

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 315**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2014 PCT/US2014/011041**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14110366**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2014 E 14738078 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2943226**

54 Título: **Composiciones terapéuticas y procedimientos que implican la transfección de ARNm**

30 Prioridad:

11.01.2013 US 201361751504 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.01.2020

73 Titular/es:

HERZBERG, MARK C. (33.3%)

3927 York Avenue South

Minneapolis, MN 55410, US;

ROSS, KAREN FARNIE (33.3%) y

SORENSEN, BRENT S. (33.3%)

72 Inventor/es:

HERZBERG, MARK C.;

ROSS, KAREN FARNIE y

SORENSEN, BRENT S.

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 738 315 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 terapéuticas y procedimientos que implican la transfección de ARNm

5 FINANCIACION GUBERNAMENTAL

[0001] La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo la subvención No. 1R01DE021206, otorgada por el NIH/NIDCR. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

10 CARACTERÍSTICAS

[0002] Esta descripción describe, en un aspecto, un ARNm que codifica un polipéptido implicado en la inmunidad innata, en el que el polipéptido es proteína antimicrobiana de catelicina (CAMP), calprotectina, S100A8, una β -defensina, S100A7, inhibidor de leucocitos de secreción, lipocalina 2, o lisozima, para usar en un procedimiento para inhibir la infección de una célula epitelial de la mucosa por un patógeno, caracterizado porque el ARNm se administra mediante la aplicación tópica de la célula en una cantidad efectiva para ser terapéutico.

[0003] En algunas realizaciones de cualquier aspecto resumido anteriormente, el ARNm puede incluir un resto de estabilización, tal como, por ejemplo, una caperuza en 5' o una extensión en 3'.

[0004] En otro aspecto, esta descripción describe una composición que comprende un ARNm que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en proteína antimicrobiana de catelicina (CAMP), calprotectina, S100A8, S100A9, una β -defensina, S100A7, inhibidor de leucocitos de secreción, lipocalina 2 y lisozima; y un vehículo de suministro *in vivo* formulado para su uso en el tratamiento de la infección de células epiteliales de la mucosa por un patógeno; en el que la composición se administra por vía tópica a las células epiteliales de la mucosa.

[0005] En algunas realizaciones, el polipéptido puede suprimir la proliferación de células epiteliales. En algunas de estas realizaciones, el polipéptido puede incluir calprotectina, S100A8 o S100A9.

[0006] En otras realizaciones, el polipéptido puede estar involucrado en la inmunidad innata. En algunas de estas realizaciones, el polipéptido puede incluir proteína antimicrobiana de catelicina (CAMP), calprotectina, S100A8, S100A9, una β -defensina, S100A7, inhibidor de leucocitos de secreción, lipocalina 2 o lisozima. En algunas realizaciones, el ARNm puede incluir un resto de estabilización, tal como, por ejemplo, una caperuza en 5' o una extensión en 3'.

[0007] El resumen anterior no pretende describir cada realización descrita o cada implementación de la presente invención. La descripción siguiente ejemplifica más particularmente realizaciones ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud, se proporciona una orientación a través de listas de ejemplos, cuyos ejemplos se pueden utilizar en diversas combinaciones. En cada caso, la lista indicada sirve únicamente como un grupo representativo y no debe interpretarse como una lista exclusiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0008] Figura 1. Expresión de la proteína CAMP por células KB después de la transfección con ARNm de *CAMP* bloqueado con ARCA o ARNm de *CAMP* bloqueado con CE. (A) Expresión de la proteína CAMP después de que las células KB fueron transfectadas con ARNm de *CAMP* bloqueado con ARCA, CE capO o cap1. En la parte superior, transferencia Western representativa. En la parte inferior, interpretación cuantitativa, con la expresión de la caperuza ARCA a las ocho horas fijada a 100. Después del análisis usando un análisis Quantity One, tal como se describe en los Materiales y Procedimientos, la expresión de la proteína después de la transfección con los diversos procedimientos de bloqueo se presentó con relación a 100. (B) Expresión de la proteína CAMP con el tiempo después de la transfección con *CAMP* bloqueada con ARCA. Como en el panel (A), la expresión de la proteína CAMP después de la transfección de ARNm de *CAMP* bloqueado con ARCA se detectó mediante transferencia Western (panel superior) y se presentó en el panel inferior en relación con el nivel en ocho horas, que se fija a 100. En los paneles (A) y (B), las barras de error muestran las medias \pm SD de tres a seis experimentos independientes.

Figura 2. Expresión de las proteínas S100A8 y S100A9 por células KB después de la transfección con ARNm de S100A8, S100A9, A8-*IRES-A9* y A8 *nIRES-A9* bloqueado con ARCA. (A) Expresión de la proteína S100A8 después de que las células KB fueron transfectadas con ARNm de S100A8, tal como se detectó mediante transferencia Western (se muestra imagen representativa) y se cuantificaron como en la figura 1. Se realizaron experimentos idénticos para determinar el curso temporal de la expresión de la proteína (B) S100A9; (C) proteínas S100A8 y S100A9 después de que las células KB fueron cotransfectadas con ARNm de S100A8/S100A9; (D) proteína S100A8 y S100A9 después de que las células KB fueron transfectadas con ARNm de A8-*IRES-A9*; y (E) proteína S100A8 y S100A9 después de que las células KB fueron transfectadas con ARNm de A8-*nIRES-A9*. La expresión de proteínas en 8h después de la transfección de ARNm se fija como 100. Las barras de error muestran las medias \pm SD de tres a seis experimentos independientes.

Figura 3. ARNm de AMPc y calprotectina aumentan la resistencia a la invasión por *Listeria* y *Salmonella*. Las

monocapas fueron transfectadas con ARNm durante (A) ocho horas, (B) 24 horas, (C) 48 horas, y después se incubaron durante dos horas con *L. monocytogenes* ATCC 10403S a una MOI de 100:1 o *S. typhimurium* ATCC 14028 a MOI 1:1. Después de transfección durante 24 horas o 48 horas, las células se dividieron a las ocho horas y de nuevo 32 horas más tarde, después se incubaron durante otras 16 horas. Las bacterias intracelulares viables se describen como porcentaje promedio \pm SD expresado en relación a las UFC en células KB transfectadas de manera simulada con vehículo (PBS), que se fija a 100%. Las barras de error muestran las medias \pm SD en relación con el vehículo de control a las ocho horas para tres a seis experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Figura 4. El suministro de ARNm reduce la viabilidad celular sin desencadenar apoptosis. (A) La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de MTT en los tiempos indicados durante tres días después del suministro de ARNm de construcciones de ARNm a células KB. Las células transfectadas de forma simulada con PBS se utilizaron como control, con su viabilidad fijada en 1. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió al menos dos veces. (B) Análisis de células apoptóticas utilizando transferencias Western después del suministro de ARNm de construcciones de ARNm. Las células que se tiñeron positivamente por anexina-V-FITC usando citometría de flujo se consideraron apoptóticas. En los paneles A y B, las barras de error muestran las medias \pm SD de tres a seis experimentos independientes. * $p < 0,05$. C. El análisis de transferencia Western para la escisión de PARP después del suministro de las construcciones de ARNm. Las células (vehículo) transfectadas de forma simulada con PBS y las células no transfectadas se utilizaron como controles.

Figura 5. Los ARNm antimicrobianos persisten hasta 32 horas en células KB. El ARN fue aislado utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) y Mini-kits RNeasy plus (Qiagen, Valencia, CA). El ARN total se transcribió de forma inversa con Superscript III (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real de forma cuantitativa (qRT-PCR) usando ensayos de qRT-PCR diseñados con PrimeTime (Hs.PT.42.1073747 para *CAMP* humana, Hs.PT.42.3682141 para *S100A8* humana, Hs.PT.42.3080635 para *S100A9* humana, Hs.PT.45.227970.g para *ACTB* humana; Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa). Los niveles de expresión de ARNm de *CAMP*, *S100A8*, *S100A9*, *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9* se normalizaron a ARNm de *ACTB* (β -actina). (A) Transfección de ARNm de *CAMP*. (B) Cotransfección de ARNm de *S100A8/S100A9* (mol/mol = 1:1). (C) Transfección de ARNm de *A8-IRES-A9*. (D) Transfección de ARNm de *A8-nIRES-A9*. Los ARNm de *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9* se detectaron mediante cebadores de *S100A9*. La abundancia de ARNm a las cuatro horas después de la transfección de ARNm se le asignó el valor arbitrario de 100%. Las barras muestran las medias \pm SD de tres a seis experimentos independientes.

Figura 6. Expresión de proteínas después de la transfección de ARNm. Imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de (A) transfección de ARNm de *EGFP* durante 16 horas. (B) transfección de ARNm de *CAMP* durante 16 horas. (C) Cotransfección de ARNm de *S100A8/S100A9* (mol/mol = 1:1) durante 16 horas, (D) transfección de ARNm de *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9* durante 40 horas. Vehículo, PBS. Barra = 10 μ M. Los experimentos se realizaron tres veces y se muestran imágenes representativas.

Figura 7. Expresión de *S100A8* y *S100A9* en los tejidos de cabeza y cuello humanos y líneas celulares de carcinoma. Los niveles de expresión de ARNm de *S100A8* y *S100A9* en (A) tejidos normales adyacente (NAT) y HNSCC y (B) células de HNSCC TR146 y KB se midieron mediante qRT-PCR y se normalizaron para GAPDH; la línea de puntos se muestra como umbral para la detección. El ARN total extraído de tejidos coincidentes de NAT y HNSCC de cada uno de tres pacientes se agrupó por separado para el análisis de expresión génica. Las líneas de células cultivadas bajo condiciones estándar se recogieron y se analizaron en aproximadamente 70% de confluencia. Los datos se presentaron como media \pm SD ($n = 2$). Inmunotransferencias representativas de (C) *S100A8* y *S100A9* en células transfectadas KB-*S100A8/A9* y (D) células knockdown de TR146-shARN-*S100A8/A9* en comparación con el tipo salvaje y los controles de transfección negativa. Se utilizó β -actina como control de carga para el análisis de inmunotransferencia separado en geles de SDS-PAGE al 10%.

Figura 8. *S100A8/A9* suprimió el crecimiento dependiente de anclaje e independiente de anclaje de células KB. (A) Curvas de crecimiento de las células KB-*S100A8/A9* en comparación con células KB-*EGFP* y de control de tipo salvaje KB. Las células fueron cultivadas en matraces de tejidos de poliestireno no pirogénicos en MEM fresco suplementado con 10% de FBS cada tres días. (B) Crecimiento independiente del anclaje en agar blando para células KB, KB-*EGFP* y KB-*S100A8/A9* (media \pm SEM, * $p < 0,03$, $n = 4$). (C) Crecimiento dependiente de anclaje en matraces de tejido en medio completo (media \pm SD, * $p < 0,02$, $n = 3$) y (D) Formación de colonias en agar blando (media \pm SEM, *** $p < 0,0005$, $n = 2$) de células TR146-shARNS100A8/A9KD en comparación con células TR146 WT y células de control TR146-shARN.

Figura 9. Ciclo celular y detención de la mitosis en G2/M inducidos por la expresión de *S100A8/A9*. (A) Análisis del ciclo celular de células KB, KB-*EGFP* y KB-*S100A8/A9* post-sincronía. Las células cultivadas en condiciones estándar fueron privadas de suero durante la noche, se sincronizaron en G1/S con el tratamiento con afidicolina y se estimularon para volver a entrar en el ciclo celular. Las células sincronizadas se tiñeron con solución de tinción de ADN con yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo para los cambios en el contenido de ADN después de la liberación del bloqueo de G1/S. (B) Análisis mitótico de células sincronizadas teñidas con fosfo-histona H3 (Ser10) y analizadas por citometría de flujo. (C) Porcentaje de células en G2/M. Se analizaron células KB, KB-*EGFP* y KB-*S100A8/A9* con el tiempo post-sincronía y se presentaron como media \pm SEM; $n = 2$ experimentos independientes (cada análisis realizado por duplicado); * $p < 0,05$. (D) Porcentaje de células mitóticas post-sincronía, lo que representa la media de dos experimentos repetidos independientes. Las células KB-*S100A8/A9* mostraron un menor número de células mitóticas tal como se muestra por una menor tinción de fosfo-histona H3 (Ser10).

Figura 10. *S100A8/A9* modula el punto de control del ciclo celular G2/M que regula moléculas en SCC. El estado de la expresión y la fosforilación (activación/inactivación) de reguladores del ciclo celular se muestra mediante análisis de

inmunotransferencia. Los datos mostrados son representativos de múltiples experimentos repetidos independientes. Se usó IgG policlonal anti- β -actina de cabra para detectar β -actina como control de carga de proteínas. (A) Expresión de proteínas que regulan G1/S, ciclina A, ciclina E, p21 y Rb, Chk2 y CDC25B, en KB, KB-EGFP y KB-S100A8/A9. La fosforilación de p-Chk2 (Thr68) no era detectable en ninguna célula, con o sin la expresión de S100A8/A9 (no mostrado). (B) Estado de expresión y fosforilación de reguladores de G2/M, Chk1/p-Chk1 (Ser345), p-Cdc25C (Thr48) activa mitótica, Cdc25C/p-Cdc25C (Ser216), Cdc2/p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) y ciclina B1. (C) Inmunotransferencia (IB) de la proteína Cdc25C coimmunoprecipitado (IP) con 14-3-3 β capturado con IgG policlonal anti-14-3-3 β de conejo. También se muestra inmunotransferencia de la proteína 14-3-3 β total. (D) Los niveles de proteína de S100A8, S100A9, Cdc2 y Cdc2-(Thr14/Tyr15) en TR146 de tipo salvaje (TR146 WT), transfectante de shARN de control (TR146-shARN-control) y células knockdown de S100A8/A9 inducida por shARN (TR146-shARN-S100A8/A9KD).

Figura 11. La interacción de S100A8/A9 con fosfatasa PP2A aumenta la actividad. (A) PP2A α / β co-inmunoprecipitó (IP) con complejo S100A8/A9 (IP con anticuerpo 27E10) o subunidad S100A9 (panel izquierdo) y S100A9 (utilizado como proteína marcadora de complejo S100A8/A9) co-IP con subunidad PP2A α / β , tal como se detectó por inmunotransferencia (IB). (B) Expresión, fosforilación y metilación de la subunidad de la subunidad PP2A en comparación en células KB, KB-EGFP y KB-S100A8/A9 tal como se detecta usando IB. La transferencia que se muestra es un representante de múltiples repeticiones ($n \geq 3$) del total de lisados de proteínas separadas en geles de SDS-PAGE al 10%. β -actina se utilizó como control de carga de proteínas. (C) Las actividades de fosfatasa PP2A-C en células KB-S100A8/A9 KB-EGFP se normalizaron a la PP2A- α / β detectable co-inmunoprecipitada con S100A8/A9 (anticuerpo 27E10) que se muestra en A y, a continuación, se normalizó adicionalmente a niveles de KB-EGFP. Los datos se muestran como media \pm SE ($n = 2$). # Barras de error no visibles. (D) Inhibición de la fosforilación de p-Cdc25C (Ser216) dependiente de S100A8/A9 por ácido ocaico 10 nM (OA). Expresión de p-Cdc25C en ausencia (panel izquierdo) y presencia de OA (derecha) como se detecta por IB.

Figura 12. Regulación mediada por S100A8/A9 (calprotectina) propuesta de la vía de señalización del punto de control del ciclo celular G2/M, tal como se resume en este informe. La línea continua representa la regulación directa; la línea discontinua representa un mecanismo desconocido.

Figura 13. Expresión estable de S100A8/A9 reduce el crecimiento del tumor del suelo de la boca. Se inyectaron células de carcinoma KB que expresan S100A8/A9 y células KB transfectadas de forma simulada que expresan solo EGFP en el suelo de la boca de grupos separados de ratones sanos como se describe en el Ejemplo 3. (A) Tumores ortotópicos formados por células KB-S100A8/A9 en el suelo de la boca eran un 65% más pequeños en el día 17 ($p < 0,03$) que las células KB que expresan EGFP. (B) Los tumores formados en el suelo de la boca a partir de células KB-S100A8/A9 son extremadamente más pequeños y menos invasivos en los tejidos circundantes que los tumores de células KB-EGFP. (C) Los tumores de células KB-EGFP histológicamente (teñidos con hematoxilina y eosina) están más desdiferenciados y tienen áreas más grandes de necrosis que tumores de células KB-S100A8/A9 de tamaño similar. Los datos mostrados son de tres experimentos individuales, con tres ratones por grupo.

Figura 14. El knockdown de shARN estable de S100A8/A9 se correlaciona con el crecimiento del tumor más grande del suelo de la boca. Se transfectaron células de carcinoma bucal TR146 con shARN para "knockdown" la expresión de forma estable de S100A8 y S100A9 endógenas. El knockdown dio lugar a aproximadamente 70% menos de expresión de la proteína S100A8/A9 (células A8A8c10) que en las células transfectadas de forma simulada (Neg3) (datos no mostrados). Las células TR146 con knockdown de shARN de S100A8/A9 (células A8A8c10) forman tumores ortotópicos que son 20% más grandes antes del día 17 ($p < 0,2$) que las células transfectadas simuladas (Neg3). Los datos mostrados son de dos experimentos individuales, con tres ratones por grupo.

Figura 15. Efectos de la concentración de saliva y el tiempo de tratamiento en el suministro de ARNm de EGFP en células KB. Las células se incubaron a 37°C con 10%, 50% o 90% de saliva para (A) un minuto, (B) tres minutos, o (C) cinco minutos, se lavaron tres veces con medio fresco, y a continuación se incubaron con ARNm modificado empaquetado que codifica EGFP. Las células tratadas con 50% saliva pero sin suministro de ARNm se utilizaron como control.

Figura 16. Suministro de ARNm de EGFP en células KB: efectos de la frecuencia de lavado a efectos inversos del tratamiento con saliva. Las células se trataron con 90% saliva durante tres minutos, se lavaron durante las frecuencias indicadas con medio fresco, seguido de transfección de ARNm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0009] Esta descripción se refiere a composiciones y procedimientos que implican la introducción de un ARNm en una célula de manera que la célula expresa uno o más polipéptidos que pueden disminuir la probabilidad y/o grado en que la célula funciona de manera anormal y/o es susceptible a la infección por un patógeno. Por lo tanto, los procedimientos y composiciones pueden proporcionar terapia contra las afecciones que resultan de la infección incluyendo, por ejemplo, enfermedades infecciosas y ciertas neoplasias. Una vez introducido en una célula, el polipéptido se expresa sólo siempre que el ARNm se puede traducir en las células diana, es decir, la expresión es transitoria, no permanente. Si las células forman un tejido diana que es accesible, el ARNm puede reintroducirse repetidamente para un beneficio terapéutico sostenido.

[0010] El epitelio mucoso proporciona la primera línea de defensa contra la invasión de microbios. Las células epiteliales de la mucosa oral y otras confieren protección contra bacterias invasoras a través de un mecanismo autónomo celular usando dos péptidos antimicrobianos efectores (AMP), calprotectina (heterodímero S100A8/S100A9) en el citosol y la proteína antimicrobiana de catelicidina (CAMP) en endosomas. Para saber si la

inmunidad innata podría aumentarse de forma benigna, se transfectaron transitoriamente células epiteliales con construcciones de ARNm optimizadas que contienen *CAMP*, marcos de lectura abiertos de *S100A8* y *S100A9*, *A8-IRES-A9* (fusión) o *A8-nIRES-A9* (fusión, IRES nativo). Para mantener la estabilidad del ARNm, el ARNm de *CAMP* bloqueado con análogo con caperuza anti-inversa (ARCA) fue más eficaz que la enzima de bloqueo (CE) cap 0 o CE 1. Los niveles de proteína *CAMP*, *S100A8* y *S100A9* generalmente alcanzaron su punto máximo a las 16 horas después de la transfección de ARNm. En cambio, la cotransfección con *S100A8/S100A9* dio lugar a la expresión máxima de proteínas a las 24 horas. Después de la transfección con ARNm en tándem (*A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9*), los niveles de proteína *S100A8* fueron máximos a las 16 horas, mientras que *S100A9* alcanzó su punto máximo a las 32 horas - 40 horas. Después de la transfección con los respectivos ARNm, *CAMP* y calprotectina aumentaron cada una significativamente la resistencia de las células epiteliales a la invasión de *Listeria* y *Salmonella* durante hasta 48 horas; la cotransfección de *S100A8/S100A9* fue más eficaz que los constructos en tándem. Las transfecciones redujeron la viabilidad celular después de 48 horas en un 20%, con sólo un 2% atribuible a la apoptosis. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la resistencia de las células epiteliales a los agentes patógenos invasivos puede aumentar por transfección transitoria de ARNm antimicrobianos en las células epiteliales.

[0011] La *CAMP* humana es un miembro de una gran familia de péptidos antimicrobianos catiónicos expresados en muchas especies que tienen una actividad de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus con envoltura y también muestran efectos inmunomoduladores (Zanetti, 2004. *J. Leukoc. Biol.* 75: 39-48; Bucki et al, 2010. *Arco Immunol Ther Exp (Warsz)* 58: 15-25; Strandberg et al, 2012. *Infect Immun* 80: 3.930-3.938; Burton et al., 2009. *Nat Prod Rep.* 26: 1572-1584). Después de la escisión del péptido señal, el precursor de CAP-18 humano codificado por *CAMP* se almacena en gránulos de neutrófilos y células epiteliales hasta que se activa a través de la escisión por la proteinasa 3, una serina proteasa (Sorensen et al, 2001. *Blood* 2001, 97: 3951-3959). El péptido activo de 37 residuos (LL-37) media en una amplia gama de respuestas biológicas, tales como, por ejemplo, muerte directa de microorganismos, la quimiotaxis y la inducción de quimioquinas, la regulación de respuestas inflamatorias, y efectos de adyuvante, angiogénicos y efectos curativos de heridas (Nijnik et al, 2009. *Curr Opin Hematol.* 16: 41-47). LL-37 parece ser directamente antimicrobiano en los fagolisosomas de neutrófilos y macrófagos y en sitios de inflamación aguda (Nijnik et al, 2009. *Curr Opin Hematol* 16: 41-47), que muestra actividad antimicrobiana de amplio espectro contra *Listeria monocytogenes* (Turner et al, 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2206-2214), *Salmonella typhimurium* (Larrick et al, 1995. *Immunotechnology* 1: 65-72) y *Streptococcus* del grupo A, B y C (Dorschner et al., 2001. *J. Invest Dermatol* 117: 91-97). La expresión de *CAMP* puede ser inducida por la 1,25-dihidroxitamina D3 (Wang et al, 2004. *J. Immunol* 173 2909-2912), patógenos (Midorikawa et al, 2003. *Infect Immun* 71: 3730-3739; Nijnik et al, 2009. *Curr Opin Hematol.* 16: 41-47) o lipopolisacárido (LPS) (Nell et al, 2004. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 225-231). La disminución de la producción de *CAMP/LL-37* acompaña al aumento de la invasión y colonización de patógenos en las células epiteliales en enfermedades, tales como, por ejemplo, morbus Kostmann y el síndrome de Papillon-Lefevre (Carlsson et al, 2006. *J. Periodontol* 77: 744-751; de Haar et al, 2006. *Infect Immun.* 74: 5.284-5.291), enfermedad de Crohn (Schauber et al, 2006. *Mol Nutr Food Res.* 50: 1006-1012) y dermatitis atópica (Ong et al., 2002. *N. Engl J. Med* 347: 1151-1160).

[0012] La calprotectina es un complejo heterodimérico de proteínas de unión a calcio *S100A8* (MRP8 o calgranulina A, 10,8 kDa) y *S100A9* (MRP14 o calgranulina B, 13,2 kDa) (Champaiboon et al, 2009. *J. Biol Chem* 284: 7078-90). *S100A8* y *S100A9* son miembros de la familia de las proteínas *S100*. Los miembros de la familia contienen dos motivos de unión a calcio de mano EF y las proteínas están implicadas en el crecimiento celular, la diferenciación celular, la progresión del ciclo celular, la supervivencia celular, la fosforilación de proteínas, la transcripción, el desarrollo del cáncer y enfermedades inflamatorias (Donato, 2001. *Int. J. Biochem Biol. Cell* 33: 637-668; Santamaria-Kisiel et al, 2006. *Biochem J.* 396: 201-14; Khammanivong et al, 2013. *PLoS One* 8: e 69395). Los motivos de unión a calcio parecen estar implicados en la resistencia de las células epiteliales a la invasión bacteriana (Champaiboon et al, 2009. *J. Biol Chem* 284: 7078-90). La calprotectina muestra actividad antimicrobiana de amplio espectro contra *Candida albicans* de la mucosa y epidérmica y bacterias que incluyen *Campylobacter sputigena*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Porphyromonas gingivalis* (Champaiboon et al, 2009. *J. Biol Chem* 284: 7078-90; Miyasaki et al, 1993. *J. Dent Res* 72: 517-523; Sohnle et al, 1991. *J. Infect Dis* 163: 187-192; Steinbakk et al, 1990. *Lancet*, 336: 763-765; Nisapakultorn et al, 2001. *Infect Immun* 69: 4242-4247). Para facilitar la supervivencia intraepitelial después de la invasión exitosa, *Listeria* moviliza calprotectina para colocalizar con microtúbulos citoplasmáticos, que parece subvertir la actividad anti-*Listeria* y la inmunidad celular autónoma (Zaia et al, 2009. *Mucosal Immunol* 2: 43-53).

