

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 432**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2011 PCT/US2011/059558**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061803**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2011 E 11838933 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2635261**

54 Título: **Composiciones y métodos para la administración de ácidos nucleicos a base de nanopolímeros**

30 Prioridad:

08.11.2010 US 411358 P

06.11.2010 US 410863 P

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

28.05.2020

73 Titular/es:

MARINE POLYMER TECHNOLOGIES, INC.

(100.0%)

1 Van De Graaff Drive, Suite 302

Burlington, MA 01803, US

72 Inventor/es:

VOURNAKIS, JOHN, N. y

DEMACHEVA, MARINA, V.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 763 432 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 y métodos para la administración de ácidos nucleicos a base de nanopolímeros

1. Introducción

5 En la presente memoria se proporciona una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, una enfermedad infecciosa o una deficiencia genética de una proteína necesaria, en donde la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico comprende poli-N-acetilglucosamina y el ácido nucleico, en donde las nanopartículas tienen un tamaño entre alrededor de 5 nm y 500 nm, y en donde 40 % a 80 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada; y en donde el método
10 comprende administrar la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico al sujeto de manera subcutánea.

Se describen además composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico que comprenden nanopartículas de derivado de lactato de poli-N-acetilglucosamina desacetilada menor que 500 nm y un ácido nucleico. Además, en la presente memoria se describen métodos para administrar un ácido nucleico a un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico.

15 2. Antecedentes

Las vacunas de ADN representan una estrategia flexible que presenta antígenos, de manera precisa y efectiva, al sistema inmunitario. Sin embargo, a pesar de todas las ventajas teóricas de las vacunas de ADN, la experiencia clínica con vacunas de ADN ha sido bastante decepcionante. Se ha hecho gradualmente evidente que uno de los problemas
20 centrales de la traducción clínica de las vacunas de ADN son las plataformas subóptimas de la administración de ADN plasmídico. Además, las plataformas mejoradas de la administración de ácido nucleico son necesarias para una amplia variedad de aplicaciones de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.

Se han elaborado plataformas víricas para la administración de ADN, como las basadas en retrovirus y adenovirus. Sin embargo, los vectores víricos tienen desventajas significativas. La administración de los virus recombinantes induce una respuesta inmunitaria a las proteínas víricas, una respuesta que puede ser alrededor de 20 veces superior
25 a las inducidas por el transgén (ver Harrington et al., 2002, Hum. Gene Ther. 13(11):1263-1280; y Harrington et al., 2002, J. Virol. 76(7):3329-3337). Tal respuesta inmunitaria limita la respuesta inmunitaria al transgén en sí mismo. La preexistencia de una inmunidad mediada por anticuerpo y linfocitos T a las partículas víricas también limita la capacidad de una administración posterior de virus recombinantes (ver Barouch et al., 2003, J. Virol. 77(13):7367-7375; Premenko-Lanier et al., 2003, Virology 307(1):67-75; Ramirez et al., 2000, J. Virol. 74(16):7651-7655; y Ramirez et al., 2000, J. Virol. 74(2):923-933), y, por tanto, no permite regímenes de tratamiento repetidos. La administración
30 repetida de tal vector conduce a la generación de anticuerpos neutralizantes contra ellos (ver Tewary et al., 2005, J. Infect. Dis. 191(12):2130-2137). Si bien la administración repetida puede lograrse mediante el uso de diferentes vectores víricos, tales enfoques son trabajosos y requieren la preparación de grandes cantidades de diferentes vectores víricos que plantean preocupaciones de bioseguridad. Además, las plataformas de administración vírica crean un riesgo de interacción de las secuencias genéticas víricas con las de un genoma hospedador. También se conoce que la mayoría de los vectores víricos se degradan mediante nucleasas séricas de forma tal que casi el 90 % de los vectores víricos inyectados se degradan dentro de las 24 horas (ver Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:97-129; y Varmus, 1988, Science 240(4858):1427-1435). La rápida degradación de los vectores víricos puede producir su incapacidad para alcanzar las células objetivo. En conjunto, las plataformas víricas para la administración
35 de ácido nucleico están significativamente limitadas.

También se ha demostrado que las plataformas no víricas para la administración de ADN, que incluyen liposomas (lipoplejo), polímeros sintéticos (poliplejo) (ver Wasungu et al., 2006, J. Control. Release 116(2):255-264; y Wasungu, 2006, Biochim. Biophys. Acta 1758(10): 1677-1684) y quitosano (ver Mansouri et al. 2004, Eur. J. Pharm. Biopharm. 57 (1): 1-8), son subóptimas. La preparación de lipoplejos es muy demandante y requiere la formulación de ADN en el vehículo (ver Wasungu et al., 2006, J. Control Release 116(2):255-264; y Wasungu, 2006, Biochim. Biophys. Acta 1758(10): 1677-1684). Además, las publicaciones de Wasungu et al. muestran que diversos factores físicos, como pH y carga y las características estructurales de los liposomas, afectan las interacciones de liposomas con el ADN, y que los lipoplejos alcanzan una baja eficiencia de transducción debido a su rápida depuración de la circulación. El proceso de ensamblaje de lipoplejo y poliplejo podría comprometer la integridad estructural del ADN plasmídico, de forma tal
45 que el empaquetamiento ineficiente resultante de plásmido en la membrana del lipoplejo puede afectar la interacción de los lipoplejos con las superficies celulares. Esto puede provocar una muy mala transcripción de los genes administrados por lipoplejo o poliplejo (ver Hama, 2006, Mol. Ther. 13(4):786-794). Asimismo, la mayoría de los poliplejos requieren la transfección conjunta con agentes endosomalíticos debido a su incapacidad para liberar el ADN intracelular en el citoplasma (ver Forrest and Pack, 2002, Mol. Ther. 6(1):57-66).

55 La heterogeneidad física y química de los productos poliméricos y la contaminación de las preparaciones de quitina y quitosano por proteínas y otros componentes ha dificultado el uso de productos a base de quitina y quitosano en las aplicaciones de administración de ADN (ver Voumakis et al., 2004, J. Trauma 57(1 Suppl.):S2-6).

US2010/0086613 describe nanopartículas de ADN-quitosano, en donde al menos 81 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada.

Por consiguiente, existe una necesidad de una plataforma no vírica para la administración de ácido nucleico que pueda inducir una alta eficiencia de transfección, pero sin inducir la toxicidad. También existe una necesidad de un vehículo de administración que permita la liberación sostenida de ácidos nucleicos, lo que permite la administración repetida pero reduce su frecuencia.

5 **3. Compendio**

En la presente memoria se proporcionan composiciones de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico ("p-GlcNAc").

10 En un aspecto, en la presente memoria se proporciona una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, una enfermedad infecciosa o una deficiencia genética de una proteína necesaria, en donde la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico comprende poli-N-acetilglucosamina y el ácido nucleico, en donde las nanopartículas tienen un tamaño entre alrededor de 5 nm y 500 nm, y en donde 40 % a 80 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada; y en donde el método comprende administrar la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico al sujeto de manera subcutánea.

15 En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un animal no humano.

En algunas realizaciones, la administración de la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico produce una expresión sostenida del ácido nucleico durante al menos 1 semana, 2 semanas o 4 semanas en el sitio de administración al sujeto.

En algunas realizaciones, el método comprende la administración repetida.

20 En algunas realizaciones, la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico comprende además un adyuvante, preferiblemente, el adyuvante es una citocina o un ácido polinosínico: policitidílico ("poli I:C"). En otra realización, la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico proporciona una liberación sostenida simultánea de tanto el ácido nucleico como el adyuvante.

25 En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada comprende un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada, preferiblemente, un derivado de lactato de poli-N-acetilglucosamina desacetilada; o la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se ha solubilizado con un ácido orgánico o mineral, preferiblemente, con un ácido láctico.

30 En algunas realizaciones, al menos 50 % de las nanopartículas tienen un tamaño entre 20 nm y 200 nm o entre 25 nm y 150 nm. En algunas realizaciones, el tamaño se determina mediante microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido.

