar en composiciones inmunógenas o como componentes en vacunas.

- 30 La combinación de un adyuvante y un antígeno se puede denominar vacuna. Cuando se administran a un sujeto en combinación, el adyuvante y el antígeno se pueden administrar en composiciones farmacéuticas separadas, o se pueden administrar juntos en la misma composición farmacéutica. Cuando se administran en combinación, el adyuvante puede ser un conjugado de lípidos, el antígeno puede ser un conjugado de lípidos, o el adyuvante y el antígeno pueden ser ambos conjugados de lípidos.

1. Antígenos

- 35 Una composición inmunógena puede incluir un conjugado de lípidos que es un adyuvante tal como un conjugado de oligonucleótido inmunoestimulador-lípido, administrado solo o en combinación con un antígeno. Los antígenos pueden ser péptidos, proteínas, polisacáridos, sacáridos, lípidos, ácidos nucleicos o combinaciones de los mismos. El antígeno puede derivarse de un virus, bacteria, parásito, planta, protozoo, hongo, tejido o célula transformada, tal como una célula cancerosa o leucémica, y puede ser una célula completa o un componente inmunógeno de la misma, por ejemplo, componentes de la pared celular o componentes moleculares de la misma.

- 45 Los antígenos adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles de fuentes comerciales y científicas. En una realización, los antígenos son organismos completamente inactivados o atenuados. Estos organismos pueden ser organismos infecciosos, tales como virus, parásitos y bacterias. Estos organismos también pueden ser células tumorales. Los antígenos pueden ser polipéptidos purificados o parcialmente purificados derivados de tumores o fuentes víricas o bacterianas. Los antígenos pueden ser polipéptidos recombinantes producidos mediante la expresión de ADN que codifica el antígeno polipeptídico en un sistema de expresión heterólogo. Los antígenos pueden ser ADN que codifica toda o parte de una proteína antigénica. El ADN puede estar en forma de ADN vectorial tal como ADN plasmídico.

- 50 Los antígenos pueden proporcionarse como antígenos individuales o pueden proporcionarse en combinación. Los antígenos también pueden proporcionarse como mezclas complejas de polipéptidos o ácidos nucleicos. Los antígenos a modo de ejemplo se proporcionan a continuación.

55 a. Antígenos víricos

- 60 Se puede aislar un antígeno vírico de cualquier virus, incluyendo, pero sin limitación, un virus de cualquiera de las siguientes familias víricas: *Arenaviridae*, *Arterivirus*, *Astroviridae*, *Baculoviridae*, *Badnavirus*, *Bamaviridae*, *Birnaviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Caulimovirus*, *Circoviridae*, *Closterovirus*, *Comoviridae*, *Coronaviridae* ((por ejemplo, *coronavirus*, tal como virus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS)), *Corticoviridae*, *Cystoviridae*, *Deltavirus*, *Dianthovirus*, *Enamovirus*, *Filoviridae* (por ejemplo, virus de Marburg y virus del Ébola (por ejemplo, cepa de Zaire, Reston, Costa de Marfil o Sudán)), *Flaviviridae*, (por ejemplo, virus de la hepatitis C, virus del dengue 1, virus del dengue 2, virus del dengue 3 y virus del dengue 4), *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae* (por ejemplo, virus del herpes humano 1, 3, 4, 5 y 6, y citomegalovirus), *Hypoviridae*, *Iridoviridae*, *Leviviridae*, *Lipothrixviridae*, *Microviridae*, *Orthomyxoviridae* (por ejemplo virus de la gripe A y B y C),

Papovaviridae, *Paramyxoviridae* (por ejemplo, sarampión, paperas y virus sincitial respiratorio humano), *Parvoviridae*, *Picornaviridae* (por ejemplo, poliovirus, rinovirus, hepatovirus y aftovirus), *Poxviridae* (por ejemplo, virus vaccinia y de la viruela), *Reoviridae* (por ejemplo, rotavirus), *Retroviridae* (por ejemplo, lentivirus, tales como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 1 y VIH 2), *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la rabia, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, etc.), *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la rubeola, virus del dengue, etc.), y *Totiviridae*. Los antígenos víricos adecuados también incluyen la totalidad o parte de la proteína M del dengue, proteína E del dengue, D1NS1 del dengue, D1NS2 del dengue y D1NS3 del dengue.

Los antígenos víricos pueden derivarse de una cepa particular tal como un virus de papiloma, un virus del herpes, por ejemplo, herpes simple 1 y 2; un virus de la hepatitis, por ejemplo, virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus delta de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (VHE) y virus de la hepatitis G (VHG), los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas; parainfluenza, varicela zoster, citomegalivirus, Epstein-Barr, rotavirus, rinovirus, adenovirus, coxsackievirus, encefalitis equina, encefalitis japonesa, fiebre amarilla, fiebre del Valle del Rift y coriomeningitis linfocítica.

b. Antígenos bacterianos

Los antígenos bacterianos pueden originarse a partir de cualquier bacteria incluyendo, pero sin limitación, *Actinomyces*, *Anabaena*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bdellovibrio*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Caulobacter*, *Clamidia*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Halobacterium*, *Heliobacter*, *Haemophilus*, *Hemophilus influenzae tipo B (HIB)*, *Hyphomicrobium*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Meningococcus A, B y C*, *Methanobacterium*, *Micrococcus*, *Myobacterium*, *Mycoplasma*, *Myxococcus*, *Neisseria*, *Nitrobacter*, *Oscillatoria*, *Prochloron*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Phodospirillum*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Spirillum*, *Spirochaeta*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Thiobacillus* y *Treponema*, *Vibrio* y *Yersinia*.

c. Antígenos parasitarios

Los antígenos parasitarios pueden obtenerse de parásitos tales como, pero sin limitación, un antígeno derivado de *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nocardia asteroides*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* y *Schistosoma mansoni*. Estos incluyen antígenos de esporozoo, antígenos plasmodianos, tales como la totalidad o parte de una proteína de circumsporozoito, una proteína de superficie de esporozoito, un antígeno en fase hepática, una proteína asociada a membrana apical o una proteína de superficie de merozoito.

d. Alérgenos y antígenos ambientales

El antígeno puede ser un alérgeno o un antígeno ambiental, tales como, pero sin limitación, un antígeno derivado de alérgenos de origen natural, tales como alérgenos del polen (alérgenos de polen de árboles, hierbas, malezas y de gramíneas), alérgenos de insectos (alérgenos de inhalación saliva y veneno, alérgenos del pelo y la caspa de los animales, y alérgenos alimentarios. Los alérgenos de polen importantes de árboles, pastos y hierbas son aquellos que se originan de los órdenes taxonómicos de *Fagales*, *Oleales*, *Pinales* y *platanaceae* incluyendo, entre otros, Abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), árbol del plátano de sombra (*Platanus*), del orden de Poales incluyendo, por ejemplo, las gramíneas del género *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales*, incluyendo, entre otros, hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros antígenos alérgenos que pueden usarse incluyen los alérgenos de los ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento, por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, los de cucarachas, mosquitos y pulgas, por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, los de mamíferos tales como de gato, de perro y de caballo, aves, alérgenos de venenos, incluyendo aquellos que se originan a partir de insectos que pican o muerden como los del orden taxonómico de *Hymenoptera*, incluyendo abejas (superfamilia *Apidae*), avispas (superfamilia *Vespidae*), y hormigas (superfamilia *Formicoidae*), otros antígenos alérgenos que pueden usarse incluyen alérgenos por inhalación de hongos tales como los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*.

e. Antígenos de cáncer

Un antígeno de cáncer es un antígeno que normalmente es expresado preferentemente por las células cancerosas (es decir, se expresa a niveles más altos en las células cancerosas que en las células no cancerosas) y en algunos casos se expresa únicamente en las células cancerosas. El antígeno de cáncer se puede expresar dentro de una célula cancerosa o en la superficie de la célula cancerosa. El antígeno de cáncer puede ser MART-1/Melan-A, gp100, proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAbp), FAP, ciclofilina B, antígeno colorrectal asociado (CCR)-C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, antígeno específico de próstata (AEP), PSA-1, PSA-2, PSA-3, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor de linfocitos T/CD3-zeta, y CD20. El antígeno de cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-

A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9, BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, β -catenina, γ -catenina, p120ctn, gp100Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa coli (APC), fodrina, conexina 37, idiotipo de Ig, p15, gp75, gangliósido GM2, gangliósido GD2, proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, CD20 o c-erbB-2.

2. Adyuvantes

Una composición inmunógena puede incluir un conjugado de lípidos que es un antígeno tal como un conjugado de polipéptido-lípido antigénico, administrado solo o en combinación con un adyuvante.

El adyuvante puede ser sin limitación alumbre (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio); saponinas purificadas de la corteza del árbol de Q. saponaria, tal como QS21 (un glucolípido que eluye en el 21^o pico con fraccionamiento por HPLC; Antigenics, Inc., Worcester, MA); poli[di(carboxioxitofeno)fosfazeno (polímero PCPP; Virus Research Institute, EE. UU.), ligando de Flt3, factor de alargamiento de Leishmania (una proteína de Leishmania purificada; Corixa Corporation, Seattle, Wash.), ISCOMS (complejos inmunoestimuladores que contienen saponinas mixtas, lípidos y forman partículas del tamaño de un virus con poros que pueden contener antígeno; CSL, Melbourne, Australia), Pam3Cys, SB-AS4 (sistema adyuvante de SmithKline Beecham #4 que contiene alumbre y MPL; SBB, Bélgica), copolímeros de bloques no iónicos que forman micelas tales como CRL 1005 (estos contienen una cadena lineal de polioxiopropileno hidrófobo flanqueado por cadenas de polioxi-etileno, Vaxcel, Inc., Norcross, Georgia) y Montanide IMS (por ejemplo, IMS 1312, nanopartículas a base de agua combinadas con un inmunoestimulador soluble, Seppic).

Los adyuvantes pueden ser ligandos de TLR, tales como los analizados anteriormente. Los adyuvantes que actúan a través de TLR3 incluyen, sin limitación, ARN bicatenario. Los adyuvantes que actúan a través de TLR4 incluyen, sin limitación, derivados de lipopolisacáridos tales como monofosforil lípido A (MPLA; Ribic ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.) y dipéptido muramilo (MDP; Ribic) y dipéptido de treonilo-murilo (t-MDP; Ribic); OM-174 (un disacárido de glucosamina relacionado con el lípido A; OM Pharma SA, Meyrin, Suiza). Los adyuvantes que actúan a través de TLR5 incluyen, sin limitación, flagelina. Los adyuvantes que actúan a través de TLR7 y/o TLR8 incluyen ARN monocatenario, oligorribonucleótidos (ORN), compuestos sintéticos de bajo peso molecular tales como las imidazoquinolinaminas (por ejemplo, imiquimod (R-837), resiquimod (R-848)). Los adyuvantes que actúan a través de TLR9 incluyen ADN de origen vírico o bacteriano, u oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN), tales como ODN de CpG. Otra clase de adyuvantes son las moléculas que contienen fosforotioato, tales como los análogos de nucleótidos de fosforotioato y los ácidos nucleicos que contienen enlaces de esqueleto de fosforotioato.

El adyuvante también puede ser emulsiones de aceite (por ejemplo, adyuvante de Freund); formulaciones de saponina; virosomas y partículas de tipo viral; derivados bacterianos y microbianos; oligonucleótidos inmunoestimuladores; toxinas ribosilantes de ADP y derivados detoxificados; alumbre; BCG; composiciones que contienen minerales (por ejemplo, sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio, hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc.); bioadhesivos y/o mucoadhesivos; micropartículas; liposomas; formulaciones de éter de polioxi-etileno y éster de polioxi-etileno; polifosfazeno; péptidos de muramilo; compuestos de imidazoquinolona; y sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol).

Los adyuvantes también pueden incluir inmunomoduladores tales como citocinas, interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

C. Terapias de combinación

En algunas realizaciones, los conjugados se administran en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes pueden administrarse en la misma composición farmacéutica que los conjugados o los conjugados y el agente terapéutico adicional pueden administrarse en composiciones farmacéuticas separadas.

En algunas realizaciones, los conjugados se administran en combinación con un agente terapéutico convencional usado para el tratamiento de la enfermedad o afección que se está tratando. Los agentes terapéuticos convencionales son conocidos en la técnica y pueden ser determinados por un experto en la materia basándose en la enfermedad o trastorno a tratar. Por ejemplo, si la enfermedad o afección es cáncer, los conjugados pueden administrarse conjuntamente con un fármaco quimioterapéutico; o si la enfermedad o afección es una infección bacteriana, los conjugados pueden administrarse conjuntamente con un antibiótico.

IV. Métodos de uso

A. Métodos de administración de agentes inmunoestimuladores

5 1. Direccionamiento a ganglios linfáticos

Los datos presentados más adelante respaldan el descubrimiento de que la conjugación de una carga, tal como un oligonucleótido, o péptido, a un dominio de unión a albúmina puede aumentar la administración y la acumulación de la carga a los ganglios linfáticos. Los ganglios linfáticos son órganos ovalados del sistema inmunitario, distribuidos ampliamente por todo el cuerpo, incluyendo las axilas y el estómago, y están unidos por vasos linfáticos. Los ganglios linfáticos son bastiones de linfocitos B, T y otras células inmunitarias. Los ganglios linfáticos actúan como filtros o trampas para partículas extrañas y son importantes para el buen funcionamiento del sistema inmunitario. Están abarrotados de glóbulos blancos llamados linfocitos y macrófagos.

15 Los conjugados que se dirigen a los ganglios linfáticos son transportados normalmente desde el sitio de la inyección a los órganos secundarios del sistema linfático (por ejemplo, los ganglios linfáticos), donde interactúan con las células inmunitarias. Se cree que la unión a albúmina de los conjugados evita que los conjugados se viertan rápidamente en el torrente sanguíneo y los redirige al sistema linfático y a ganglios linfáticos drenantes, donde se filtran, acumulan y presentan su oligonucleótido inmunoestimulador, péptido antigénico u otra carga a las células inmunitarias.

20 Como se analizó anteriormente, los lípidos de unión a albúmina se pueden conjugar a, por ejemplo, un oligonucleótido inmunoestimulador o un péptido antigénico que aumenta el efecto inmunoestimulador del oligonucleótido o el péptido antigénico en comparación con la administración de oligonucleótido o péptido antigénico no conjugado. En algunas realizaciones, la conjugación del antígeno oligonucleótido inmunoestimulador o péptido con un lípido de unión a albúmina aumenta la acumulación de la carga 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces en comparación con la carga no conjugada.

30 2. Direccionamiento específico del tejido

Los conjugados estabilizadores de micelas se pueden usar para aumentar la administración y la acumulación de la carga al tejido en o cerca de un sitio de administración. Se cree que los conjugados estabilizadores de micelas son resistentes a la ruptura por proteínas séricas tales como la albúmina. Por lo tanto, pueden acumularse en el sitio de inyección, por ejemplo, al unirse a proteínas de la matriz extracelular o insertarse en las membranas celulares de las células locales.