[0013] Las células epiteliales de la mucosa, por lo tanto, pueden proteger contra y suprimir patógenos invasivos principalmente utilizando dos sistemas efectores antimicrobianos, *CAMP/LL-37* en gran medida en endosomas (Chamilos et al, 2012. *Blood* 120: 3.699-3.707) y la calprotectina (*S100A8/S100A9*) en el citosol (Champaiboon et al, 2009. *J. Biol Chem* 284: 7078-90). Se describe en el presente documento una manera en la que la resistencia de células intraepiteliales frente a patógenos microbianos invasivos se puede aumentar mediante el suministro transitorio de ARNm específicos antimicrobianos específicos (por ejemplo, *CAMP*, *S100A8/S100A9*). Las transfecciones de ARNm para fines terapéuticos pueden reemplazar o aumentar la expresión de proteínas a través de la administración sistémica o ex vivo (Tavernier et al, 2011. *J. Control Release* 150: 238-47). Este enfoque evita la transfección con el ADN y los desafíos relacionados, incluyendo, por ejemplo, la inserción mutagénica imprecisa en las células huésped. Con miras a aumentar la inmunidad innata de la mucosa, se describe el suministro de ARNm de *CAMP* y *S100A8/S100A9* en células epiteliales humanas y los efectos antibacterianos funcionales de estas transfecciones.

Optimización de la estabilidad del ARNm

[0014] El bloqueo en el extremo 5' del ARNm mejora la estabilidad del mensaje expresado. Un ARCA puede bloquear en una eficacia de hasta el 80% y la enzima de bloqueo (CE) puede aumentar la eficiencia de bloqueo al 100% (Zhao et al, 2010. Cancer Res 70: 9053-9061). Para optimizar la estrategia de bloqueo, se compararon mMACHINE® T7 Ultra (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), que genera ARNm bloqueado con ARCA, con el Sistema de ARN mScript™ (Cell Script Inc., Madison, WI), que utiliza enzima de bloqueo (CE), y enzima de bloqueo de 2'-O-metiltransferasa para generar un cap 0 o cap 1. Los ARNm de *CAMP* se sintetizaron usando los diferentes sistemas de bloqueo, se liberaron en células KB y la expresión de la proteína se detectó mediante análisis de transferencia western. A las ocho horas, 24 horas, y 48 horas después de la transfección con ARNm bloqueados con ARCA, las células KB expresaron más proteína *CAMP* que después de la transfección con CE cap 1, que era más alto que el CE cap 0 (Figura 1A). Los niveles de proteína *CAMP* alcanzaron un máximo a alrededor de 16 horas y disminuyeron en aproximadamente un 50% en 40 horas a 48 horas después del suministro de ARNm bloqueado con ARCA (Figura 1B). A continuación se usó el bloqueo con ARCA para todos los experimentos. También se comparó la estabilidad del ARNm cuando se expresó con extensiones en 3' de 64A y 150A. Hubo poca diferencia (datos no mostrados) y se utilizó 150A para todos los experimentos posteriores.

Estabilidad de ARNm bloqueados con análogo de caperuza anti-inversa (ARCA)

[0015] Las células KB expresan de forma nativa ARNm para *CAMP*, *S100A8* y *S100A9* por debajo del nivel de detección (datos no mostrados). Por lo tanto, los ARNm de *S100A8*, *S100A9* y *CAMP* endógenos expresados en células KB contribuirán poco a los niveles posteriores después de la transfección con ARNm bloqueados con ARCA. Para sintetizar un ARNm de fusión que contiene tanto *S100A8* como *S100A9*, un ORF de *S100A8* contiene una secuencia de Kozak se clonó en pIRES MCS A y *S100A9* se clonó en MCS B. Para eliminar la atenuación de la traducción en dirección 3' con pIRES, se construyó un IRES nativo (nIRES) y se insertó entre los ORF de *S100A8* y *S100A9*. Las secuencias que contienen todos los elementos necesarios se clonaron en pGEM4Z.2bgUTR.150A y a continuación se sintetizaron los ARNm de *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9*. La transfección de ARNm de *CAMP*, *S100A8*, *S100A9*, *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9* bloqueados por ARCA transcritos *in vitro* se analizó utilizando qRT-PCR (Fig. 5). A las cuatro horas después de la transfección de cada ARNm, los ARNm intracelulares específicos estaban en el nivel más alto medido. A los 16 horas hasta 20 horas después de la transfección, el nivel de ARNm de *CAMP* era aproximadamente la mitad que en cuatro horas, lo que indica que la semivida en células KB fue entre 12 horas y 16 horas (Fig. 5A). En cambio, la cotransfección de ARNm de *S100A8* dio lugar a semividas de ARNm de 12 horas a 16 horas, mientras que la cotransfección de ARNm de *S100A9* dio lugar a semividas de ARNm de ocho horas a 12 horas (Fig. 5B). Cuando se transfectaron los ARNm en tándem, la semivida de *A8-IRES-A9* fue de 12 horas a 16 horas, mientras que la semivida del ARNm de *A8-nIRES-A9* fue de ocho horas a 12 horas (Fig. 6C, 6D). Las semividas de estos ARNm fueron de ocho horas a 16 horas en células KB.

La cotransfección de S100A8 y S100A9 aumenta la estabilidad de cada proteína

[0016] Después del suministro en células KB, los ARNm bloqueados con ARCA para *S100A8* (figura 2A), *S100A9* (figura 2B) y la calprotectina (1:1 mol/mol *S100A8* + *S100A9*) (Figura 2C) se compararon para la expresión de proteínas. La expresión de la proteína *S100A8* sola fue máxima a las 16 horas y disminuyó aproximadamente a la mitad en alrededor de 28 horas (Figura 2A), mientras que la proteína *S100A9* se maximizó a las 16 horas y se redujo a la mitad en alrededor de 40 horas a 48 horas (Figura 2B). En cambio, la cotransfección de los ARNm de *S100A8* y *S100A9* (la mitad de la cantidad de cada uno en comparación con transfecciones con *S100A8* o *S100A9*) pareció aumentar la estabilidad de cada péptido. A diferencia de *S100A8* por ejemplo (Figura 2A), cada proteína se expresó en todo el transcurso del tiempo (Figura 2C, 2D). Para *S100A8*, la proteína se maximizó en 24 horas y disminuyó en la mitad en alrededor de 72 horas (Figura 2C). Cuando se cotransfectó con *S100A8*, la proteína *S100A9* también se maximizó en 24 horas y se redujo a la mitad en aproximadamente 48 horas a 72 horas (Figura 2C). La cotransfección de los ARNm de *S100A8* y *S100A9* condujo a un aumento de la estabilidad de cada péptido lo que sugiere que se prefiere la formación de heterodímero de calprotectina.

Expresión de la proteína S100A8/S100A9 utilizando construcciones en tándem

[0017] Después de la transfección de ARNm de *A8-IRES-A9*, la expresión de la proteína *S100A8* fue máxima a las 16 horas y disminuyó a la mitad a las 24 horas a 32 horas (Figura 2D), mientras que la proteína *S100A9* se maximizó a las 32 horas y disminuyó a la mitad en aproximadamente 48 horas a 72 horas (Figura 2D). Para la transfección de ARNm de *A8-nIRES-A9*, la expresión de la proteína *S100A8* fue máxima a las 16 horas y disminuyó a la mitad a las 24 horas a 32 horas (Figura 2E), mientras que la proteína *S100A9* fue máxima a las 40 horas y disminuyó a la mitad en alrededor de 40 horas a 48 horas (Figura 2E). Como cuando *S100A8* fue coexpresada con *S100A9* (Figura 2C), el uso de las construcciones de ARNm en tándem generalmente parecía estabilizar las subunidades de proteína cuando se comparó con la transfección de sólo ARNm de *S100A8* (Figura 2A).

Presentación intracelular de CAMP y calprotectina

[0018] Después de las transfecciones de ARNm, *CAMP* y calprotectina también se detectaron en células KB mediante

inmunofluorescencia. Los niveles de proteínas CAMP, S100A8 y S100A9 están en o por debajo de los límites de detección y no se detectó fluorescencia por encima del fondo con transfecciones simuladas (Figura 6). A las 16 horas después del suministro de los ARNm para *EGFP*, *CAMP*, o calprotectina (S100A8/S100A9), se detectó fluorescencia significativa, lo que sugiere que el suministro de ARNm aumenta la expresión de las proteínas EGFP, CAMP y calprotectina (Figuras 6A, 6B, 6C). A las 16 horas después de la transfección con ARNm de *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9*, no se detectó fluorescencia significativa (datos no mostrados). A las 40 horas después de la transfección de ARNm, sin embargo, no se detectaron señales de fluorescencia para la calprotectina (Figura 6C). Estos resultados son consistentes con el análisis de transferencia Western (Figura 1B, Figuras 2D, 2E).

10 *La transfección de ARNm de CAMP o calprotectina aumenta la resistencia de las células KB a la invasión bacteriana*

[0019] Se determinó si las proteínas antimicrobianas seleccionadas producidas después de transfecciones de ARNm en las células epiteliales afectaban a la resistencia a la invasión por agentes patógenos bacterianos. Después de la transfección con todas las construcciones de ARNm de AMPc y calprotectina, la resistencia de las células epiteliales a la invasión por *Listeria* y *Salmonella* se incrementó significativamente en ocho horas (Figura 3A), 24 horas (Figura 3B) y 48 horas (Figura 3C). La resistencia parecía ser la mayor a las 8 horas después de la transfección. Los esquemas de transfección de ARNm de CAMP y S100A8 + S100A9 parecieron aumentar la resistencia más eficazmente que las construcciones de ARNm en tándem. Las construcciones en tándem, sin embargo, contenían menos equivalentes molares de ARNm de S100A8 y S100A9 que S100A8 + S100A9. Por lo tanto, las construcciones en tándem pueden ser tan eficaces como cotransfección.

El sistema de suministro TransIT-mRNA reduce la viabilidad celular sin desencadenar apoptosis.

[0020] La citoletalidad de estos ARNm suministrado por el reactivo de transfección TransIT-mRNA se analizó mediante la medición de la viabilidad celular usando el ensayo MTT y mediante la cuantificación de células apoptóticas mediante citometría de flujo y escisión por PARP. Cuando se compara con las células no transfectadas, la transfección de células con vehículo, ARNm de *CAMP*, *S100A8/S100A9*, *A8-IRES-A9* o *A8-nIRES-A9* redujo significativamente la viabilidad celular 48 horas y 72 horas más tarde (Fig. 4A). Cuando se compara con las células no transfectadas, el suministro del vehículo, ARNm de *CAMP*, *S100A8/S100A9*, *A8-IRES-A9* o *A8-nIRES-A9* no afectó a la apoptosis (Fig. 4B). El pequeño incremento en células apoptóticas a las 72 horas después de cada una de las transfecciones fue indistinguible de las células no transfectadas. Un análisis más detallado de la situación de apoptosis de las células KB utilizó un análisis de transferencia Western para escisión por poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), un indicador de la activación de la caspasa (Taylor et al, 2008. Naturaleza Rev. Mol Cell Biol 9: 231-241). La escisión por PARP se elevó 32 horas después de la transfección de ARNm (Fig. 4C). Cuando se compara con las células no transfectadas, el patrón de PARP escindido después del suministro de los ARNm fue similar (Fig. 4C).

[0021] Se demostró por primera vez que la resistencia de las células epiteliales a los agentes patógenos invasivos *in vitro* se puede aumentar mediante transfección transitoria usando ARNm que codifican *CAMP* antimicrobiana y calprotectina (*S100A8/S100A9*, *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9*). Los vehículos de transferencia de genes con carga de ARNm parecen ser alternativas atractivas a los vehículos que suministran ADN para el tratamiento de la enfermedad a pesar de las preocupaciones persistentes de que la facilidad de síntesis y estabilidad del ARNm transfectado resultaría insuficiente para producir un producto de proteína útil (Tavernier et al., 2011. J. Control Release. 150: 238-47). El suministro de ARNm facilita la expresión simultánea de todos los epítomos de un antígeno y la manipulación y la purificación es más bien simple.

[0022] Cuando se considera este enfoque para el desarrollo de agentes terapéuticos potenciales en las superficies de la mucosa o epidérmicas o en los tejidos accesibles, el suministro de ARNm tiene varias ventajas sobre técnicas de transferencia génica de ADN. Dado que el ARNm no se integra en el genoma y la transfección permanece transitoria, la seguridad farmacéutica de transfección de ARNm es mayor que para la terapia de transferencia génica de ADN. Con el objetivo de desarrollar un agente terapéutico que aumenta la inmunidad en mucosa, se muestra por primera vez el suministro de ARNm transcritos *in vitro*, bloqueados y poliadenilados que especifican la proteína antimicrobiana en células epiteliales humanas y los efectos funcionales correspondientes.

[0023] La estabilidad de la carga de ARNm sintetizado mediante traducción *in vitro* mejorada a través del bloqueo de 5' con análogo de caperuzón anti-reverso (ARCA), y la expresión de proteína se puede aumentar mediante el bloqueo de ARNm en 3' utilizando cadenas de poli (A) en cis y en trans (Mockey et al, 2006. Biochem Biophys Res Commun 340: 1062-1068). Por lo tanto, ciertas modificaciones de ARNm mejoran la estabilidad del ARNm. Sin embargo, la carga específica de ARNm, la estabilidad de la proteína traducida y la célula diana afectan a la cinética y la eficiencia de la expresión de nuevas proteínas.

[0024] En nuestros estudios, se compararon diferentes ARNm. Las proteínas CAMP, S100A8 y S100A9 alcanzaron su máximo 16 horas después de la transfección de ARNm (Figuras 1B, 2A, 2B). Después de la cotransfección de ARNm de *S100A8/S100A9*, las proteínas S100A8 y S100A9 alcanzaron su punto máximo a las 24 horas y disminuyeron lentamente en comparación con transfecciones individuales con ARNm de *S100A8* o *S100A9* (Figura 2C). Dado que S100A8 y S100A9 forman espontáneamente heterodímeros (Hsu et al, 2009. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem 8: 290-305), se sugiere que la dimerización después de cotransfección inhibe la degradación de cada

subunidad.

[0025] La calprotectina, el complejo heterodimérico de S100A8 y S100A9, aumenta la inmunidad innata del citoplasma de las células epiteliales aumentando la resistencia contra las bacterias invasoras, incluyendo *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. La cotransfección con ARNm de S100A8 y S100A9 indujo la producción de S100A8/A9 en las células KB (Fig. 6C). Para simplificar el proceso de transfección para la traducción de la calprotectina, se utilizó pIRES para construir un vector de expresión de mamífero que permite una expresión de alto nivel de dos genes del mismo transcrito de ARNm bicistrónico. El vector contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (ECMV) flanqueado por dos sitios de clonación múltiple (MCS A y B) (Bochkov et al, 2006. *Biotechniques* 41: 283-284, 286, 288). El primer cistrón es traducido por el mecanismo de iniciación de elementos dependiente de caperuza, mientras que el segundo cistrón es traducido por el mecanismo de iniciación de elementos IRES independiente de caperuza (Bochkov et al, 2006. *Biotechniques* 41: 283-284, 286, 288). pIRES contiene una secuencia de IRES parcialmente desactivada que reduce la velocidad de la traducción del gen clonado en MCS B en comparación con MCS A (Rees et al, 1996. *Biotechniques* 20: 102-110). Para facilitar la traducción de la calprotectina a partir de una única construcción de la transfección, los ORF de S100A8 y S100A9 fueron clonados en un vector pIRES y el plásmido se transfectó en células KB. Usando ADNc clonado en tándem con pIRES, se puede observar la formación de la calprotectina (dímeros S100A8/S100A9) (Champaiboon et al, 2009. *J. Biol Chem* 284: 7078-90). Cuando se clonaron los ARNm en tándem con pIRES, también se observaron dímeros de calprotectina (Fig. 6D) y las señales fueron similares a la cotransfección con ARNm de S100A8 y S100A9 (Fig. 6C).

[0026] Dado que se esperaba que el ARNm de S100A9 clonado en el sitio MCS B con pIRES mostrara traducción atenuada, también se construyó un vector con un IRES nativo (n, no atenuado). La expresión de la proteína calprotectina con pIRES y nIRES fue similar (figura 6D, parte superior e inferior; Figura 2D, 2E). Dado que se suministraron concentraciones iguales de vectores de ARNm a las células, las construcciones en tándem parecerían traducir más eficientemente que S100A8 o S100A9 solas, pero no se han realizado comparaciones cuantitativas. Del mismo modo, la transfección y la traducción de ARNm de CAMP también fueron satisfactorias, pero no se pudo comparar la eficiencia con calprotectina. Está claro, sin embargo, que la expresión de las proteínas S100A8 y S100A9 era más estable cuando se co-transfectaba o cuando se suministraban ARNm de A8-IRES-A9 o A8-nIRES-A9 (Fig. 2D, 2E). Las diversas construcciones para los ARNm de S100A8/S100A9, A8-IRES-A9 y A8-nIRES-A9 resultaron en diferentes cinéticas de traducción y es evidente que el inserto del sitio MCS B proximal a pIRES (Fig. 2D) y nIRES (Fig. 2E) mostró un retraso. Sin desear estar ligado por ninguna teoría en particular, los ARNm en el sitio MCS B pueden rastrearse e iniciar la traducción mediante un mecanismo de IRES independiente de caperuza de baja eficacia en células KB.

[0027] Nuestros resultados mostraron que las semividas medias de ARNm de CAMP, S100A8/S100A9, A8-IPES-A9, y A8-NIRES-A9 bloqueados con ARCA después de la transfección en células KB fueron de entre ocho horas a 16 horas (Fig. 6A-D). Para aumentar las semividas, estas construcciones de ARNm incluyeron dos UTR de beta-globina humana secuenciales. Las diferencias en la estabilidad de estos ARNm transfectados podrían deberse a las estructuras secundarias de ARNm, que pueden afectar el reconocimiento por las enzimas de degradación de ARN y proteínas auxiliares asociadas con la regulación de la degradación del ARN. Mientras que las diferencias en el ARNm en la semivida pueden reflejar la proporción de grupos secuestrados o expuestos a la degradación citoplasmática y la traducción después de la liberación de liposomas (Barreau et al, 2006. *RNA*. 12: 1790-1793), este fenómeno es poco probable para explicar nuestros resultados. Nuestras transfecciones utilizaron una formulación de polímero/lípido catiónico no liposómica disponible comercialmente (kit de transfección *TransIt*®-mRNA, Mirus Bio LLC, Madison WI). Aunque los ARNm con codones de parada prematuros pueden prevenir la traducción de mensajes de longitud completa y evitar la producción de proteínas de longitud completa a través de la ruta de descomposición mediada por antisentido (Apcher et al, 2011. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 11572-11577), no está claro si este mecanismo puede explicar la variabilidad en las semividas de ARNm y la traducción de proteínas en nuestras células.

[0028] Tal como se describe en más detalle a continuación, puede construirse un ARNm que incluya una o más bases modificadas. Tales ARNm modificados pueden exhibir mayor estabilidad y/o un potencial reducido de respuestas inmunes (Kormann et al, 2011, *Nat Biotechnol* 29 (2): 154-157).

[0029] En última instancia, la prueba para la eficacia de transfección de ARNm es una función nueva o aumentada y la citotoxicidad asociada o la inducción de la apoptosis mínimas. Nuestros datos mostraron que el suministro de ARNm de CAMP o calprotectina podría aumentar significativamente la resistencia de las células epiteliales a la invasión por *Listeria* y *Salmonella* (Fig. 3A-3C). Para llevar a cabo estos experimentos, hemos establecido las diferencias en la confluencia celular necesaria para el uso óptimo del reactivo de transfección *TransIT*-mRNA (60-90%) con la confluencia celular del 40-60% para un rendimiento óptimo del ensayo de protección por antibiótico (Champaiboon et al., 2009. *J. Biol Chem* 284: 7078-90; Nisapakultorn et al, 2001. *Infect Immun* 69: 4242-4247; Nisapakultorn et al, 2001. *Infect Immun* 69, 3.692-3.696). Para realizar el ensayo de protección por antibiótico después de la transfección óptima, las células se dividieron a las ocho horas y 32 horas después de la transfección y a continuación las células se incubaron durante otras 16 horas para ajustar la confluencia celular al 40% a 60% para la invasión bacteriana. La actividad antimicrobiana a las 24 horas y 48 horas después de la transfección de ARNm fue inferior que a las ocho horas después de la transfección (figura 3A-3C.); la división celular con el tiempo (y subcultivo) disminuyó los niveles intracelulares de proteínas CAMP o calprotectina. No obstante, los niveles residuales de LL-37 y calprotectina fueron

suficientes para proporcionar aumentos estadísticamente significativos en la resistencia a los patógenos invasores hasta 48 horas después de la transfección.

5 **[0030]** No se encontraron pruebas que indicaran que el suministro de ARNm de cualquiera de los ARNm de carga o sus productos de proteína traducidos indujera apoptosis. Puesto que el vehículo de control mostró reducciones similares de la viabilidad que el suministro de ARNm, se concluyó que una pequeña pérdida de viabilidad con el tiempo era atribuible al sistema de suministro de TransIT-mRNA en lugar de la expresión de la proteína. Cuando se comparó con las células no transfectadas, el suministro de ARNm de proteína antimicrobiana (*CAMP*, *S100A8/S100A9*, *A8-IRE5-A9*, y *A8-nIPES-A9*) y la producción de proteína intracelular no desencadenó significativamente la apoptosis. Tomados en conjunto, los datos sugieren que el sistema de suministro de TransIT-mRNA reduce la viabilidad celular, pero no desencadena la apoptosis. La pérdida de viabilidad con este reactivo no se considera que sea consecuente *in vivo*. La administración sistémica no causa la activación de células inmunitarias (Kariko et al, 2011. Nucl Acids Res 39: E142) y este reactivo parece ser menos tóxico y muestra una mayor eficiencia de transfección que la electroporación (González et al, 2007. J. Virol Procedimientos 145: 14-21). Lo más importante, la pérdida de la viabilidad celular resultante de la transfección no pareció afectar a los datos de invasión, ya que los resultados de la apoptosis fueron similares con el vehículo de control (Fig. 3, 4A). Estos datos muestran que un sistema de suministro de ARNm puede ser un sustituto efectivo para un enfoque de terapia génica con ADN para el tratamiento o el control de infecciones de las mucosas. El uso de este enfoque para propósitos terapéuticos en infecciones de las mucosas puede mejorarse con un sistema de empaquetamiento de ARNm que aumentaría la estabilidad del ARNm, minimizaría la activación inmunitaria y/o, más específicamente, reconocerían las células epiteliales de la mucosa.

25 **[0031]** La presencia de saliva en las superficies de las membranas mucosas orales podría ser una barrera para las transfecciones de ARNm tópicas para fines terapéuticos. La saliva contiene mucinas de alto peso molecular y muchas otras proteínas que podrían formar una barrera de difusión en la superficie de las células epiteliales de la boca. Además, la saliva contiene ARNasas que podrían degradar los ARNm terapéuticos.

30 **[0032]** Para probar esta posibilidad, se añadió saliva para reconocer células epiteliales *in vitro*, se intentó transfectar con ARNm de EGFP y se ensayó la traducción de EGFP mediante la emisión de fluorescencia verde. También modificamos la composición de nucleótidos del ARNm para aumentar su estabilidad y reducir la inmunogenicidad potencial (Kormann et al, 2011, Nat Biotechnol 29 (2): 154-157). La modificación sustituye el 25% de la citidina por metilcitidina y 25% de la uridina por 2-tiouridina. Las adeninas y guanosinas permanecen sin cambios.

35 **[0033]** En ausencia de saliva añadida (0% saliva), las células epiteliales transfectadas produjeron EGFP; sin transfección no se observó fluorescencia verde con o sin saliva (Fig. 15 AC). El pretratamiento de las células con cantidades crecientes de saliva para cantidades crecientes de tiempo (hasta cinco minutos), anuló la producción de fluorescencia verde. Lavar las células con medio de cultivo fresco con un aumento de frecuencia de repetición (hasta cinco lavados) invirtió la incapacidad de la transfección de ARNm para producir la fluorescencia verde (Fig. 16). Lavar las células cinco veces maximizó la recuperación de transfección de ARNm satisfactoria, aunque la eficiencia fue menor que en ausencia de saliva.

40 **[0034]** El lavado del epitelio tratado con saliva *in vitro* invirtió la inhibición del enfoque de transfección de ARNm. En el ámbito clínico, el lavado del epitelio de la mucosa y la prevención de la reexposición a la saliva pueden ayudar a superar la barrera de la saliva a la transfección y aumentar la eficiencia de transfección. Además, la saliva es un modelo representativo de los fluidos de la mucosa, en particular con respecto a la composición y la viscosidad. Por lo tanto, los resultados del lavado con saliva mostrados en las figuras 15 y 16 indican que el pretratamiento de una superficie de la mucosa mediante el lavado de los fluidos de la mucosa de la superficie puede aumentar la eficacia de la transformación de otros epitelios de mucosa, tales como, por ejemplo, el epitelio de la mucosa del sistema genitourinario, ojos u otras mucosas escamosas.