En algunas realizaciones, el método es parte de un protocolo de terapia génica o protocolo de vacunación. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina está de 60 % a 80 % desacetilada. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina está de 65 % a 75 % desacetilada.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN.

35 En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para elaborar una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico que comprende:

(a) agregar una base a la poli-N-acetilglucosamina para desacetilar al menos 40 % a 80 % de la poli-N-acetilglucosamina;

(b) agregar un ácido láctico para formar un derivado de lactato de poli-N-acetilglucosamina desacetilada;

40 (c) agregar un amortiguador para facilitar la dilución; y

(d) agregar un ácido nucleico, lo que elabora una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el amortiguador en la etapa (c) es amortiguador acético-acetato de sodio.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico se ha combinado con una sal, preferiblemente, sulfato de sodio.

45 En algunas realizaciones, el método comprende además:

(i) agregar un adyuvante en la etapa (d); o

(ii) combinar la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico con un adyuvante,

en donde el adyuvante es preferiblemente poli I:C.

En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina está de 60 % a 80 % desacetilada. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina está de 65 % a 75 % desacetilada.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN.

5 También se describe en la presente memoria que las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprenden poli-N-acetilglucosamina y un ácido nucleico, en donde al menos 40 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN. En determinadas realizaciones, las nanopartículas en las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño de entre
10 alrededor de 5 nm y 500 nm. En algunas realizaciones, al menos 50 % de las nanopartículas en las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño entre alrededor de 5 nm y 500 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas en las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño de entre alrededor de 10 nm y 500 nm, 20 nm y 200 nm, 20 nm y 150 nm, 20 nm y 100 nm, 25 nm y 250 nm, 25 nm y 150 nm y 150 nm, 25 nm y 100 nm, 50 nm y 200 nm o 50 nm y 150 nm. En realizaciones específicas, al menos 50 % de las nanopartículas en las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño de entre
15 alrededor de 10 nm y 500 nm, 20 nm y 200 nm, 20 nm y 150 nm, 20 nm y 100 nm, 25 nm y 250 nm, 25 nm y 150 nm, 25 nm y 100 nm, 50 nm y 200 nm o 50 nm y 150 nm. En realizaciones particulares, al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las nanopartículas tienen un tamaño de entre alrededor de 5 nm y 500 nm, 10 nm y 500 nm, 20 nm y 200 nm, 20 nm y 150 nm, 20 nm y 100 nm, 25 nm y 250 nm, 25 nm y 150 nm, 25 nm y 100 nm, 50 nm y 200 nm o 50 nm y 150 nm. En determinadas realizaciones, el tamaño de las nanopartículas se determina mediante microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunas realizaciones, la composición
20 comprende además un adyuvante. En una realización particular, el adyuvante es Poli I:C. En otra realización, el adyuvante es una citocina.

En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada en la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprende un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada en la composición comprende un derivado de lactato de poli-N-acetilglucosamina desacetilada. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada en la composición se ha solubilizado con un ácido orgánico o mineral. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada en la composición se ha solubilizado con ácido láctico.

En determinados ejemplos, en la presente memoria se describen composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico, en donde al menos 65 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En algunos ejemplos, al menos 70 % de la poli-N-acetilglucosamina en la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico está desacetilada. En una realización, alrededor de 60 % a alrededor de 80 % (p. ej., 60 % a 80 %) de la poli-N-acetilglucosamina en la composición está desacetilada. En otras realizaciones, alrededor de 40 % a alrededor de 80 %, alrededor de 50 % a alrededor de 80 %, alrededor de 55 % a alrededor de 80 %, alrededor de 65 % a alrededor de 80 % o alrededor de 65 % a alrededor de 75 % de la poli-N-acetilglucosamina en la composición está desacetilada.

35 En otros ejemplos, alrededor de 40 % a alrededor de 90 % (p. ej., 40 % a 90 %) de la poli-N-acetilglucosamina en la composición está desacetilada. En otros ejemplos, alrededor de 40 % a alrededor de 95 %, alrededor de 40 % a alrededor de 85 %, alrededor de 50 % a alrededor de 95 %, alrededor de 50 % a alrededor de 90 %, alrededor de 50 % a alrededor de 85 %, alrededor de 55 % a alrededor de 95 %, alrededor de 55 % a alrededor de 90 %, alrededor de 55 % a alrededor de 85 %, alrededor de 60 % a alrededor de 95 %, alrededor de 60 % a alrededor de 90 %, alrededor de 60 % a alrededor de 85 %, alrededor de 65 % a alrededor de 95 %, alrededor de 65 % a alrededor de 90 % o alrededor de 65 % o alrededor de 85 % de la poli-N-acetilglucosamina en la composición está desacetilada.

En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina en la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico es una fibra de alrededor de 50 a alrededor de 200 μm de longitud. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina en la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico es una fibra de 50 a 100 μm de longitud. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina en la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tiene un peso molecular de al menos 2×10^6 Da o al menos 2.5×10^6 Da, o peso molecular entre alrededor de 2×10^6 Da y alrededor de 3.5×10^6 Da o entre alrededor de 2.5×10^6 Da y alrededor de 3×10^6 Da.

También se describe en la presente memoria que las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprenden nanopartículas derivadas de lactato poli-N-acetilglucosamina desacetilada menores que 500 nm y un ácido nucleico. En determinadas realizaciones, al menos 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de las nanopartículas tienen un tamaño de 100 a 200 nm como se determina mediante, p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunas realizaciones, la composición comprende además un adyuvante. En una realización específica, el adyuvante es Poli I:C. En otra realización, el adyuvante es una citocina.

En la presente memoria se describen métodos para administrar un ácido nucleico a un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un animal no humano. En determinadas realizaciones, la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra de manera subcutánea al sujeto. En realizaciones específicas, la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra de manera subcutánea a células epiteliales de un sujeto. En otras realizaciones, la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra de manera intramuscular o intravenosa a un sujeto. Los métodos descritos en la

presente memoria se basan, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la administración de composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico a un sujeto producen la expresión sostenida de ácido nucleico en el sitio de administración. Además, el ácido nucleico expresado puede ser tomado efectivamente por células presentadoras de antígeno profesionales y transportado a los ganglios linfáticos de drenaje, lo que produce una actividad de linfocitos T CD8+ específica. En algunas realizaciones, la administración de la composición produce una expresión sostenida del ácido nucleico en la composición durante al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 4 semanas, al menos 6 semanas o al menos 2 meses. En determinadas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra de manera repetida a un sujeto (p. ej., dos veces, tres veces, cuatro veces o más de tres o cuatro veces; o una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 8 semanas). En algunas realizaciones, la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra de manera repetida en el transcurso de un período de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 2 años, 3 años, 4 años o 5 años (o más de 1 año o 5 años).

En la presente memoria se describen métodos para administrar un ácido nucleico y un adyuvante a un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico y un adyuvante. El adyuvante puede administrarse en la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico, o administrarse de manera simultánea con la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico (p. ej., en una composición separada que comprende p-GlcNAc y un adyuvante). En algunas realizaciones, administrar de la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico que comprende un ácido nucleico y un adyuvante produce una liberación sostenida simultánea tanto del ácido nucleico como del adyuvante.