35 Los conjugados estabilizadores de micelas se pueden usar para aumentar la acumulación local de oligonucleótidos inmunoestimuladores, péptidos antigénicos, moléculas pequeñas y otras dianas en el sitio de administración. En algunas realizaciones, la conjugación del antígeno oligonucleótido inmunoestimulador o péptido aumenta la acumulación local de la carga 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces en comparación con la carga no conjugada.

B. Métodos para aumentar una respuesta inmunitaria

45 Los conjugados de lípidos que incluyen un oligonucleótido inmunoestimulador o una carga de péptido antigénico pueden administrarse en una cantidad eficaz para inducir, aumentar o mejorar una respuesta inmunitaria. La "respuesta inmunitaria" se refiere a respuestas que inducen, aumentan, inducen o perpetúan la activación o eficiencia de la inmunidad innata o adaptativa. Además, se pueden usar conjugados de lípidos de unión a albúmina de antígenos polipeptídicos en ausencia de otros adyuvantes para promover la tolerancia en lugar de la inmunidad, por ejemplo, a un alérgeno o antígeno autoinmunitario. Los conjugados pueden administrarse por vía parenteral (por inyección subcutánea, intradérmica o intramuscular) a través del sistema linfático, o por administración sistémica a través del sistema circulatorio. Se observa que los ganglios linfáticos pueden filtrar los conjugados unidos a albúmina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la administración parenteral no produce una distribución sistémica, ya que los conjugados pueden ser filtrados preferentemente por los ganglios linfáticos más cercanos. Esta tendencia también reduce la toxicidad sistémica, tal como la inflamación del bazo.

55 Por consiguiente, en algunas realizaciones, los conjugados se administran en un sitio adyacente o que conduce a uno o más ganglios linfáticos que están cerca del sitio que necesita una respuesta inmunitaria (es decir, cerca de un tumor o foco de infección). En algunas realizaciones, los conjugados se administran en dosis múltiples en diversas ubicaciones por todo el cuerpo. Los conjugados, particularmente los conjugados estabilizadores de micelas también pueden administrarse directamente a un sitio que necesita una respuesta inmunitaria (por ejemplo, un tumor o un foco de infección).

60 La respuesta inmunitaria puede ser inducida, aumentada o mejorada por el conjugado de lípidos en comparación con un control, por ejemplo, una respuesta inmunitaria en un sujeto inducida, aumentada o mejorada por la carga sola, o la carga administrada usando una estrategia de administración alternativa tal como liposomas. Como se analiza a continuación con más detalle, en algunas realizaciones, los conjugados de lípidos reducen la inactivación

y/o prolongan la activación de los linfocitos T (es decir, aumentan la proliferación específica de antígeno de los linfocitos T, mejoran la producción de citocinas por los linfocitos T, estimulan la diferenciación y las funciones efectoras de los linfocitos T y/o promueven la supervivencia de linfocitos T) o superan el agotamiento y/o la anergia de linfocitos.

5 Los conjugados de lípidos se pueden usar, por ejemplo, para inducir una respuesta inmunitaria, cuando administrar la carga sola, o la carga en combinación con un sistema de administración alternativo, es ineficaz. Los conjugados de lípidos también se pueden usar para potenciar o mejorar la respuesta inmunitaria en comparación con la administración de carga sola. En algunas realizaciones, los conjugados de lípidos pueden reducir la dosis requerida para inducir, aumentar o mejorar una respuesta inmunitaria; o reducir el tiempo necesario para que el sistema inmunitario responda después de la administración.

15 Los conjugados de lípidos pueden administrarse como parte de vacunas profilácticas o composiciones inmunógenas que confieren resistencia en un sujeto a la exposición posterior a agentes infecciosos, o como parte de vacunas terapéuticas, que se pueden usar para iniciar o mejorar la respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno preexistente, tal como un antígeno vírico en un sujeto infectado con un virus o con cáncer.

20 El desenlace deseado de una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica puede variar de acuerdo con la enfermedad o afección a tratar, o de acuerdo con principios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una respuesta inmunitaria contra un agente infeccioso puede prevenir completamente la colonización y la replicación de un agente infeccioso, afectando a la "inmunidad estéril" y la ausencia de cualquier síntoma de enfermedad. Sin embargo, una vacuna contra agentes infecciosos puede considerarse eficaz si reduce el número, la gravedad o la duración de los síntomas; si reduce el número de individuos en una población con síntomas; o reduce la transmisión de un agente infeccioso. De forma similar, las respuestas inmunitarias contra el cáncer, los alérgenos o los agentes infecciosos pueden tratar completamente una enfermedad, pueden aliviar los síntomas o pueden ser una faceta en una intervención terapéutica general contra una enfermedad.

30 Los conjugados de lípidos inducen una mejor respuesta de las células efectoras, tal como una respuesta inmunitaria de los linfocitos T CD4, contra al menos uno de los componentes antigénicos o composiciones antigénicas en comparación con la respuesta de las células efectoras obtenida con la composición correspondiente sin el conjugado de lípidos. La expresión "respuesta de células efectoras mejorada" se refiere a una respuesta de células efectoras superior, tal como una respuesta de CD8 o CD4 obtenida en un paciente humano después de la administración de la composición de vacuna, que la obtenida después de la administración de la misma composición sin un conjugado de lípidos.

35 La respuesta de células efectoras mejorada se puede obtener en un paciente no sensibilizado inmunológicamente, es decir, un paciente que es seronegativo al antígeno. Esta seronegatividad puede ser el resultado de que el paciente nunca se haya enfrentado al antígeno (el llamado paciente "sin exposición previa") o, como alternativa, no haya respondido al antígeno una vez encontrado. En algunas realizaciones, la respuesta de células efectoras mejorada se obtiene en un sujeto inmunocomprometido.

45 La respuesta de células efectoras mejorada puede evaluarse midiendo el número de células que producen cualquiera de las siguientes citocinas: (1) células que producen al menos dos citocinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa); (2) células que producen al menos CD40L y otra citocina (IL-2, TNF-alfa, IFN-gamma); (3) células que producen al menos IL-2 y otra citocina (CD40L, TNF-alfa, IFN-gamma); (4) células que producen al menos IFN-gamma y otra citocina (IL-2, TNF-alfa, CD40L); (5) y células que producen al menos TNF-alfa y otra citocina (IL-2, CD40L, IFN-gamma).

50 Una respuesta de células efectoras mejorada está presente cuando las células que producen cualquiera de las citocinas anteriores estarán en una cantidad mayor después de la administración de la composición de vacuna en comparación con el control como se analizó anteriormente.

55 En una realización preferida, la composición aumenta el número de linfocitos T que producen IFN-gamma, TNF-alfa, o una combinación de los mismos, o aumenta la producción de IFN-gamma, TNF-alfa, o una combinación de los mismos en los linfocitos T existentes.

60 En algunas realizaciones, la administración de la composición inmunógena, de forma alternativa o adicional, induce una respuesta de linfocitos B de memoria mejorada en pacientes a los que se administran conjugados de lípidos en comparación con un control. Se pretende que una respuesta de linfocitos B de memoria mejorada signifique un aumento de la frecuencia de linfocitos B de sangre periférica capaces de diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos tras el encuentro con un antígeno, medida por estimulación de la diferenciación *in vitro*.

65 En otra realización más, la composición inmunógena aumenta la respuesta inmunitaria primaria así como la respuesta de CD8. La administración de los conjugados de lípidos induce una respuesta inmunitaria mejorada de los linfocitos T CD4 o CD8 contra un antígeno específico en comparación con un control. Este método puede permitir inducir una respuesta de linfocitos T CD4 que es más persistente en el tiempo.

Preferentemente, la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4, tal como la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 mejorada obtenida en un sujeto no sensibilizado, implica la inducción de una respuesta de linfocitos T CD4 auxiliares con reactividad cruzada. En particular, se incrementa la cantidad de linfocitos T CD4 con reactividad cruzada. La expresión respuesta de CD4 "con reactividad cruzada" se refiere a epítomos compartidos que se dirigen de linfocitos T CD4, por ejemplo, entre cepas de la gripe.

C. Enfermedades a tratar

1. Cáncer

Los conjugados de lípidos desvelados son útiles para estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el huésped para tratar el cáncer. Los tipos de cáncer que pueden tratarse con las composiciones y los métodos proporcionados incluyen, pero sin limitación, los siguientes: de vejiga, de cerebro, de mama, cervical, colorrectal, esofágico, de riñón, de hígado, de pulmón, nasofaríngeo, pancreático, de próstata, de piel, de estómago, uterino, de ovario, testicular y hematológico.

Los tumores malignos que pueden tratarse se clasifican en el presente documento según el origen embrionario del tejido del que se deriva el tumor. Los carcinomas son tumores que surgen de tejidos endodérmicos o ectodérmicos, tales como la piel o el revestimiento epitelial de los órganos internos y las glándulas. Los sarcomas, que surgen con menos frecuencia, se derivan de los tejidos conectivos mesodérmicos, tales como hueso, grasa y cartílago. Las leucemias y los linfomas son tumores malignos de células hematopoyéticas de la médula ósea. Las leucemias proliferan como células individuales, mientras que los linfomas tienden a crecer como masas tumorales. Los tumores malignos pueden aparecer en numerosos órganos o tejidos del cuerpo para establecer un cáncer.

Los conjugados pueden administrarse como una composición inmunógena o como parte de una vacuna, tal como las vacunas profilácticas o vacunas terapéuticas, que se pueden usar para iniciar o mejorar la respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno preexistente, tal como un antígeno tumoral en un sujeto con cáncer.

El desenlace deseado de una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica puede variar de acuerdo con la enfermedad, de acuerdo con principios bien conocidos en la técnica. De forma similar, las respuestas inmunitarias contra el cáncer, pueden aliviar los síntomas o pueden ser una faceta en una intervención terapéutica general contra una enfermedad. Por ejemplo, la administración de los conjugados de lípidos puede reducir el tamaño del tumor o retardar el crecimiento del tumor en comparación con un control. La estimulación de una respuesta inmunitaria contra un cáncer puede combinarse con enfoques quirúrgicos, quimioterapéuticos, radiológicos, hormonales y otros enfoques inmunológicos para afectar al tratamiento.

2. Enfermedades infecciosas

En una realización preferida, los conjugados de lípidos son útiles para tratar enfermedades infecciosas agudas o crónicas. Debido a que las infecciones víricas son eliminadas principalmente por los linfocitos T, un aumento en la actividad de los linfocitos T es terapéuticamente útil en situaciones en las que una eliminación más rápida o completa de un agente vírico infeccioso sería beneficiosa para un sujeto animal o humano. Por tanto, los antagonistas de los conjugados de lípidos pueden administrarse para el tratamiento de infecciones víricas locales o sistémicas, incluyendo, pero sin limitación, infecciones víricas de inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH), papiloma (por ejemplo, VPH), herpes (por ejemplo, VHS), encefalitis, gripe (p. ej., virus de la gripe A humana) y resfriado común (por ejemplo, rinovirus humano). Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas que incluyen los conjugados de lípidos se pueden administrar por vía tópica para tratar enfermedades víricas de la piel, tales como lesiones de herpes o culebrilla, o verrugas genitales. Los conjugados de lípidos también se pueden administrar para tratar enfermedades víricas sistémicas, incluyendo, pero sin limitación, SIDA, gripe, resfriado común o encefalitis.

Las infecciones representativas que pueden tratarse, incluyen, pero sin limitación, infecciones causadas por microorganismos, incluyendo, pero sin limitación, *Actinomyces*, *Anabaena*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bdellovibrio*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Caulobacter*, *Clamidia*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Halobacterium*, *Heliobacter*, *Haemophilus*, *Hemophilus influenza tipo B (HIB)*, *Histoplasma*, *Hyphomicrobium*, *Legionella*, *Leishmania*, *Leptospirosis*, *Listeria*, *Meningococcus A, B y C*, *Methanobacterium*, *Micrococcus*, *Myobacterium*, *Mycoplasma*, *Myxococcus*, *Neisseria*, *Nitrobacter*, *Oscillatoria*, *Prochloron*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Phodospirillum*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Spirillum*, *Spirochaeta*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Thiobacillus* y *Treponema*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nocardia asteroides*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydial psittaci*, *Chlamydial trachomatis*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* y *Schistosoma mansoni*.

En alguna realización, el tipo de enfermedad a tratar o prevenir es una enfermedad infecciosa crónica causada por una bacteria, virus, protozoo, helminto u otro patógeno microbiano que entra por vía intracelular y es atacado, por ejemplo, por linfocitos T citotóxicos.

En una realización preferida, las infecciones a tratar son infecciones crónicas causadas por un virus de hepatitis, un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), un virus linfótrofo de linfocitos T humano (VLTH), un virus del herpes, un virus de Epstein-Barr o un virus del papiloma humano.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: los conjugados de lipo-oligo de unión a albúmina se acumulan en los ganglios linfáticos

Materiales y métodos

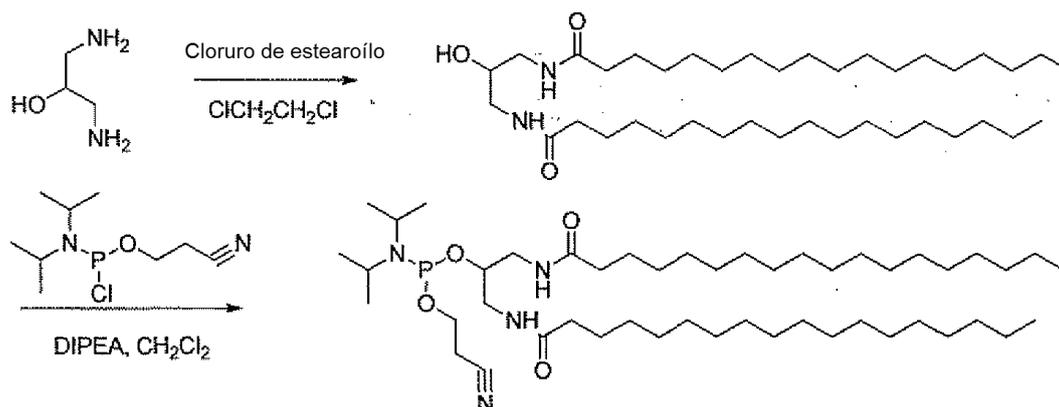
10

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se sintetizaron en una escala de 1,0 micromolar en un sintetizador de ADN automatizado (ABI 394, Applied Biosystems, Inc.). Todos los reactivos de síntesis de ADN incluyendo colesteril-TEG fosforamidita y DMT-PEG-fosforamidita se adquirieron de Glenres y Chemgenes y se usaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligos de CpG inmunoestimuladores empleados fueron una secuencia de tipo B conocida como 1826. La síntesis de fosforamidita lipídica y la conjugación en fase sólida fue seguida por informes previos. El tamaño de partícula se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) usando un analizador de tamaño de partícula y potencial ξ 90Plus/ZetaPals (Brookhaven Instruments). DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimida se adquirió de Laysan Bio Inc. PEG₂₀₀₀-DSPE marcado con carboxifluoresceína se adquirió de Avanti Polar lipids Inc. NHS-PEG₂₀₀₀ marcado con carboxifluoresceína se adquirió de nanocs Inc. Los péptidos se adquirieron de Genscript Corp. (Piscataway, NJ). El adyuvante incompleto de Freund (IFA) y la BSA sin ácidos grasos se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Síntesis de diacil-lípido fosforamidita

25



El diacil-lípido fosforamidita se sintetizó en dos etapas como lo describen Liu, et al. J. Angew. Chem., Int. Ed. 2011, 50, 7252-7255.