50 **[0035]** También se presentan datos apoyan el uso de transfección de ARNm para expresar un complejo de dos proteínas (que son antimicrobianas) que pueden ser supresoras tumorales si se inoculan directamente en cánceres epiteliales, tales como, por ejemplo, cánceres cervicales y cánceres de la cabeza y cuello. (Khammanivong et al, 2013. PLoS One 8: e69395 Doi: 10.1371/journal.pone.0069395). La pérdida de la supresión del crecimiento es uno de los distintivos del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011. Cell 144: 646-674), que contribuyen a la transformación maligna y la tumorigénesis. Los mecanismos moleculares que conducen a la regulación y el crecimiento anormal del ciclo celular varían en los diferentes tipos de cáncer y siguen siendo imprecisos en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). La calprotectina puede estar implicada en la regulación del crecimiento y la tumorigénesis en HNSCC y otros carcinomas de células escamosas (SCC). S100A8/A9 se expresa constitutivamente en el citoplasma de células epiteliales escamosas sanas de la cavidad oral y la orofaringe (Ross et al, 2001. Infect Immun 69: 3.248-3.254; Hitomi et al, 1998. Arch Histol Cytol 61: 163- 178). Codificadas por regiones que se asignan al complejo de diferenciación epitelial humano en el locus cromosómico 1q21, S100A8 y S100A9 son miembros de la familia S100 de proteínas, que contienen dos motivos de unión a calcio de mano EF canónicos implicados en el control dependiente de calcio de la diferenciación celular, progresión del ciclo celular y crecimiento (Itou et al, 2002. J Mol Biol 316: 265-276), y están implicados en el desarrollo del cáncer y otras enfermedades inflamatorias. En el cáncer, la S100A8/A9 extracelular, típicamente liberada del citoplasma de leucocitos polimorfonucleares infiltrantes y macrófagos (Hesse et al, 2001. Eur J Biochem. 268: 353-363; Hsu et al, 2009. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem 8.: 290-305), está

asociada con la inflamación y la progresión de la enfermedad (Gebhardt et al, 2002. Oncogene 21: 4266-4276). Cuando se libera, S100A8/A9 puede señalar a través del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) y/o receptor de tipo toll 4 (TLR4) para promover la inflamación asociada a tumores y la progresión de adenocarcinomas en etapa avanzada y cáncer asociado a colitis (Hermani et al., 2006. Exp Cell Res 312: 184-197; Gebhardt et al, 2006. Biochem Pharmacol. 72: 1622-1631; Ehrchen et al, 2009. J Leukoc Biol. 86: 557-566; Turovskaya et al, Carcinogenesis 2008. 29: 2035-2043). Poco se sabe, sin embargo, acerca de las funciones intracelulares de S100A8/A9 y cómo el complejo de proteínas regula las funciones en las células cancerosas.

[0036] La expresión de S100A8/9 intracelular parece ser específica de células y tejidos y puede ser regulada de forma diferencial en diferentes tumores malignos. Los niveles de S100A8/A9 pueden ser anormalmente elevados en tumores primarios humanos procedentes de tejidos que normalmente no expresan la proteína, tales como la piel (Gebhardt et al, 2002. Oncogene 21: 4266-4276), mama (Arai et al, 2008. Curr Cancer Drug Targets 8: 243-252; Moon et al, 2008. Mol Cancer Res 6: 1544-1553), tiroides (Ito et al, 2009. Anticancer Res 29: 4157-4161), hígado (Nemeth. et al., 2009. Hepatology 50: 1251-1262), mucosa gástrica (Yong et al, 2007. Arco Pharm Res. 30: 75-81), próstata (Hermani et al, 2006. Exp Cell Res 312: 184-197), ovario (Odegaard et al, 2008. Am J Obstet Gynecol 198: 418 e411-417), vejiga (Yao et al, 2007. Anticancer Res. 27: 3051-3058) y pulmón (Arai et al, 2001. Oncol Rep 8: 591-596). En estos tejidos, si el aumento del nivel de S100A8/A9 es una respuesta a la tumorigénesis o realmente impulsa el desarrollo y progresión del tumor no está claro. En cambio, la expresión de S100A8/A9 puede disminuir en tumores humanos de origen de células epiteliales escamosas que normalmente expresan el complejo de proteínas de forma constitutiva, tales como SCC de cabeza y cuello (incluyendo oral, nasofaríngeo y orofaríngeo) (Melle et al, 2004. Cancer Res 64: 4099-4104; González et al, 2003. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 129: 754-759; Fung et al, 2000. Life Sci 67: 923-936), esófago (Kong et al, 2004. World J Gastroenterol 10: 1093-1097; Wang et al, 2004. Cell Res 14: 46-53) y cervical (Tugizov et al, 2005. J Virol 79: 1099-1112; Coleman et al, 1994. Hum Pathol 25: 73-79). En estos cánceres epiteliales escamosos, la disminución de S100A8/A9 se correlaciona con la pérdida de diferenciación y aumento en el crecimiento y la invasividad. Por el contrario, los SCC que expresan S100A8/A9 parecen menos agresivos. Hemos tratado de determinar, por lo tanto, si S100A8/A9 funciona como un factor regulador del crecimiento en SCC.

[0037] Para probar la función reguladora de S100A8/A9 por rescate en células de carcinoma negativas de S100A8/A9, se transfectoron de forma estable células KB para expresar el complejo de proteínas S100A8/A9. La expresión estable de S100A8/A9 en células KB da como resultado la detención del ciclo celular G2/M dependiente de S100A8/A9 y un crecimiento reducido independiente de anclaje y formación de colonias en agar blando. Para determinar el efecto de reducir los niveles de S100A8/A9, se silenciaron S100A8 y S100A9 en células TR146 utilizando ARN de horquilla corta (shARN). En las células TR146, silenciando la expresión de S100A8 y S100A9 se invierte el efecto supresor sobre el crecimiento y clonogenicidad y parece estar asociado con la pérdida de control del punto de control G2/M. Los puntos de control del ciclo celular G1/S y G2/M se desregulan en carcinomas, dando lugar a un crecimiento celular y proliferación incontrolados. La regulación del crecimiento por S100A8/A9 en células KB no se encontró que fuera a través de G1, punto de control G1/S o fase S. En cambio, la expresión de S100A8/A9 aumenta la actividad de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), aparentemente a través de la interacción proteína-proteína, que parece estar implicada en la modulación y la restauración de la señalización del punto de control G2/M y la reducción del crecimiento del carcinoma.

[0038] PP2A es una serina y treonina (Ser/Thr) proteína fosfatasa conocida por regular el punto de control del ciclo celular mediante el reconocimiento de Cdc25C específica de G2/M para la inactivación por desfosforilación en Thr48, la inhibición de la salida mitótica y la división celular (Forester et al. , 2007. Proc Natl Acad Sci USA. 104: 19.867-19.872; Margolis et al, 2006. Cell 127: 759-773). PP2A reconoce un amplio espectro de fosfoproteínas y también se ha demostrado que ejerce actividades antitumorales mediante la inhibición de AKT y C-MYC en las vías de supervivencia y la proliferación celular y mediante la inducción de la detención del ciclo celular (Guenin et al., 2008. Int J Oncol 32: 49-57). Al interactuar con S100A8/A9 [B30], PP2A puede activarse para ejercer funciones reguladoras en la progresión del ciclo celular en el punto de control G2/M. Por lo tanto, S100A8/A9 y PP2A pueden funcionar como socios de interacción para regular la mitosis y controlar el crecimiento celular. La reducción de S100A8/A9 en carcinomas (en HNSCC por ejemplo) puede dar lugar a una actividad de fosfatasa PP2A disminuida y un aumento del crecimiento y la tumorigénesis.

Expresión génica de S100A8 y S100A9 mediante qRT-PCR en muestras normales y de SCC

[0039] La expresión de la proteína S100A8/A9 se reduce en HNSCC (Driemel et al, 2007. Proteomics Clin Appl 1: 486-493; Roesch et al, 2005. Eur J Cell Biol 84: 431-444). Se comparó la expresión de genes de subunidades S100A8 y S100A9 en tejidos coincidentes de HNSCC y normales adyacentes (NAT) usando reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El análisis de expresión se normalizó con el gen constitutivo de GAPDH como control de carga de ARN interno y total. El ARN total de tejidos de HNSCC y NAT se agrupó por separado de tres pacientes diferentes con tumores en fase II, III y IVA y se analizó para la expresión de ARNm diferencial. Usando qRT-PCR, se encontró que la expresión de S100A8 y S100A9 fue aproximadamente 10 veces menor en HNSCC que en NAT como control de tejido normal (Figura 7A).

[0040] También hemos investigado el nivel de expresión de S100A8 y S100A9 en más de 35 casos clínicos de HNSCC y once muestras de mucosa oral sana utilizando perfiles de expresión génica en microarray y se encontró que la

expresión de estas proteínas también disminuyó con respecto a los tejidos normales de control (datos no publicados). La expresión de S100A8 y S100A9 en células TR146 y células KB-S100A8/A9 fue de aproximadamente uno a dos veces en forma log mayor que en células KB y KB-EGFP negativas en S100A8/A9 (figura 7B; línea de puntos mostrada como umbral para detección). Las células KB-S100A8/A9 son células KB negativas de S100A8/A9 transfectadas para sobreexpresar S100A8/A9, mientras que las células KB-EGFP son controles transfectados de forma simulada. En células KB de tipo salvaje y células KB-EGFP transfectadas de forma simulada, el ARNm y la expresión de proteínas S100A8 y S100A9 fue apenas detectable, mientras que las células KBS100A8/A9 y TR146 transfectadas claramente mostraron la expresión de las proteínas S100A8 y S100A9 (Fig. 7C, 7D). La transfección de shARN estable específica de S100A8 y específica de S100A9 de células TR146 redujo las proteínas S100A8 y S100A9 endógenas a niveles apenas detectables (Fig. 7D). Los niveles de proteína S100A8 y S100A9 parecen diferir tal como se muestra mediante inmunotransferencia (Fig. 7C, 7D). Tales diferencias pueden ser reales o reflejar diferencias en la sensibilidad de los anticuerpos primarios utilizados. Por lo tanto, los niveles de S100A8 y S100A9 no pudieron compararse directamente entre sí.

15 *Crecimiento dependiente e independiente de anclaje de células de carcinoma suprimido por S100A8/A9*

[0041] La capacidad de S100A8/A9 para regular el crecimiento celular se ensayó en células KB-S100A8/A9 transfectadas en matraces de cultivo tisular de poliestireno no pirogénico estándar para condiciones de crecimiento dependientes de anclaje (adherente) y en agar blando para las condiciones de crecimiento independiente de anclaje. Las células muy malignas son capaces de sobrevivir, forman colonias y proliferar de forma independiente del anclaje y se ensayan rutinariamente en agar blando. Cuando se comparan con células KB de tipo salvaje o células KB-EGFP, las células KBS100A8/A9 mostraron un crecimiento dependiente de anclaje *in vitro* aproximadamente dos veces menor (Fig. 8A). La expresión ectópica de S100A8/A9 no pareció inducir la apoptosis en las células KB-S100A8/A9 cuando se cultivaron bajo condiciones adherentes estándar, ya que ni la caspasa 1 escindida ni la caspasa 3 escindida eran detectables mediante inmunotransferencia, mientras que las células KB de tipo salvaje, KB-EGFP y KB-S100A8/A9 mostraron niveles totales de caspasa 1 y caspasa 3 similares (datos no mostrados). Durante el crecimiento independiente de anclaje en agar blando, las células KB-S100A8/A9 crecieron mal, formando colonias más pequeñas y menor en número que las células KB y KB-EGFP (Fig. 8B). Para confirmar el efecto de S100A8/A9 sobre el crecimiento celular, el knockdown de la expresión endógena de S100A8/A9 en células TR146-shARN-S100A8/A9KD mostraron un aumento del crecimiento dependiente de anclaje (Fig. 8C) e independiente de anclaje (Fig. 8D) en comparación células de control negativas de knockdown (TR146-shARN-control).

S100A8/A9 induce la detención del punto de control del ciclo celular G2/M

[0042] Para determinar si S100A8/A9 suprimió el crecimiento de células de carcinoma mediante la regulación del ciclo celular, se realizó el análisis del ciclo celular en células KB que expresaban y no expresaban S100A8/A9. Las células de división rápida, tales como carcinomas, progresan a través del ciclo celular a velocidades mayores que las células normales. Los cambios celulares en el contenido de ADN se pueden medir con el tiempo mediante tinción con yoduro de propidio (PI). Para determinar las diferencias en la progresión del ciclo celular, las células de carcinoma se sincronizaron en fase G1/S por privación de suero durante la noche, seguido por tratamiento con afidicolina durante 12 horas en medio de crecimiento normal. Tras la liberación del bloqueo de G1/S inducida por afidicolina, las células KB de tipo salvaje, KB-EGFP y KB-S100A8/A9 progresaron a través de la fase G1/S y entraron en la fase G2/M a aproximadamente la misma velocidad, tal como se determina mediante tinción con PI del ADN (Fig. 9A, 9C). Las células KB y KB-EGFP salieron de fase G2/M en 11 horas y la población de células G2/M regresó a los niveles de base en 13 horas post-sincronía. Las células KB-S100A8/A9, sin embargo, parecieron detenerse en la fase G2/M durante al menos tres horas. Consistente con estas observaciones, las células KB-S100A8/A9 mostraron un menor número de células mitóticas a las nueve horas post-sincronía y se mantuvieron en metafase más tiempo que las células KB-EGFP (Fig. 9B, 9D).

S100A8/A9 modula la vía de señalización de G2/M

[0043] Para confirmar si S100A8/A9 regula el punto de control G2/M, se ensayó la expresión de proteínas y estado de activación de los reguladores del punto de control del ciclo celular G1/S y G2/M mediante inmunotransferencia. Las células KB, KB-EGFP y KB-S100A8/A9 expresaron niveles similares de los reguladores del ciclo celular ciclina A, ciclina E, p21, Rb, Chk2 y CDC25B (Fig. 10A), sugiriendo que el punto de control G1/S no se veía afectado por la expresión de S100A8/A9. La ciclina B1, que es un regulador del punto de control G2/M requerido para las actividades de la quinasa 1 dependiente de ciclina (Cdc2) durante la entrada en la mitosis (Soni et al, 2008. Cell Cycle. 7: 1285-1300), mostró niveles de ARNm (datos no mostrados) y proteína (Fig. 10B) más bajos en células KB-S100A8/A9 que en células KB y KB-EGFP. De forma más destacada, la expresión de S100A8/A9 aumentó la fosforilación de quinasa p-Chkl (Ser345), fosfatasa p-Cdc25C (Ser216) y p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) del punto de control asociado a G2/M en KB-S100A8/A9, pero no alteró los niveles de expresión de estas proteínas (Fig. 10B). S100A8/A9 también disminuyó la forma activa mitótica de p-Cdc25C (Thr48) (Fig. 10B). En las células KB-S100A8/A9, se encontró una mayor coinmunoprecipitación de Cdc25C con 14-3-3 β (Fig. 10C), lo que sugiere una mayor interacción entre Cdc25C y 14-3-3 β . La expresión de la proteína 14-3-3 β total no se vio afectada por la expresión de S100A8/A9. El knockdown de S100A8/A9 en las células TR146-shARN-S100A8/A9KD disminuyó la fosforilación de p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) (Fig. 10D). Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que S100A8/A9 modula la vía de señalización G2/M

canónica compatible con el mantenimiento de un retardo del punto de control G2/M.

S100A8/A9 interactúa con fosfatasa PP2A y aumenta la actividad

5 **[0044]** Para identificar los reguladores del ciclo celular candidatos que pueden interactuar directamente con S100A8/A9, se examinó una base de datos seleccionada de parejas de interacción proteína-proteína conocidas y predichas (Ingenuity Pathway Analysis, Genedata Inc., San Francisco, CA). Se encontró que S100A8/A9 podría ser una pareja de unión y modulador de la actividad de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), un conocido regulador del ciclo celular. PP2A es una holoenzima heterotrimérica con tres subunidades: subunidad de proteína A estructural, subunidad B reguladora y la subunidad C catalítica. La actividad catalítica de PP2A-C está regulada negativamente por la fosforilación en Tyr307 y la metilación C-terminal de Leu309 es esencial para la actividad global de la fosfatasa. Se ha descrito que la isoforma PP2A-B 56δ controla Cdc25C y la actividad del punto de control del ciclo celular G2/M (Guenin et al, 2008. *Int J Oncol* 32: 49-57; Perrotti et al, 2008. *Cancer Metastasis Rev* 27: 159-168). La unión de S100A8/A9 a PP2A se confirmó mediante un ensayo de coimmunoprecipitación usando anticuerpos contra el complejo S100A8/A9 o PP2A. PP2A coimmunoprecipitó con S100A8/A9 cuando se capturó con el anticuerpo 27E10 (específico para el complejo de S100A8/A9) (Fig. 11A). La interacción también se confirmó mediante la detección de S100A9 (utilizado como un marcador para el complejo de S100A8/A9) cuando se capturó con el anticuerpo PP2A-Aα/β. La expresión de S100A8/A9 en las células KB-S100A8/A9 no afectó los niveles de proteína de las subunidades de PP2A (subunidades Aα/β, B56δ y Cα/β) utilizando el análisis de inmunotransferencia; la fosforilación de la subunidad Cα/β (Tyr307), sin embargo, pareció reducirse (Fig. 11B). La metilación C-terminal pareció no estar afectada por la expresión de S100A8/A9 como se identificó por el anticuerpo anti-PP2A-C metilado (Leu309).

25 **[0045]** Para determinar la actividad de la fosfatasa PP2A, se utilizó un anticuerpo contra la subunidad catalítica PP2A-C para inmunoprecipitar la holoenzima de lisados celulares con o sin expresión de S100A8/A9. La actividad de la fosfatasa PP2A inmunoprecipitada se determinó a continuación midiendo el nivel de liberación de fosfato inorgánico (Pi) de un sustrato fosfopéptido. Durante hasta siete horas post-sincronía, la actividad de la fosfatasa PP2A fue aproximadamente cinco veces mayor en presencia de S100A8/A9 en comparación con la ausencia (células KB-EGFP) de S100A8/A9, disminuyendo en siete veces a las 12 horas post-sincronía. Las actividades de las fosfatasas se normalizaron a los niveles de PP2A-Aα/beta detectables co-inmunoprecipitado con S100A8/A9 (anticuerpo 27E10) (Fig. 11C). La modulación dependiente de S100A8/A9 de la actividad de PP2A en células KB, por lo tanto, parece depender de las fases del ciclo celular. También se observaron cambios similares en las actividades de PP2A cuando el lisado celular de KB-EGFP se preincubó con 1 µg de S100A8/A9 purificado (datos no mostrados). Las células KB-S100A8/A9 tratadas con un inhibidor de PP2A, el ácido okadaico (OA), mostraron niveles similares de p-Cdc25C (Ser216) que las células KB y KB-EGFP, lo que sugiere que se inhibió el aumento mediado por S100A8/A9 de la fosforilación de p-Cdc25C (Ser216) (Fig. 11D).

40 **[0046]** Por lo tanto, como miembros de la familia S100 de proteínas, S100A8 y S100A9 en un complejo (S100A8/A9, o calprotectina) se cree que tienen un papel regulador en la progresión del ciclo celular. En este estudio, encontramos que S100A8/A9 funciona como un regulador negativo de la división y el crecimiento celular en las células KB y en células de carcinoma humano TR146 mediante la inducción de la detención del ciclo celular G2/M. Se utilizaron células KB como un modelo *in vitro* para el estudio de ganancia de función ya que esta línea celular de carcinoma carece de la expresión de S100A8 y S100A9, tanto a niveles de proteína como de ARNm. TR146 es una línea celular HNSCC más diferenciada con la expresión de S100A8/A9 detectable en comparación con otras líneas disponibles. Las proporciones de S100A8 con respecto a S100A9 no pueden compararse en células TR146 y KB-S100A8/A9, aunque el papel atribuido en el control del punto de control de G2/M parece ser el mismo. Por lo tanto, si están presentes en exceso subunidades individuales en cualquier línea celular, tales discrepancias no explican la función intracelular pretendida de S100A8/A9. A partir de nuestros resultados actuales, los niveles reducidos de S100A8/A9 y la consiguiente pérdida de la función podrían por tanto desregular el crecimiento en SCC y contribuir a la carcinogénesis. En lesiones orales inflamatorias o hiperproliferativas y tejidos HNSCC, el complejo S100A8/A9 es marcadamente regulado por disminución, tanto a niveles de ARNm como de proteína en comparación con la mucosa normal (S100A8/A9 generalmente no es detectable en las células de carcinoma escamoso). Por otra parte, se encontró que las HNSCC muestran aproximadamente 10 veces menos la expresión de genes de S100A8 y S100A9 que NAT. Los niveles de S100A8/A9 en NAT pueden reflejar la cancerización de campo. Aunque la expresión de genes de S100A8/A9 en los tejidos de la mucosa de los individuos libres de cáncer puede ser aún mayor, la disminución de los niveles de expresión de S100A8/A9 está claramente asociada con la carcinogénesis.

60 **[0047]** Para determinar si la desregulación de la S100A8/A9 en HNSCC es una causa o un efecto del fenotipo del cáncer, hemos tratado de determinar un papel en la regulación del ciclo celular. La proteína S100A8/A9 se encuentra en el citoplasma y parece localizarse en el núcleo (la base de datos de The Human Protein Atlas, accesible en www.proteinatlas.org) o el área perinuclear (Champaiboon et al, 2009. *J Biol Chem* 284: 7078-7090) dependiendo del estado de crecimiento de las células. Durante la división celular y cuando se controla el punto de control G2/M, S100A8/A9 se localiza en los centros de organización de microtúbulos en los polos de los husos mitóticos. El punto de control G2/M está bajo el control de las quinasas Chk1/2 del punto de control (Agarwal et al, 2003. *Oncogene* 22: 8.271-8.282; Taylor et al, 2001. *Oncogene* 20: 1803-1815). Chk1/2 inactivan la proteína fosfatasa Cdc25, que se requiere para la activación del complejo de ciclina B/quinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1, también conocida como

Cdc2) y la entrada en mitosis (Agarwal et al, 2003. Oncogene 22: 8271-8282; Taylor et al, 2001. Oncogene 20: 1803-1815). En presencia de S100A8/A9, se encontró que se incrementó el nivel de activación de la fosforilación de p-Chk1 (Ser345). Del mismo modo, se elevó la fosforilación inhibitoria de p-Cdc25C (Ser216) y p-Cdc2 (Thr14/Tyr15). La hiperfosforilación de Ser345 de las quinasas p-Chk1 específicas de G2/M sugiere que p-Chk1 (Ser345) es probablemente activada (Shiromizu et al, 2006. Genes Cells 11: 477-485) por S100A8/A9 a través de un mecanismo que es aún desconocido. Un intento para determinar la interacción proteína-proteína entre S100A8/A9 y Chk1 por coinmunoprecipitación no tuvo éxito (datos no mostrados). En la ruta de señalización del punto de control G2/M canónico, la p-Chk1 activada (Ser345) fosforila la fosfatasa específica de G2/M Cdc25C en Ser216 y promueve su unión a la chaperona molecular 14-3-3 β (Peng et al., 1997. Science 277: 1501-1505; Peng et al, 1998. Cell Growth Differ 9: 197-208) (véase la figura 12). La unión a 14-3-3 β inactiva y promueve la acumulación citosólica de p-Cdc25C (Ser216) (Graves et al, 2001. Oncogene 20: 1839-1851). Alternativamente, p-Cdc25C activa (Thr48) desfosforila los residuos inhibitorios Thr14 y Tyr15 de p-Cdc2 y activa el complejo Cdc2/ciclina B1, dando como resultado la entrada en mitosis (Ozen et al, 2005. Clin Cancer Res. 11: 4701-4706). La expresión S100A8/A9 en las células KB-S100A8/A9 indujo un aumento destacado en los niveles de p-Cdc25C (Ser216), complejo Cdc25C/14-3-3 β y p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) inhibidores. El nivel de p-Cdc25C mitóticamente activa (Thr48) y ciclina B1 se redujo en gran medida en presencia de S100A8/A9. Estos resultados indican una activación dependiente de S100A8/A9 del punto de control del daño de ADN G2/M, lo que lleva a la inactivación de la Cdc25C y la detención de la mitosis.

[0048] La inactivación inducida por S100A8/A9 de Cdc25C y del complejo ciclina B1/Cdc2 para regular negativamente la progresión del ciclo celular G2/M se sugiere que reduce el crecimiento de carcinoma y puede inhibir la formación de tumores. De hecho, las células KB-S100A8/A9 y TR146 que expresan S100A8/A9 mostraron una reducción significativa en el crecimiento y clonogenicidad cuando se compararon con células negativas de S100A8/A9 o knockdown de S100A8/A9. Aunque las células KB-S100A8/A9 expresaron menos S100A8 y S100A9 que el tejido normal, tal como se representa por NAT (con relación al gen constitutivo de GAPDH como control intracelular), la expresión ectópica causó una supresión sustancial del crecimiento. Dado que el knockdown de S100A8/A9 en las células TR146 resultó en un marcado aumento en el crecimiento y la formación de colonias en agar blando, nuestros datos, por lo tanto, sugieren fuertemente un efecto dependiente de la concentración de S100A8/A9 en el crecimiento y clonogenicidad de células de carcinoma. Sería de esperar una mayor pérdida de la expresión de S100A8/A9 en los tejidos para acelerar el crecimiento del tumor y la transformación maligna en HNSCC.

[0049] Aunque se requiere la pérdida de los puntos de control G1/S y G2/M para el aumento del crecimiento y la proliferación en los carcinomas, la inducción dependiente de S100A8/A9 del punto de control G2/M contribuyó significativamente a la supresión de la actividad mitótica y el crecimiento de las células KB. La expresión de S100A8/A9 provocó que las células KB-S100A8/A9 se detuvieran y se acumularan en G2/M, inhibiendo la progresión en la mitosis sin afectar a la velocidad de transición G1/S a G2/M. En general, este efecto de inhibición del crecimiento de S100A8/A9 es coherente con un informe en los queratinocitos epidérmicos, donde la expresión transitoria ectópica de S100A8/A9 suprimía la división y proliferación celular (Voss et al, 2011. FEBS Lett 585: 440-446). En nuestros experimentos, el efecto sobre el crecimiento de carcinoma no podía atribuirse a la proteína S100A8/A9 extracelular, ya que el análisis de la secuencia de los genes *S100A8* y *S100A9* no muestra péptidos señal aguas arriba, que son necesarios para la secreción canónica. Además, en nuestras manos, S100A8/A9 extracelular de TR146 o KB transfectadas estaba por debajo de niveles detectables, tal como se determina usando un ELISA específico (datos no mostrados). Por lo tanto, S100A8/A9, tal como se estudió, es un complejo de proteínas citosólicas y es poco probable que sea secretado por el epitelio en el espacio extracelular en condiciones de crecimiento normales. La expresión de S100A8/A9 tampoco tuvo ningún efecto aparente sobre los niveles de proteínas reguladoras aguas abajo asociadas con G1/S y los porcentajes de células positivas y negativas de S100A8/A9 en G1/S y la fase S fueron similares después de la liberación de la sincronía. Aunque no se ha excluido rigurosamente un defecto en G1/S, la regulación mediada por S100A8/A9 del ciclo celular se sugiere fuertemente que afecta a G2/M.