En la presente memoria se describen métodos de elaboración de una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico. En particular, en la presente memoria se describen métodos de elaboración de la composición que comprenden: (a) agregar una base a poli-N-acetilglucosamina para desacetilar al menos 40 % de la poli-N-acetilglucosamina; (b) agregar un ácido mineral o ácido orgánico para formar un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada; (c) agregar un amortiguador para facilitar la dilución; y (d) agregar un ácido nucleico; lo que elabora una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico. En una realización, el ácido mineral o ácido orgánico es ácido láctico. En algunos ejemplos, el ácido mineral o ácido orgánico es ácido glicólico, succínico, cítrico, glucónico, glucorónico, málico, pirúvico, tartárico, tartrónico o fumárico. En realizaciones específicas, el amortiguador en la etapa (c) es amortiguador acético-acetato de sodio o amortiguador acético-acetato de amonio. En algunas realizaciones, el ácido nucleico se ha combinado con una sal (p. ej., sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de calcio o sulfato de magnesio) antes de la etapa (d) (en la cual se agrega el ácido nucleico al derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada diluido en un amortiguador). En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina utilizada para elaborar las composiciones de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico está de 60 % a 80 % desacetilada. En algunas realizaciones específicas, la poli-N-acetilglucosamina utilizada para elaborar las composiciones descritas está de 40 % a 80 %, alrededor de 50 % a alrededor de 80 %, alrededor de 55 % a alrededor de 80 %, alrededor 65 % a alrededor de 80 %, o alrededor de 65 % a alrededor de 75 % desacetilada.

En determinados ejemplos, la poli-N-acetilglucosamina utilizada para elaborar las composiciones de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico está de 40 % a 90 % desacetilada o más de 65 % desacetilada. En algunos ejemplos específicos, la poli-N-acetilglucosamina utilizada para elaborar las composiciones descritas está de alrededor de 40 % a alrededor de 95 %, alrededor de 40 % a alrededor de 85 %, alrededor de 50 % a alrededor de 95 %, alrededor de 50 % a alrededor de 90 %, alrededor de 50 % a alrededor de 85 %, alrededor de 55 % a alrededor de 95 %, alrededor de 55 % a alrededor de 90 %, alrededor de 55 % a alrededor de 85 %, alrededor de 60 % a alrededor de 95 %, alrededor de 60 % a alrededor de 90 %, alrededor de 60 % a alrededor de 85 %, alrededor de 65 % a alrededor de 95 %, alrededor de 65 % a alrededor de 90 % o alrededor de 65 % a alrededor de 85 % desacetilada.

En determinadas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos para elaborar la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico, que comprenden además agregar un adyuvante en la etapa (d) descrita anteriormente. En aun otras realizaciones, en la presente memoria se describen métodos para elaborar la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico, que comprenden además combinar la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico con un adyuvante. El adyuvante puede ser cualquier adyuvante descrito en la presente memoria (p. ej., poli I:C o una citocina).

3.1 Terminología

El término "alquilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal o ramificado, en donde el alquilo se puede sustituir opcionalmente como se describe en la presente. El término "alquilo" también abarca tanto el alquilo lineal como ramificado, salvo que se especifique lo contrario. En determinadas realizaciones, el alquilo es un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal que tiene 1 a 20 (C₁₋₂₀), 1 a 15 (C₁₋₁₅), 1 a 10 (C₁₋₁₀), o 1 a 6 (C₁₋₆) átomos de carbono, o radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado de 3 a 20 (C₃₋₂₀), 3 a 15 (C₃₋₁₅), 3 a 10 (C₃₋₁₀), o 3 a 6 (C₃₋₆) átomos de carbono. Como se emplean en la presente memoria, los grupos alquilo C₁₋₆ lineal y C₃₋₆ ramificado también se denominan "alquilo inferior". Ejemplos de grupos alquilo incluyen, de modo no taxativo, metilo, etilo, propilo (incluidas todas las formas isoméricas), n-propilo, isopropilo, butilo (incluidas todas las formas isoméricas), n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo (incluidas todas las formas isoméricas) y hexilo (incluidas todas las formas isoméricas). Por ejemplo, alquilo C₁₋₆ se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente saturado

lineal de 1 a 6 átomos de carbono o un radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado de 3 a 6 átomos de carbono.

El término "alquenilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente lineal o ramificado, que contiene uno o más, en una realización, uno a cinco, enlaces dobles carbono-carbono. El alquenilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe en la presente memoria. El término "alquenilo" también abarca los radicales que tienen configuraciones "cis" y "trans" o, alternativamente, configuraciones "Z" y "E", como apreciará un experto en la técnica. Como se emplea en la presente memoria, el término "alquenilo" abarca tanto alquenilo lineal como ramificado, salvo que se especifique lo contrario. Por ejemplo, el alquenilo C₂₋₆ se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente insaturado lineal de 2 a 6 átomos de carbono o un radical de hidrocarburo monovalente insaturado de 3 a 6 átomos de carbono. En determinadas realizaciones, el alquenilo es un radical de hidrocarburo monovalente lineal de 2 a 20 (C₂₋₂₀), 2 a 15 (C₂₋₁₅), 2 a 10 (C₂₋₁₀), o 2 a 6 (C₂₋₆) átomos de carbono, o un radical de hidrocarburo monovalente ramificado de 3 a 20 (C₃₋₂₀), 3 a 15 (C₃₋₁₅), 3 a 10 (C₃₋₁₀), o 3 a 6 (C₃₋₆) átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquenilo incluyen, de modo no taxativo, etenilo, propen-1-ilo, propen-2-ilo, alilo, butenilo y 4-metilbutenilo.

El término "alquinilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente lineal o ramificado, que contiene uno o más, en una realización, uno a cinco, enlaces triples carbono-carbono. El alquinilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe en la presente memoria. El término "alquinilo" también abarca tanto el alquinilo lineal como ramificado, salvo que se especifique lo contrario. En determinadas realizaciones, el alquinilo es un radical de hidrocarburo monovalente lineal de 2 a 20 (C₂₋₂₀), 2 a 15 (C₂₋₁₅), 2 a 10 (C₂₋₁₀), o 2 a 6 (C₂₋₆) átomos de carbono, o un radical de hidrocarburo monovalente ramificado de 3 a 20 (C₃₋₂₀), 3 a 15 (C₃₋₁₅), 3 a 10 (C₃₋₁₀), o 3 a 6 (C₃₋₆) átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, de modo no taxativo, etinilo (—C≡CH) y propargilo (—CH₂C≡CH).

Por ejemplo, alquinilo C₂₋₆ se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente insaturado lineal de 2 a 6 átomos de carbono o un radical de hidrocarburo monovalente insaturado ramificado de 3 a 6 átomos de carbono.

El término "halógeno", "haluro" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo y/o yodo.

Se pretende que la expresión "opcionalmente sustituido" signifique que un grupo, como un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o alcoxi, se puede sustituir con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de, p. ej., (a) alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más, en una realización, uno, dos, tres o cuatro, sustituyentes Q; y (b) halo, ciano (—CN), nitro (—NO₂), —C(O)R^a, —C(O)OR^a, —C(O)NR^bR^c, —C(NR^a)NR^bR^c, —OR^a, —OC(O)R^a, —OC(O)OR^a, —OC(O)NR^bR^c, —OC(=NR^a)NR^bR^c, —OS(O)R^a, —OS(O)₂R^a, —OS(O)NR^bR^c, —OS(O)₂NR^bR^c, —NR^bR^c, —NR^aC(O)R^d, —NR^aC(O)OR^d, —NR^aC(O)NR^bR^c, —NR^aC(=NR^d)NR^bR^c, —NR^aS(O)R^d, —NR^aS(O)₂R^d, —NR^aS(O)NR^bR^c, —NR^aS(O)₂NR^bR^c, —SR^a, —S(O)R^a, —S(O)₂R^a, —S(O)NR^bR^c, y —S(O)₂NR^bR^c, en donde cada R^a, R^b, R^c y R^d es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, arilo C₆₋₁₄, heteroarilo o heterociclilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más, en una realización, uno, dos, tres o cuatro, sustituyentes Q; o (iii) R^b y R^c, junto con el átomo N al que se unen, forman heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o más, en una realización, uno, dos, tres o cuatro, sustituyentes Q. Como se emplea en la presente memoria, todos los grupos que pueden ser sustituidos son "opcionalmente sustituidos", salvo que se especifique lo contrario.