30

Se añadió gota a gota una solución de cloruro de estearoilo (6,789 g, 22,41 mmol) en ClCH₂CH₂Cl (50 ml) a una solución de 1,3-diamino-2-dihidropropano (1,0 g, 11,10 mmol) en presencia de ClCH₂CH₂Cl (100 ml) y trietilamina (2,896 g, 22,41 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y después se calentó a 70 °C durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió después a TA, se filtró y el sólido se lavó con CH₂Cl₂, CH₃OH, NaHCO₃ al 5 % y éter dietílico, respectivamente. El sólido se secó al vacío para dar el producto intermedio como un sólido blanco (rendimiento: 90 %). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6,3 (m, 2H), 3,8 (m, 1H), 3,4-3,2 (m, 4H), 2,2 (t, 4H), 1,6 (m, 4H), 1,3-1,2 (m, 60H), 0,9 (t, 6H). El producto intermedio (5,8 g, 9,31 mmol) y DIPEA (4,2 ml, 18,62 mmol) se disolvieron a continuación en CH₂Cl₂ anhidro (100 ml). La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (8,6 ml, 0,47 mmol) en nitrógeno seco. Después de agitar a TA durante 1 hora, a solución se calentó a 60 °C durante 90 minutos. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ al 5 % y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. El producto final se aisló por precipitación en acetona para dar 4 g (55 % de rendimiento) de fosforamidita como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6,4 (m, 2H), 3,9 (m, 2H), 3,8 (m, 2H), 3,6 (m, 2H), 3,0-2,9 (m, 2H), 2,6 (t, 2H), 2,2 (m, 4H), 1,6 (m, 6H), 1,3-1,2 (m, 72H), 0,9 (t, 6H). ³¹P RMN (CDCl₃) 154 ppm.

45

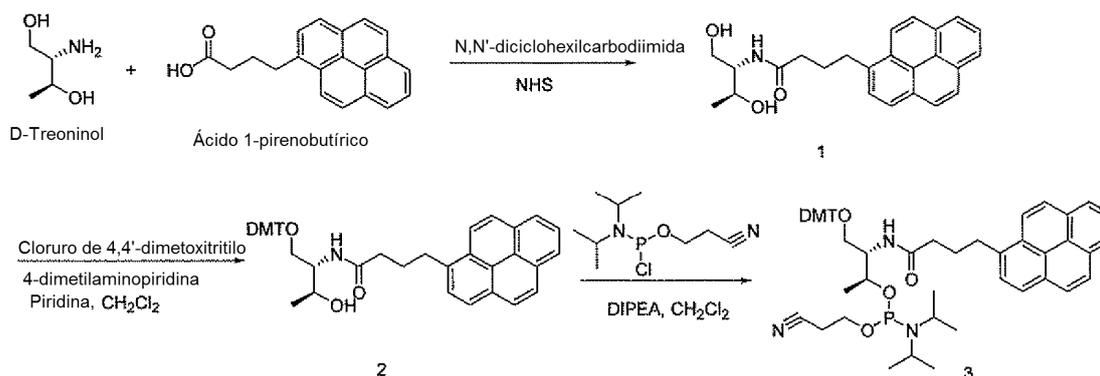
Síntesis de ADN y conjugación lipófila

Todas las secuencias de ADN y ARN se sintetizaron usando un sintetizador ABI 394 en una escala de 1,0 micromoles. Todas las fosforamiditas lipófilas se conjugaron como una "base" final en el extremo 5' de los oligos. Las fosforamiditas lipófilas se disolvieron en diclorometano y se acoplaron a los oligos usando la llamada técnica de síntesis con jeringas (Storhoff, et al., J. Am. Chem. Soc., 120:1959-1964 (1999)). En resumen, se mezclaron

50

- fosforamiditas lipídicas (200 µl) con activador (5-etilto tetrazol 0,2 mM en 200 µl de acetonitrilo) y la mezcla se empujó hacia atrás y hacia adelante a través de la columna de CpG con 2 jeringas durante 10 min. Como alternativa, la fosforamidita lipófila también podría acoplarse usando el sintetizador de ADN (tiempo de acoplamiento de 15 minutos). Después de la síntesis, el ADN se escindió del CpG y se desprotegió y purificó por HPLC de fase inversa usando una columna C4 (BioBasic-4, 200 mm x 4,6 mm, Thermo Scientific), tampón de ácido trietilamina-acético 100 mM (TEAA, pH 7,5)-acetonitrilo (0-30 min, 10-100 %) como eluyente. Los ODN lipófilos se eluyeron normalmente a los 20 min, mientras que los ODN no conjugados se eluyeron a los 8 min. Los oligos de CpG inmunoestimuladores empleados fueron una secuencia de tipo B conocida como 1826 (Ballas, et al., J. Immunol., 167, 4878-4886 (2001)).
- 10 Secuencia típica de Lipo-G_n-CpG:
5'diacil-lípido-G_n*T*C*A*T*G*A*C*G*T*C*T*G*A*C*G*T*-3' (SEC ID NO:1)

Síntesis de pireno fosforamidita



- 15 Síntesis del compuesto 1: En un matraz de fondo redondo de 300 ml, D-treoninol (0,95 g, 9,1 mmol), ácido 1-pirenobutírico (2,88 g, 10,0 mmol), DCC (2,06 g, 10,0 mmol) y NHS (1,15 g, 10 mmol) se disolvieron en 50 ml de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La N,N'-dicyclohexilurea insoluble se filtró y la DMF se eliminó con un evaporador rotatorio al vacío para obtener un producto en bruto aceitoso. El compuesto 1 se purificó por cromatografía ultrarrápida (rendimiento: 85 %). 1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,1-7,7 (m, 9H), 6,2 (d, 1H), 4,2-3,8 (m, 4H), 3,0 (m, 2H), 2,3-2,2 (m, 4H), 1,2 (d, 3H).
- 20 Síntesis del compuesto 2: compuesto 1 (2,93 g, 7,2 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0,043 g, 0,36 mmol) en 40 ml de piridina seca en un matraz de fondo redondo de 100 ml en nitrógeno seco. La solución se enfrió en un baño de hielo. Se disolvió DMT-Cl (2,93 g, 8,64 mmol) en 10 ml de CH₂Cl₂ seco en un matraz de 50 ml bajo nitrógeno y se añadió lentamente a la solución de piridina anterior en nitrógeno seco. La reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 24 horas. El disolvente se eliminó al vacío y el compuesto 2 se aisló mediante cromatografía (acetato de etilo:hexano/trietilamina 50:50:3) (rendimiento: 75 %). 1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,3-7,5 (m, 22H), 6,1 (d, 1H), 4,2-3,9 (m, 2H), 3,7 (d, 6H), 3,4-3,3 (m, 4H), 2,4-2,2 (m, 4H), 1,2 (d, 3H).
- 30 Síntesis del compuesto 3: el compuesto 2 (1 g, 1,48 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ y se enfrió en un baño de hielo. Después, se añadieron DIPEA (0,57 g, 4,44 mmol) y 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (0,42 g, 1,78 mmol) en nitrógeno seco. La mezcla de reacción se agitó en hielo durante 3 horas. El disolvente se evaporó y el compuesto 3 se purificó por cromatografía (acetato de etilo:hexano/trietilamina 50:50:3) (Rendimiento: 70 %). 1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,3-6,6 (m, 21H), 5,82 (d, 1H), 4,4-4,2 (m, 2H), 3,8 (s, 3H), 3,7 (d, 6H), 3,6-3,1 (m, 8H), 2,5 (m, 1H), 2,4-2,2 (m, 5H), 1,3-0,9 (m, 20H). 31P RMN (CDCl₃) 149.

Cromatografía de exclusión por tamaño

- 40 La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en un sistema de HPLC Shimadzu equipado con una columna SEC-biosil (reempacutada en una columna de 200x4,6 mm). Las muestras se eluyeron usando 1xPBS + KCl 20 mM a un caudal de 0,5 ml por minuto. En un experimento típico, se añadieron 80 µl de lipo-G_nT_{10-n}CpG-Fam 5 µM en 1xPBS + KCl 20 mM a 20 µl de FBS (Greiner Bio-one), las muestras se agitaron en vórtice brevemente y se incubaron a 37 °C durante 2 horas y después se diluyeron en 500 µl de 1xPBS con KCl 20 mM, la muestra se analizó a continuación mediante SEC, el FBS se monitorizó usando absorciones a 280 nm, mientras que los ODN se monitorizaron a 480 nm (pico de Fam).

Mediciones del espectrómetro de dicroísmo circular

- 50 Los ODN de CpG 5 µM se disolvieron en 1xPBS con KCl 20 mM. Los espectros de dicroísmo circular (CD) se registraron en un espectrómetro de dicroísmo circular Modelo 202 de Aviv a 20 °C. Se realizaron exploraciones de

220 a 320 nm con una velocidad de exploración de 100 nm/min, ancho de banda de 1 nm. Para cada espectro, se tomó un promedio de tres exploraciones, y se restó la contribución espectral del tampón.

Animales y células

5 Los animales se cuidaron en la instalación para animales del MIT inspeccionada por el USDA según las pautas federales, estatales, locales y NIH para el cuidado de animales. Se obtuvieron ratones albinos C57BL/6 (6-8 semanas) del Jackson Laboratory. Las células se cultivaron en medio completo (MEM, suero fetal bovino al 5 % (Greiner Bio-one), 100 U/ml de penicilina G sódica y 100 µg/ml de estreptomicina (Pen/Strep), MEM piruvato de sodio (1 mM), NaH₂CO₃, MEM Vitaminas, MEM aminoácidos no esenciales (todos de Invitrogen), β-mercaptoetanol (β-ME) 20 µM).

Análisis estadístico

15 Todas las barras de error representan SEM. Las comparaciones de los valores medios se realizaron usando pruebas la t de Student para datos independientes. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001. Se usó el software Graphpad Prism 5.

Resultados

20 La albúmina sirve como el principal transportador de ácidos grasos en los fluidos extracelulares. Los experimentos se diseñaron para ensayar si el antígeno/adyuvante modificado con un dominio de unión a albúmina lipófilo se acumularía en los órganos linfáticos después de la inyección a través de la complejación *in situ* y el transporte con albúmina endógena. Para desarrollar esta estrategia, se desarrollaron vacunas modelo que incluyen antígenos peptídicos combinados con ADN de CpG, oligonucleótidos monocatenarios que contienen motivos de citosina-guanina no metilados que se unen al receptor-9 de tipo Toll y sirven como adyuvantes moleculares potentes.

30 Para identificar un dominio óptimo de unión a albúmina que podría ser anexado a los antígenos CpG o péptido, se construyeron una serie de oligos de CpG estabilizados con 20 bases de fosforotioato (PS) anfífilos enlazados a varias colas lipófilas a través del extremo 5' (amph-CpGs) marcados en 3' con fluoresceína amidada (FAM, figura 1A) y se evaluó la interacción de estos anfífilos con proteínas séricas mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, figura 2B). El suero fetal bovino (FBS) exhibió una fracción importante de proteína eluyendo a los 5,3 minutos en SEC (coincidiendo con la albúmina sérica). CpG conjugados a diacil lípidos (lipo-CpGs) en solución acuosa se eluyeron como micelas (3,7 min), pero después de la incubación con FBS al 20 % durante 2 h, ~46% de este amph-CpG migraba conjuntamente con la albúmina (figura 2B). Por el contrario, la gran mayoría de los oligos mono-acil-(C18-CpG) y colesterol-(Cho-CpG) eluyeron como unímeros a los 5,8 min esencialmente idénticos a la CpG no modificado en presencia o ausencia de suero, lo que indica la estabilidad del esqueleto de PS contra la degradación por nucleasa sérica y la falta de interacción con la albúmina (figura 2B).

40 Las mediciones espectroscópicas de FRET entre lipo-CpG marcado con FAM y albúmina conjugada con rodamina confirmaron la asociación molecular del anfífilo de diacil lípido y la albúmina en solución (figuras 1F y 1G).

45 Para determinar si los CpG con diferente afinidad por la albúmina presentan un direccionamiento diferencial a los GL, se inyectaron amph-CpG s.c. en la base de la cola de los ratones y, 24 horas más tarde, se extirparon los GL inguinales y axilares drenantes y se analizaron intactos mediante imágenes de fluorescencia de IVIS. C18-CpG y Cho-CpG mostraron una captación ligeramente mayor en GL con respecto a CpG no modificado. Por el contrario, lipo-CpG mostró un aumento dramático en la acumulación en GL, 8 veces más que CpG soluble a las 24 horas y mucho mayor que CpG administrado en dos vehículos de vacunas prototípicas, adyuvante incompleto de Freund o liposomas revestidos con poli(etilenglicol) (PEG). Como se mostró en estudios previos, el esqueleto de PS usado para estabilizar los oligos de CpG contra las nucleasas séricas promueve la unión inespecífica a la matriz extracelular en el sitio de inyección, lo que causa una eliminación lenta de los oligos del tejido durante varios días. Sin embargo, los niveles de CpG soluble alcanzaron un pico inicial bajo en los GL proximales y no mostraron una acumulación superior al 0,3 % de la dosis inyectada en ningún momento (figura 2C). Por el contrario, se detectó lipo-CpG en los GL dentro de las 2 horas posteriores a la inyección y continuó acumulándose durante 3 días antes de la descomposición, dando un AUC total de exposición a CpG en los GL drenantes mayor que el CpG soluble durante la semana posterior a la inyección. La acumulación en los GL no dependía de los motivos CpG reconocidos por TLR-9, ya que se detectaron anfífilos de politimidina no-CpG (lipo-T₂₀) en GL a niveles similarmente altos (figura 2J).

Ejemplo 2: Las micelas estabilizadas exhiben reducción del direccionamiento a los ganglios linfáticos

60 Materiales y métodos

Citometría de flujo

65 Todos los anticuerpos fueron adquiridos de BD pharmingen o ebioscience. Las células se adquirieron en un citómetro de flujo FACScanto (BD biosciences) y se analizaron usando el software flowjo (Tree Star Inc. Ashland, OR).

Tinción intracelular de citocinas (ICCS)

Las células se colocaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se pulsaron con péptidos mínimos en presencia de brefeldina A durante 6 horas en medio completo a 37 °C. Las células se tiñeron con anti-CD8-APC y después se fijaron usando Cytifix (BD biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron y se permeabilizaron. La tinción intracelular para anti-INF- γ -PE y anti-TNF- α -FITC se realizó de acuerdo con el protocolo de BD. Los datos de FACS se recopilaron y analizaron como se describió anteriormente.