[0050] A continuación se presenta el primer entendimiento mecánico para explicar cómo S100A8/A9 señala la inactivación de Cdc25C y la inducción de detención del ciclo celular de G2/M. La reducción de la fosfoproteína p-Cdc25C (Thr48) mitótica probablemente se señala a través de la desfosforilación por una Ser/Thr proteína fosfatasa 2A (PP2A). Se ha descrito que PP2A induce la detención del ciclo celular mediante reconocimiento y desfosforilación de p-Cdc25C (Thr48) (Forester et al, 2007. Proc Natl Acad Sci USA. 104: 19867-19872; Margolis et al, 2006. Cell 127: 759-773; Guenin et al, 2008. Int J Oncol 32: 49-57), lo que permite a Cdc25C ser fosforilada en Ser216 por p-Chk1 (Ser345) para la inactivación y la exportación nuclear, tal como se ha descrito anteriormente.

[0051] La subunidad PP2A-C α/β es el sitio activo enzimático de PP2A y su actividad de fosfatasa está controlada por la fosforilación en Tyr307 y la metilación en Leu309, que también es esencial para el ensamblaje de holoenzimas. En las células KB-S100A8/A9, la expresión de S100A8/A9 no afectó el nivel de proteína de PP2A-A α/β , PP2A-B56 δ (una subunidad reguladora conocida por reconocer la señal de Cdc25C) o subunidades PP2A-C α/β . Los niveles de metilación de Leu309 de la subunidad PP2A-C (metil-PP2A-C) también fueron similares en células KB-S100A8/A9, KB-EGFP y células de control de tipo salvaje. Estos datos sugieren que S100A8/A9 no tiene efectos reguladores sobre la expresión de PP2A o el ensamblaje de holoenzimas en células KB. El nivel de fosforilación del residuo inhibitorio Tyr307 de PP2A-C, sin embargo, se redujo en las células KB-S100A8/A9, sugiriendo un aumento de la actividad fosfatasa de la enzima.

[0052] La expresión de S100A8/A9 aumentó la actividad de la fosfatasa PP2A premitótica en células transfectadas con KB-S100A8/A9. Cuando la proteína S100A8/A9 purificada se preincubó con lisado de células KB-EGFP (que carecían de S100A8/A9), la actividad de PP2A se moduló de manera similar. Por lo tanto, S100A8/A9 parece señalar directamente un aumento de la desfosforilación y activación de PP2A. La actividad de fosfatasa PP2A post-mitótica fue claramente suprimida por la expresión de S100A8/A9, lo que sugiere la regulación bifásica dependiente del ciclo celular por S100A8/A9. La actividad de fosfatasa PP2A se elevó de forma destacada a tiempo = 0 horas post-sincronía. El nivel a t = 0 puede reflejar la actividad durante G1/S. PP2A también juega un papel en la detención del ciclo celular G1/S (Pitre et al, 2012. *Mol Cell Biol.* 23: 1243-1253; Hofstetter et al, 2012. *PLoS One* 7: e30059), independiente de la vía de señalización del punto de control G2/M. El aumento de la actividad de la fosfatasa PP2A observada a t = 0 era probablemente debido al bloqueo transitorio de G1/S por afidicolina que se utilizó para sincronizar las células en G1/S. Aunque S100A8/A9 no alteró el progreso del ciclo celular de G1 a S, una inhibición independiente de S100A8/A9 de G1/S (farmacológicamente por afidicolina en este caso) podría haber señalado la activación de PP2A. De forma más destacable, la actividad de la fosfatasa PP2A en G1/S fue dependiente o mejoró por la expresión de S100A8/A9 en las células KB-S100A8/A9 y será objeto de estudio en nuestros estudios futuros. Curiosamente, PP2A y S100A8/A9 parecían interactuar directamente en base a experimentos de coimmunoprecipitación, lo que sugiere un posible mecanismo de activación de PP2A por el complejo de proteínas S100A8/A9.

[0053] Para proporcionar evidencia adicional de que la inactivación inducida por S100A8/A9 de Cdc25C era dependiente de la actividad de PP2A, se mostró que el tratamiento con ácido ocadaico, que inhibe específicamente la actividad de PP2A, reduce la fosforilación de p-Cdc25C fosforilación (Ser216) en presencia de S100A8/A9 expresado. Este hallazgo es coherente con la bibliografía, ya que la inactivación de Cdc25C a través de la fosforilación de Ser216 (por Chk1) requiere la desfosforilación de Cdc25C en Thr48, un sustrato conocido para PP2A (Zhou et al, 2000. *Mol Cell* 6: 873-883). El tratamiento con ácido ocadaico, por lo tanto, inhibió la fosforilación dependiente de PP2A inducida por S100A8/A9 de p-Cdc25 C (Ser216) inhibidor. En condiciones normales de crecimiento, por lo tanto, S100A8/A9 media en la reactivación por PP2A del punto de control G2/M y el retraso del ciclo celular.

[0054] La reducción dependiente de S100A8/A9 en la expresión de ciclina B1 y la hiperfosforilación de p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) que se muestra en este estudio también son consistentes con la inactivación de Cdc2 y la detención del punto de control G2/M como comúnmente se describe en carcinomas (Yang et al., 2010. *Free Radic Res.* 44: 792-802; Maalouf et al, 2009. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 74: 200-209; Wang et al, 2008. *J Cell Biochem* 104: 1181-1191). Tal como se observa en el knockdown de S100A8/A9 por shARN en células HNSCC TR146, la reducción de S100A8/A9 aumentó significativamente el crecimiento y la formación de colonias en agar blando en asociación con la hipofosforilación de p-Cdc2 (Thr14/Tyr15). La pérdida de la regulación dependiente de S100A8/A9 del punto de control G2/M, el aumento de la señalización de la transición de G2 a M, y el punto de control G1/S desregulado de forma constitutiva sugirieron firmemente que causaban el aumento de la tasa de crecimiento de las células TR146.

[0055] En resumen, se propone un modelo que ahora incluye S100A8/A9 como mediador clave de señalización en la inducción del punto de control del ciclo celular G2/M y la detención de la mitosis a través de una vía dependiente de PP2A (Fig. 12). La expresión de S100A8/A9 aumenta la actividad de la fosfatasa PP2A, potencialmente a través de la interacción directa proteína-proteína y la desfosforilación del residuo inhibidor Tyr307 de la subunidad catalítica de PP2A-C, aumentando la activación de PP2A. La PP2A activada hipotéticamente reconoce y desfosforila p-Cdc25C (Thr48), permitiendo que Cdc25C sea fosforilada por Chk1 en el residuo inhibidor Ser216 (Perry et al, 2007. *Cell division.* 2: 12). En las células de carcinoma, el punto de control del ciclo celular G2/M está desregulado, dando lugar a un aumento de la fosforilación de Thr48 de p-Cdc25C y el crecimiento celular acelerado. S100A8/A9 activa el punto de control G2/M a través de PP2A para inducir la detención mitótica (y reducción en el crecimiento) mediante la reducción del nivel de p-Cdc25C (Thr48) y mediante el aumento de los niveles de p-Chk1 (Ser345) y p-Cdc25C (Ser216). Si la activación de Chk1 quinasa (por fosforilación en Ser345) y el punto de control G2/M se señala directamente por la expresión de S100A8/A9 o por desfosforilación por PP2A de Cdc25C en Thr48 todavía no está claro, pero ambos residuos Thr48 y Ser216 de Cdc25C no pueden ser fosforilados a la vez. La p-Cdc25C (Ser216) fosforilada es reconocida y unida por 14-3-3 β , lo que lleva a la inactivación y la acumulación citosólica de Cdc25C. Como resultado, el complejo ciclina B1/p-Cdc2 (Thr14/Tyr15) se inactiva, deteniendo el ciclo celular en el punto de control G2/M. Otros inhibidores de punto de control mitótico no se ven afectados. Por lo tanto, S100A8/A9 (o calprotectina) puede funcionar como un supresor de tumores en células epiteliales escamosas y una reducción de la expresión puede servir como un indicador de la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, un aumento artificial de la expresión intracelular de S100A8/A9 en HNSCC y otros SCC puede llegar a ser una estrategia terapéutica eficaz.

[0056] Por ejemplo, S100A8/A9 intracelular reduce la formación de tumores en el suelo de la boca (ortotópicos) en ratones. Las células tumorales suspendidas en MATRIGEL (BD Biosciences, San Jose, CA) se inocularon en el suelo de la boca de ratones nu/nu utilizando un protocolo establecido (Henson B. et al, 2007. *J Oral Pathol Med.* 36: 363-370). Las células KB que expresan S100A8/A9 producen tumores ortotópicos 65% más pequeños ($p < 0,02$) antes del día 17 que las células KB de control transfectadas de forma simulada (que expresan EGFP) (Fig. 13A). La expresión de S100A8/A9 se correlacionó con los tumores más discretos y menos invasivos (Fig. 13B), disminución de áreas necróticas y un fenotipo histológico menos agresivo (Fig. 13C). Por el contrario, las células de carcinoma bucal TR146 formaron tumores (ortotópicos) en el suelo de la boca que eran un 20% más grandes que los tumores formados después del knockdown simulado en células TR146 (Fig. 14). Estos datos indican que la expresión de S100A8/A9 en células tumorales reduce el volumen y la aparente capacidad de invasión de los tumores que se forman en el suelo

de la boca.

[0057] Por lo tanto, hemos demostrado que la expresión de S100A8/A9 por células de carcinoma en tumores (ortotópicos) del suelo de la boca está inversamente relacionada con el tamaño de los tumores que se forman. Por lo tanto, S100A8/A9 puede funcionar como un supresor de tumores. Se pueden utilizar procedimientos que dan lugar a una mayor expresión de S100A8/A9 como procedimientos terapéuticos para ciertos tipos de cáncer que implican neoplasias de células epiteliales, tales como, por ejemplo, cánceres, de cabeza y cuello, incluyendo, pero no limitados a, tumores del suelo de la boca. Tales procedimientos pueden incluir introducir en una célula uno o más polinucleótidos de ARNm que codifican componentes S100A8/A9 de manera que la célula aumenta la producción de S100A8/A9. En realizaciones alternativas, el procedimiento puede incluir administrar al sujeto uno o más agentes activos que dan lugar a un aumento de la expresión de S100A8/A9. Los agentes activos de ejemplo incluyen, por ejemplo, citoquinas reguladoras, tales como IL-1 α , IL-1 α con factor de crecimiento de queratinocitos, IL-6, IL-8 con y sin CXCL8, IL-22, TNF, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20. Los agentes activos de ejemplo también incluyen compuestos que regulan por incremento S100A8/A9 tal como, por ejemplo, acetato de forbol miristato.

[0058] En un aspecto, por lo tanto, esta descripción describe un procedimiento para disminuir la probabilidad y/o la gravedad de la infección de los epitelios de las mucosas por un microbio patogénico. El procedimiento generalmente implica introducir en una célula un ARNm que codifica un polipéptido implicado en la inmunidad innata y que permite que la célula exprese el polipéptido en una cantidad eficaz para disminuir la probabilidad de que la célula sea infectada por un patógeno. En otro aspecto, esta descripción describe un procedimiento para disminuir la probabilidad o grado de proliferación de células epiteliales. El procedimiento implica generalmente introducir en una célula epitelial un ARNm que codifica un polipéptido implicado en la supresión de la proliferación celular y permitir que la célula exprese el polipéptido en una cantidad eficaz para disminuir la probabilidad de que la célula prolifere en un entorno independiente de anclaje. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una secuencia de residuos de aminoácidos sin tener en cuenta la longitud de la secuencia. Por lo tanto, el término "polipéptido" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos que tiene al menos dos aminoácidos e incluye proteínas de longitud completa.

[0059] El procedimiento puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. El ARNm puede ser introducido en la célula mediante cualquier procedimiento adecuado. Al introducir el ARNm *in vivo*, típicamente puede introducirse el ARNm en la célula con la ayuda de un vehículo de administración *in vivo*. Los vehículos de administración *in vivo* de ejemplo pueden incluir componentes tales como, por ejemplo, TransIT-mRNA y reactivos estimuladores de t TransIT-mRNA (Mirus Bio LLC, Madison WI).

[0060] En algunas realizaciones, la célula puede ser, o derivar de, una célula epitelial, tal como, por ejemplo, una célula del epitelio de la mucosa. Así, las células de ejemplo incluyen células de carcinoma. Las células de ejemplo incluyen además células de la mucosa oral, mucosa vaginal, mucosa genital, epitelio de las amígdalas, orofaringe, nasofaringe, pulmones, mucosa gastrointestinal o epitelio de la mucosa que rodea el ojo. En consecuencia, los procedimientos pueden ser usados como terapia para afecciones que incluyen, por ejemplo, carcinoma, gingivitis, periodontitis, candidiasis oral, dolor de garganta estreptocócica, mucositis, bronquitis bacteriana, neumonía bacteriana, vaginosis, otras infecciones vaginales y cervicovaginales, infecciones vaginales por hongos, infecciones gastrointestinales (por ejemplo, infecciones por *Listeria* y *Salmonella* GI), infecciones de los ojos, infecciones de las mucosas y/o infecciones perimucosales. Los procedimientos son igualmente susceptibles a la introducción de ARNm en la mucosa y epitelio relacionado para expresar transitoriamente prácticamente cualquier proteína que pueda ser de valor preventivo o terapéutico, tal como supresores tumorales o proteínas para mejorar la cicatrización de heridas. Por ejemplo, las proteínas que podrían mejorar la curación de heridas de la piel recalcitrantes, antagonizar cánceres de piel, tales como el carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, prevenir la escarificación y la formación de queloides, o revertir el proceso angiogénico en nevos epidérmicos podrían expresarse usando transfecciones de ARNm.

[0061] Para realizaciones *in vitro* del procedimiento, las células pueden ser o pueden derivar de cualquiera de los tipos de células *in vivo* identificadas inmediatamente antes. Alternativamente, las células pueden ser, o derivar de, cualquier línea de células epiteliales adecuada tal como, por ejemplo, células KB humanas (ATCC CCL-17).

[0062] El ARNm codifica un polipéptido implicado en la inmunidad innata. Los polipéptidos de ejemplo implicados en la inmunidad innata incluyen, por ejemplo, proteína antimicrobiana de catelicina (CAMP), calprotectina, S100A8, S100A9, cualquier α -defensina, β -defensina, S100A7, S100A12, inhibidor de leucocitos de secreción, lipocalina 2, y lisozima. El ARNm también puede codificar cualquier combinación de dos o más polipéptidos implicados en la inmunidad innata. Tal como se usa en este documento, "un polipéptido implicado en la inmunidad innata" se refiere a un polipéptido de longitud completa, un fragmento eficaz del mismo, o un precursor de un polipéptido de longitud completa o un fragmento eficaz. Por ejemplo, un ARNm de CAMP puede codificar CAP-18, un precursor que se activa a LL-37 por la proteinasa 3, una serina proteasa. Más allá de la inmunidad innata, las cargas de ARNm pueden codificar prácticamente cualquier polipéptido huésped para introducir, sustituir o aumentar cualquier función.

[0063] El procedimiento se puede utilizar para disminuir la probabilidad y/o extensión de la infección por un patógeno. El patógeno puede ser cualquier patógeno para el cual la célula es una diana de la infección. Los patógenos

de ejemplo incluyen, por ejemplo, hongos tales como, por ejemplo, *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus* spp. (por ejemplo, *A. nidulans* y *A. fumigatus*), y bacterias, tales como, por ejemplo, *Capnocytophaga sputigena*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. (por ejemplo, *S. aureus* y *S. epidermis*), *Streptococcus* spp. (por ejemplo, *S. pneumoniae*, *Streptococcus del grupo A*, *Streptococcus del grupo B* y *Streptococcus del grupo C*), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Borrelia burgdorferi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia* spp., *Neisseria* spp., *Gardnerella* spp., y *Trichomonas* spp.

[0064] En algunas realizaciones, el ARNm puede incluir un resto de estabilización que aumenta la semivida del ARNm una vez que el ARNm se introduce en la célula. El resto de estabilización puede incluir una caperuza 5', tal como, por ejemplo, análogo de caperuza anti-inverso (ARCA) o una caperuza de 7-metilguanilato (m⁷G). En algunas realizaciones, el resto de estabilización puede incluir una extensión de 3' poli (A). Las extensiones de poli (A) de ejemplo pueden incluir cualquier número de residuos de adenina. En ciertas realizaciones, una extensión de poli (A) puede incluir 64 residuos de adenina o 150 residuos de adenina con poca diferencia aparente en la semivida de los ARNm. La estabilización también puede implicar el uso de bases modificadas cuando se sintetizan construcciones de ARNm.

[0065] En algunas realizaciones, el procedimiento puede incluir, además, permitir que el patógeno entre en contacto con la célula en la que se ha introducido el ARNm.

[0066] Para los procedimientos *in vivo*, la célula en la que se introduce el ARNm puede ser una célula de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad causada por la infección por el patógeno. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto que tiene una afección causada por la infección por el patógeno se refiere a un sujeto que muestra uno o más síntomas o signos clínicos de la enfermedad. "Síntoma" se refiere a cualquier evidencia subjetiva de enfermedad o de la afección de un paciente. "Señal" o "signo clínico" se refiere a un hallazgo físico objetivo relativo a una afección particular capaz de ser encontrado por uno que no sea el paciente. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "en riesgo" se refiere a un sujeto que puede o no puede poseer en realidad el riesgo descrito. Así, por ejemplo, un sujeto "en riesgo" de la afección infecciosa es un sujeto presente en una zona donde otras personas se han identificado como que tienen la afección infecciosa y/o es susceptible de ser expuesta al agente infeccioso, incluso si el sujeto no ha manifestado aún ninguna indicación detectable de infección por el microbio e independientemente de si el animal puede albergar una cantidad subclínica del microbio.

[0067] Por consiguiente, la introducción del ARNm se puede realizar antes, durante o después de que el sujeto muestre primero un síntoma o signo clínico de la afección o, en el caso de condiciones infecciosas, antes, durante, o después de que el sujeto entre primero en contacto con el agente infeccioso. El tratamiento iniciado después de que el sujeto muestre primero un síntoma o signo clínico asociado con la afección, es decir, el tratamiento terapéutico puede dar lugar a la disminución de la gravedad de los síntomas y/o signos clínicos de la afección, desaparición completa de la afección y/o disminución de la probabilidad de experimentar evidencias clínicas de la afección en comparación con un animal al que no se administra la composición. Del mismo modo, el tratamiento iniciado antes de que el sujeto muestre primero un síntoma o signo clínico asociado con la afección, es decir, el tratamiento profiláctico, puede dar lugar a la disminución de la gravedad de los síntomas y/o signos clínicos de la afección, desaparición completa de la afección y/o disminución de la probabilidad de experimentar evidencias clínicas de la afección en comparación con un animal al que no se administra la composición.

[0068] El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de la composición a un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, una afección particular. En este aspecto de la invención, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para reducir, limitar la progresión, mejorar o resolver, en cualquier grado, los síntomas o signos clínicos relacionados con la afección.

[0069] Una formulación que contiene el ARNm se puede proporcionar en cualquier forma adecuada incluyendo, pero no limitado a, una solución, una suspensión, una emulsión, un spray, un aerosol, o cualquier forma de mezcla. La composición puede suministrarse en la formulación con cualquier excipiente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. La formulación puede incluir además uno o más aditivos que incluyen, tales como, por ejemplo, un adyuvante o un portador inerte (por ejemplo, una nanopartícula).

[0070] La cantidad de ARNm administrada a un sujeto puede variar dependiendo de varios factores incluyendo, pero no limitado a, el peso, la condición física y/o la edad del sujeto, la vía de administración, la carga de ARNm específica, y/o la estabilidad de la expresión de la proteína resultante. Por lo tanto, la cantidad absoluta de ARNm incluido en una forma de dosificación unitaria determinada puede variar ampliamente y depende de factores, tales como el cargo de ARNm, la indicación terapéutica, la especie, la edad, el peso y/o la condición física del sujeto, así como el procedimiento de administración. En consecuencia, no es práctico establecer de forma general la cantidad que constituye una cantidad de ARNm efectiva para todas las aplicaciones posibles. Los expertos ordinarios en la técnica, sin embargo, pueden determinar fácilmente la cantidad apropiada con la debida consideración de tales factores.

[0071] El ARNm se puede administrar, por ejemplo, en una sola dosis a múltiples dosis. Debido a que el ARNm no se integra en el genoma del sujeto, el efecto terapéutico y/o profiláctico de la introducción del ARNm en células del sujeto,

naturalmente, desaparece con el tiempo. Por lo tanto, un régimen terapéutico o profiláctico que implica la introducción de ARNm en una célula de un sujeto puede incluir tratamientos múltiples.

5 [0072] En otro aspecto, esta descripción describe una composición que incluye un ARNm que codifica un polipéptido implicado en la inmunidad innata, tal como se describe en el presente documento, y un vehículo de administración *in vivo*. La composición puede tener actividad antitumoral, antimicrobiana y/o antifúngica y puede, por lo tanto, ser un agente antitumoral, antimicrobiano y/o antifúngico.

10 [0073] El ARNm que se describe en el presente documento puede formularse en una composición junto con un "portador". Como se usa en este documento, "portador" incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, vehículo, recubrimiento, diluyente, agente antibacteriano y/o antifúngico, agente isotónico, agente retardante de la absorción, tampón, solución de portador, suspensión, coloide y similares. El uso de tales medios y/o agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar principios activos suplementarios en las composiciones.

15 [0074] Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el ARNm sin causar ningún efecto biológico indeseable ni interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

20 [0075] El ARNm se puede formular en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede formularse en una variedad de formas adaptadas a una vía de administración preferida. De este modo, una composición se puede administrar a través de rutas conocidas, incluyendo, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, intradérmica, transcutánea, subcutánea, etc.), o tópica (por ejemplo, intranasal, intrapulmonar, intramamaria, intravaginal, intrauterina, intradérmica, transcutánea, por vía rectal, etc.). Se prevé que una composición se pueda administrar a una superficie mucosa, tal como mediante la administración a, por ejemplo, la mucosa vaginal, nasal o respiratoria (por ejemplo, mediante pulverización o aerosol). Una composición también se puede administrar a través de una liberación sostenida o retardada.

25 [0076] Una formulación se puede presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se puede preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Los procedimientos de preparación de una composición con un portador farmacéuticamente aceptable incluyen la etapa de poner en contacto un vector que contiene el ARNm con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, una formulación se puede preparar poniendo en contacto uniforme y/o íntimamente el compuesto activo con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y a continuación, si es necesario, dando forma al producto en las formulaciones deseadas.

30 [0077] En la descripción anterior, pueden describirse realizaciones particulares aisladas para mayor claridad. A menos que se especifique expresamente de otro modo que las características de una realización particular son incompatibles con las características de otra realización, ciertas realizaciones pueden incluir una combinación de características compatibles descritas en este documento en relación con una o más realizaciones.

35 [0078] Para cualquier procedimiento descrito en este documento que incluya etapas discretas, las etapas pueden llevarse a cabo en cualquier orden factible. Y, según sea apropiado, puede llevarse a cabo simultáneamente cualquier combinación de dos o más etapas.

40 [0079] El término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de cualquiera de dos o más de los elementos enumerados; el término "comprende" y variaciones del mismo no tienen un significado limitativo cuando estos términos aparecen en la descripción y reivindicaciones; a menos que se especifique lo contrario, "un", "una", "el/la" y "al menos uno/a" se utilizan indistintamente y significan uno o más de uno; y la mención de intervalos numéricos por puntos extremos incluyen todos los números incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, de 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

45 [0080] La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

60 *Cultivo de células*

[0081] Las células KB humanas (American Type Culture Collection, ATCC CCL-17) fueron cultivadas en medio de Eagle Modificado (MEM, Mediatech Inc, Herndon, VA) suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS) a 37°C en una incubadora con 5 % de CO₂.

Bacterias

5 [0082] Se cultivaron *L. monocytogenes* ATCC 10403S y *S. enterica* serovar typhimurium (*S. typhimurium*) ATCC 14028 en medio de infusión de cerebro corazón (DIFCO, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) y en agar de soja tríptico (DIFCO, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) a 37°C. Las células de *Listeria* y *Salmonella* se recogieron de la fase log y fases estacionarias, respectivamente, a una absorbancia de 0,4-0,6 a 620 nm), y se utilizaron para infectar células KB.