En una realización, cada Q se selecciona independientemente del grupo que consiste en (a) ciano, halo y nitro; y (b) alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, arilo C₆₋₁₄, heteroarilo y heterociclilo; y —C(O)R^e, —C(O)OR^e, —C(O)NR^fR^g, —C(NR^e)NR^fR^g, —OR^e, —OC(O)R^e, —OC(O)OR^e, —OC(O)NR^fR^g, —OC(=NR^e)NR^fR^g, —OS(O)R^e, —OS(O)₂R^e, —OS(O)NR^fR^g, —OS(O)₂NR^fR^g, —NR^fR^g, —NR^eC(O)R^h, —NR^eC(O)OR^h, —NR^eC(O)NR^fR^g, —NR^eC(=NR^h)NR^fR^g, —NR^eS(O)R^h, —NR^eS(O)₂R^h, —NR^eS(O)NR^fR^g, —NR^eS(O)₂NR^fR^g, —SR^e, —S(O)R^e, —S(O)₂R^e, —S(O)NR^fR^g, y —S(O)₂NR^fR^g; en donde cada R^e, R^f, R^g y R^h es independientemente (i) hidrógeno; (ii) alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, arilo C₆₋₁₄, heteroarilo o heterociclilo; o (iii) R^f y R^g, junto con el átomo N al que se unen, forman heterociclilo.

4. Breve descripción de las figuras

Figura 1 (A)-(F). Micrográficos electrónicos de barrido de nanopartículas de p-GlcNAc.

Figura 2. Detección bioluminiscente de la actividad de luciferasa después de la vacunación con ADN plasmídico que codifica la luciferasa con o sin nanopartículas de p-GlcNAc. El ADN plasmídico que codifica el gen para la luciferasa se administró según se indica (es decir, inyección subcutánea de ADNp desnudo; inyección subcutánea de nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp, o inyección intramuscular de ADN desnudo). Se detectó actividad de luciferasa después de la inyección intraperitoneal (i.p.) de luciferina en el intervalo de tiempo indicado. La bioluminiscencia se sometió a imagenología con el uso del sistema IVIS. Las nanopartículas de p-GlcNAc liberan efectivamente ADN 1, 7 y 14 días después de la inyección subcutánea.

Figura 3. La administración de ADN con el uso de la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN produce la absorción y el transporte del antígeno codificado al ganglio linfático de drenaje mediante las células presentadoras de antígeno profesionales. Seis ratones fueron inyectados en la almohadilla de la pata con nanopartículas de p-GlcNAc solas (n=3) o con nanopartículas de p-GlcNAc mezcladas con 100 µg de ADN plasmídico que codifica GFP (n=3). Un día después de la inyección, se extirparon los ganglios linfáticos poplíteos y se tiñeron las suspensiones celulares con

el anticuerpo monoclonal contra MHC clase II conjugado con PE. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran el porcentaje de células MHC clase II positivas con señal de GFP. Cada histograma representa un ratón individual.

5 Figura 4. La proliferación de células Pmel donantes en respuesta a la vacunación hgp100. La vacunación de nanopartícula de p-GlcNAc/phgp100 induce respuestas específicas a CD8+. Se vacunaron los ratones de manera subcutánea según se indica 24 horas después de la transferencia adoptiva de 10^6 esplenocitos de Pmel (Thy1.1⁺). Los niveles de células Pmel en circulación se determinaron mediante citometría de flujo. La frecuencia de células donantes se muestra como promedio de porcentaje de linfocitos T CD8⁺ total (n=3)±SDEV.

10 Figura 5. La administración conjunta de ADN y Poli I:C con nanopartículas de p-GlcNAc potencia la inmunidad antitumoral y la eficacia terapéutica de las vacunas de ADN que codifican antígenos tumorales propios. (A) Ratones (n=5) fueron inyectados de manera intravenosa (i.v.) con 3×10^4 células del melanoma B16. Se dieron tres vacunaciones subcutáneas con intervalos de tres días, con inicio el tercer día después de la inyección celular del tumor B16 (es decir, con control salino, nanopartícula de p-GlcNAc/pTRP2 o nanopartícula de p-GlcNAc/pTRP2/Poli I:C). Posteriormente, se sacrificaron los animales y se extirparon y pesaron los pulmones. (B) Ratones (n=5) fueron inyectados de manera subcutánea (s.c.) con 10^5 células del melanoma B16. Se dieron tres vacunaciones subcutáneas con intervalos de tres días, con inicio el quinto día después de la inyección celular del tumor B16 (es decir, con control salino, nanopartícula de p-GlcNAc/pTRP2 o nanopartícula de p-GlcNAc/pTRP2/Poli I:C). Después del tratamiento, se monitoreó la evolución del tumor tres veces a la semana.

5. Descripción detallada

20 5.1 Composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico

En la presente memoria se describen composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico. En determinadas realizaciones, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN comprenden poli-N-acetilglucosamina o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración β -1 \rightarrow 4. En otras realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración α -1 \rightarrow 4. En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina es alrededor de 100 %, 99.9 %, 99.8 %, 99.5 %, 99 %, 98 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 % o 20 % pura. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina es de 90 a 100 % pura. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina es más de 90 %, más de 95 %, más de 98 %, más de 99 % pura o más de 99.5 % pura. En determinadas realizaciones, el 40 % a 80 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 50 % a 80 %, 60 % a 80 %, 65 % a 75 %, 65 % a 80 % o 75 % a 80 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En determinados ejemplos, el 25 % a 50 %, 40 % a 95 %, 40 % a 90 %, 50 % a 95 %, 50 % a 90 %, 60 % a 95 %, 60 % a 90 %, 65 % a 95 %, 65 % a 90 %, 65 % a 80 %, 70 % a 90 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En algunos ejemplos, el 25 %, 35 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En algunos ejemplos, al menos o más del 25 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En realizaciones específicas, la poli-N-acetilglucosamina o poli-N-acetilglucosamina desacetilada se deriva con un ácido orgánico o ácido mineral para formar una sal de amonio para facilitar su solubilización. En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina o poli-N-acetilglucosamina desacetilada se deriva con ácido láctico. En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina o poli-N-acetilglucosamina desacetilada se deriva con ácido láctico para facilitar su solubilización. Las patentes de EE. UU. n.º 5,622,834; 5,623,064; 5,624,679; 5,686,115; 5,858,350; 6,599,720; 6,686,342; y 7,115,588 describen la poli-N-acetilglucosamina y sus derivados, y métodos de producir los mismos.

Por ejemplo, la poli-N-acetilglucosamina puede ser producida y purificada por microalgas, preferiblemente diatomeas. Las diatomeas que pueden utilizarse como fuentes de partida para la producción de la poli-N-acetilglucosamina incluyen, de modo no taxativo, miembros del género *Coscinodiscus*, el género *Cyclotella*, y el género *Thalassiosira*. La poli-N-acetilglucosamina puede obtenerse de cultivos de diatomeas mediante una variedad de métodos diferentes, que incluyen el método de fuerza mecánica y método químico/biológico conocido en la técnica (ver, p. ej. las patentes de EE. UU. n.º 5,622,834; 5,623,064; 5,624,679; 5,686,115; 5,858,350; 6,599,720; 6,686,342; y 7,115,588). En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina no es derivada de uno o más de los siguientes: un marisco, un crustáceo, insecto, hongo o levaduras. En determinadas realizaciones, las composiciones no comprenden fibras de colágeno. En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina es alrededor de 100 %, 99.9 %, 99.8 %, 99.5 %, 99 %, 98 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 % o 20 % pura. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina es de 90 a 100 % pura. En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina son fibras mayores que 15 μ m. En realizaciones específicas, la poli-N-acetilglucosamina son fibras con una longitud mayor que 15 μ m. En algunas realizaciones, más del 50 %, más del 75 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 99 % de las fibras de poli-N-acetilglucosamina tienen una longitud mayor que 15 μ m. En una realización, 100 % de la poli-N-acetilglucosamina son fibras con una longitud mayor que 15 μ m. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina son fibras de 50 a 200 μ m, 50 a 150 μ m, 50 a 100 μ m, u 80 a 100 μ m de longitud. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina son fibras con diámetros de 10 a 25 nm, 10 a 50 nm, 25 a 50 nm o 50 a 100 nm. En algunos ejemplos, la poli-N-acetilglucosamina son fibras con diámetros de 1 a 5 nm, 2 a 4 nm o 2 a 10 nm.