Tinción inmunohistoquímica

La tinción inmunofluorescente se realizó en secciones congeladas de 10 μ m de muestras de biopsia de ganglios linfáticos. Para reducir el desvanecimiento de FITC, las secciones se montaron en medio de montaje Vectashield. (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) y se visionaron en un microscopio Zeiss LSM 510 (Oberkochen, Alemania). La tinción de las secciones de los ganglios linfáticos se realizó directamente con CD11c marcado con PE y F4/80 marcado con APC, o con anticuerpos B220 y CD3 marcados con APC.

Resultados

Los análisis in vitro en el ejemplo 1 indican que las moléculas lipo-CpG se equilibran entre las formas micelares y unidas a albúmina en presencia de suero. Sin embargo, la acumulación mejorada en ganglios linfáticos lograda por estos anfillos podría haber sido impulsada por cualquiera de las especies. Para distinguir estas posibilidades, se introdujeron repeticiones de poli-guanina entre la secuencia de diacil lípido y CpG. Los enlaces de hidrógeno de G-cuádruple entre las cadenas de oligo adyacentes en las micelas de lipo-G_n-CpG que contienen 4 o más repeticiones de guanina bloquearon el acceso de la albúmina a las colas de lípidos y hicieron que las micelas se mantuvieran estables frente al desensamblaje en presencia de suero (se explica con más detalle más adelante).

Mientras que la lipo-CpG de unión a la albúmina y la lipo-G₂-CpG mostraron un robusto direccionamiento a los GL, las micelas de lipo-G₄-CpG o lipo-G₆-CpG estabilizadas por el cuarteto de G mostraron una acumulación en GL muy pobre después de inyección s.c. (figura 8A). (Cabe destacar que el efecto de las diferentes longitudes de oligo en este contexto es despreciable, ya que lipo-T₆-CpG mostró una acumulación en GL similar). El análisis longitudinal de la fluorescencia de CpG en el lugar de la inyección y el drenaje de los GL mostró que la baja acumulación en GL de los anfillos lipo-G_{4/6}-CpG se debió al fallo de las micelas estabilizadas para drenarse del sitio de la inyección. Es posible que la amplificación de la unión a la matriz no específica por los esqueletos de ADN de PS en la forma micelar multivalente atrape irreversiblemente la mayoría de las micelas estabilizadas en el sitio de la inyección.

De acuerdo con los datos de IVIS, se observó una pequeña acumulación detectable de CpG o lipo-G₄-CpG en las secciones histológicas de GL inguinales drenantes, mientras que lipo-CpG y lipo-G₂-CpG se acumularon en el seno subcapsular y áreas interfoliculares que alcanzan la paracorteza. El análisis inmunohistoquímico y de citometría de flujo mostró estos anfillos que acumulan en GL colocalizados con macrófagos F4/80⁺ y células dendríticas CD11c⁺ (figura 3E).

Ejemplo 3: El "transporte por unión a" albúmina dirige los conjugados de lipo-oligo a los ganglios linfáticosMateriales y métodos*Conjugado de albúmina-CpG*

A albúmina de suero de ratón (10 mg en 200 μ l de PBS) se le añadieron 0,79 mg de BMPS (Aldrich) disuelto en 20 μ l de DMSO. La mezcla se agitó a TA durante 2 horas. El BMPS extra se eliminó haciendo pasar la mezcla a través de una columna G-25. Después de lo cual, a la solución se le añadieron 246 μ g de fluoresceína-CpG marcada con disulfuro (preactivada por 20 μ l de TCEP 100 mM). Se dejó reaccionar la mezcla durante una noche y se dializó CpG extra (50K MWCO) y se confirmó la ausencia de CpG libre mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Resultados

Si se requiere "transporte por unión a" albúmina para el direccionamiento óptimo de las moléculas de CpG a los GL, entonces la conjugación covalente de oligos a albúmina debería conducir a una acumulación en los GL similar. Para ensayar esto, CpG se conjugó covalentemente con albúmina de suero de ratón (MSA) y comparó la captación en GL de estos conjugados frente a lipo-CpG o CpG soluble. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los conjugados y lipo-ODN, la intensidad de la fluorescencia de MSA-CpG y lipo-CpG en GL fue mucho mayor que la de ODN soluble. En conjunto, estos datos indican que la acumulación eficiente en GL de oligonucleótidos de CpG conjugados con colas lipófilas depende de la capacidad del anfillo para dividirse a partir de las micelas a un estado unido a proteínas del suero.

Ejemplo 4: Los conjugados de lipo-oligo de unión a albúmina mejoran las respuestas inmunitarias y minimizan la toxicidad sistémica *in vivo*

5 Para determinar el impacto del direccionamiento a los GL de CpG sobre la respuesta inmunitaria, los ratones se inmunizaron con ovoalbúmina (OVA) mezclada con CpG no modificado, CpG en IFA, CpG de unión a albúmina (lipo-G_n-CpG, n=0, 2) o las micelas de CpG estabilizadas con G-cuádruple (lipo-G_n-CpG, n=4, 6). Los animales se sensibilizaron el día 0, se reforzaron el día 14 y las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ se analizaron el día 20. La administración de CpG conjugados con lípidos, pero no de CpG no conjugado (CpG soluble o CpG emulsionado en IFA), dio lugar a un aumento significativo de las frecuencias de linfocitos T CD8⁺ que fueron específicos para OVA₂₅₇₋ 10 ₂₆₄ en comparación con CpG no modificado solo o emulsionado en IFA. Las respuestas más potentes fueron provocadas por lipo-CpG y lipo-G₂-CpG de unión a albúmina (figura 4A).

15 La tinción intracelular de citocinas en linfocitos de sangre periférica mostró tendencias cualitativamente idénticas, con grandes frecuencias de linfocitos T productores de IFN- γ y TNF- α expandidos por los anfífilos CpG de unión a albúmina (figura 4B). Las inmunizaciones de control con lipo-GpC no agonista de TLR o un conjugado de PEG, lipo-(PEG) con 48 unidades de etilenglicol mezclado con OVA provocaron respuestas mínimas, descartando un efecto adyuvante directo de la cola de diacil lípido.

20 Las inyecciones repetidas de CpG de unión a albúmina a dosis elevadas no indujeron subactivación *in vivo* generalizada, no específica, según se caracteriza por la liberación de citocinas proinflamatorias sistémicas (figura 10) y la activación de linfocitos en el bazo (esplenomegalia, figura 4D). Por el contrario, la administración de CpG libre en ratones dio como resultado toxicidad sistémica (figura 10, figura 11). Tomados en conjunto, estos experimentos sugieren fuertemente que los amph-CpG que se dirigen a los ganglios linfáticos son potentes adyuvantes capaces de provocar respuestas masivas de linfocitos T CD8 mientras evitan la activación inmunitaria 25 sistémica.

Ejemplo 5: El "transporte por unión a" albúmina dirige los conjugados de lipo-péptido a los ganglios linfáticos

30 Materiales y métodos

Síntesis de anfífilos de PEG con fluoresceína

35 Lípidos de PE (1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, DMPE; 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, DMPE; 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, DPPE; 1,2-dioctadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, DSPE, Avanti polar lipids, Inc.) se disolvieron en 500 μ l de CHCl₃ y 500 μ l de DMF, se añadieron 1,2 eq de fluoresceína-PEG₂₀₀₀-NHS (creative PEG works Inc.) y la mezcla de reacción se agitó durante una noche, los anfífilos de PEG con fluoresceína anfífila se purificaron por HPLC de fase inversa usando una columna C4 (BioBasic-4, 200 mm x 4,6 mm, Thermo Scientific), tampón de ácido trietilamina-acético 100 mM (TEAA, pH 7,5)-metanol (0-30 min, 10-100 %) como eluyente. 40

Síntesis de péptidos anfífilos

45 Los péptidos modificados con cisteína N-terminal se disolvieron en DMF y se mezclaron con 2 equivalentes de maleimida-PEG₂₀₀₀-DSPE (Laysan Bio, Inc.), la mezcla se agitó a TA durante 24 horas. La bioconjugación se consideró esencialmente completa por análisis de HPLC. El conjugado de péptidos se diluyó después en 10x ddH₂O y se liofilizó en polvo, se redisolvió en H₂O y se almacenó a -80 °C.

Resultados

50 La síntesis de lipo-CpG es sencilla debido a la solubilidad promovida por el largo bloque de oligonucleótidos polares, pero dependiendo de la secuencia de aminoácidos, los péptidos lipidados pueden ser esencialmente insolubles. Por tanto, para generalizar el enfoque de direccionamiento a los ganglios linfáticos logrado con lipo-CpG a antígenos peptídicos y otros componentes potenciales de la vacuna, los anfífilos lipo-PEG compuestos por una cola de diacil lípido enlazada a las cargas peptídicas a través de un bloque de PEG polar (amph-péptidos; por ejemplo, figura 1C) se generaron usando espaciadores de etilenglicol de longitudes variables para imitar el bloque polar largo de lipo-CpG. 55

60 La longitud del bloque de PEG en este diseño controla la armonía de un equilibrio de 3 vías en condiciones fisiológicas: los amph-péptidos y los lipo-PEG en agua pura forman micelas, pero en presencia de suero y células, estos anfífilos se equilibran entre la unión a albúmina y la inserción de sus colas de diacilo en las membranas celulares (figura 2F). Los anfífilos Lipo-PEG-FAM con bloques cortos de PEG mostraron una inserción estable en la membrana plasmática cuando se incubaron con células en presencia de suero *in vitro* (figura 2G), lo que bloquearía el tránsito a los GL en albúmina *in vivo*. Sin embargo, al aumentar el bloque polar a 48 unidades de etilenglicol, se obtuvieron los anfífilos lipo-PEG que se dividieron en la solución mientras conservaban la unión a la albúmina (figura 2G). Este comportamiento *in vitro* predijo directamente patrones de drenaje *in vivo*, ya que los anfífilos lipo-PEG- 65

FAM inyectados s.c. mostraron una acumulación creciente en los GL al aumentar la longitud del bloque de PEG (aumentó para 48 unidades de EG en comparación con 4 unidades de EG, figura 2H).

Se observó una tendencia análoga para los anfífilos de ADN; los oligos de lipo-Tn preparados con una longitud creciente de la cadena de politimidina mostraron una acumulación creciente en los GL después de inyección s.c., hasta una acumulación estacionaria para oligos (figura 2J). Al igual que los anfífilos de CpG, la estructura del bloque hidrófobo también fue importante; mientras que los anfífilos lipo-PEG con largas colas de diacilo (≥ 16 carbonos, que exhiben una alta afinidad por la albúmina) mostraron una fluorescencia intensa en los ganglios linfáticos, las colas lipídicas más cortas con escasa afinidad por la albúmina mostraron una baja acumulación en los GL (figura 2I).

Ejemplo 6: Las vacunas dirigidas a los ganglios linfáticos inducen respuestas inmunitarias Materiales y métodos

Ingredientes de la vacuna

Los péptidos mínimos se adquirieron de Anaspec; la ovoalbúmina se adquirió de Worthington Biochemical Corporation; el péptido modificado con cisteína (Cys), E7₄₉₋₅₇ de VPH-16 (CRAHYNIVTF), AL-11 (CAAVKNWMTQTL) y Trp-2 (CSVYDFFVWL) se sintetizaron mediante GenScript y se purificaron mediante HPLC de fase inversa. DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida se adquirió de Laysan Bio Inc. Los ODN de CpG se sintetizaron internamente. El IFA se adquirió de Sigma-Aldrich.

Preparación de la vacuna

Los ratones fueron vacunados con un régimen de sensibilización-refuerzo, normalmente, cada vacuna de sensibilización y refuerzo en experimentos consistió en los siguientes ingredientes: 10 μ g de OVA, 1,24 nmol de CpG suspendido en 1xPBS con K⁺ 20 mM, Mg⁺ 10 mM. En los experimentos en los que se usó el IFA, se combinaron CpG/OVA con el mismo volumen de IFA y se emulsionaron ampliamente. El volumen de todas las inyecciones de vacuna fue de 100 μ l. Para la micela peptídica, los ratones se sensibilizaron con 10 μ g de conjugado péptido-PEG₂₀₀₀-DSPE, mezclado con 1,24 nmol de CpG suspendidos en 1xPBS con K⁺ 20 mM, Mg⁺ 10 mM y se reforzaron con 20 μ g de conjugado péptido-PEG₂₀₀₀-DSPE, mezclado con 1,24 nmol de CpG. A los ratones se les inyectó s.c. en la base de la cola.

Tinción de tetrámeros

Se recogieron muestras de tejido y se preparó una suspensión celular individual (bazos y ganglios linfáticos). La sangre se recogió y los glóbulos rojos se agotaron mediante tampón de lisis ACK. Las células se bloquearon con bloqueador de Fc (anticuerpo monoclonal anti-CD16/CD32 de ratón) y se tificaron con tetrámeros marcados con PE (Beckman Coulter) y anti-CD8-APC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón FACS. Los datos de FACS se recopilaron en un citómetro de flujo FACScanto de BD y se analizaron usando el software flowjo. El análisis normalmente acotó células vivas positivas para tetrámero, CD8+.

Ensayos de citotoxicidad in vivo

Los esplenocitos de ratones sin tratamiento previo se pulsaron con o sin péptido SIINFEKL 10 μ M durante 30 minutos, las células se marcaron con CFSE 1 μ M (para células pulsadas) o 0,1 μ M (células de control) durante 10 minutos a 37 °C y se lavaron exhaustivamente. Las células se mezclaron en una proporción de 1:1 y se inyectaron i.v. 10x10⁶ células totales en ratones provocados previamente con formulaciones de vacunas como se describió anteriormente. Después de 18 horas, los esplenocitos de cada ratón receptor se analizaron mediante FACS para detectar las células marcadas con CFSE.

Resultados

Basándose en las reglas de diseño para dirigir eficazmente los compuestos a los ganglios linfáticos analizados anteriormente, los antígenos peptídicos se conjugaron con DSPE-PEG disponible en el mercado (cola de diacil lípido de 18 carbonos, bloque de PEG de 2 KDa) para generar amph-péptidos para su uso en estudios de vacunación (figura 9).

Una vez establecida la relación estructura-función entre la unión a albúmina y la retención en los ganglios linfáticos, los experimentos se diseñaron para ensayar si la combinación de antígeno y anfífilos de CpG podría impartir directamente la estimulación de la respuesta inmunitaria específica del antígeno. Varios antígenos peptídicos, incluyendo antígeno de virus (SIV gag, AL11), autoantígeno asociado al tumor (antígeno de melanoma, Trp2) y antígeno específico del tumor (virus del papiloma humano, tipo 16, E7, VPH-16-E7) se conjugaron a DSPE-PEG₂₀₀₀ funcionalizado con maleimida. La conjugación de antígenos no afectó significativamente a la unión a la albúmina.

Después de la vacunación, las respuestas y las funcionalidades de los linfocitos T CD8 desencadenadas se monitorizaron usando técnicas de tetrámero o tinción intracelular de citocinas (ICS) como se analizó anteriormente.