10 *Construcción de plásmidos*

10 [0083] pGEM4Z.ssIbbz.2bgUTR.150A (proporcionado por el Prof. Carl H. June y Dr. Yangbing Zhao, Universidad de Pensilvania) se digirieron utilizando NotI y HindIII para eliminar la inserción (Zhao et al., 2010. *Cancer Res.* 70: 9053-9061). A continuación, los marcos de lectura abierta (ORFs) de *EGFP* (pares de cebadores P1 y P2), *CAMP* humana (pares de cebadores P3 y P4), S100A8 (pares de cebadores P5 y P6) y S100A9 (pares de cebadores P7 y P8) que contenían la secuencia de Kozak, se clonaron en pGEM4Z.2bgUTR.150A (Tabla 1). Por otro lado, los ORF de S100A8 que contenían secuencias de Kozak fueron clonados en el primer sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pIRES (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) a través de NheI y XhoI (pares de cebadores P11 y P12). Los ORF de S100A9 que contenían la secuencia Kozak se clonaron en el segundo MCS a través de XbaI y NotI (pares de cebadores P13 y P14) (Tabla 1). A continuación, se amplificaron los fragmentos A8-IRES-A9 (pares de cebadores P9 y P10) y también se clonaron en pGEM4Z.2bgUTR.150A para generar el plásmido pGEM4Z.A8-IRES-A9.2bgUTR.150A (Tabla 1).

Tabla 1: Sondas de oligonucleótidos

Nombre	Fragmentos	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO:
<i>Cebadores para los fragmentos clonados en el vector pGEM4Z.2bgUTR.150A</i>			
P1 (sentido)	<i>EGFP</i>	CCTAAGCTTGCCACC ATGGTGAGCAAGGG	1
P2 (antisentido)		ATTTGCGGCCGCTT ACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG	2
P3 (sentido)	<i>CAMP</i>	CCTAAGCTTGCCACC ATGAAGACCCAAAGGGATGGCC	3
P4 (antisentido)		ATTTGCGGCCGCTT AGACTCTGTCTGGGTACAAGATTCC	4
P5 (sentido)	<i>S100A8</i>	CCTAAGCTTGCCACC ATGTTGACCGAGCTGGAGAAAGCC	5
P6 (antisentido)		ATTTGCGGCCGCTT ACTCTTTGTGGCTTTCTTCATGGC	6
P7 (sentido)	<i>S100A9</i>	CCTAAGCTTGCCACC ATGACTTGCAAAATGTGCGCAGCTG	7
P8 (antisentido)		ATTTGCGGCCGCTT AGGGGGTGCCCTCCCC	8
P9 (sentido)	<i>A8-IRES-A9</i>	CCTAAGCTTGCCACC ATGTTGACCGAGCTGGAGAAAGCC	9
P10 (antisentido)		ATTTGCGGCCGCTT AGGGGGTGCCCTCCCC	10
<i>Cebadores para fragmentos clonado en vector pIRES</i>			
P11 (sentido)	<i>S100A8</i>	CTAGCTAGCGCCACC ATGTTGACCGAGCTGGAGAAAGC	11
P12 (antisentido)		CCGCTCGAGCTACT CTTTGTGGCTTTCTTCATGGC	12
P13 (sentido)	<i>S100A9</i>	GCTCTAGAGCCACC ATGACTTGCAAAATGTGCGCAGCTG	13
P14 (antisentido)		ATTTGCGGCCGCTT AGGGGGTGCCCTCCCC	14

^aRegiones de oligonucleótidos no derivados de los genes/fragmentos están en **negrita y cursiva**

25 [0084] IRES en el vector pIRES es una secuencia parcialmente desactivada (Rees et al, 1996. *Biotechniques* 20: 102-110; Bochkov et al, 2006. *Biotechniques* 41: 283-284, 286, 288 passim). Para construir IRES nativos (nIRES) entre dos MCS, se utilizaron vectores pGEM4Z.A8-IRES-A9.2bgUTR.150A como plantillas y se amplificaron con el par de cebadores 5'-AAACGTCTAGGCCCCCGAACC-3'/5'-TTTAACCTCGACTAAACACATGTAAAGCATGTGC-3'. Los productos se purificaron y se auto-ligaron para generar plásmidos pGEM4Z.A8-IRES/mut1-A9.2bgUTR.150A. El par de cebadores 5'-ACCATGACTTGCAAAATGTGCGCAGCTG-3'/5'-ATTATCATCGTGTTCCTCAAAGGAAAACCAC-3' se utilizó para amplificar utilizando pGEM4Z.S100A8-IRES/mut1-S100A9.2bgUTR como plantillas, a continuación, los fragmentos se purificaron y se auto-ligaron para generar plásmidos pGEM4Z.A8-nIRES-A9.2bgUTR.150A.

35 *Transcripción in vitro*

40 [0085] Las plantillas fueron amplificadas a partir de las correspondientes construcciones de plásmido y se extrajeron a partir de geles. Los fragmentos purificados se trataron con SDS al 0,5% y 100 µg/ml de Proteasa K a 50°C durante 30 minutos y se extrajeron con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y después con cloroformo. Después de la precipitación con etanol, las plantillas se disolvieron en 10 mM de Tris-HCl y se almacenaron a -80°C. Usando el kit mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) o el kit ScriptCapTM m7G Capping System/ScriptCapTM 2'-O-metiltransferasa (Cell Script, Madison, WI), los ARNm fueron sintetizados y después se purificaron usando un kit MEGAclear (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) seguido de precipitación con etanol.

45 *Transfecciones de ARNm*

[0086] En aproximadamente el 60%-90% de confluencia, las células fueron transfectadas con ARNm utilizando el kit reactivo TransIT-mRNA (Mirus Biol LLC, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de transferencia Western

5 [0087] Las células se extrajeron utilizando tampón PE LBTM para células de mamífero (G-Biosciences, St. Louis, MO). Las proteínas extraídas se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con uno de los siguientes: anti-β-actina de conejo (DB070, Delta Biolabs, LLC, Gilroy, CA), anti-LL37 de ratón (sc-166770, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anti-S100A8 de ratón (sc-48352, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anti-S100A9 de conejo (sc-20173, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anti-PARP de conejo (# 9542S, Cell Signaling). A continuación, se incubaron anticuerpos primarios de conejo con anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano (HP) de cabra anti-conejo, mientras que los anticuerpos primarios de ratón fueron incubados con anticuerpos conjugados con HP anti-ratón de cabra (anticuerpos secundarios, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Las inmunoreacciones se visualizaron usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) y se expusieron a la película Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ). Las bandas de proteína se cuantificaron mediante análisis Quantity One (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

Ensayo de invasión bacteriana

20 [0088] La invasión bacteriana se determinó mediante el ensayo de protección de antibiótico (Champaiboon et al, 2009. J. Biol Chem 284: 7078-90; Nisapakultorn et al, 2001. Infect Immun 69: 3692-3696). Brevemente, se sembraron células KB (1,0-1,2 × 10⁵ células) durante la noche en placas de 24 pocillos. Las células se incubaron a continuación con *L. monocytogenes* ATCC 10403S o *S. typhimurium* ATCC 14028 a una multiplicidad de infección (MOI) de 100:1 y 1:1, respectivamente. Después de dos horas de incubación, las monocapas se lavaron con DPBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se incubaron durante 1,5 horas en MEM suplementado con FBS al 10% que contenía 100 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y las células se lisaron por incubación con agua destilada estéril durante 15 minutos. Las bacterias liberadas se diluyeron, se emplacaron con un dispensador en espiral (Spiral Biotech, Bethesda, MD), se incubaron durante la noche a 37°C y a continuación se enumeró el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias intracelulares en un contador de colonias (C-110, New Brunswick Scientific, Enfield, CT).

Ensayo de toxicología in vitro

35 [0089] Los efectos tóxicos del suministro de ARNm *in vitro* se analizaron mediante determinación cuantitativa de la viabilidad celular usando el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (kit de ensayo toxicología in vitro, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Brevemente, se añadió solución de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo en una cantidad igual al 10% del volumen de medio de cultivo. Las células fueron incubadas a continuación durante dos horas a 37°C, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y se calculó el porcentaje de células viables como la relación de absorbancias de las células transfectadas y no transfectadas.

Análisis de la apoptosis

45 [0090] Para evaluar el estado apoptótico de las células, se evaluaron las células transfectadas para la escisión por PARP utilizando anti-PARP de conejo en transferencias de Western, tal como se describe anteriormente, y mediante citometría de flujo utilizando el kit de detección de apoptosis Anexina V-FITC (MBL International Corp, Watertown, MA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En puntos de tiempo hasta 72 horas después de la transfección, se tripsinizaron las células, se lavaron con FBS al 2,5% en PBS y se incubaron con Anexina V-FITC más yoduro de propidio en tampón de unión a temperatura ambiente durante 5 min en la oscuridad. Se analizaron las células teñidas usando un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) con el software CellQuest, colocando la señal FITC en FL1 y la señal de yoduro de propidio en FL2. Las células que se tiñeron positivamente por la anexina-V-FITC se consideraron apoptóticas (Pelicano et al, 2003. J. Biol Chem 278: 37832-37839).

55 *Análisis estadístico*

[0091] Para cada condición, se realizaron y se analizaron al menos de tres a seis experimentos independientes. Para analizar las diferencias en los valores promedio, se aplicó la prueba t de Student usando el software Excel (Microsoft, Redmond, WA).

60

Análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

[0092] Usando el reactivo Trizol (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) y mini kits RNeasy plus (Qiagen, Valencia, CA), se aisló el ARN total y se transcribió de forma inversa con Superscript III (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) usando ensayos de

65

qRT-PCR prediseñados PrimeTime (Hs.PT.42.1073747 para *CAMP* humano, Hs.PT.42.3682141 para *S100A8* humano, Hs.PT.42.3080635 para *S100A9* humano, Hs.PT.45.227970.g para *ACTB* humano; Integrated Device Technology, San Jose, CA). El nivel de expresión de ARNm de *CAMP*, *S100A8*, *S100A9* *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9* se normalizó a ARNm de *ACTB*.

5

Inmunofluorescencia

[0093] Después de la transfección de ARNm de *CAMP*, *S100A8/S100A9* durante 16 horas, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos, se lavaron con PBS (pH 7,4) y a continuación se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,25% durante 10 minutos. Después de bloquear una hora con BSA al 1% en PBS/0,1% de Tween 20 y enjuagar 3 veces con PBS, las células fueron incubadas con anti-calprotectina de ratón (mAb 27E10, sc-33714, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) o anti-LL37 de ratón (sc-166 770, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) durante una hora, seguido de IgG anti-ratón de cabra conjugado a Alexa Fluor 568 o IgG anti-conejo de cabra conjugado a Alexa Fluor 568 (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) durante una hora. Para la transfección de ARNm de EGFP, no se necesitó ninguna incubación de anticuerpos. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes de fluorescencia fueron capturadas utilizando un sistema de microscopio de epifluorescencia. También se realizaron las transfecciones de ARNm de *A8-IRES-A9* y *A8-nIRES-A9* durante 40 horas.

10

15

Ejemplo 2

20

Líneas celulares y condiciones de cultivo

[0094] La línea celular de carcinoma humano KB (ATCC CCL-17), negativa para la expresión de *S100A8/A9*, se cultivó en medio esencial mínimo (MEM). La línea celular HNSCC humana TR146 que expresa *S100A8/A9* endógenamente se cultivó en Medio de Eagle modificado por Dulbecco/F-12 de Ham (DMEM/F-12). Las células TR146 derivaron originalmente de una metástasis de ganglio linfático cervical de un carcinoma bucal bien diferenciado (Rupniak et al, 1985. J Natl Cancer Inst. 75: 621-635) y fue una donación del Dr. Reuben Lotán, Universidad de Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX (Eicher et al, 1996. Clin Cancer Res. 2: 1659-1664). Los medios de cultivo MEM y DMEM/F-12 se complementaron con suero bovino fetal al 10% inactivado por calor (medio completo) y las células se mantuvieron en 5% de CO₂ a 37°C. Cada línea celular indicó *Mycoplasma* negativo mediante qPCR antes de su uso.

25

30

Expresión estable de S100A8/A9 en la línea celular de carcinoma humano

[0095] Se generaron células de carcinoma transfectadas de forma estable para expresar *S100A8/A9* (KB-S100A8/A9, anteriormente conocido como KB-MRP8/14) o vector de control simulado (KB-EGFP) a partir de células KB como se ha descrito anteriormente (Nisapakultorn et al. 2001. Infect Immun 69: 4242-4.247). Brevemente, las células KB fueron cotransfectadas con el vector de expresión de mamífero, pIRES-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA), que contiene las regiones codificantes los genes de subunidades *S100A8* (*MRP8*) y *S100A9* (*MRP14*) y el marcador seleccionable pSV2-neo (marcador resistente a sulfato de G418). La línea celular resultante, KB-S100A8/A9, expresa el complejo de proteína *S100A8/A9*. El control de transfección simulada KB-EGFP se generó mediante cotransfección de pIRES-EGFP menos inserto y pSV2-neo. Tanto KB-S100A8/A9 como KB-EGFP se mantuvieron en 700 µg/ml de sulfato de G418 (GENETICIN, Mediatech Inc., Manassas, VA.). La expresión citosólica de *S100A8/A9* en células transfectadas se verificó mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sandwich e inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal específico de heterodímero anti-*S100A8/A9*, 27E10 (Bachem, King of Prussia, PA). La co-inmunoprecipitación también se realizó para confirmar la formación del complejo de proteínas.

35

40

45

Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real

[0096] La expresión *S100A8* y *S100A9* se analizó en muestras clínicas de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humanas (HNSCC) y NAT correspondientes resecaadas de tres pacientes con tumores de estadio II (T2N0M0), III (T3N0M0) e IVA (T4N0M0) que se originan en la lengua, laringe y las glándulas salivales, respectivamente. Se obtuvieron tejidos tumorales de HNSCC de los tres pacientes HNSCC y NAT, que no mostró evidencia de células tumorales, con consentimiento informado a través de un banco de tejidos comercial (ProteoGenex, Inc., Culver City, CA). Los tumores y NATs se congelaron instantáneamente dentro de los 30 minutos post-resección, se seccionaron y se analizaron para células neoplásicas. Se extrajo ARN de las regiones de las muestras de HNSCC que contienen al menos un 70% de células tumorales y NAT utilizando Trizol y se analizó usando un Agilent Bioanalyzer 2100 para el control de calidad. El ARN total de tumor y NAT de cada paciente se agrupó por separado, se transcribió de forma inversa y se cuantificó usando reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) con verde SYBR.

50

55

60

[0097] En experimentos separados, el ARN total fue extraído de células KB y TR146 utilizando un mini kit Qiagen RNeasy, se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop, y se cuantificaron los ARNm específicos de *S100A8* y *S100A9* usando qRT-PCR en tiempo real como se ha indicado anteriormente.

65

Knockdown estable de S100A8/A9 en una línea celular humana HNSCC

[0098] Para generar clones knockdown de S100A8/A9 (TR146-shARN-S100A8/A9KD) como se describe previamente (Sorenson et al, 2012. *Mucosal Immunol* 5: 66-75), se transfectaron células TR146 (con la expresión endógena de S100A8/A9) con el vector de expresión de mamífero de ARN de horquilla corta GeneEraser (shARN) (Stratagene, Cedar Creek, TX) PGE-1 que contenía oligosecuencias para producir shARN de interferencia para transcritos de genes S100A8 y S100A9. Algunas células fueron transfectadas con el vector de control PGE-1, que contenía shARN mezclado, para producir un control negativo para clones silenciados en los genes de S100A8 y S100A9 (TR146-shARN-control). Se seleccionaron los clones que crecieron en presencia de 250 µg/ml de sulfato de G418. Se cuantificaron los genes y la expresión de proteínas S100A8/A9 mediante qRT-PCR e inmunotransferencia.

Crecimiento de células positivas y negativas de S100A8/A9

[0099] Para determinar las tasas de crecimiento dependientes de anclaje, se cultivaron células tumorales en matraces de cultivo tisular de poliestireno no pirogénicos en medio completo (véase anteriormente), se recogieron por tripsinización y se contaron por exclusión de azul de tripano. Los recuentos se confirmaron usando un analizador de la viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El crecimiento independiente del anclaje se determinó mediante la enumeración de colonias de células después del crecimiento en medio de agar blando estándar (0,25% de agar en medio completo emplacado en la parte superior de agar sólido al 0,5%) durante un máximo de 2,5 semanas en 5% de CO₂ a 37°C.

Sincronización de las células y análisis del ciclo celular

[0100] Se sembraron células KB, KB-EGFP y KB-S100A8/A9 a una densidad de 1×10^5 células/ml y se cultivaron en medio completo como se describe anteriormente. Para sincronizar en G1/S, las células en 70% de confluencia (cultivadas durante ~ 48 horas) se privaron de suero durante la noche y después se bloquearon con 3 µg/ml de afidicolina en medio completo durante 12 horas. Para liberar el bloque de G1/S y facilitar la reentrada en el ciclo celular, las células sincronizadas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin calcio y magnesio para eliminar afidicolina y se cultivaron en medio fresco que contiene 10% de FBS. Después de la liberación del bloque de G1/S, se recogieron las células a diversos puntos de tiempo, se fijaron en etanol al 70% enfriado con hielo y el ADN teñió a 37°C durante 30 minutos con 25 µg/ml de solución de yoduro de propidio (PI) (que contiene 1 mg/ml de ARNasa y 0,1% de Triton X-100 en DPBS). El contenido de ADN teñido con PI se analizó mediante citometría de flujo. Las células mitóticas en cultivos sincronizados también se enumeraron mediante inmunotinción usando anticuerpo policlonal específico de fosfo-histona H3 (Ser10), que fue detectado por anticuerpo secundario conjugado con PE y se analizó por citometría de flujo, tal como se describe en otra parte (Krutzik et al., 2003. *Cytometry A* 55: 61-70).

Lisis celular y la extracción de proteínas

[0101] Células de carcinoma cultivadas en monocapas se recogieron por tripsinización, se lavaron dos veces con DPBS y se lisaron durante dos horas en hielo usando tampón de lisis de inmunoprecipitación (IP) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1% de Triton X-100, 0,5% Nonidet P-40, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 2 mM) suplementado con cóctel inhibidor de proteasa fresca (Cat # P8340, Sigma-Aldrich Biotecnología, St. Louis, MO) a dilución 1:100. Los materiales insolubles se eliminaron por centrifugación a 15.000 xg durante 10 minutos a 4°C, se recogieron los sobrenadantes, y las concentraciones de proteína se determinaron mediante ensayo de proteína BCATM (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Análisis por inmunotransferencia

[0102] Las muestras de proteína se hirvieron en tampón de muestra IX (1% de SDS en Tris-HCl 31,25 mM, pH 6,8 con 12,5% de glicerol, 0,005% de azul de bromofenol y 2,5% betamercaptoetanol) durante cinco minutos. Se cargaron geles de SDS-poliacrilamida con de 50 a 100 µg de proteína total por pocillo, tal como se ha indicado, se transfirieron a membranas de PVDF o nitrocelulosa mediante un aparato de transferencia de proteína semisecas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), se bloquearon durante la noche con 5% de leche desnatada en tampón TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 137 mM, Tween-20 al 0,1%), y se incubaron con el anticuerpo primario diluido a 1:1000 durante 1 hora en tampón de bloqueo a temperatura ambiente. A continuación, las transferencias se lavaron tres veces durante 5 minutos cada una con TBS-T y se incubaron durante otra hora con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido a 1 3000 en tampón de bloqueo. Todos los anticuerpos para detectar reguladores del ciclo celular se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Santa Cruz, CA), a excepción de anticuerpo monoclonal de conejo fosfo-PP2A-C (Tyr307) (Epitomics, Inc., Burlingame, CA). Los lavados finales se realizaron tres veces con TBS-T antes de que las transferencias se incubaran en sustrato de detección de transferencia Western ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se documentaron bandas quimioluminiscentes y se analizaron mediante la exposición a una película de rayos X Kodak XAR-5.

Co-inmunoprecipitación

[0103] Se incubó una cantidad igual de proteína de lisado de cada línea celular con gel de afinidad de proteína A EZView Red (gel de proteína A, Sigma-Aldrich) para minimizar la unión no específica (preaclarado). El lisado preaclarado se mezcló entonces con 5 µg de anticuerpo de captura y el volumen se ajustó a 1 ml con TBS. La mezcla se incubó a 4°C con rotación suave durante una hora, seguido de la adición de 25 µl de gel de proteína A e incubación durante una hora adicional a 4°C con rotación suave. A continuación, el complejo de proteína A-anticuerpo-proteína se lavó tres veces con tampón de lisis de inmunoprecipitación frío y se eluyó del gel de proteína A con tampón de muestra IX (como arriba). Después de una breve centrifugación, los sobrenadantes se incubaron en agua en ebullición durante cinco minutos y se analizaron por inmunotransferencia. Para el estudio de interacción 14-3-3β:Cdc25C, se utilizó anti-14-3-3β de ratón como anticuerpo de captura co-IP y anti-Cdc25C de conejo para la detección de inmunotransferencia. El anticuerpo anti-S100A8/A9 de ratón 27E10 o anticuerpo anti-S100A9 y anti-PP2A-Aα de cabra se utilizaron para co-inmunoprecipitar S100A8/A9 y PP2A. Todos los anticuerpos fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Inhibición de PP2A mediante tratamiento con ácido okadaico

[0104] Las células KB, KB-EGFP y KB-S100A8/A9 se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/pocillo y se cultivaron en medio completo durante la noche, tal como se describe anteriormente. Las células cultivadas se incubaron con medio fresco que contenía ácido okadaico 10 nM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o vehículo de control (DMSO) durante 24 horas. Se recogieron las células mediante lavado dos veces con DPBS frío y se lisaron directamente en el pocillo en hielo con tampón de lisis de fosfatasa (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 1%, Triton X-100 al 1%, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 2 mM y el inhibidor de la proteasa al 10%). Los lisados celulares se sometieron a dos ciclos de congelación-descongelación a -80°C, se centrifuga a 4°C y los sobrenadantes se recogieron para la cuantificación de proteína mediante BCA e inmunotransferencia.

Ensayo de la actividad de la fosfatasa PP2A

[0105] La actividad fosfatasa se realizó usando el kit de ensayo de fosfatasa por inmunoprecipitación de fosfatasa (Cat # 17-313, EMD Millipore, Billerica, MA). Se recogieron las células sincronizadas, se lavaron dos veces con DPBS, se sedimentaron y se resuspendieron en tampón de lisis IP suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas fresco, tal como se describe anteriormente, pero sin inhibidores de la fosfatasa, Na₃VO₄ y NaF. Los lisados de células frescas se utilizaron en cada reacción. La actividad de la fosfatasa PP2A se midió siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, 100 µg de proteína total (concentración ajustada en tampón de lisis IP) se mezclaron con 2 µg de anticuerpo de captura monoclonal de ratón (PP2A, clon 1D6 de subunidad C, EMD Millipore), se utilizó isotipo IgG2b de ratón como control y se ajustó el volumen a 500 µl con tampón de ensayo pNPP Ser/Thr (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, CaCl₂ 100 µM), seguido de una hora de incubación a 4°C con balanceo constante. Después de la incubación, se añadieron 25 µl de partículas agarosa para proteína A a cada mezcla de reacción y se continuó la incubación con balanceo constante durante otra hora a 4°C. A continuación, las partículas se lavaron tres veces con TBS, seguido de un lavado con tampón de ensayo Ser/Thr e incubación en solución de fosfopéptido treonina (K-R-p-T-T-I-R) 750 µM diluida en tampón de ensayo Ser/Thr durante 10 minutos a 30°C con agitación constante. El fosfato inorgánico total (Pi) liberado se midió usando solución de detección de fosfato de verde malaquita (incluido en el kit).

Ejemplo 3

Líneas celulares

[0106] Se generaron células epiteliales transfectadas de forma estable para expresar la calprotectina (KB-S1 00A8/A9, anteriormente conocida como KB-MRP8/14) o el vector de control simulado (KB-EGFP) a partir de células KB como se ha descrito anteriormente (Nisapakultorn et al., 2001. Infect Immun. 69: 3692-3696). Brevemente, las células KB fueron cotransfectadas con el vector de expresión de mamífero, pIRES-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA), que contiene las regiones codificantes de las subunidades de calprotectina S100A8 (MRP8) y S100A9 (MRP14) y el marcador seleccionable pSV2-neo (marcador resistente a sulfato de G418). La línea celular resultante, KB-S100A8/A9, expresa el complejo de calprotectina. El control de transfección simulada KB-EGFP se generó mediante cotransfección de pIRES-EGFP menos inserto y pSV2-neo. Tanto KB-S100A8/A9 como KB-EGFP se mantuvieron en 700 µg/ml de sulfato de G418 (GENETICIN, Mediatech Inc., Manassas, VA.) en MEM (Cellgro, Mediatech, Inc., Manassas, VA), suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y se mantuvo al 5% de CO₂ a 37°C. Las células se mantuvieron en MEM con FBS al 10% sin G418 (medio completo) durante 2 días antes de todos los experimentos.

[0107] Las células TR146 son una línea celular de carcinoma bucal obtenida del Dr. Reuben Lotán en el MD Anderson Cancer Center, Houston, TX. Las células se cultivaron como anteriormente sin G418. Algunas células fueron transfectadas de forma estable con shARN para suprimir la expresión y la producción de S100A8/A9 o con el control de transfección simulada utilizando procedimientos estándar.

Modelo animal de la formación de tumores en el suelo de la boca

[0108] Ratones de 6 a 8 semanas de edad hembra de cepa 01N70 [desnudos Cr: NIH (S)-nu/nu] fueron alojados y

alimentados con comida y agua ad libitum en jaulas microaislantes en condiciones específicas libres de patógenos usando un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad. Los animales fueron anestesiados usando isoflurano al 5% en O₂ 2 litros min⁻¹. Se suspendieron células KB (1 × 10⁵) o TR146 (5 × 10⁴) o derivados transfectados en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1:1 (DPBS)/MATRIGEL (BD Biosciences, San Jose, CA) y se inyectaron de forma ortotópica en el suelo de la boca. Los animales fueron controlados hasta ambulatoria y se comprobaron todos los días durante todo el experimento. En el día 17 después de la inyección, los ratones se sometieron a eutanasia con CO₂. Se recogieron los tejidos orales incluyendo tumores, se enjuagaron en DPBS, se conservaron en una solución de formalina al 10% embebida en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Histoserv Inc, Germantown, MD) para el análisis histológico.