60 La poli-N-acetilglucosamina puede desacetilarse mediante el tratamiento de la poli-N-acetilglucosamina con una base para producir residuos de glucosaminas con grupos amino libres. Este proceso de hidrólisis puede llevarse a cabo con

soluciones de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio concentrados a temperaturas elevadas. De manera alternativa, se puede emplear un procedimiento enzimático que utiliza una enzima desacetilasa de quitina para la desacetilación de la poli-N-acetilglucosamina con el uso de técnicas conocidas en la técnica. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina se desacetila con el uso de los métodos descritos en la Sección 6.1, *infra*. En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada tiene un peso molecular de 1×10^4 Da a 3.5×10^6 Da, 5×10^4 Da a 3.5×10^6 Da, 1×10^5 Da a 3.5×10^6 Da, 5×10^5 Da a 3.5×10^6 Da, 1×10^6 Da a 3×10^6 Da, 1.5×10^6 Da a 3.5×10^6 Da, 1.5×10^6 Da a 3×10^6 Da, 2×10^6 Da a 3×10^6 Da, 2×10^6 Da a 5×10^6 Da, 2×10^6 Da a 8×10^6 Da. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada tiene un peso molecular de 2.8×10^6 Da. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada tiene un peso molecular de al menos 1×10^4 Da. En una realización, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada tiene un peso molecular de al menos 2×10^6 Da. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada tiene un peso molecular menor que 3×10^6 Da.

En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada puede derivarse, lo que incluye la sustitución de contraiones para formar derivados de sal, con cualquier ácido orgánico o ácido mineral para formar una sal de amonio de p-GlcNAc. En algunas realizaciones, el ácido orgánico tiene la estructura RCOOH, donde R es alquilo, alqueno o alquino opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es alquilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es alquilo sustituido con uno o más grupos hidroxilo. En determinadas realizaciones, RCOOH es ácido glicólico o ácido láctico. En otras realizaciones, RCOOH es ácido cítrico, succínico, glucónico, glucorónico, málico, pirúvico, tartárico, tartrónico o fumárico. En una realización particular, RCOOH es ácido láctico. En determinadas realizaciones, la relación de la poli-N-acetilglucosamina desacetilada con la poli-N-acetilglucosamina es 1:1, 1.2: 2:1, 1:3, o 3:1. En una realización específica, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se puede derivar con ácido láctico con el uso de los métodos descritos en la Sección 6.1, *infra*. En algunas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se deriva para hacerla soluble. En determinadas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se solubiliza mediante incubación con cualquier ácido orgánico o ácido mineral (descrito en la presente memoria o conocido en la técnica). En realizaciones específicas, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se deriva para formar una sal de amonio de p-GlcNAc soluble. En algunas realizaciones, la solubilidad de la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se alcanza a un pH de alrededor de 4 a un pH de alrededor de 5, p. ej., pH 4, pH 4.5, pH 5 o un pH entre 4 y 5. En una realización, la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se incuba con ácido láctico para hacerla soluble (por ejemplo, a un pH 4 a pH 5, como pH 4.5). En tal realización, el ion H^+ se sustituye por el contraión de lactato para facilitar la solubilización de la poli-N-acetilglucosamina desacetilada.

En determinadas realizaciones, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprenden un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada, como un derivado de lactato. En una realización específica, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprenden un derivado de lactato de poli- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina desacetilada. En determinadas realizaciones, el 40 % a 80 %, 50 % a 80 %, 60 % a 80 %, 65 % a 80 %, 75 % a 80 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 % o 65 % a 75 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En algunas realizaciones, el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En determinados ejemplos, el 25 % a 50 %, 40 % a 95 %, 40 % a 90 %, 50 % a 95 %, 50 % a 90 %, 60 % a 95 %, 60 % a 90 %, 65 % a 95 %, 65 % a 90 %, 70 % a 95 %, 70 % a 90 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En algunos ejemplos, el 25 %, 35 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En algunos ejemplos, al menos o más del 25 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada. En una realización específica, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico son las composiciones producto del proceso descrito en la Sección 6.1, *infra*.

En una realización específica, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprenden un ácido nucleico, como se describe en la Sección 5.2, *infra*. En determinadas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprende 0.1 μ g a 2 mg, 0.2 μ g a 1 mg, 0.5 μ g a 500 μ g, 1 μ g a 750 μ g, 1 μ g a 500 μ g, 1 μ g a 200 μ g, 1 μ g a 100 μ g, 1 μ g a 50 μ g, 5 μ g a 25 μ g, 5 μ g a 15 μ g, 50 μ g a 150 μ g, 1 μ g a 5 μ g, 2 μ g a 5 μ g, 1 μ g a 10 μ g, 5 μ g a 10 μ g, 5 μ g a 15 μ g, 10 μ g a 15 μ g, 10 μ g a 20 μ g, 15 μ g a 25 μ g, 100 μ g a 750 μ g, 100 μ g a 500 μ g, 100 μ g a 1 mg, o 500 μ g a 750 μ g de un ácido nucleico. En algunas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprende dos, tres o más tipos diferentes de ácido nucleico. En algunas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprende dos, tres o más ácidos nucleicos diferentes que codifican dos, tres o más péptidos, polipéptidos o proteínas diferentes. En determinadas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprende un adyuvante además de un ácido nucleico.

En determinadas realizaciones, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico no comprenden una cantidad significativa de material proteínico. En determinadas realizaciones, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico no comprenden ningún adyuvante proteínico ni peptídico. En otras realizaciones, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprenden como máximo 0.1 %, 0.5 % o 1 % en peso de material proteínico. En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprenden como máximo 0.1 %, 0.5 %, 1 % o 2 % en peso de material proteínico como se determina mediante cualquier técnica conocida en la técnica (como tinción con Coomassie). En otras realizaciones, el contenido proteínico de una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico no es detectable mediante tinción con Coomassie. En aun otras realizaciones, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprenden un adyuvante proteínico o peptídico.

5 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 600 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos de esos ejemplos, al menos 25 %, al menos 35 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño de al menos 5 nm, 10 nm, 20 nm, 25 nm o 50 nm.

10 En determinados ejemplos, 25 % a 50 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 65 % a 75 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 500 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos ejemplos, 25 % a 50 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 65 % a 75 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 500 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos de esos ejemplos, al menos 25 %, al menos 35 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño de al menos 5 nm, al menos 10 nm, 20 nm, 25 nm o 50 nm.

20 En determinados ejemplos, 25 % a 50 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 65 % a 75 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 400 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos ejemplos, 25 % a 50 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 65 % a 75 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 400 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos de esos ejemplos, al menos 25 %, al menos 35 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño de al menos 5 nm, 10 nm, 20 nm, 25 nm o 50 nm.

30 En determinados ejemplos, 25 % a 50 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 65 % a 75 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 300 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos ejemplos, 25 % a 50 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 65 % a 75 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 300 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos de esos ejemplos, al menos 25 %, al menos 35 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño de al menos 5 nm, 10 nm, 20 nm, 25 nm o 50 nm.

45 En determinados ejemplos, 25 % a 50 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 65 % a 75 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 200 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos ejemplos, 25 % a 50 %, 40 % a 65 %, 50 % a 65 %, 65 % a 75 %, 75 % a 85 %, 85 % a 95 %, 90 % a 99 % o 95 % a 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño máximo de 200 nm, como se mide mediante p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido. En algunos de esos ejemplos, al menos 25 %, al menos 35 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen un tamaño de al menos 5 nm, 10 nm, 20 nm, 25 nm o 50 nm.