La administración de vacunas compuestas de amph-antígenos (DSPE-PEG₂₀₀₀-péptidos) y adyuvantes amph-CpG (lipo-G₂-CpG) dio como resultado un aumento espectacular de las respuestas de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno (figuras 5A-5B) para todos los epítomos de péptidos mínimos anteriores. En ratones vacunados con amph-Trp2 más amph-CpG, una media del 15 % y el 7 % de los linfocitos CD8+ produjo IFN- γ y TNF- α , respectivamente. Por el contrario, dos grupos de control que recibieron Trp2 libre exhibieron solo actividades de LTC marginales (figura 5B).

La conjugación directa de lípido a antígeno sin un enlazador de PEG dio como resultado una disminución dramática de la respuesta inmunitaria, lo que indica que se necesita un enlazador de PEG largo para desencadenar la respuesta inmunitaria de los linfocitos T CD8 (figura 5C). Esta observación es coherente con los datos de acumulación en los GL observados anteriormente, donde la retención eficiente en los GL requirió un espaciador de PEG largo. Los datos anteriores muestran que las formulaciones de vacunas de unión a albúmina pueden inducir grandes cantidades de linfocitos T CD8+ funcionales específicos de antígeno. Se observó sistemáticamente que los ratones inmunizados con formulaciones de auto-administración tenían actividades citotóxicas más potentes contra poblaciones diana pulsadas con péptidos en comparación con los controles no pulsados (figura 5D).

Ejemplo 7: Las vacunas con direccionamiento a los ganglios linfáticos exhiben eficacia terapéutica

Los beneficios terapéuticos de las respuestas de CD8 generadas después de la inmunización se ensayaron tratando el tumor TC-1 subcutáneo de ratón establecido, que expresa la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano de tipo 16 (VPH-16). Se inocularon ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad en el flanco izquierdo anterior con células tumorales TC-1 (3×10^5 células/ratón) por vía subcutánea. Después de la formación del tumor palpable (día 6), los ratones se aleatorizaron y se trataron el día 6, el día 13 y el día 19 con amph-VPH (DSPE-PEG-E7₄₉₋₅₇) combinados con amph-CpG (Lipo-G₂-CpG) en la base de la cola del ratón, usando péptido E7₄₉₋₅₇ y CpG no conjugados como control. El crecimiento del tumor se siguió cada 2-3 días.

Como se muestra en las figuras 5E y 5F, los tumores crecieron rápidamente en ratones que no recibieron la vacuna. Los ratones tratados con anfífilos de vacunas inhibieron el crecimiento del tumor TC-1 en crecimiento subcutáneo durante varias semanas (3-5 mm de diámetro en el tratamiento inicial). Por el contrario, el tratamiento con oligonucleótido de CpG no conjugado más antígeno peptídico E7 de VPH-16 tuvo solo efectos antitumorales menores (figuras 5E y 5F), causando un retraso transitorio del crecimiento del tumor en el día 19, después de lo cual los tumores progresaron rápidamente. Considerados juntos, los resultados demuestran que la combinación de antígenos amph-péptido y adyuvante amph-CpG mejora dramáticamente las respuestas de LTC específicas de antígeno y conduce a una inmunidad antitumoral mejorada en un modelo de tumor de ratón.

Ejemplo 8: Los enlazadores de G-cuádruple estabilizan las micelas de oligonucleótidos Materiales y métodos

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se sintetizaron en una escala de 1,0 micromolar en un sintetizador de ADN automatizado (ABI 394, Applied Biosystems, Inc.). Todos los reactivos de síntesis de ADN incluyendo colesteril-trietilenglicol (TEG)-fosforamada y DMT-polietilenglicol (PEG)-fosforamada se adquirieron de Glenres y Chemgenes y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de citosina-guanina (CG) fueron una secuencia de tipo B denominada 1826 (Lipo-G_n-CG: 5'-diacil lípido-G_n-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3' (SEQ ID NO: 1). La síntesis de fosforamada lipídica y la conjugación en fase sólida fue seguida por informes previos. El tamaño de partícula se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) usando un analizador de tamaño de partícula y potencial ξ 90Plus/ZetaPals (Brookhaven Instruments). DSPE-PEG2000-Maleimida se adquirió de Laysan Bio Inc., PEG2000-DSPE marcado con carboxifluoresceína se adquirió de Avanti Polar lipids Inc.

Dicroísmo circular

Se disolvieron cinco μ M de oligonucleótidos de CG en solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS) con KCl 20 mM. Los espectros de dicroísmo circular (CD) se registraron en un Espectrómetro de Dicroísmo Circular Modelo 202 de Aviv a 20°C. Se realizaron exploraciones de 220 a 320 nm con una velocidad de exploración de 100 nm/min, ancho de banda de 1 nm. Para cada espectro, se tomó un promedio de tres exploraciones y se restó la contribución espectral del tampón.

Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en un sistema de HPLC Shimadzu equipado con una columna SEC-biosil (reempaquetada en una columna de 200x4,6 mm). Las muestras se eluyeron usando 1X PBS + KCl 20 mM a un caudal de 0,5 ml por minuto. En un experimento típico, se incubaron micelas de ADN marcadas con fluoresceína (80 μ l de lipo-G_nT₁₀-nCG-Fam 5 μ M en 1X PBS + KCl 20 mM) con suero fetal bovino al 20 % (FBS) (20 μ l) (Greiner Bio-one), las muestras se agitaron en vórtice brevemente y se incubaron a 37 °C durante 2 horas, a continuación se diluyeron en 500 μ l de PBS 1X + KCl 20 mM. las muestras se analizaron a continuación mediante SEC. El suero fetal bovino (FBS) se monitorizó usando absorciones a 280 nm, mientras que los oligonucleótidos se

monitorizaron a 480 nm (pico de Fam).

Resultados

5 Las secuencias de ácido nucleico ricas en guanina (G) se pueden plegar en diversos tipos de estructuras de G-cuádruple (Davis, J. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43, 668-698 (2004)) (por ejemplo, intramolecular, intermolecular, paralela, y antiparalela). Para facilitar el autoensamblaje de las micelas y para minimizar el plegamiento de los oligonucleótidos, el conjugado de lípido-oligonucleótido se suspendió primero en agua pura, y después se añadió tampón que contenía potasio (K⁺) para estabilizar el G-cuádruple. La formación de las micelas se confirmó mediante
10 microscopía electrónica de transmisión, mediciones de dispersión dinámica de luz y cromatografía de exclusión por tamaño. La figura 7B ilustra el perfil de tamaño de las micelas autoensambladas, que muestran una distribución de tamaño uniforme.

15 Se llevó a cabo dicroísmo circular (CD) para caracterizar la formación de G-cuádruple. El espectro del oligonucleótido Lipo-G₀T₁₀-CG mostró un pequeño pico negativo cercano a 245 nm y un pico positivo cercano a 278 nm, mientras que el cambio del número de guaninas de cero a diez indujo un G-cuádruple paralelo, como se manifestó mediante el desplazamiento del pico positivo desde 278 nm hacia 262 nm (bandas distintivas para G-cuádruple paralelo) (Paramasivan, S., et al., *Methods* 43, 324-331 (2007)), mientras que conserva las bandas negativas de 245 nm (figura 7C).

20 El diseño de los adyuvantes de CpG estabilizados con G-cuádruple se muestra en la figura 3A. Las micelas de CpG estabilizadas con G-cuádruple se autoensamblan a partir de un ODN compuesto por tres segmentos distintos: un CpG-ODN inmunoestimulador, un bloque de repetición central que contenía $n = 1-10$ guaninas formadoras de cuartetos de G seguidas de $10 - n$ timidinas que no interactúan y una cola de diacil-lípidos (figura 3A). Se usó la fluorescencia del excímero de pireno para ensayar las estabildades de las micelas de G-cuádruple en presencia de albúmina (figura 3B). El colorante pireno incorporado en las micelas de CpG estabilizadas ($n > 2$) conserva la fluorescencia del excímero en presencia de una alta concentración de albúmina. Por el contrario, la albúmina se une al resto lipídico de las micelas no estabilizadas ($n \leq 2$) y rompe las estructuras de la micela, lo que da como resultado una disminución de la fluorescencia del excímero de forma dependiente de la concentración de albúmina (figura 3B).
25 La estabilidad de las micelas de ADN en presencia de proteína sérica también se investigó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (figura 3C). Las micelas tienen una masa molecular relativamente alta, por lo que se eluyeron a los 3,7 minutos, mientras que la FBS mostró un pico principal a los 5,3 minutos. Después de la incubación, el 20 % de las micelas no estabilizadas (lipo-G₀T₁₀-CG) estaban intactas, mientras que el 80 % restante se rompió y se unió con componentes de FBS (alcanzó un pico a los 5,2 minutos). En presencia de guaninas, el porcentaje de micelas intactas aumentó del 36 % (lipo-G₂T₈-CG) al 73 % (lipo-G₄T₆-CG), y finalmente alcanzó el 90 % (lipo-G₆T₄-CG). El aumento del número de guaninas a ocho (lipo-G₈T₂-CG) y diez (lipo-G₁₀T₀-CG) no mejoró aún más la estabilidad de la micela. La alteración del número de guaninas entre el oligonucleótido de CPG y la cola lipídica controla la estabilidad de la micela en presencia de proteínas séricas, como se pone de manifiesto a partir del pico de FBS.

40 Tomados en conjunto, estos experimentos demostraron que la estabilidad de la micela de G-cuádruple en condiciones de ruptura de micelas puede controlarse alterando el número de guaninas.

Ejemplo 9: Los enlazadores de G-cuádruple influyen en la acumulación en los ganglios linfáticos y la captación celular

Materiales y métodos

Ratones

50 Se obtuvieron ratones albinos C57BL/6 (6-8 semanas) del Jackson Laboratory. Los animales se cuidaron en la instalación para animales del Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT), inspeccionada por el USDA, bajo las pautas federales, estatales, locales y NIH para el cuidado de animales.

Aislamiento de células de médula ósea

55 Las células dendríticas derivadas de la médula ósea se prepararon siguiendo una modificación del procedimiento de Inaba como se notificó anteriormente. Las células dendríticas se activaron/maduraron con sondas de CG 500 nM durante 12 horas y se lavaron tres veces con PBS antes de su uso. Las células se cultivaron en medio completo (MEM, suero fetal bovino al 5 % (Greiner Bio-one), 100 unidades (U)/ml de penicilina G sódica y 100 µg/ml de estreptomicina (Pen/Strep), MEM piruvato de sodio (1 mM), NaH₂CO₃, MEM Vitaminas, MEM aminoácidos no esenciales (todos de Invitrogen) y β-mercaptoetanol (β-ME) 20 µM).
60

Imagenología in vivo y citometría de flujo

65 Los ganglios linfáticos drenantes de cada grupo de ratones fueron analizados por In Vivo Imaging Systems (IVIS®) y

citometría de flujo 24 y 72 horas después de la inyección. Todos los anticuerpos para la citometría de flujo se adquirieron de BD Pharmingen o Ebioscience.

Análisis estadístico

5 Todas las barras de error representan SEM. Las comparaciones de los valores medios se realizaron usando pruebas la t de Student para datos independientes. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Se usó el software GraphPad Prism 5.

Resultados

10 El sistema linfático absorbe el líquido intersticial del tejido y lo devuelve a la sangre a través de los ganglios linfáticos. Se llevaron a cabo experimentos con animales para evaluar el direccionamiento de las micelas al sistema linfático. Se inyectaron por vía subcutánea oligonucleótidos de CG marcados con colorante, oligonucleótidos de CG marcados con colorante emulsionados en IFA, o micelas de lipo-G_n-CG marcadas con colorante (n=0, 2, 4 o 6) en grupos separados de ratones. Los ganglios linfáticos drenantes de cada grupo de ratones fueron analizados por In Vivo Imaging Systems (IVIS®) y citometría de flujo 24 y 72 horas después de la inyección. Las células se adquirieron en un citómetro de flujo FACScanto (BD Biosciences) y se analizaron usando el software Flowjo (Tree Star Inc. Ashland, OR).

20 Todos los ganglios linfáticos se agrandaron visiblemente, alcanzando la ampliación máxima en 24 horas. La imagenología por fluorescencia de los ganglios linfáticos aislados a las 24 y 72 horas reveló una diferencia significativa entre los diferentes grupos de ratones. El número de micelas de lipo-G_n-CpG modestamente estabilizadas (n=0 o 2) retenidas por los ganglios inguinales (ganglios linfáticos proximales) y axilares (ganglios linfáticos distales) fue mayor que el número de micelas lipo-G_n-CpG sobreestabilizadas (n=4 o 6) retenidas, con el direccionamiento máximo a los ganglios linfáticos logrado por las micelas de lípido-G₂-CpG (figuras 8A y 8B). 72 horas después de la inyección, la captación de micelas de lípido-G_(0 o 2)-CpG desestabilizadas por las células dendríticas (CD) aumentó 5 veces, la captación por macrófagos aumentó 8 veces y la captación por linfocitos B aumentó 5 veces, en comparación con los oligonucleótidos CpG solubles. Por el contrario, las micelas de lipo-G_(4 o 6)-CG más estables mostraron un bajo nivel de retención en los ganglios linfáticos y asociación celular.

Ejemplo 10: Las micelas inmunoestimuladoras inducen la expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno

Materiales y métodos

35 Se examinó la expansión de linfocitos T CD8⁺ de ratón después de la inmunización/vacunación con oligo-CpG modestamente estabilizado (lipo-G_(0 o 2)-CpG) o micelas inmunoestimuladoras (lipo-G_(4 o 6)-CpG oligo), usando oligonucleótido de CpG soluble como control. Se vacunaron ratones C57B16 (B6) los días 0 y 14 y se analizaron el día 20 o 21. Normalmente, cada inyección contenía los siguientes ingredientes: 10 µg de antígeno de ovoalbúmina (OVA) (adquirido de Worthington Biochemical Corporation) y 1,24 nmol de micela de lipo-G_n-CG suspendidos en PBS 1X (K⁺ 20 mM y Mg⁺ 10 mM). La ovoalbúmina (OVA) se usó como antígeno modelo porque tiene un epítipo de clase I de MHC con restricción de H-2 Kb bien estudiado en ratones B6. En los experimentos en los que se usó el adyuvante incompleto de Freund (IFA), se combinó un volumen de oligonucleótidos de CpG solubles y antígeno OVA soluble con un volumen igual de IFA y se emulsionó. El volumen total de cada inyección de vacuna fue de 100 µl. A los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la base de la cola. Después de la inmunización, se recogieron muestras de sangre de bazo y ganglios linfáticos y se prepararon suspensiones celulares individuales (los glóbulos rojos se agotaron con el tampón de lisis ACK). Las preparaciones de muestras de sangre se evaluaron mediante tinción con tetrámero OVA₂₅₇₋₂₆₄ restringido por MHC de clase I para rastrear la expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos de SIINFEKL. El péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (CSIINFEKL) modificado con cisteína (cys) se sintetizó mediante GenScript y se purificó mediante HPLC de fase inversa. Las células se bloquearon con bloqueador de Fc (anticuerpo monoclonal anti-CD16/CD32 de ratón) y se tiñeron con tetrámero de Kb/SIINFEKL marcado con PE (Beckman Coulter) y anti-CD8-APC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón FACS. Los datos de FACS se recopilaron en un citómetro de flujo FACScanto de BD y se analizaron usando el software Flowjo. El análisis normalmente acotó células vivas positivas para tetrámero, CD8⁺.