[0109] Los resultados se muestran en la figura 13

Ejemplo 4

[0110] Se amplificaron plantillas de pGEM4Z.2bgUTR.150A como se describe en el Ejemplo 1, con la adición de 25% de 2-tiouridina, la adición de 25% de 5-metilcitosina y se sintetizaron ARNm usando el Ultra Kit mMACHINE mMACHINE T7 (Ambion, Life Technologies Corp., Grand Island, NY), con el bloqueo de ARCA. Las células se transfectaron usando el kit de TransIT-mRNA (Mirus Bio LLC, Madison, WI). Se recogió saliva de tres donantes inmediatamente antes de los experimentos de transfección, se agruparon, se centrifugaron a 12.000 x g durante cinco minutos para eliminar partículas y se usó el sobrenadante de la saliva para todos los experimentos.

[0111] La saliva se diluyó para mostrar las relaciones de dosis-respuesta y se incubó con los cultivos de células epiteliales durante un minuto, tres minutos, o cinco minutos. En algunos experimentos, las células tratadas con saliva se lavaron para invertir el tratamiento. Inmediatamente después de los tratamientos de saliva, con y sin lavados, las células fueron transfectadas con ARNm de EGFP. 16 horas después de la transfección de ARNm, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y los núcleos se tiñeron con DAPI. Se capturaron imágenes fluorescentes con un microscopio de epifluorescencia. Los resultados se muestran en la figura 15 y la figura 16.

Ejemplo 5

Modelo animal de periodontitis y eficacia de los tratamientos con ARNm de S100A8/A9

[0112] La susceptibilidad a la periodontitis inducida por *P. gingivalis* se evalúa en ratones C57BL/6 de tipo salvaje que son ratones S100A8/A9 -/-, S100A8/A9 +/- con expresión específica de tejido epitelial de S100A8/A9 humana o ratones S100A8/A9 +/- que recibieron transfecciones de ARNm de S100A8/A9 mediante aplicación tópica en el epitelio gingival.

Infección oral por P. gingivalis

[0113] *P. gingivalis* ATCC 53977 (A7A1-28) (Costalonga, et al, 2009, J Periodontal Res. 44: 537-542) induce una mayor destrucción ósea que otras cepas de *P. gingivalis* (Baker, et al., 2000, Oral Microbiol Immunol 15: 27-32). Para crear la infección oral, los ratones son pretratados con antibióticos y alimentados con 4 × 10⁹ UFC de *P. gingivalis* en carboximetilcelulosa al 2% o *L. murinus* de control mediante sonda oral, seis episodios, con cuatro días de diferencia, tal como se describió previamente (Costalonga, et al., 2009, J periodontal Res 44: 537-542). *L. murinus* no causa pérdida de hueso periodontal o inflamación. La colonización de *P. gingivalis* y *L. murinus* se ensaya mediante el muestreo de la cavidad oral de ratones antes de la primera sonda y 50 días más tarde.

Animales utilizados

[0114] Se inoculan ratones C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) mediante sonda oral con *P. gingivalis* ATCC 53977. Todos los ratones se alojan en una instalación libre de patógenos específicos (SPF) acreditada por AAALAC. En base a cálculos de potencia anteriores, 21 ratones que recibieron cada tratamiento o control (simulado) son suficientes para detectar diferencias de potencia del 90% del 10-15% en el grado de destrucción ósea alrededor de los dientes (cuando α se fijó en 0,05) entre ratones infectados con *P. gingivalis* ATCC 53977 y ratones infectados de forma simulada.

Medición de la inflamación

[0115] Se recogen maxilares y mandíbulas a los 0 y 50 días, se diseccionaron, y se separaron en la línea media para obtener cuatro muestras como se ha descrito (Costalonga, et al, 2009, J Periodontal Res. 44: 537-542). Siete de las 14 hemimandíbulas y hemimaxilares derechos de cada grupo experimental o tratamiento se fijan en paraformaldehído al 4% y se descalcificaron en EDTA al 10% a un pH de 8 durante una semana. Las muestras se introdujeron en parafina tal como se ha descrito (Sato, et al, 1986, Am J Pathol 125: 431-435) y se tiñeron con hematoxilina-eosina o se congelaron en OCT y se procesaron para la identificación por inmunofluorescencia de las células inmunes.

[0116] Para caracterizar la celularidad de los tejidos interproximales, las muestras de los tres molares se seccionaron

de forma meso-distal con corte de 7 µm de forma apico-coronal. La presencia de la inflamación y pérdida de unión se identifica por el predominio de núcleos inflamatorios y la migración apical del epitelio de unión de la unión cemento-esmalte, respectivamente.

5 *Recuperación de las bacterias de las mandíbulas*

10 [0117] Inmediatamente después de la recogida, las otras siete de 14 hemimandíbulas y hemimaxilares derechos se utilizan para recuperar bacterias del epitelio gingival mediante la extracción del tejido del hueso o mediante el tratamiento de la mandíbula con dispasa para digerir la capa epitelial de los tejidos conectivos. Alternativamente, la mandíbula se homogeneiza en medios de cultivo prereducidos. Una parte se coloca en placas sobre agar de sangre en una cámara anaeróbica y se enumeran las UFC. Una alícuota también se utiliza para estimar los niveles de *P. gingivalis* y *L. murinus* usando qPCR en el homogeneizado.

15 *Determinación de la pérdida de hueso alveolar*

20 [0118] A las hemimandíbulas y hemimaxilares izquierdos se les extrajo la carne suavemente usando un escalpelo. Las mandíbulas se hierven en agua destilada durante 10 minutos, se colocan en NaOH 1 N durante tres horas para eliminar la encía queratinizada restante, y finalmente se tiñeron con azul de metileno al 1% durante un minuto. Las hemimandíbulas y hemimaxilares sin carne se montan con la lengua hacia arriba en un molde flexible y se fotografían a un aumento de 40X con un estereomicroscopio equipado con una cámara digital como se ha descrito (Costalonga, et al, 2009, J Periodontal Res. 44: 537-542). Para minimizar la distorsión de imagen relacionada con el ángulo del objetivo con muestra, la vista lingual de las hemimandíbulas y hemimaxilares se estandarizan de manera que el área proyectada entre el borde distal de la cúspide media bucal y el borde distal de la cúspide media lingual es de 10.000 ± 500 píxeles. Las mandíbulas fotografiadas se miden desde la unión cemento-esmalte (CEJ) de cada uno de los tres dientes molares a la cresta ósea alveolar utilizando una cuadrícula estandarizada en Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA). Los cambios en el nivel de hueso alveolar se miden indirectamente como el número de píxeles en el área de la superficie del tronco de la raíz visible como se ha descrito previamente (Costalonga, et al, 2009, J Periodontal Res. 44: 537-542).

30 [0119] Además, algunas mandíbulas se evalúan utilizando la tomografía microcomputarizada (CT).

Análisis

35 [0120] El promedio de las mediciones del área de hueso en los cuatro grupos independientes (infectados con *P. gingivalis*, control con *L. murinus*) en ratones C57BL/6 y los ratones S100A8/A9 -/- se utilizan como la variable dependiente en un análisis de varianza. La sensibilidad del procedimiento de medición permite la detección de un 10% cambios en los niveles de cresta ósea con una potencia del 90%.

40 [0121] Del mismo modo, se compara el crecimiento de bacterias en general y de *P. gingivalis* y el control *L. murinus* específicamente en presencia y ausencia de S100A8/A9.

[0122] La inflamación se estima de forma semicuantitativa.

45 [0123] Para evaluar la susceptibilidad a la periodontitis en ratones C57BL/6 de tipo salvaje y S100A8/A9 -/- con rescate específico de epiteliales de S100A8/A9 humana, se usan *P. gingivalis* o control de *L. murinus* para infectar ratones C57BL/6 de tipo salvaje (S100A8/A9+/+), ratones S100A8/A9 -/-, y ratones S100A8/A9 -/- rescatados por knock-in con S100A8 y S100A9 específicas de epitelial humana. La mutación nula para S100A8/A9 en ratones de la base de C57BL/6 se rescata usando un sistema para introducir múltiples genes en el ratón utilizando vectores de múltiples genes integrables en transposones (Moriarty et al, 2013, Nucleic Acids Res. 41: e92). Usando este sistema, se puede reconocer el locus ROSA26 (Soriano, P. 1999, Nature Genetics 21: 70-71) con el vector de múltiples genes que contiene las regiones codificantes para S100A8 y S100A9 para "knock-in" con un promotor K14. Por lo tanto, el knock-in sólo se expresa en las células epiteliales. La expresión de S100A9 humana puede permitir la traducción de S100A8 de ratón en los ratones S100A8/A9 -/- porque S100A8 de ratón no forma complejo con S100A9 humana para formar heterodímeros híbridos (Propper et al, 1999, J Biol Chem 274: 183-188.).

55 [0124] Las tres cepas de ratones se comparan para la expresión de la periodontitis como se describe anteriormente usando *P. gingivalis* como patógeno y *L. murinus* como control no patógeno comensal.

60 [0125] La periodontitis se expresa de manera similar en cepas de C57BL/6 de tipo salvaje (S100A8/A9 +/+ murinos) y knock-in humanos específicos epiteliales (base S100A8/A9 -/-). Los ratones S100A8/A9 -/- muestran la mayor cantidad de pérdida de hueso alveolar.

65 [0126] Este experimento muestra que las regiones codificantes para S100A8 y S100A9 son factores inmunes innatos en la resistencia a la periodontitis. La comparación de la histopatología de tejidos blandos de las tres cepas antes y después de establecerse la periodontitis confirma la localización de S100A8/A9 humano y murino en el epitelio gingival

y la pérdida de la integridad epitelial después de la infección en el ratón S100A8/A9 -/-.

Knock-in de S100A8/A9 humano específico de epitelio

5 **[0127]** S100A8/A9 específico de epitelio se introduce (“knock-in”) en células ES S100A8/A9 -/- usando el vector de
 múltiples genes integrable (Moriarity et al, 2013, Nucleic Acids Res. 41: e92) que reconoce el locus ROSA26. Se coloca
 un casete lox-stop-lox entre un promotor K14 y el vector de múltiples genes que contiene regiones de codificación de
 S100A8 y S100A9 humanas. S100A8/A9 humana forma un complejo espontáneamente dentro de las células
 10 epiteliales (Champaiboon et al, 2009, J Biol Chem 284: 7078-7090)). Los ratones homocigotos para queratina14-CRE
 y el alelo condicional de múltiples genes (S100A8 y S100A9)^{CRE} se cruzan para generar ratones experimentales. Los
 ratones cruzados con éxito expresan S100A8/A9 en tejidos epiteliales. El ratón que se describe en el presente
 documento como S100A8/A9 -/- es en realidad S100A9 -/-, expresando el ARNm de S100A8 pero no la proteína
 S100A8 (Hobbs et al, 2003, Mol Cell Biol. 23: 2564-2576; Manitz et al, 2003, Mol Cell Biol 23: 1034-1043). El
 15 S100A8/A9 murino permanece intacto de modo que la sobreexpresión de S100A8/A9 es únicamente de las proteínas
 humanas introducidas (“floxed-in”).

Evaluación de la periodontitis

20 **[0128]** Usando procedimientos y el enfoque descrito anteriormente, se estima la inflamación y se miden la infección
 por *P. gingivalis* del epitelio y niveles de hueso alveolar en ratones infectados por *P. gingivalis*, de tipo salvaje,
 S100A8/A9 -/- y S100A8/A9 humana introducida (S100A8/A9 -/- de base) al inicio del experimento y a los 50 días
 después de la inoculación inicial. Los datos se comparan con ratones infectados con *L. murinus* (control) de cada base
 para determinar el papel de S100A8/A9 en la resistencia a la infección por *P. gingivalis*.

25 *Análisis*

[0129] El promedio de las mediciones de área de hueso se utiliza como la variable dependiente en un análisis de
 varianza en los seis grupos independientes (infectados por *P. gingivalis*, control infectado por *L. murinus*) en ratones
 C57BL/6, ratones S100A8/A9-/- y ratones rescatados de S100A8/A9 humana en la base S100A8/A9 -/-. La sensibilidad
 30 del procedimiento de medición permite la detección de un 10% cambios en los niveles de cresta ósea con una potencia
 del 90%. Del mismo modo, se compara el crecimiento de bacterias en general en el epitelio y *P. gingivalis* y *L. murinus*
 de control específicamente en presencia y ausencia de S100A8/A9 se comparan.

35 **[0130]** La inflamación se estima de forma semicuantitativa.

[0131] Para evaluar la susceptibilidad a la periodontitis en ratones C57BL/6 S100A8/A9 -/- con y sin ARNm de
 S100A8/A9 aplicados tópicamente a la encía, se usan *P. gingivalis* o *L. murinus* de control para infectar ratones de
 tipo salvaje (S100A8/A9 +/+ murino), ratones S100A8/A9 -/- y ratones S100A8/A9 -/- rescatados mediante aplicación
 40 tópica de ARNm de S100A8/A9 empaquetado humano. Las células epiteliales pueden ser transfectadas con ARNm
 específicos para S100A8 y S100A9 para expresar ambas proteínas y formar el complejo antimicrobiano S100A8/A9
 (Zou et al, 2013, Infect Immun. 81: 3.975-3.983). El sistema de transfección es esencialmente tópico. Los ARNm
 empaquetados se añaden directamente a la superficie epitelial, el ARNm se recoge en las células epiteliales, se
 coexpresan nuevas proteínas S100A8 y S100A9 en la misma célula y aumenta la resistencia a la invasión de
 45 patógenos bacterianos.

[0132] Para los experimentos *in vivo*, la saliva se lava del epitelio oral del ratón para reducir la barrera salival para la
 captación de los ARNm empaquetados. El epitelio se seca al aire antes de aplicar los ARNm empaquetados
 directamente a la interfaz diente-encía usando un atomizador de alta intensidad esencialmente tal como se describe
 para el uso en los pulmones (Kormann et al, 2011, Nature Biotechnology 29: 154-157; Mays et al., 2013, J Clin Invest
 50 123: 1216-1228). El atomizador está equipado con una aguja de abertura estrecha para permitir la dirección del ARNm
 a la interfaz prevista.

[0133] El ARNm de S100A8/A9 se aplica a la encía un día antes de cada aplicación de *P. gingivalis* para minimizar la
 interferencia con cualquiera de los protocolos. Los ratones de las tres condiciones se comparan para la expresión de
 55 la periodontitis, tal como se describe anteriormente, usando *P. gingivalis* como patógeno y *L. murinus* como control no
 patógeno comensal. La periodontitis es evidente de manera similar en ratones de tipo salvaje (S100A8/A9 +/+ murino)
 y S100A8/A9 -/- rescatados por aplicación tópica de ARNm de S100A8/A9 empaquetado humano. Los ratones
 S100A8/A9 -/- muestran la mayor cantidad de pérdida de hueso alveolar.

60 **[0134]** Este experimento confirma que S100A8 y S100A9 son factores inmunes innatos en la resistencia epitelial
 gingival a la periodontitis. La comparación de la histopatología de tejidos blandos de los ratones en las tres condiciones
 antes y después de establecerse la periodontitis confirma la localización de S100A8/A9 humano y murino en el epitelio
 gingival y la pérdida de integridad epitelial después de la infección en el ratón S100A8/A9 -/-.

65 *Análisis*

[0135] El promedio de las mediciones de área de hueso se utiliza como la variable dependiente en un análisis de varianza en los seis grupos independientes (infectados por *P. gingivalis*, control infectado por *L. murinus*) en ratones de tipo salvaje (S100A8/A9 +/+ murino), ratones S100A8/A9 -/- y ratones S100A8/A9 -/- rescatados mediante aplicación tópica de ARNm de S100A8/A9 humano empaquetado. Los análisis son como se describen anteriormente.

- 5 PUNTOS DE EJEMPLO
- [0136]**
- 10 Punto 1. Un procedimiento que comprende:
introducir en una célula epitelial un ARNm que codifica un polipéptido implicado en la supresión de la proliferación celular; y
permitir que la célula exprese el polipéptido en una cantidad eficaz para disminuir la probabilidad de que la célula prolifere en un entorno independiente de anclaje.
- 15 Punto 2. El procedimiento del punto 1, en el que el polipéptido comprende calprotectina, S100A8 o S100A9.
- Punto 3. Un procedimiento que comprende:
introducir en una célula un ARNm que codifica un polipéptido implicado en la inmunidad innata; y
20 permitir que la célula exprese el polipéptido en una cantidad eficaz para disminuir la probabilidad de que la célula sea infectada por un patógeno.
- Punto 4. El procedimiento del punto 3 en el que el polipéptido comprende proteína antimicrobiana de catelicina (CAMP), calprotectina, S100A8, S100A9, una β -defensina, S100A7, inhibidor de leucocitos de secreción, lipocalina 2, o lisozima.
- 25 Punto 5. El procedimiento de cualquiera de los puntos anteriores, en el que el ARNm comprende un resto de estabilización.
- Punto 6. El procedimiento del punto 5, en el que el resto de estabilización comprende una caperuza 5'.
- 30 Punto 7. El procedimiento del punto 5, en el que el resto de estabilización comprende una extensión 3'.
- Punto 8. El procedimiento de cualquiera de los puntos anteriores, en el que la célula es una célula epitelial de la mucosa.
- 35 Punto 9. El procedimiento de cualquiera de los puntos 3-8, que comprende además permitir a la célula que se exponga al patógeno.
- Punto 10. El procedimiento de cualquiera de los puntos 3-9, en el que el patógeno comprende una bacteria.
- 40 Punto 11. El procedimiento del punto 10, en el que la bacteria comprende *Capnocytophaga sputigena*, *Escherichia coli*, una *Staphylococcus spp.*, una *Streptococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Borrelia burgdorferi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Pseudomonas aeruginosa*, una *Chlamydia spp.*, una *Neisseria spp.*, una *Gardnerella spp.*, o una *Trichomonas spp.*
- 45 Punto 12. El procedimiento de cualquiera de los puntos 3-9, en el que el patógeno comprende un hongo.
- Punto 13. El procedimiento del punto 12, en el que el hongo comprende hongos *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii* o una *Aspergillus spp.*
- 50 Punto 14. El procedimiento de cualquiera de los puntos 3-13, en el que la célula es una célula de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una afección causada por la infección por el patógeno.
- Punto 15. El procedimiento del punto 14, en el que la afección comprende un carcinoma.
- 55 Punto 16. El procedimiento de cualquiera de los puntos anteriores, que comprende además lavar la célula para eliminar el líquido de la mucosa de la célula antes de introducir el ARNm en la célula.
- Punto 17. El procedimiento del punto 16, en el que el fluido de la mucosa comprende saliva.
- 60 Punto 18. Una composición que comprende:
un ARNm que codifica un polipéptido que suprime la proliferación celular en una célula epitelial; y
un vehículo de suministro *in vivo*.
- 65 Punto 19. La composición del punto 18, en la que el polipéptido comprende calprotectina, S100A8 o S100A9.

Punto 20. La composición del punto 18 o el punto 19, en la que el polipéptido suprime la proliferación celular de la célula epitelial cuando la célula epitelial se cultiva en un entorno independiente de anclaje.

5 Punto 21. Una composición que comprende:
un ARNm que codifica un polipéptido implicado en la inmunidad innata; y
un vehículo de suministro *in vivo*.

10 Punto 22. La composición del punto 21, en la que el polipéptido comprende proteína antimicrobiana de catelicina (CAMP), calprotectina, S100A8, S100A9, una β -defensina, S100A7, inhibidor de leucocitos de secreción, lipocalina 2 o lisozima.

Punto 23. La composición de una cualquiera de los puntos 18-22, en la que el ARNm comprende un resto de estabilización.

15 Punto 24. La composición del punto 23, en la que el resto de estabilización comprende una caperuza 5'.

Punto 25. La composición del punto 23, en la que el resto de estabilización comprende una extensión 3'.

20 **[0137]** La descripción detallada anterior y los ejemplos se han proporcionado por claridad de comprensión solamente. No deben entenderse limitaciones innecesarias a partir de los mismos. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, las variaciones obvias para un experto en la técnica se incluirán dentro de la invención definida por las reivindicaciones.

25 **[0138]** A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, y así sucesivamente usados en la memoria y en las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener por la presente invención. Por lo menos, y no como
30 un intento de limitar la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos indicados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

[0139] A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que exponen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se indican de forma tan precisa como sea posible. Todos los valores numéricos, sin embargo, contienen inherentemente un intervalo resultante
35 necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de ensayo.

[0140] Todos los títulos son para la conveniencia del lector y no deben utilizarse para limitar el significado del texto que sigue al título, a menos que así se especifique.

REIVINDICACIONES

- 5 1. ARNm que codifica un polipéptido implicado en la inmunidad innata, en el que el polipéptido es proteína antimicrobiana de catelicina (CAMP), calprotectina, S100A8, una β -defensina, S100A7, inhibidor de leucocitos de secreción, lipocalina 2, o lisozima, para usar en un procedimiento de inhibición de la infección de una célula epitelial de la mucosa por un patógeno, **caracterizado porque** el ARNm se administra mediante la aplicación tópica de la célula, en una cantidad efectiva para ser terapéutico.
- 10 2. ARNm para usar, según la reivindicación 1, en el que el ARNm comprende un resto de estabilización.
3. ARNm para usar, según la reivindicación 2, en el que el resto de estabilización comprende una caperuza 5' o una extensión 3'.
- 15 4. ARNm para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además permitir que la célula se exponga al patógeno.
- 20 5. ARNm para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que uno o más patógenos comprenden una bacteria o un hongo.
- 25 6. ARNm para usar, según la reivindicación 5, en el que la bacteria comprende *Capnocytophaga sputigena*, *Escherichia coli*, una *Staphylococcus* spp., una *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Borrelia burgdorferi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Pseudomonas aeruginosa*, una *Chlamydia* spp., una *Neisseria* spp., una *Gardnerella* o una *Trichomonas* spp.; y en el que el hongo comprende hongos *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii* o una *Aspergillus* spp.
7. ARNm para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula es una célula de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una afección causada por la infección por dicho uno o más patógenos.
- 30 8. ARNm para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además lavar la célula para eliminar el líquido de la mucosa de la célula antes de introducir el ARNm en la célula.
9. ARNm para usar, según la reivindicación 8, en el que el fluido de la mucosa comprende saliva.
- 35 10. Una composición para usar en el tratamiento de la infección de células epiteliales de la mucosa por un patógeno, comprendiendo la composición:
un ARNm que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en proteína antimicrobiana de catelicina (CAMP), calprotectina, S100A8, S100A9, un β -defensina, S100A7, inhibidor de leucocitos de secreción, lipocalina 2 y lisozima; y
- 40 un vehículo de suministro *in vivo*;
en la que la composición se administra por vía tópica a células epiteliales de la mucosa.
11. Composición, según la reivindicación 10, en la que el ARNm comprende un resto de estabilización.
- 45 12. Composición, según la reivindicación 11, en la que el resto de estabilización comprende una caperuza 5' o una extensión 3'.