En determinadas realizaciones, las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen una geometría irregular. En otras realizaciones, las nanopartículas en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tienen formas geométricas regulares (p. ej., una forma redonda o esférica).

55 En una realización específica, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico es biocompatible y/o biodegradable. La biocompatibilidad puede determinarse mediante una variedad de técnicas, que incluyen, de modo no taxativo, procedimientos como la prueba de elución, la implantación intramuscular o inyección intracutánea o sistémica en sujetos animales. Tales pruebas se describen en la patente de EE. UU. n.º 6,686,342. En una realización, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico tiene un puntaje de prueba de elución de "0", un puntaje de prueba de implantación intramuscular de "0", un puntaje de prueba de inyección intracutánea de "0" y/o una ganancia de peso contrario a la pérdida de peso en respuesta a una inyección sistémica. En una realización, el polímero de fibra tiene un puntaje de prueba de elución de "0".

En una realización específica, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico biodegradables se degradan dentro de alrededor de 1 día, 2 días, 5 días, 8 días, 12 días, 17 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 55 días, 60 días, 65 días, 70 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 95 días o 100 días después de la administración o implantación en un paciente. En un aspecto, la naturaleza biodegradable lenta de las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico permite la liberación sostenida del ácido nucleico. Esta propiedad aumenta la eficiencia de transfección del ácido nucleico y protege el ácido nucleico de la degradación por las nucleasas séricas.

En determinados aspectos, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico es inmunoneutra dado que no provoca una respuesta inmunitaria. En aspectos específicos, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico es inmunoneutra, dado que no provoca una respuesta inmunitaria cuando se administra a un animal (p. ej., inyectada subcutánea o intramuscularmente en un animal como un ratón o un conejo). La naturaleza no inmunogénica de la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico permite su administración repetida en un sujeto.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico no tienen una reactividad biológica como se muestra mediante una o más pruebas de biocompatibilidad. En una realización, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico no tienen una reactividad biológica como se muestra mediante una prueba de elución, prueba de inyección subcutánea, prueba de implantación intramuscular y/o prueba de inyección sistémica.

En determinadas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede almacenarse a 20 °C a 30 °C o 20 °C a 25 °C durante un determinado período de tiempo antes del uso. En una realización específica, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede almacenarse a temperatura ambiente durante un determinado período de tiempo antes del uso. En una realización, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede almacenarse a 20 °C a 30 °C o 20 °C a 25 °C durante alrededor de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1.5 horas o 2 horas. En otra realización, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede almacenarse a 20 °C a 30 °C o 20 °C a 25 °C durante alrededor de 30 a 45 minutos, 45 minutos a 1 hora, 1 hora a 1.5 horas, 1 a 2 horas o 1.5 a 2 horas. En una realización, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede almacenarse a temperatura ambiente durante alrededor de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1.5 horas o 2 horas. En otra realización, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede almacenarse a temperatura ambiente durante 30 a 45 minutos, 45 minutos a 1 hora, 1 hora a 1.5 horas, 1 a 2 horas o 1.5 a 2 horas. En realizaciones específicas, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede almacenarse a 4 °C, 20 °C a 30 °C, 20 °C a 25 °C o a temperatura ambiente durante hasta alrededor de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1.5 horas o 2 horas. En algunas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede almacenarse a 4 °C, 20 °C a 30 °C, 20 °C a 25 °C o a temperatura ambiente durante más de 2 horas (p. ej., 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 12 horas o 24 horas) o durante más de 1 día. En una realización, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se almacena a 4 °C. En una realización específica, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede congelarse o criopreservarse (y descongelarse antes de la administración a un paciente). Por ejemplo, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede congelarse a -20 °C o -70 °C. En otras realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico no se congela, ni se criopreserva y se descongela, antes de la administración a un paciente.

5.2 Ácidos nucleicos

Una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede comprender cualquier ácido nucleico conocido para un experto en la técnica. Dichos ácidos nucleicos incluyen, de modo no taxativo, ADN y ARN, que incluyen ADNc, ADN genómico, ADN plasmídico, ARN plasmídico, ARNm, ARNip, microARN, ARN de cadena simple, ARN de cadena doble, oligonucleótidos, oligonucleótidos de cadena simple o cadena doble, oligonucleótidos de tríplex y otros ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos abarcados en la presente memoria incluyen ácidos nucleicos en orientaciones sentido o antisentido, ácidos nucleicos modificados, sin modificar y sintéticos. En realizaciones específicas, el ácido nucleico es una región codificante de un gen.

En un aspecto, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprende un ácido nucleico que codifica un péptido, un polipéptido o una proteína terapéuticos. Tales péptidos, polipéptidos o proteínas terapéuticos pueden ser útiles para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno en el cual la producción del péptido, polipéptido o proteína terapéutico beneficia a un sujeto, como cáncer, enfermedades infecciosas, deficiencias genéticas o determinadas proteínas necesarias y/o desequilibrios regulatorios o metabólicos adquiridos. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica una citocina, como interferón, IL-2, IL-12 o IL-15, puede ser útil para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades infecciosas y/o cáncer. Los ácidos nucleicos que codifican una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 7 (IGFBP-7) y otros factores pueden ser útiles para reducir la proliferación de determinadas células cancerosas (p. ej., células de cáncer de mama) y/o el crecimiento de determinados tipos de tumores (p. ej., tumores de mama). Los ácidos nucleicos que codifican la insulina pueden ser útiles para tratar y/o prevenir la diabetes. Los ácidos nucleicos que codifican, p. ej., la esfingomielinasa ácida pueden ser útiles para tratar la enfermedad de Niemann-Pick.

En otro aspecto, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno. El ácido nucleico puede codificar cualquier enfermedad objetivo de interés. Por ejemplo, el ácido

nucleico puede codificar antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos parasíticos y/o antígenos asociados al tumor. En una realización específica, el ácido nucleico codifica un autoantígeno. Los ejemplos no limitantes de antígenos víricos incluyen antígenos de adenoviridae (p. ej., mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (p. ej., virus de herpes simple 1, virus de herpes simple 2, virus de herpes simple 5, virus de herpes simple 6, virus de Epstein-Barr, HHV6-HHV8 y citomegalovirus), leviviridae (p. ej., levivirus, fago MS2 de enterobacteria, alolevirus), poxviridae (p. ej., chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus y entomopoxvirinae), papovaviridae (p. ej., polioma virus y papilomavirus), paramyxoviridae (p. ej., paramixovirus, virus de la parainfluenza 1, morbillivirus (p. ej., virus del sarampión), rubulavirus (p. ej., virus de las paperas), pneumonovirinae (p. ej., pneumovirus, virus respiratorio sincitial humano), virus respiratorio sincitial humano y metapneumovirus (p. ej., pneumovirus aviario y metapneumovirus humano)), picornaviridae (p. ej., enterovirus, rinovirus, hepatovirus (p. ej., virus de la hepatitis A humana), cardiovirus, y aftovirus), reoviridae (p. ej., orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fijivirus, phytoreovirus y oryzavirus), retroviridae (p. ej., retrovirus de mamíferos tipo B, retrovirus de mamíferos tipo C, retrovirus aviarios tipo C, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (p. ej., virus de la inmunodeficiencia humana 1 y virus de la inmunodeficiencia humana 2), spumavirus), flaviviridae (p. ej., virus de la hepatitis, hepadnaviridae (p. ej., virus de la hepatitis B), togaviridae (p. ej., alfavirus (p. ej., virus sindbis) y rubivirus (p. ej., virus de la rubeola)), rhabdoviridae (p. ej., vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus y necleorhabdovirus), arenaviridae (p. ej., arenavirus, virus coriomeningitis linfocítica, virus lppy y virus lassa) y coronaviridae (p. ej., coronavirus y torovirus).