Resultados

60 La administración de las micelas inmunoestimuladoras dio como resultado la expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos para OVA₂₅₇₋₂₆₄ (figuras 4A y 4B). Inesperadamente, las micelas basadas en oligo lipo-G₂-CpG modestamente estabilizadas fueron las más eficaces para estimular la expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos de SIINFEKL. Seis días después de la segunda inyección (refuerzo) de las micelas a base de oligo lipo-G₂-CpG desestabilizadas, aproximadamente el 33 % de todos los linfocitos T CD8⁺ detectados en la sangre fueron específicos para el antígeno, mientras que solo el 7 % de todos los linfocitos T CD8⁺ fueron específicas de antígeno después de la administración del refuerzo con micelas basadas en oligo lipo-G₆-CpG estabilizadas. Por tanto, la fuerza de la respuesta de los linfocitos T estimulada por esta vacuna se correlacionó directamente con las micelas de CpG modestamente estabilizadas que mostraron una acumulación máxima en los ganglios linfáticos.

5 Para examinar la capacidad de respuesta de los linfocitos T CD8+, los linfocitos de la sangre se volvieron a estimular *ex vivo* durante 6 horas con el péptido específico de OVA, SIINFEKL, y se analizaron para determinar la producción de citocinas, IFN- γ y TNF- α . Las células se colocaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se pulsaron con péptidos mínimos en presencia de brefeldina A durante 6 horas en medio completo a 37 °C. Las células se tiñeron con anti-CD8-APC y después se fijaron usando Cytotfix (BD biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron y se permeabilizaron. La tinción intracelular para anti-IFN- γ -PE y anti-TNF- α -FITC se realizó de acuerdo con el protocolo de BD. Los datos de FACS se recopilaron y se analizaron como se ha descrito. De nuevo, las micelas basadas en oligo lipo-G₂-CpG desestabilizadas fueron las más eficaces (figura 4B),
 10 en correlación con los descubrimientos anteriores.

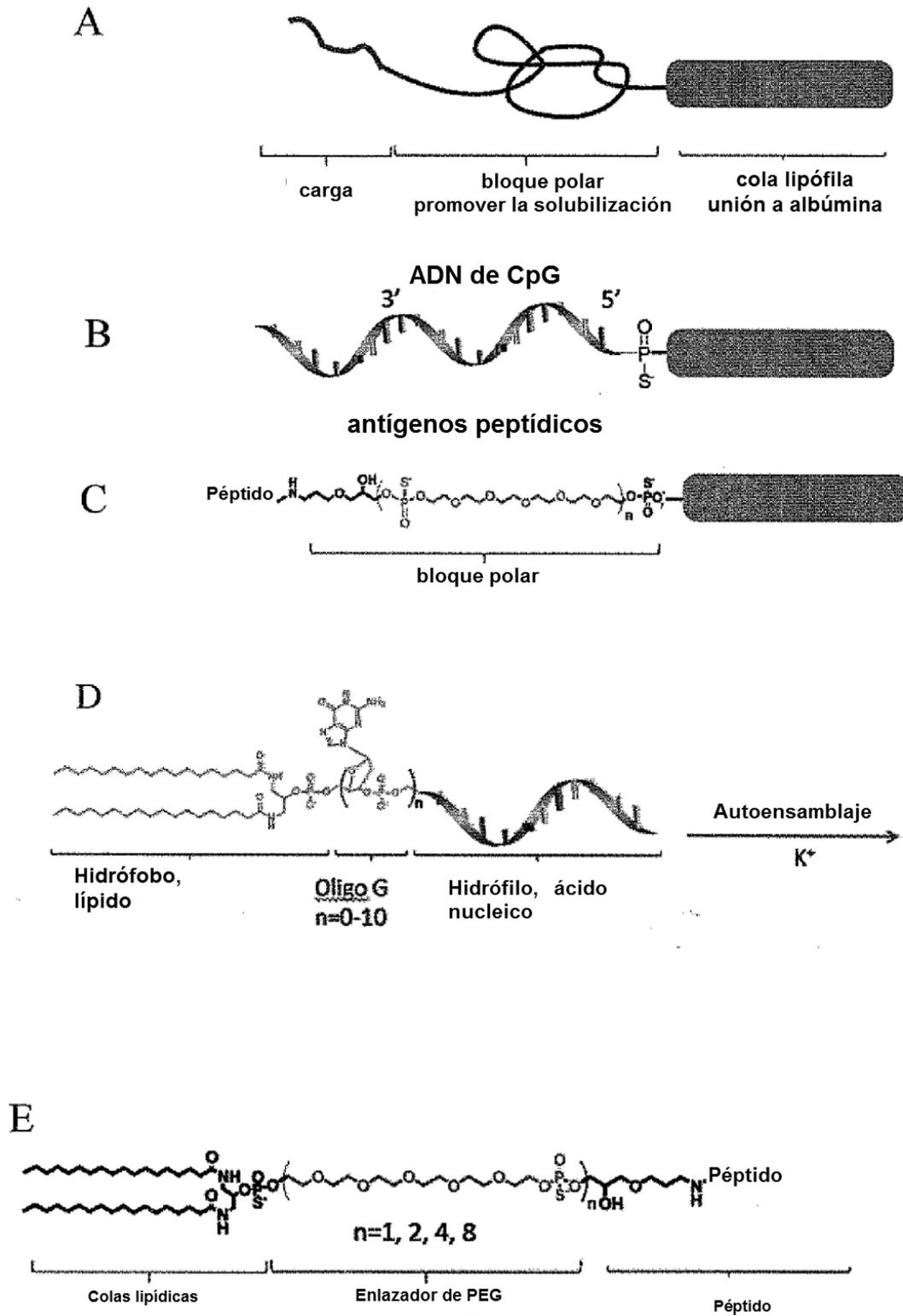
Se realizaron ensayos adicionales de linfocitos citotóxicos (LTC) *in vivo* para evaluar si las poblaciones de linfocitos T CD8+ expandidos eran funcionales. Los esplenocitos de ratones no tratados se pulsaron con o sin péptido SIINFEKL 10 μ M durante 30 min. Las células se marcaron después con CFSE 1 μ M (para células pulsadas) o 0,1 μ M (células de control) durante 10 min a 37 °C y se lavaron exhaustivamente. Las células se mezclaron en una proporción de 1:1 y se inyectaron por vía intravenosa 10x10⁶ células totales en ratones provocados previamente con formulaciones de vacunas como se describió anteriormente. Después de 18 horas, los esplenocitos de cada ratón receptor se analizaron mediante FACS para detectar las células marcadas con CFSE. Los linfocitos T CD8+ de ratones inmunizados con micelas inmunoestimuladoras basadas en lipo-G_n-CG lisaron >97,9 % de la población diana pulsada con péptido, mientras que los linfocitos T CD8+ de ratones inmunizados con oligonucleótido de CpG soluble lisaron de promedio un 54,6 % de las células diana.
 15
 20

REIVINDICACIONES

1. Un adyuvante de vacuna que comprende una pluralidad de conjugados de unión a albúmina anfífilos que comprende
- 5 (a) un componente lipídico;
 (b) un componente polar opcional; y
 (c) un compuesto inmunomodulador o un adyuvante molecular;
- 10 en donde el compuesto inmunomodulador o el adyuvante molecular están enlazados covalentemente al lípido a través de un enlazador nucleotídico u oligonucleotídico que comprende "n" guaninas consecutivas, en donde n es 1-10, y en donde el conjugado es suficientemente soluble, de modo que el lípido se une a albúmina en condiciones fisiológicas.
- 15 2. El adyuvante de vacuna de la reivindicación 1, en donde:
- (a) una pluralidad de los conjugados pueden formar espontáneamente micelas en solución acuosa, y opcionalmente en donde las micelas pueden desensamblarse en presencia de albúmina; opcionalmente, en donde el 50 % o más de las micelas se desensamblan en presencia de suero fetal bovino;
- 20 (b) el enlazador nucleotídico u oligonucleotídico consiste en "n" guaninas consecutivas, en donde n es 1-2 o 3-10; o
 (c) el conjugado comprende la estructura L-5'-G_n-ON-3', en donde "L" es el lípido, "G" es una guanina, "n" es 1-10 y "ON" es un oligonucleótido inmunoestimulador.
- 25 3. El adyuvante de vacuna de las reivindicaciones 1 o 2, en donde:
- (a) el compuesto inmunomodulador o el adyuvante molecular son un oligonucleótido inmunoestimulador; opcionalmente, en donde el oligonucleótido inmunoestimulador comprende CpG; opcionalmente además en donde el oligonucleótido inmunoestimulador es un ligando para un receptor de tipo Toll;
- 30 (b) el oligonucleótido inmunoestimulador tiene un esqueleto de fosforotioato (PS); y/o
 (c) el oligonucleótido comprende 20 o más ácidos nucleicos.
- 35 4. Un adyuvante de vacuna que comprende una pluralidad de conjugados de oligonucleótidos que comprenden un oligonucleótido inmunoestimulador que está enlazado a un enlazador que comprende al menos 3 guaninas consecutivas, que está conjugado de manera covalente a un lípido, en donde una pluralidad de los conjugados de oligonucleótidos pueden formar espontáneamente micelas en solución acuosa, y en donde más del 36 % de las micelas están intactas en presencia del 20 % de suero fetal bovino, y opcionalmente en donde el conjugado de oligonucleótidos comprende la estructura L-5'-G_n-ON-3', en donde "L" es el lípido, "G" es una guanina, "n" es 3-10, y "ON" es el oligonucleótido inmunoestimulador.
- 40 5. El adyuvante de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende un adyuvante molecular.
- 45 6. Un conjugado peptídico anfífilo que comprende un antígeno peptídico que está enlazado a un enlazador que está conjugado a un lípido, en donde el lípido es un diacil lípido, en donde el conjugado es suficientemente soluble, de modo que el lípido se une a albúmina en condiciones fisiológicas, y en donde el enlazador comprende una o más unidades de polietilenglicol; y, opcionalmente, en donde el enlazador comprende "N" unidades de polietilenglicol consecutivas, en donde N es 25-50.
- 50 7. El adyuvante de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:
- (a) el lípido es un diacil lípido;
 (b) las cadenas acilo del lípido comprenden 12-30 unidades de hidrocarburo; y/o
 (c) el enlazador comprende una o más unidades de polietilenglicol, que está conjugado a un diacil lípido.
- 55 8. Una composición inmunógena que comprende el adyuvante de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 y el conjugado peptídico anfífilo de la reivindicación 5.
- 60 9. Una composición inmunógena que comprende el adyuvante de vacuna de las reivindicaciones 1-5 y un antígeno.
10. Un adyuvante de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7, o un conjugado peptídico anfífilo de la reivindicación 6, o una composición inmunógena de una cualquiera de las reivindicaciones 5, 8 o 9 para su uso en medicina.
- 65 11. Un adyuvante de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7, o una composición inmunógena de las reivindicaciones 8 o 9 para su uso en el tratamiento de un sujeto mediante el aumento de una respuesta

inmunitaria en el sujeto; opcionalmente
en donde el sujeto tiene cáncer o una enfermedad infecciosa.

- 5 12. Un adyuvante de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7, o una composición inmunógena de la reivindicación 8 o 9 para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad infecciosa.



Figuras 1A-1E

CpG y BSA mezclados a 15 μ M:

FRET entre FITC-CpG y rodamina-albúmina

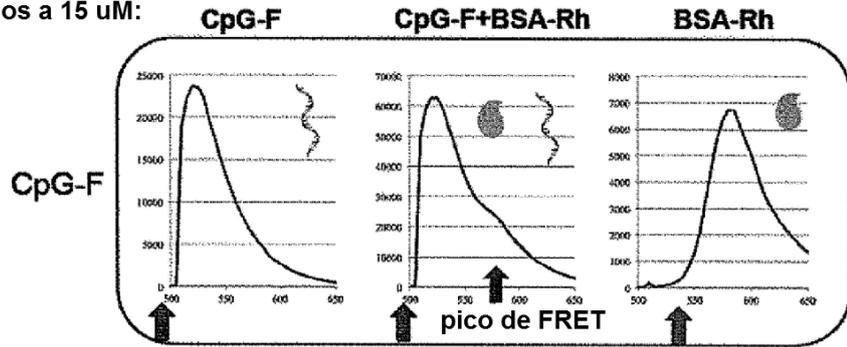


Figura 1F

CpG y BSA mezclados a 15 μ M:

FRET entre FITC-CpG y rodamina-albúmina

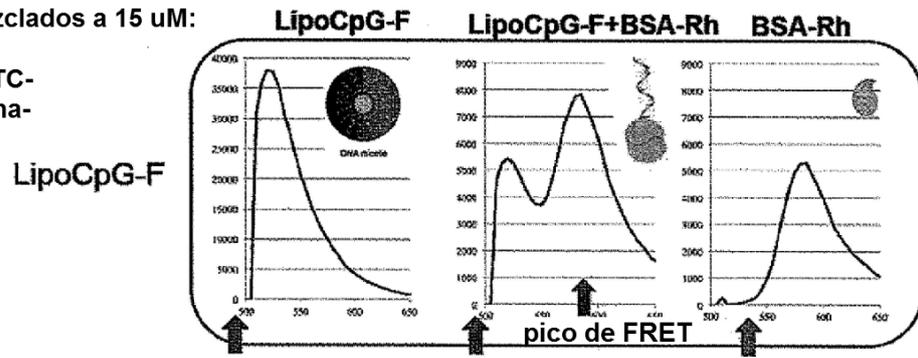
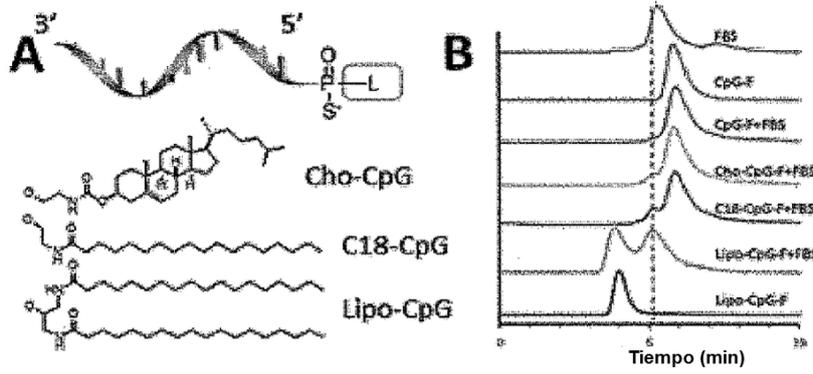
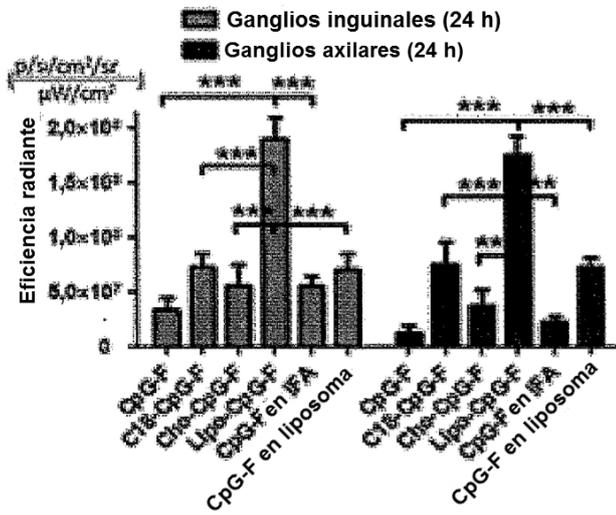