Fig. 1

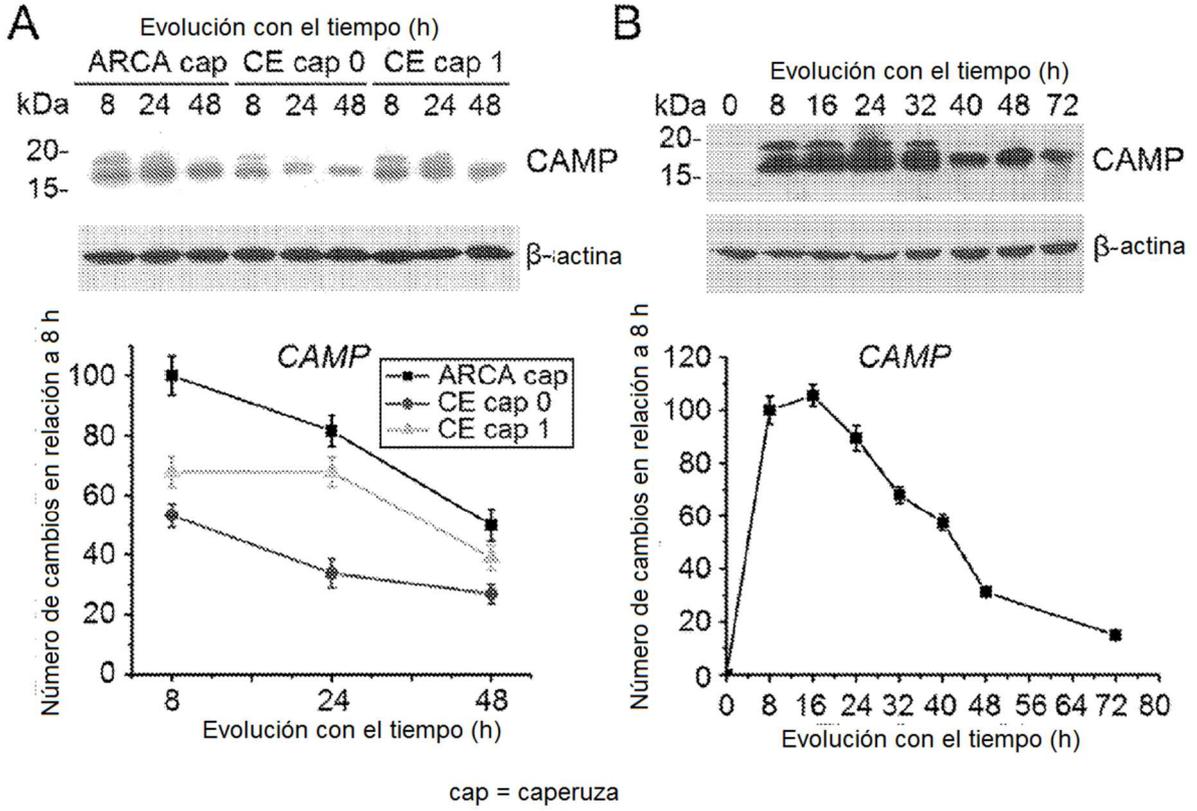


Fig. 2

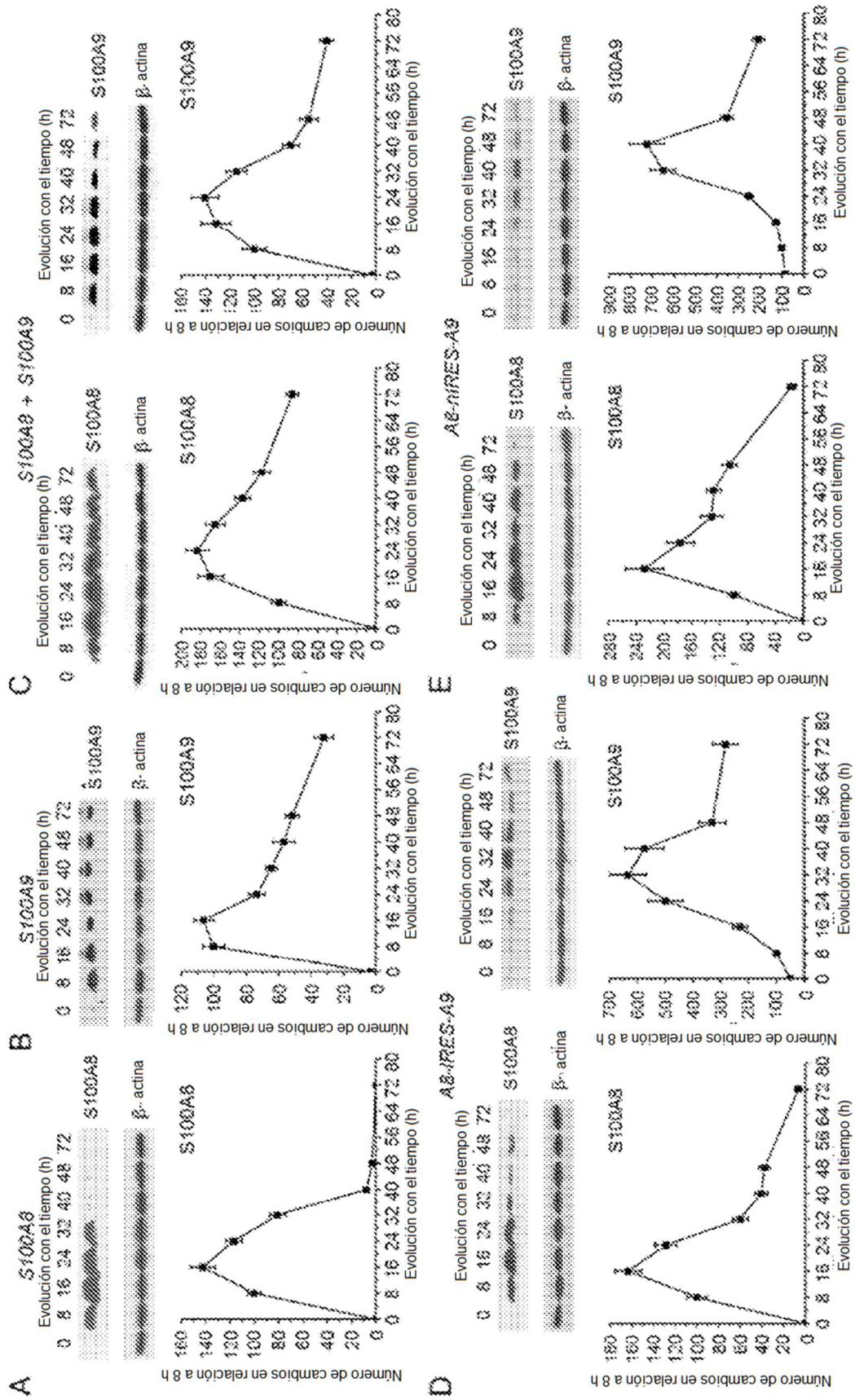


Fig. 3

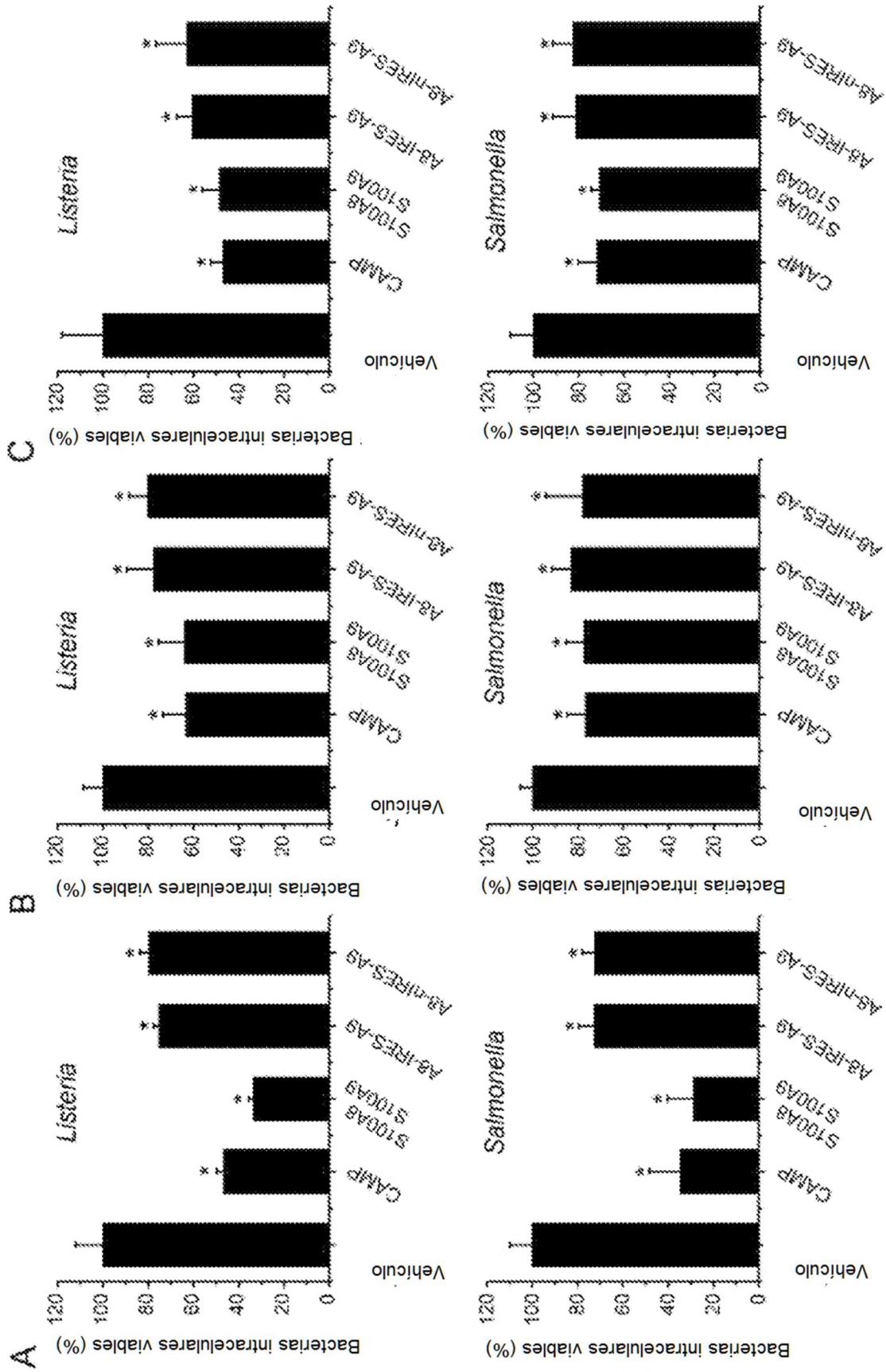


Fig. 4

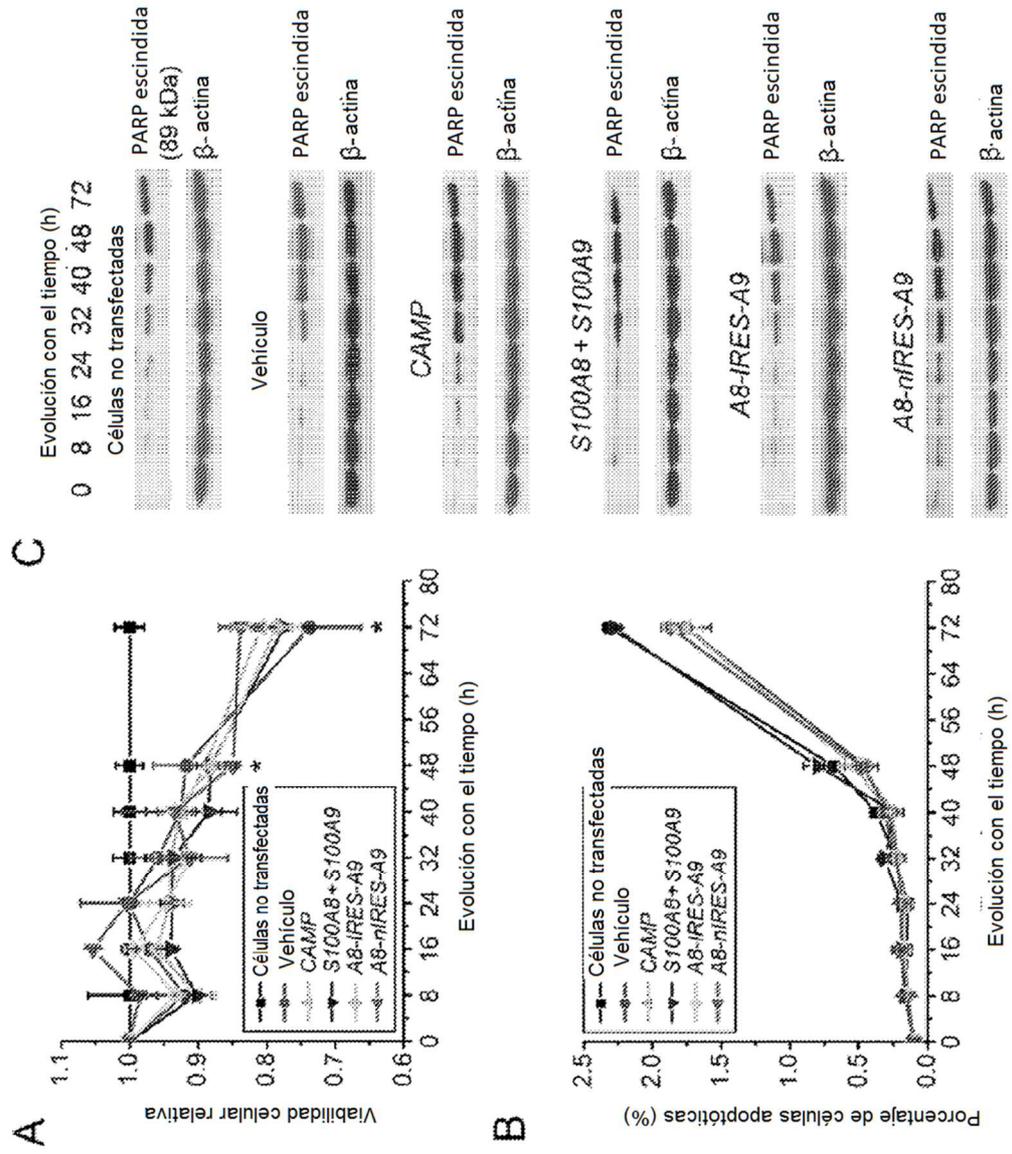


Fig. 5

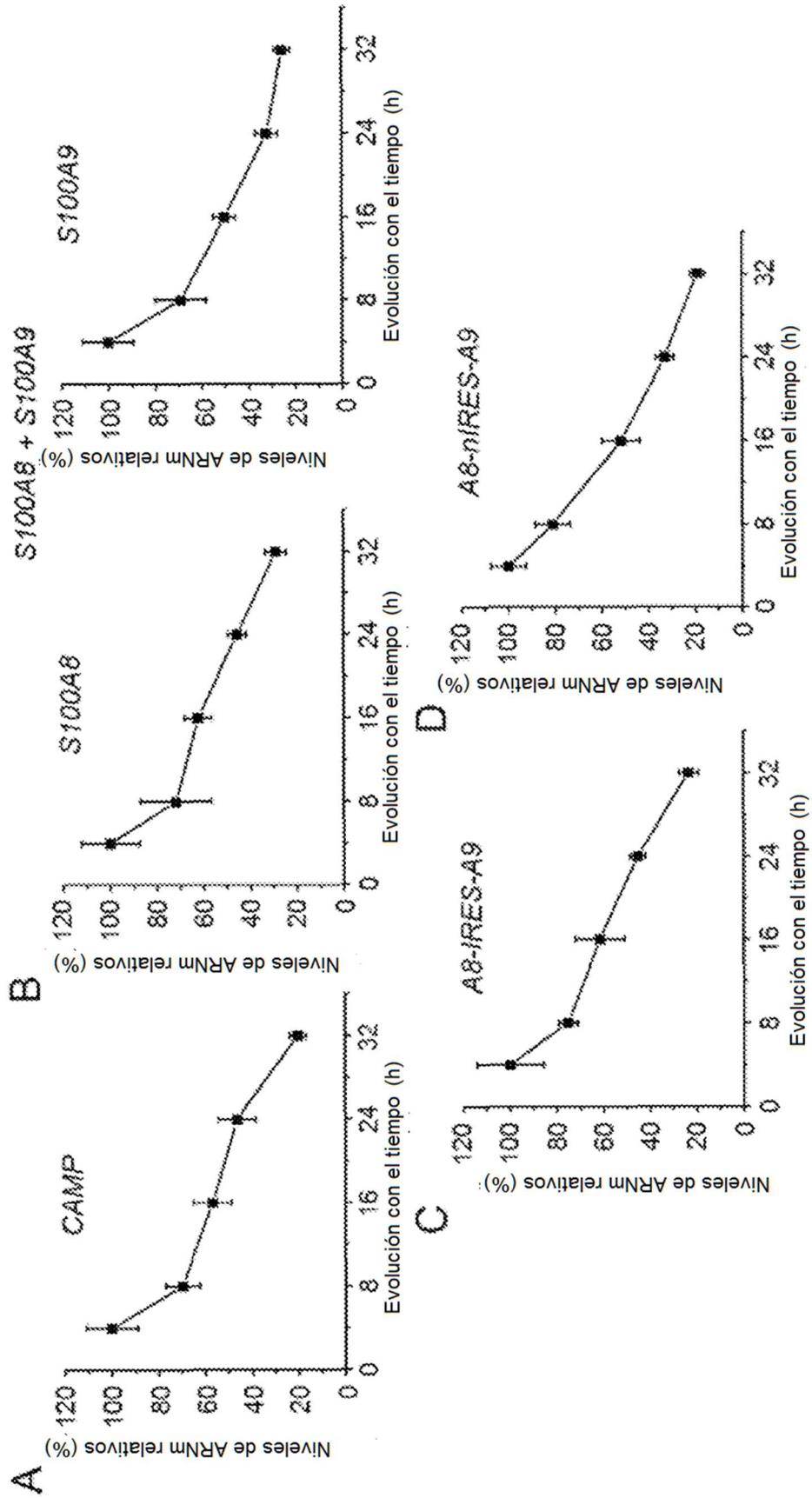


Fig. 6

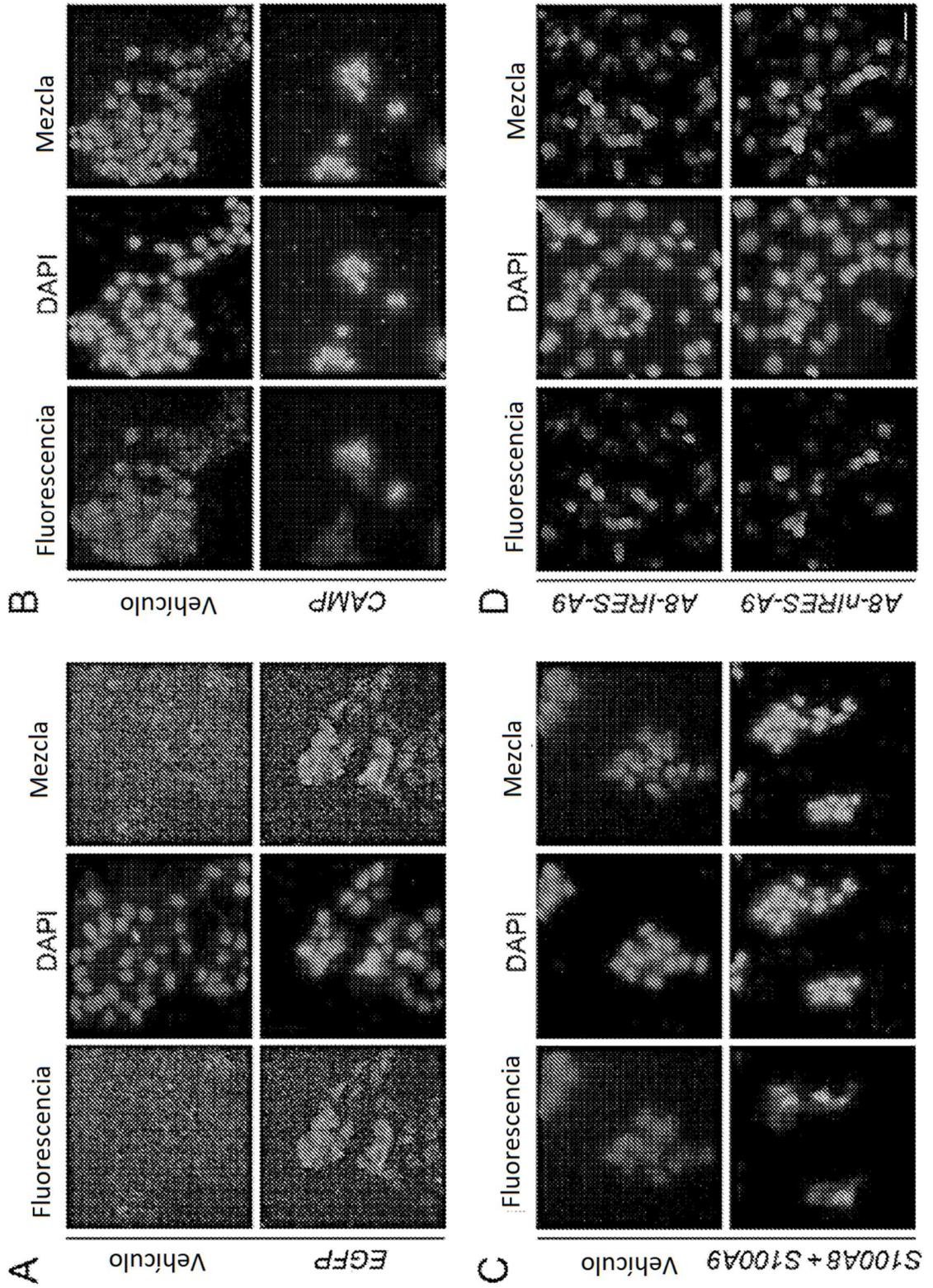


Fig. 7

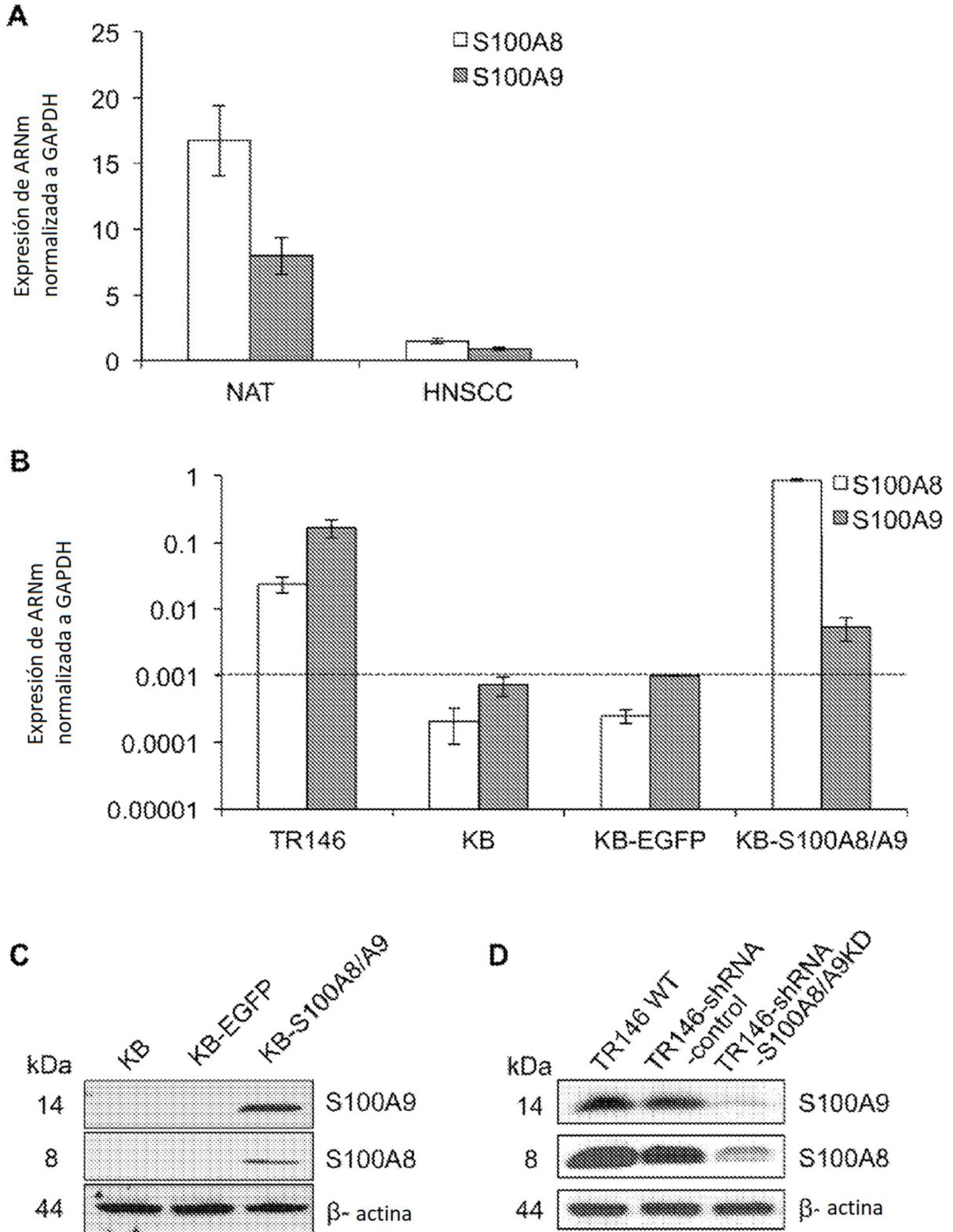


Fig. 8

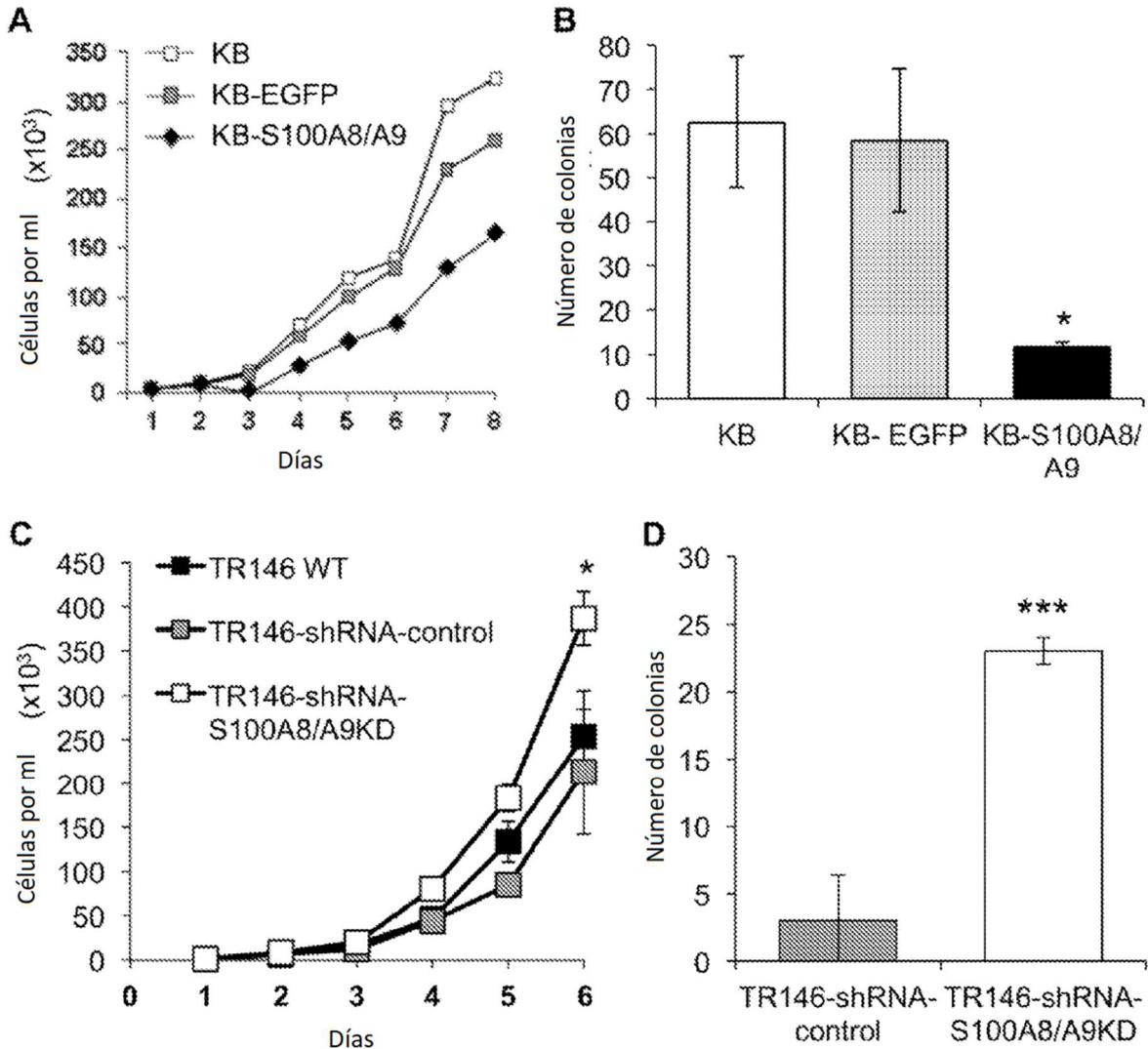