Los ejemplos no limitantes de antígenos bacterianos incluyen antígenos de bacterias de la familia *Aquaspirillum*, familia *Azospirillum*, familia *Azotobacteraceae*, familia *Bacteroidaceae*, especie *Bartonella*, familia *Bdellovibrio*, especie *Campylobacter*, especie *Chlamydia* (p. ej., *Chlamydia pneumoniae*), clostridium, familia *Enterobacteriaceae* (p. ej., especie *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter aerogenes*, especie *Erwinia*, *Escherichia coli*, especie *Hafnia*, especie *Klebsiella*, especie *Morganella*, *Proteus vulgaris*, *Providencia*, especie *Salmonella*, *Serratia marcescens*, y *Shigella flexneri*), familia *Gardinerella*, *Haemophilus influenzae*, familia *Halobacteriaceae*, familia *Helicobacter*, familia *Legionellaceae*, especie *Listeria*, familia *Methylococcaceae*, micobacterias (p. ej., tuberculosis de *mycobacterium*), familia *Neisseriaceae*, familia *Oceanospirillum*, familia *Pasteurellaceae*, especie *Pneumococcus*, especie *Pseudomonas*, familia *Rhizobiaceae*, familia *Spirillum*, familia *Spirosomaceae*, *Staphylococcus* (p. ej., *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pyrogenes* resistentes a la metilicina), *Streptococcus* (p. ej., *Streptococcus enteritidis*, *Streptococcus fasciae*, y *Streptococcus pneumoniae*), familia *Vampirovibr Helicobacter* y familia *Vampirovibrio*.

Los ejemplos no limitantes de antígenos fúngicos incluyen antígenos del hongo de la especie *Absidia* (p. ej., *Absidia corymbifera* y *Absidia ramosa*), especie *Aspergillus*, (p. ej., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus terreus*), *Basidiobolus ranarum*, *Blastomyces dermatitidis*, especie *Candida* (p. ej., *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kerr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida quillermondii*, *Candida rugosa*, *Candida stellatoidea*, y *Candida tropicalis*), *Coccidioides immitis*, especie *Conidiobolus*, *Cryptococcus* neofoms, especie *Cunninghamella*, dermatofitos, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium gypseum*, *Mucor pusillus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhinosporidium seeberi*, *Pneumocystis carinii*, especie *Rhizopus* (p. ej., *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, y *Rhizopus microsporus*), especie *Saccharomyces*, *Sporothrix schenckii*, zigomicetos y clases como *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, y *Oomycetes*.

Los antígenos asociados a tumores no limitantes incluyen proteínas del linaje de los melanocitos (como gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), y tirosinasa) y antígenos específicos al tumor (como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, -2, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p15, beta-catenina, MUM-1, CDK4, antígenos no melanómicos, HER-2/neu (carcinoma de mama y ovarios), virus del papiloma humano E6, E7 (carcinoma de cuello uterino) y MUC-1 (carcinoma de mama, ovarios y páncreas).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican un péptido, polipéptido o proteína terapéuticos, o un antígeno, pueden determinarse mediante técnicas de clonación o encontrarse dentro de bases de datos de secuencias, como GenBank y Uniprot.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos descritos anteriormente pueden ser parte de, o contenerse de otro modo en, un vector o plásmido que proporciona elementos de regulación de la transcripción y, opcionalmente, elementos de regulación de la traducción. El vector o plásmido seleccionado dependerá de una variedad de factores, que incluyen, de modo no taxativo, la fuerza de los elementos de regulación de la transcripción.

Las técnicas para poner en práctica los aspectos de la presente invención emplearán, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular y producción y manipulación de ADN recombinante, que son habitualmente puestas en práctica por un experto en la técnica.

55 5.3 Adyuvantes

En determinadas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico descrita en la presente memoria comprende un adyuvante, o se administra en combinación con uno. El adyuvante para su administración en combinación con una composición descrita en la presente memoria puede administrarse antes, de manera simultánea o después de la administración de dicha composición. En realizaciones específicas, el adyuvante se administra en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico. En otras realizaciones, el adyuvante se administra de

manera simultánea con el ácido nucleico, pero no en la misma composición.

En algunas realizaciones, el término “adyuvante” se refiere a un compuesto que, cuando se administra en conjunto con o como parte de una composición descrita en la presente memoria, aumenta, mejora y/o potencia una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, un adyuvante puede mejorar y/o potenciar una respuesta inmunitaria a una hemaglutinina del virus de la influenza, pero cuando el compuesto se administra solo no genera una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el adyuvante genera una respuesta inmunitaria y no produce una alergia ni otra reacción adversa. Los adyuvantes pueden mejorar una respuesta inmunitaria mediante diversos mecanismos, que incluyen p. ej., el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de linfocitos B y/o T y la estimulación de los macrófagos.

En determinadas realizaciones, un adyuvante aumenta la respuesta inmunitaria intrínseca al antígeno codificado por el ácido nucleico en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico. En determinadas realizaciones, un adyuvante aumenta la respuesta inmunitaria intrínseca al antígeno codificado por el ácido nucleico en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico sin provocar cambios conformacionales en el producto codificado por el ácido nucleico. En determinadas realizaciones, un adyuvante aumenta la respuesta inmunitaria intrínseca al antígeno codificado por el ácido nucleico en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico sin provocar cambios conformacionales en el producto codificado por el ácido nucleico que afecta la forma cualitativa de la respuesta.

En realizaciones específicas, el adyuvante es una proteína o un péptido. En otras realizaciones, el adyuvante no es una proteína ni un péptido. En algunas realizaciones, el adyuvante es un químico. En otras realizaciones, el adyuvante no es un químico.

En algunas realizaciones, el adyuvante es un ácido nucleico. Tal adyuvante puede situarse en la misma o en una construcción diferente que el ácido nucleico “primario” a administrarse en una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico. Tal adyuvante puede agregarse tanto a la misma composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico “primaria” como administrarse de manera simultánea o secuencial con la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico “primaria” en un vehículo polimérico/adyuvante separado. Se pueden administrar dos o más adyuvantes (p. ej., adyuvantes de ácido nucleico) en dos o más composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico separadas. En determinadas realizaciones, el adyuvante no es un ácido nucleico.

Los ejemplos específicos de adyuvantes incluyen, de modo no taxativo, sales de aluminio (alum) (como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio), monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (MPL) (ver GB 2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), polisorbato 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), compuestos de imidazopiridina (ver solicitud internacional n.º PCT/US2007/064857, publicada como solicitud internacional n.º WO2007/109812), compuestos de imidazoquinoxalina (ver solicitud internacional n.º PCT/US2007/064858, publicada como solicitud internacional n.º WO2007/109813) y saponinas, como QS21 (ver Kensil et al., en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de EE. UU. n.º 5,057,540). En algunas realizaciones, el adyuvante es adyuvante de Freund (completo o incompleto). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (como escualeno o aceite de maní), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunitarios, como monofosforil lípido A (ver Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)). Otro adyuvante es CpG (Bioworld Today, 15 de noviembre de 1998). Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos como MPL o 3-DMP, QS21, aminoácidos monoméricos o poliméricos, como ácido poliglútamico o polilisina, u otros agentes inmunopotenciadores conocidos en la técnica.