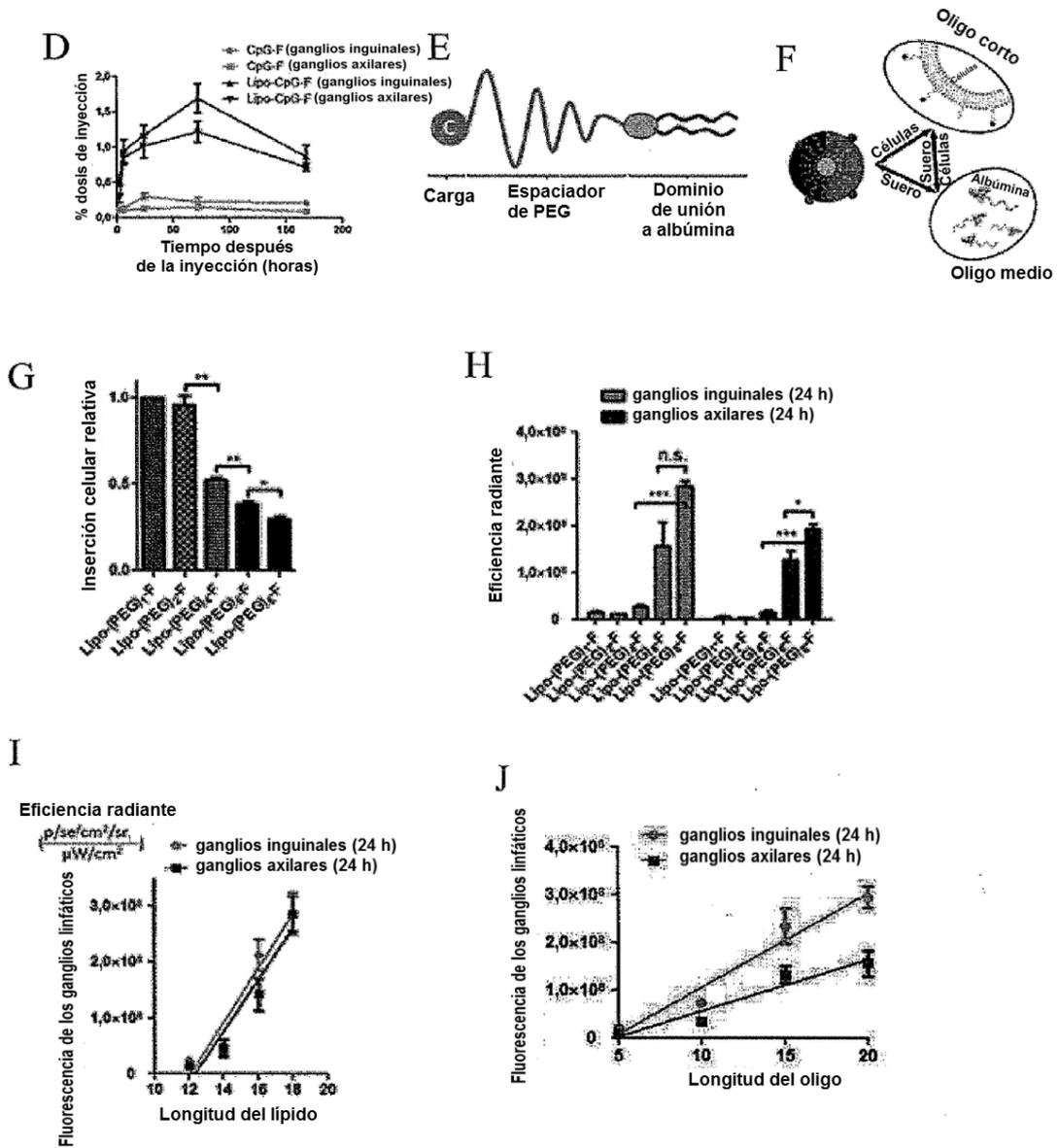
Figura 1G



C



Figuras 2A-C



Figuras 2D-2J

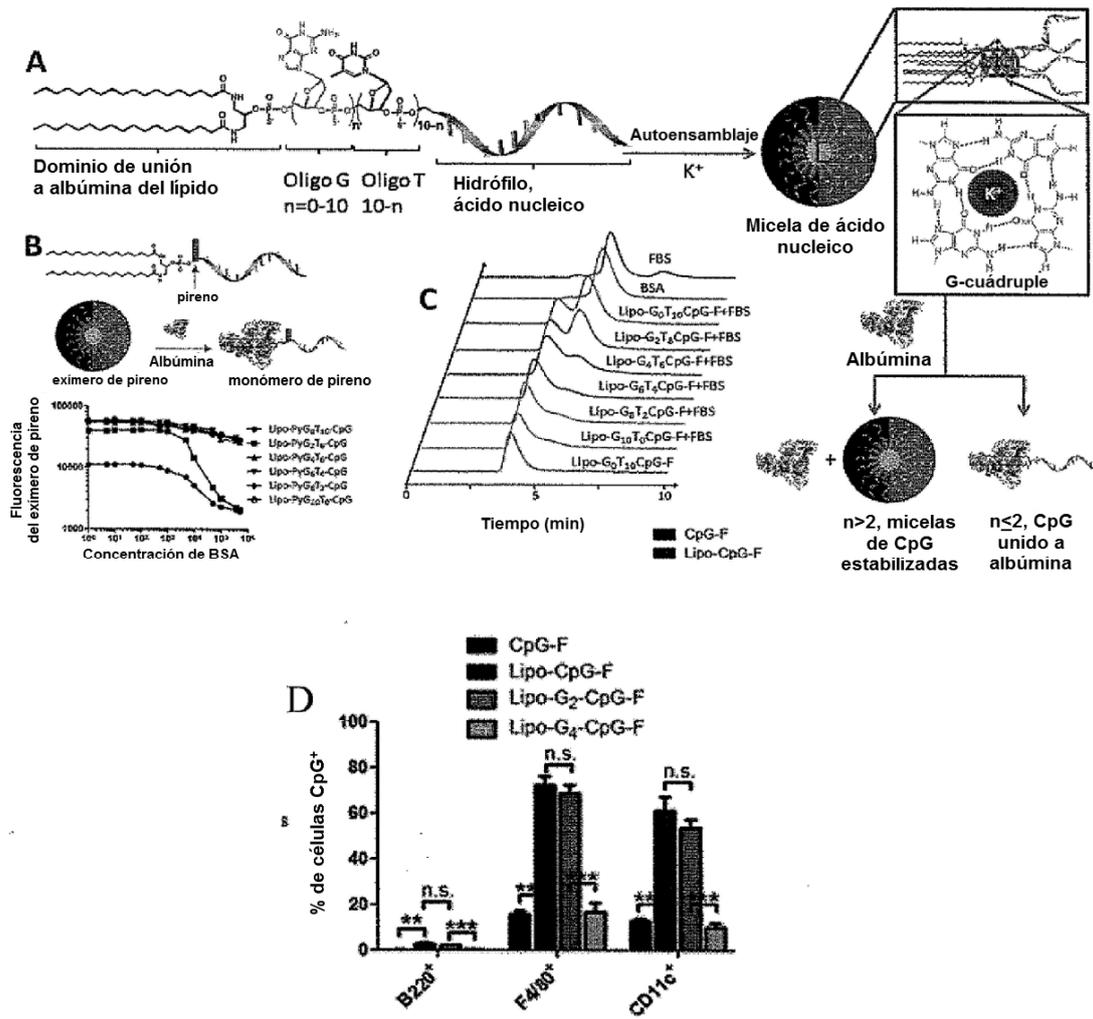
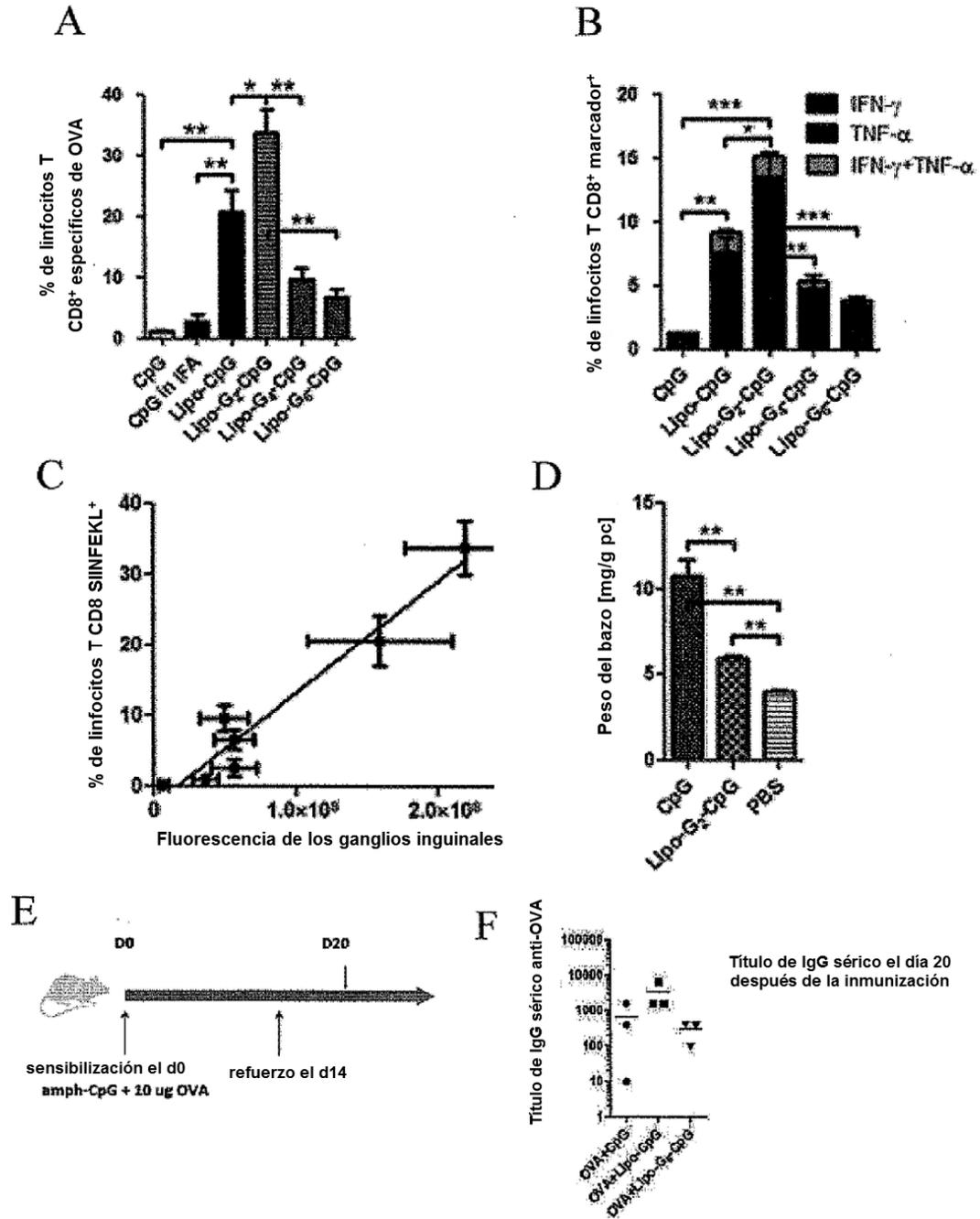
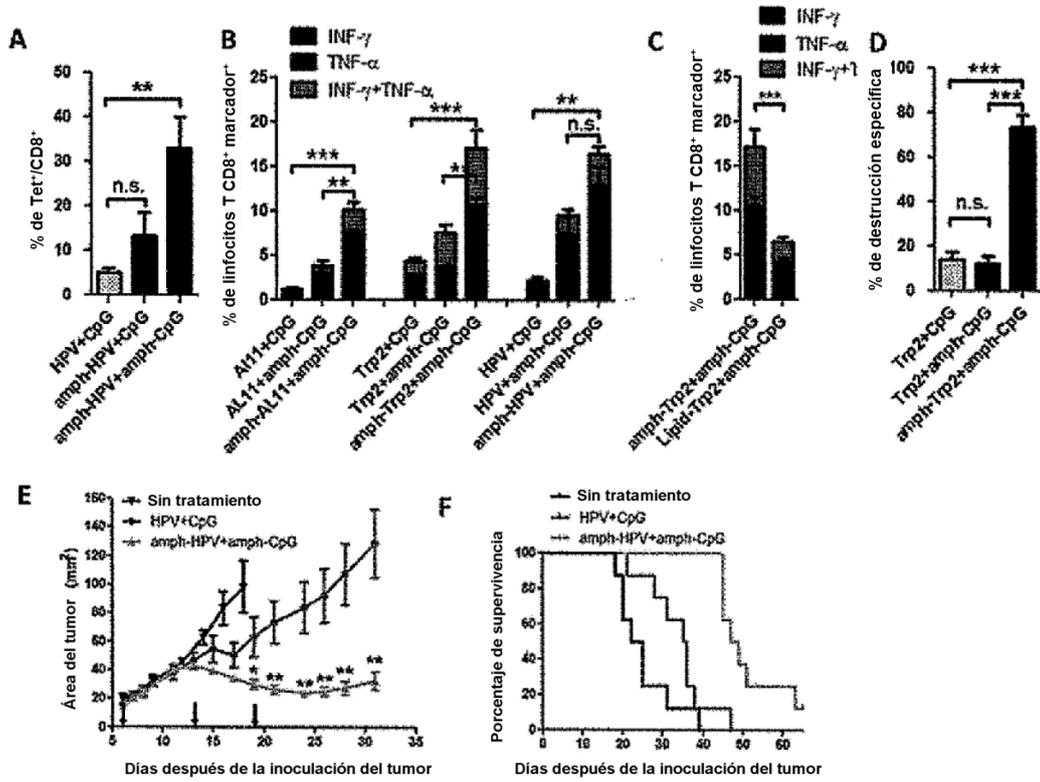