Fig. 9

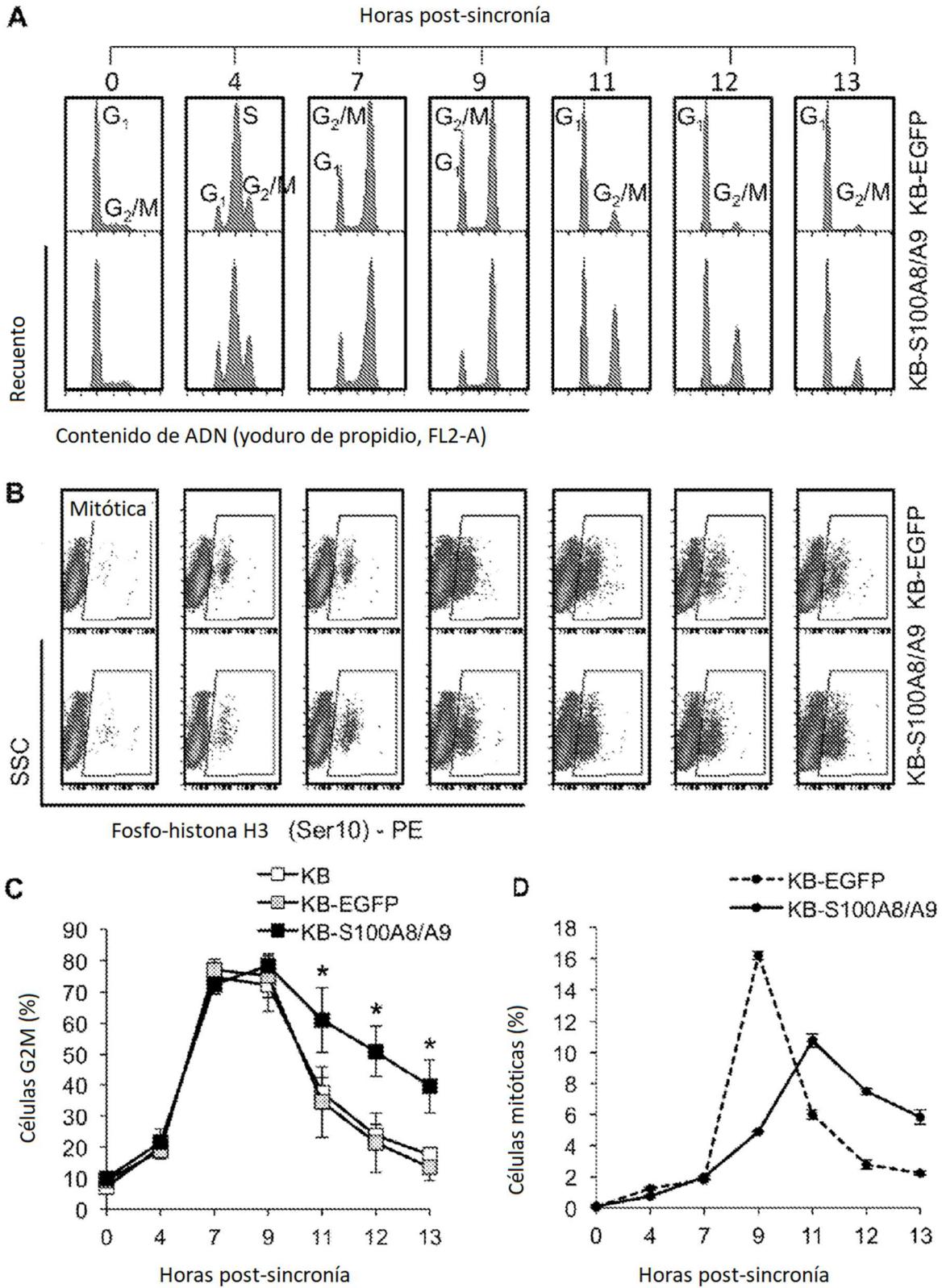


Fig. 10

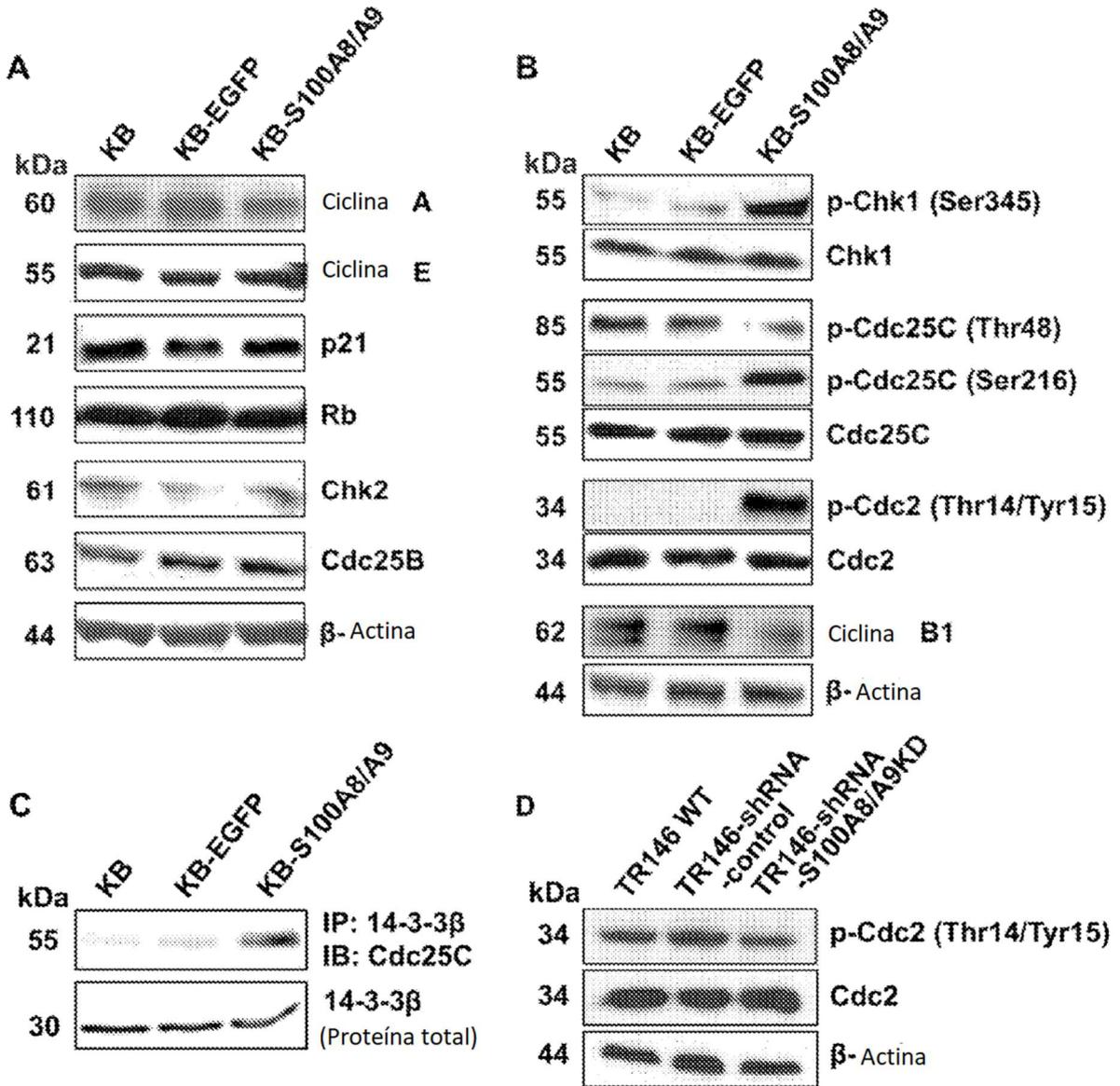


Fig. 11

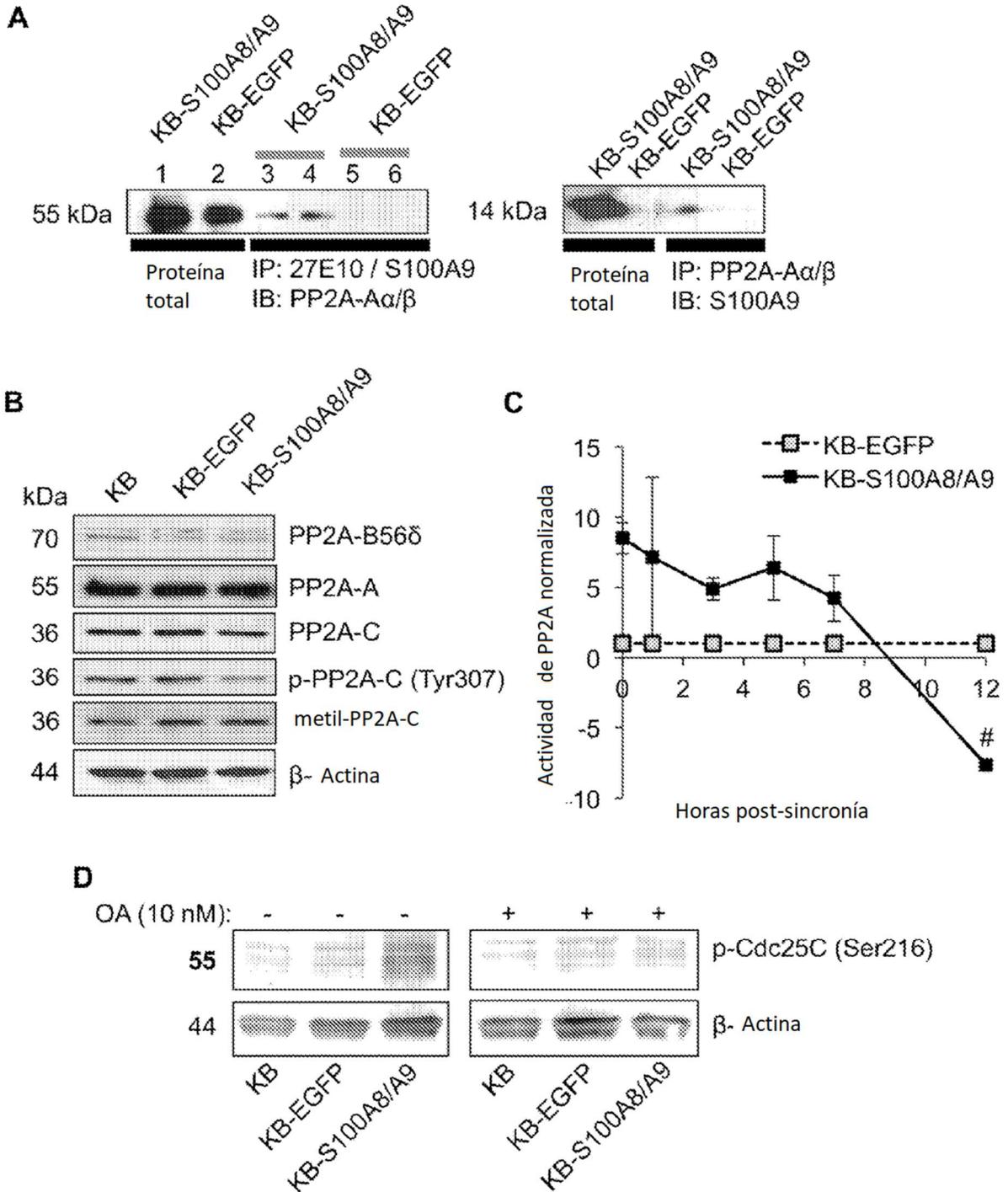


Fig. 12

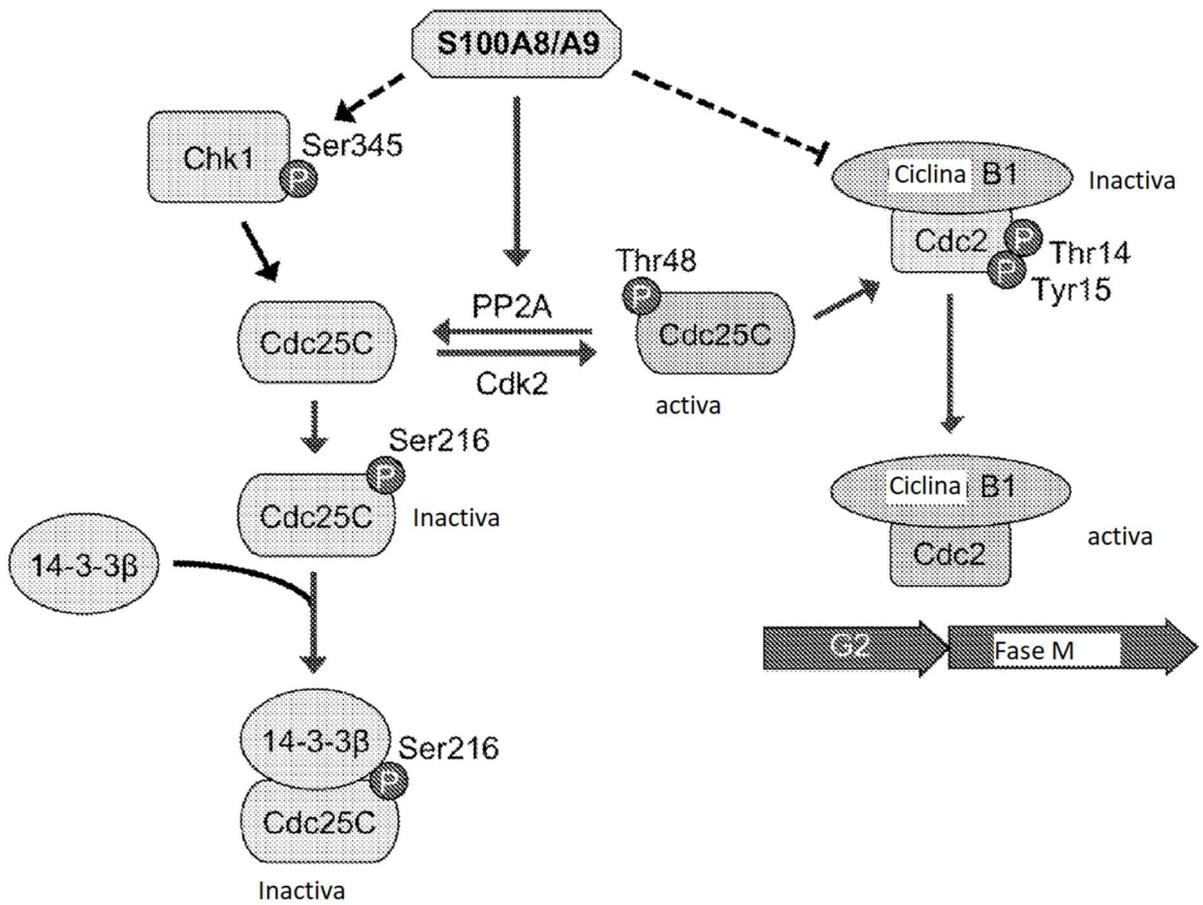


Fig. 13

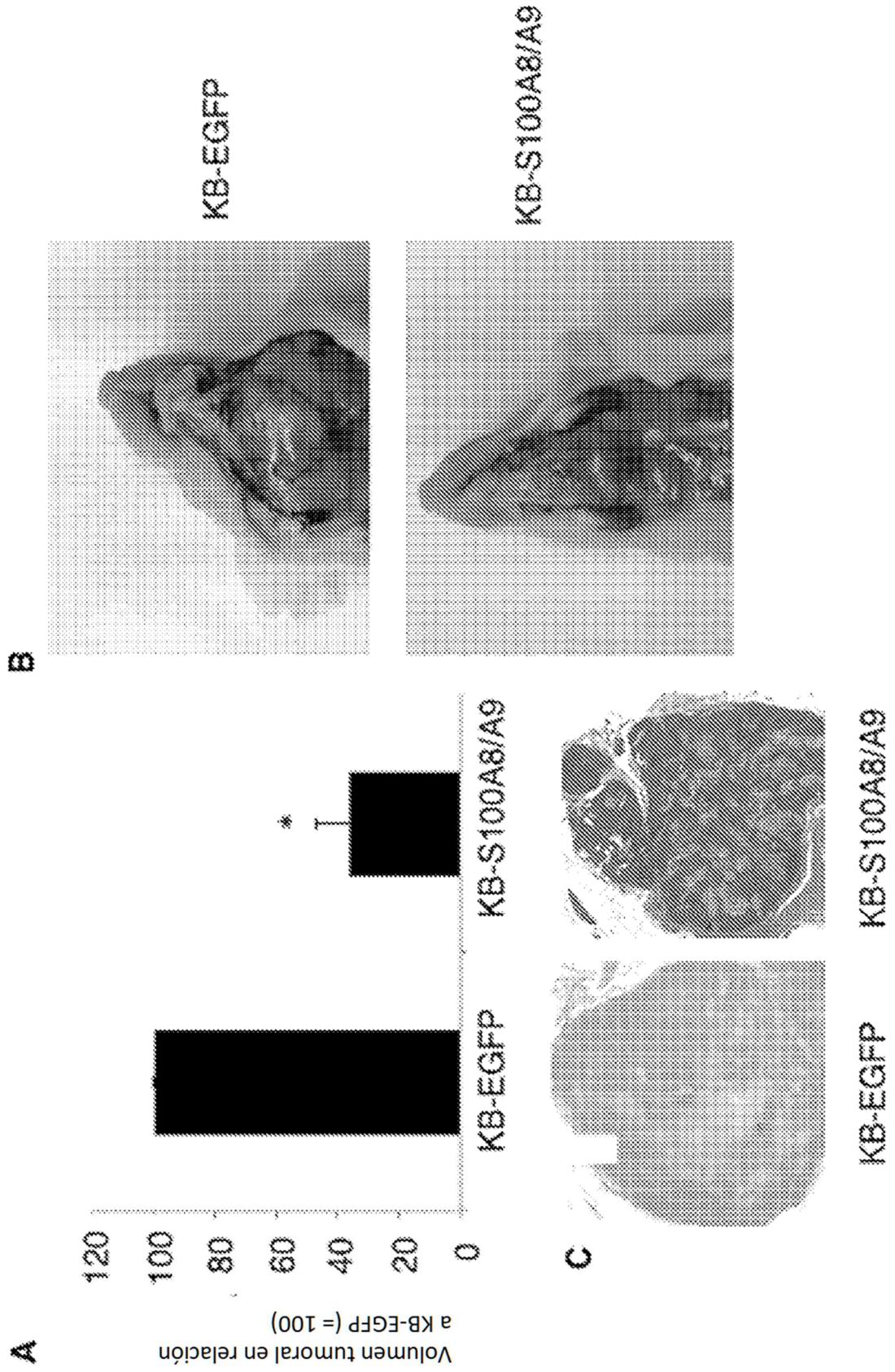


Fig. 14

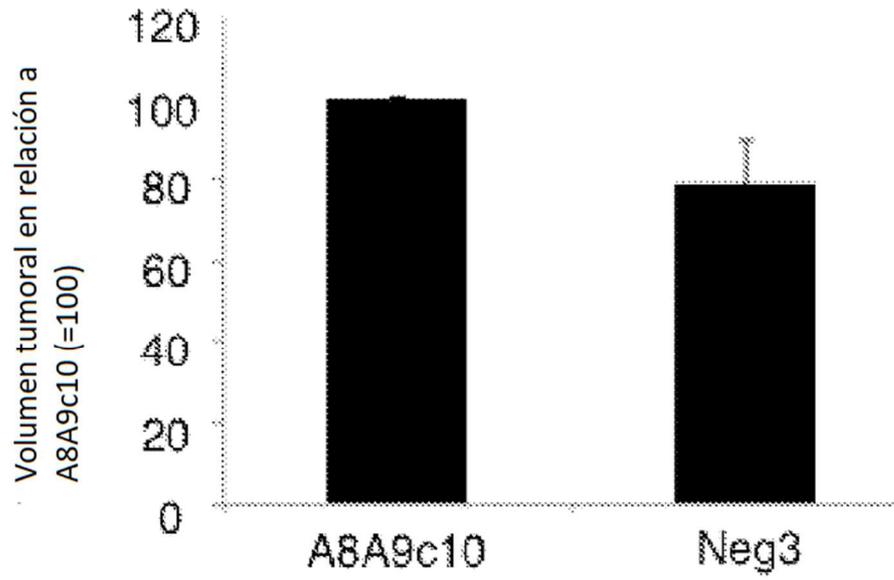


Fig. 15

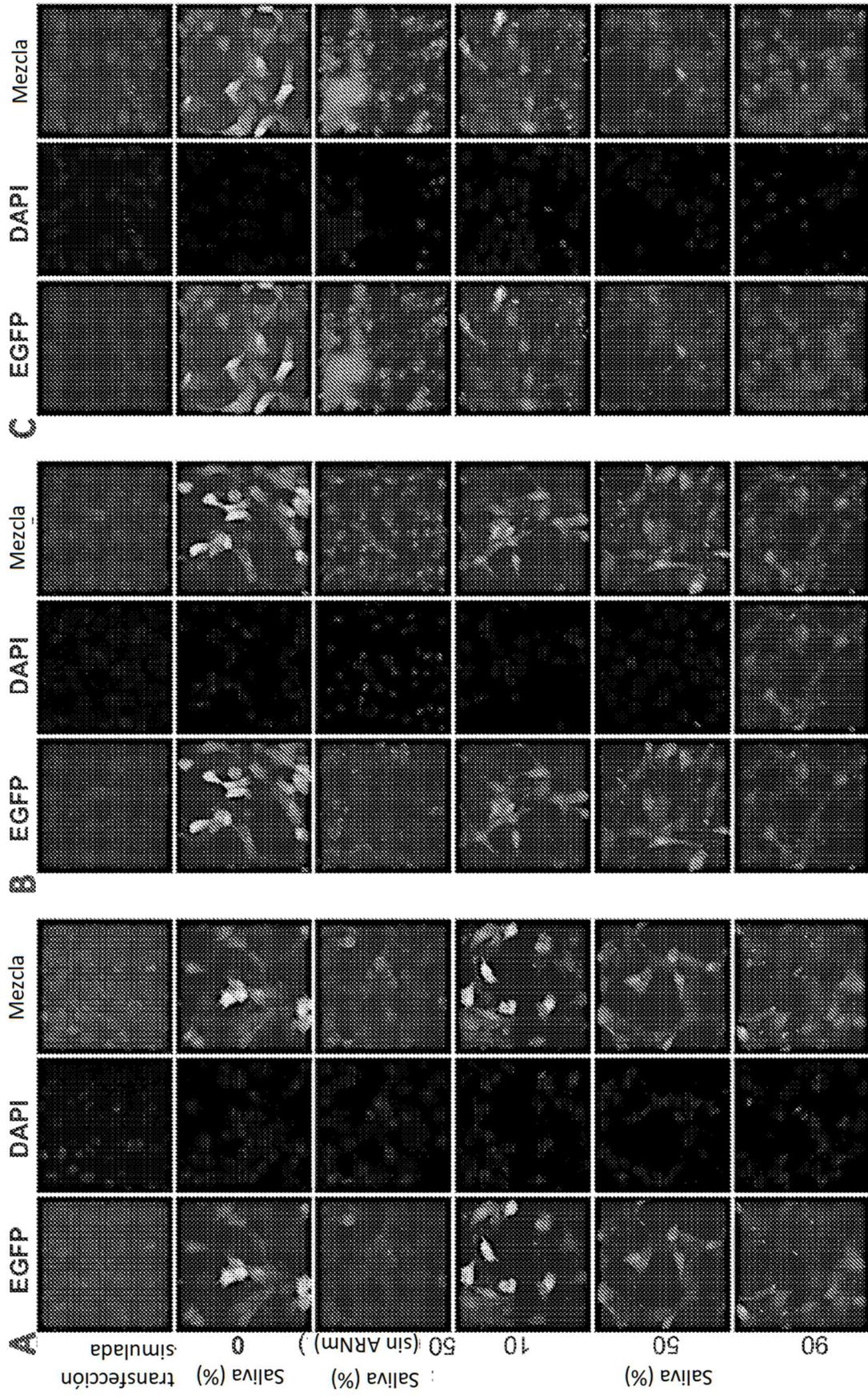


Fig. 16