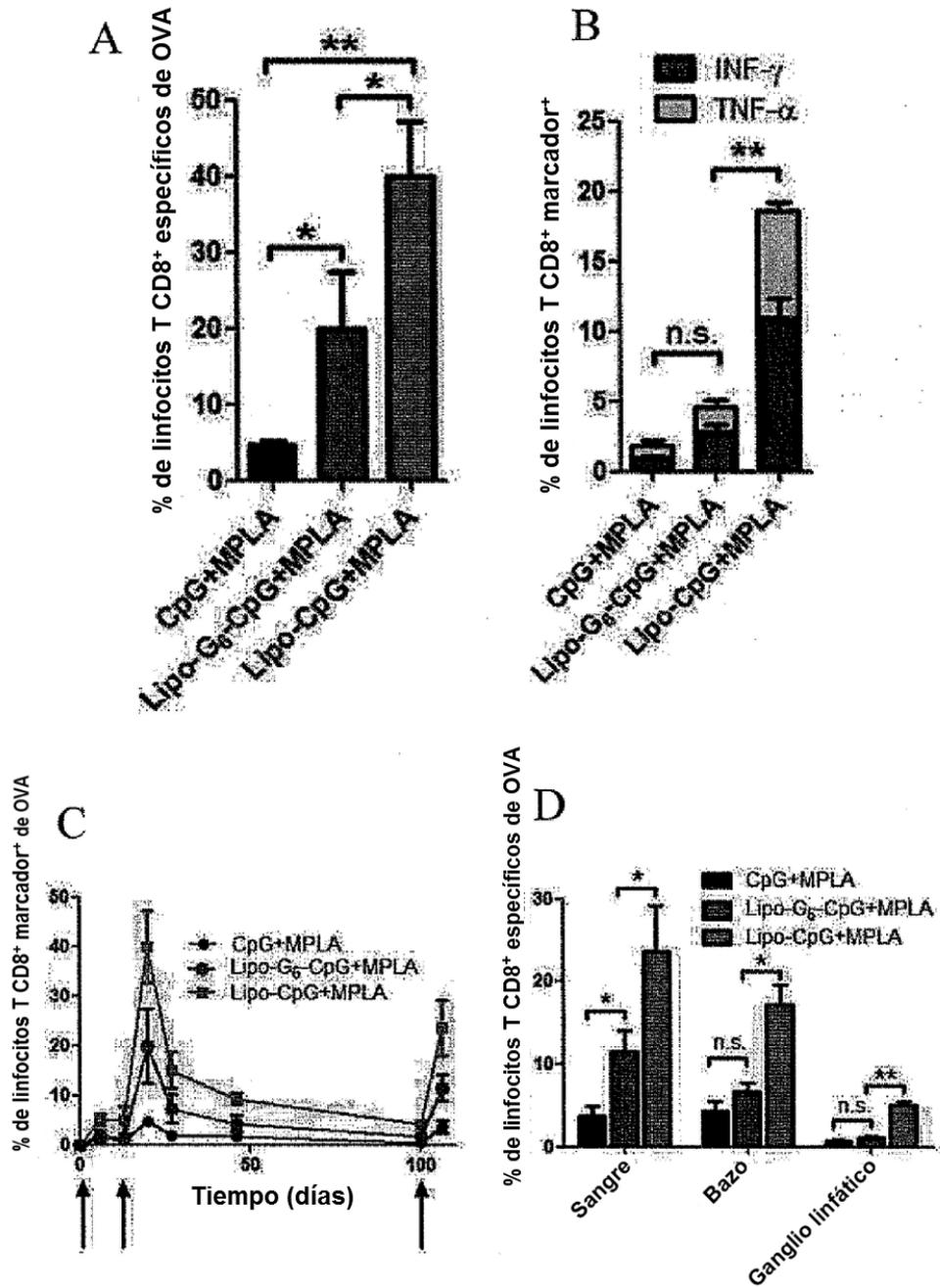
Figura 3A-D



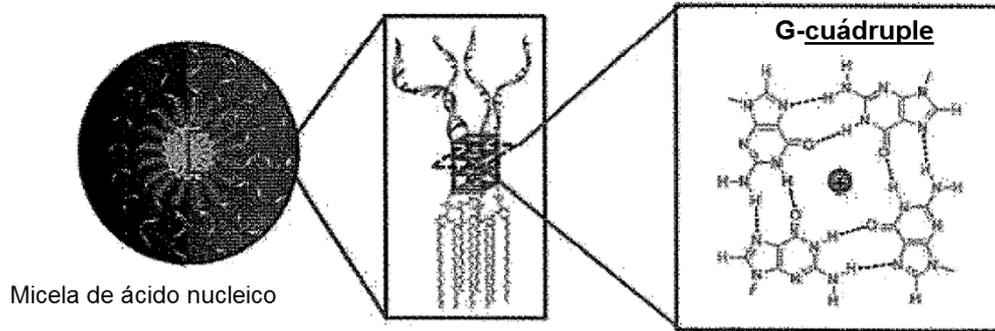
Figuras 4A-4F



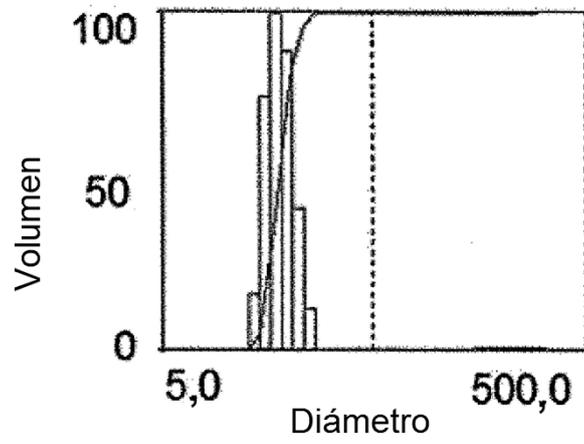
Figuras 5A-F



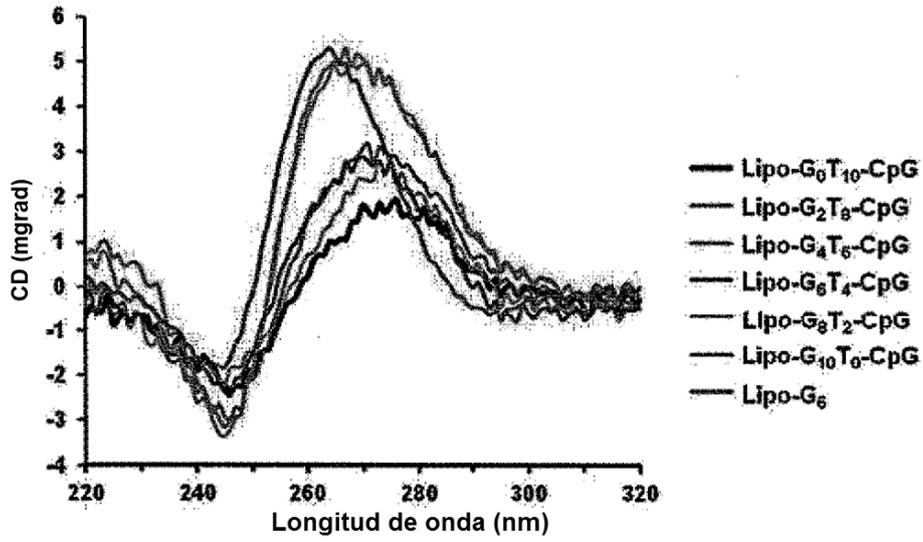
Figuras 6A-6D



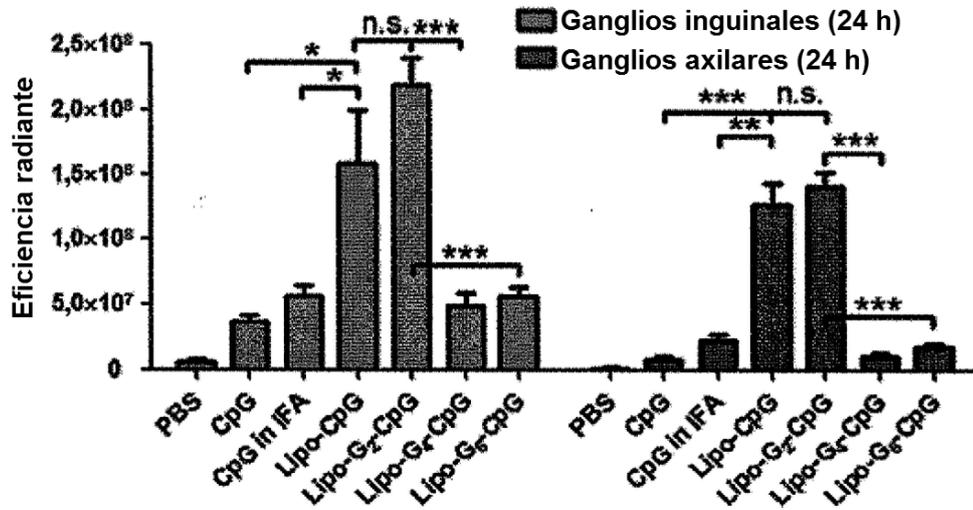
Figuras 7A



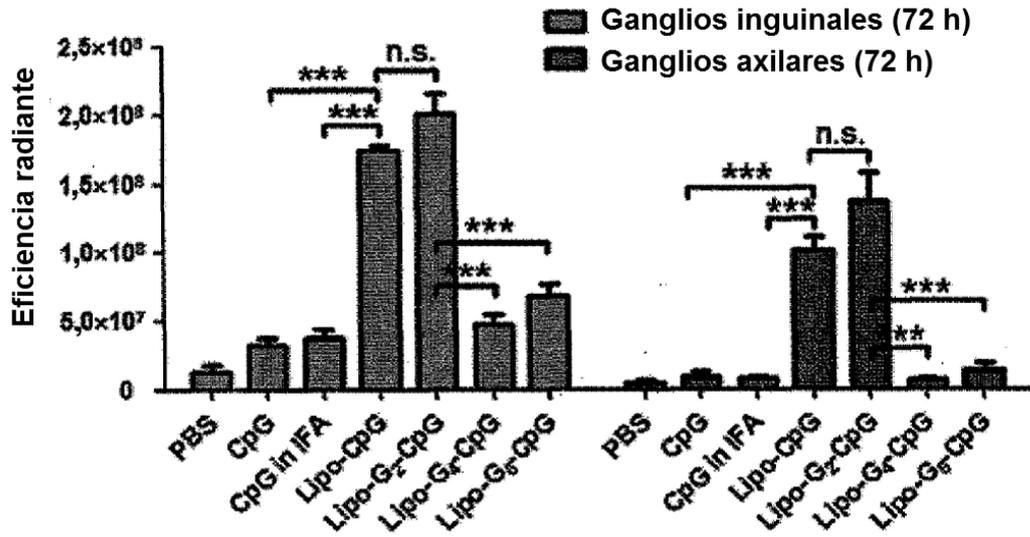
Figuras 7B



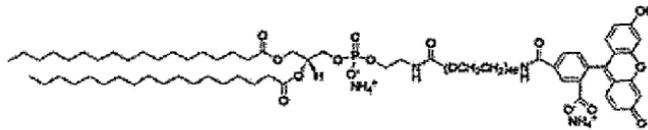
Figuras 7C



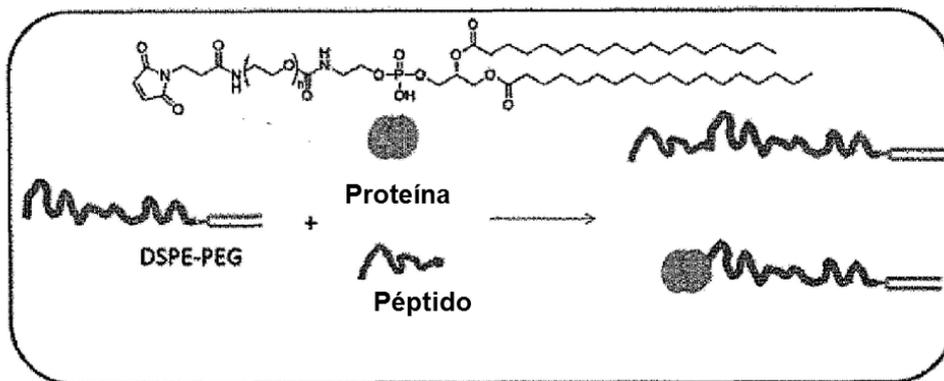
Figuras 8A



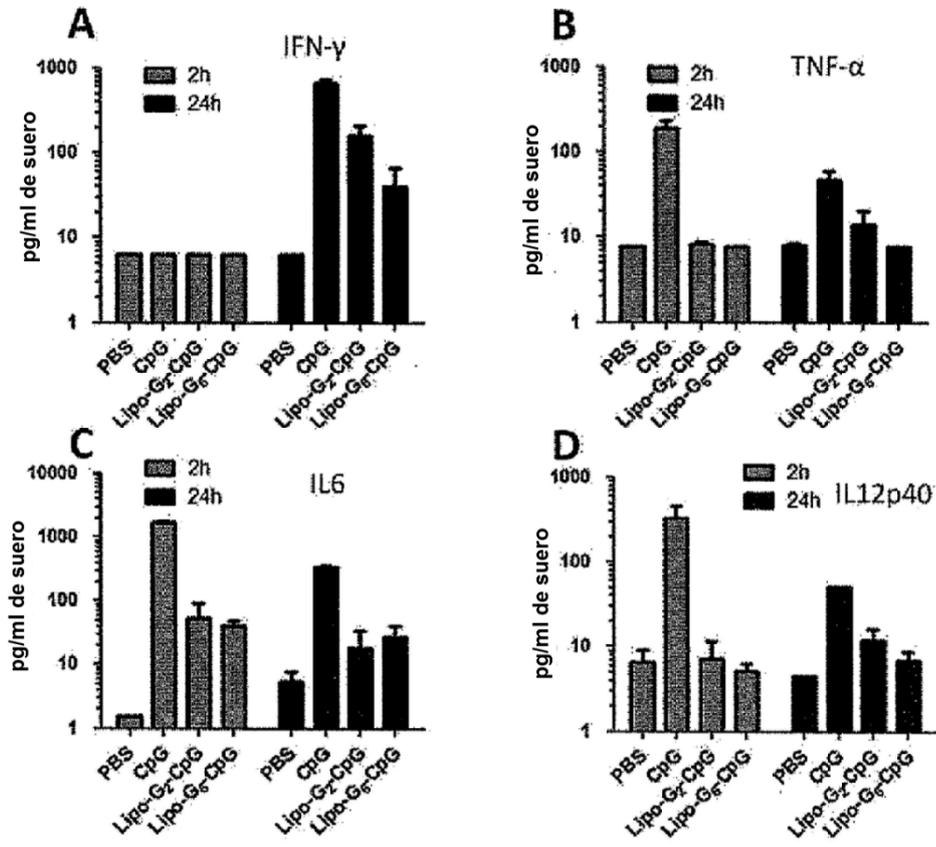
Figuras 8B



DSPE-PEG se usa ampliamente en el mercado de liposomas sigilosos



Figuras 9



Figuras 10A-10B