En un aspecto, un adyuvante es una citocina, p. ej., GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-15, TNF- α e IFN- α . En otro aspecto, el adyuvante es ácido poliinosínico:policitidílico (“Poli I:C”) o CPG. En una realización, el adyuvante es Poli I:C. En algunas realizaciones, el adyuvante se utiliza a una concentración de alrededor de 1 μ g a 100 μ g para una dosis de administración. En algunas realizaciones, el adyuvante se utiliza a una concentración de alrededor de 0.5 μ g a 200 μ g, 1 μ g a 150 μ g, 1 μ g a 20 μ g, 1 μ g a 50 μ g, 10 μ g a 25 μ g, 10 μ g a 50 μ g, 10 μ g a 75 μ g, 10 μ g a 100 μ g, 10 μ g a 150 μ g, 20 μ g a 50 μ g, 20 μ g a 80 μ g, 20 μ g a 100 μ g, 25 μ g a 75 μ g, 50 μ g a 75 μ g, 50 μ g a 100 μ g, o 50 μ g a 150 μ g para una dosis de administración. En realizaciones específicas, se utiliza Poli I:C o CpG a una concentración de alrededor de 1 μ g a 500 μ g, 10 μ g a 250 μ g, 20 μ g a 200 μ g, 25 μ g a 150 μ g, 25 μ g a 100 μ g, 25 μ g a 75 μ g, 30 μ g a 70 μ g, o 40 μ g a 60 μ g para una dosis de administración. En otras realizaciones específicas, se utiliza GM-CSF o IL-12 a una concentración de alrededor de 0.1 μ g a 250 μ g, 0.5 μ g a 100 μ g, 0.5 μ g a 75 μ g, 0.5 μ g a 50 μ g, 1 μ g a 100 μ g, 1 μ g a 50 μ g, 1 μ g a 25 μ g, 1 μ g a 15 μ g, 1 μ g a 10 μ g, 2 μ g a 15 μ g, 2 μ g a 10 μ g, o 2.5 μ g a 7.5 μ g para una dosis de administración. En una realización específica, el adyuvante se agrega o utiliza en combinación con una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico.

5.4 Métodos de elaboración de composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico

En determinadas realizaciones, las composiciones de p-GlcNAc que comprenden la poli-N-acetilglucosamina desacetilada derivada con un ácido mineral o un ácido orgánico para permitir que se solubilice (como se describió *supra*, sección 5.1), como ácido láctico, cítrico, succínico, gluconico, glucorónico, málico, pirúvico, tartárico, tartrónico o fumárico, se diluyen en un amortiguador (p. ej., amortiguador de ácido acético como amortiguador de ácido acético-acetato de sodio o un amortiguador de ácido acético-acetato de amonio) y, opcionalmente, se incuban durante un determinado período de tiempo (p. ej., 5 a 10 minutos, 5 a 15 minutos, 10 a 15 minutos, 10 a 20 minutos, 15 a 30 minutos, 30 a 45 minutos, 30 minutos a 1 hora, 45 minutos a 1 hora, 5 minutos a 1 hora, 10 minutos a 1 hora, o durante

al menos 5 o 10 minutos) a una temperatura determinada (p. ej., 45 °C a 55 °C, 50 °C a 55 °C, 50 °C a 60 °C, 55 °C a 60 °C, 55 °C a 65 °C, 60 °C a 75 °C o 45 °C a 75 °C). En determinadas realizaciones, el ácido orgánico tiene la estructura RCOOH, donde R es alquilo, alqueno o alquino opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es alquilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es alquilo sustituido con uno o más grupos hidroxilo. En determinadas realizaciones, RCOOH es ácido glicólico o ácido láctico. En otras realizaciones, RCOOH es ácido cítrico, succínico, glucónico, glucorónico, málico, pirúvico, tartárico, tartrónico o fumárico. En determinadas realizaciones, el amortiguador utilizado en el método descrito en la presente memoria puede ser cualquier amortiguador que sea efectivo para diluir las composiciones de p-GlcNAc.

En algunas realizaciones, las composiciones de p-GlcNAc que comprenden la poli-N-acetilglucosamina desacetilada derivada/solubilizada con un ácido mineral o un ácido orgánico para formar un derivado de sal de amonio (como se describió *supra*, sección 5.1), como ácido láctico, cítrico, succínico, glucónico, glucorónico, málico, pirúvico, tartárico, tartrónico o fumárico, se diluyen/disuelven en un amortiguador, como amortiguador de ácido acético-acetato de sodio pH 5.7 (o un amortiguador de ácido acético-acetato de amonio) y se incuban durante un determinado período de tiempo (p. ej., 5 a 10 minutos, 5 a 15 minutos, 10 a 15 minutos, 10 a 20 minutos, 15 a 30 minutos, 30 a 45 minutos, 30 minutos a 1 hora o 45 minutos a 1 hora) a una temperatura determinada (p. ej., 45 °C a 55 °C, 50 °C a 55 °C, 50 °C a 60 °C, 55 °C a 60 °C, 55 °C a 65 °C o 60 °C a 75 °C). En una realización, una composición de p-GlcNAc que comprende poli-N-acetilglucosamina desacetilada derivada/solubilizada con ácido láctico se disuelve/diluye en amortiguador, como amortiguador de ácido acético/acetato de sodio pH 5.7 (o amortiguador de ácido acético-acetato de amonio) para obtener una concentración final de la poli-N-acetilglucosamina derivada de alrededor de 0.001% a alrededor de 0.01%, alrededor de 0.01% a alrededor de 0.1%, alrededor de 0.1% a alrededor de 0.2%, alrededor de 0.1% a alrededor de 0.25%, alrededor de 0.1% a alrededor de 0.3%, alrededor de 0.1% a alrededor de 0.4%, alrededor de 0.1% a alrededor de 0.5%, alrededor de 0.1% a alrededor de 1%, alrededor de 0.2% a alrededor de 0.3%, alrededor de 0.2 a alrededor de 0.4% o alrededor de 0.2% a alrededor de 0.5%. En otra realización, una composición de p-GlcNAc que comprende poli-N-acetilglucosamina desacetilada derivada/solubilizada con ácido láctico se disuelve/diluye en un amortiguador, como amortiguador de ácido acético/acetato de sodio pH 5.7 (o amortiguador de ácido acético-acetato de amonio) para obtener una concentración final de la poli-N-acetilglucosamina derivada de 0.001 % a 0.01 %, 0.01 % a 0.1 %, 0.1 % a 0.2 %, 0.1 % a 0.25 %, 0.1 % a 0.3 %, 0.1 % a 0.4 %, 0.1 % a 0.5 %, 0.1 % a 1 %, 0.2 % a 0.3 %, 0.2 a 0.4 % o 0.2 % a 0.5 %. En una realización específica, una composición de p-GlcNAc que comprende poli-N-acetilglucosamina desacetilada derivada/solubilizada con ácido láctico se disuelve/diluye en un amortiguador, como amortiguador de ácido acético/acetato de sodio pH 5.7 (o amortiguador de ácido acético-acetato de amonio) para obtener una concentración final de la poli-N-acetilglucosamina derivada de 0.2 %. En una realización, el amortiguador seleccionado precipita la composición de p-GlcNAc.

Una determinada cantidad de la composición de p-GlcNAc disuelta/diluida puede combinarse luego con una determinada concentración de un ácido nucleico y la mezcla puede agitarse (mediante, p. ej., mezclado, agitación o agitación por vórtex) durante un determinado período de tiempo (p. ej., 5 a 10 segundos, 5 a 15 segundos, 5 a 20 segundos, 10 a 20 segundos, 20 a 30 segundos, 20 a 40 segundos, 30 a 40 segundos, 40 a 50 segundos, 50 a 60 segundos, 1 a 2 minutos, 2 a 4 minutos o 2 a 5 minutos) para formar las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico descritas en la presente memoria. En determinadas realizaciones, se combinan 50 a 100 microlitros, 75 a 150 microlitros, 75 a 100 microlitros o 100 a 200 microlitros de la composición de p-GlcNAc disuelta/diluida con una determinada concentración de un ácido nucleico. En una realización específica, se combinan 100 microlitros de la composición de p-GlcNAc disuelta/diluida con una determinada concentración de un ácido nucleico. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico se ha combinado con una sal, como sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de calcio o sulfato de magnesio, y se incubó a una temperatura determinada (p. ej., 45 °C a 55 °C, 50 °C a 55 °C, 50 °C a 60 °C, 55 °C a 60 °C, 55 °C a 65 °C o 60 °C a 75 °C) durante un determinado período de tiempo (p. ej., 5 a 10 minutos, 5 a 15 minutos, 10 a 15 minutos, 10 a 20 minutos, 15 a 30 minutos, 30 a 45 minutos, 30 minutos a 1 hora o 45 minutos a 1 hora). En una realización específica, 0.1 µg a 2 mg, 0.2 µg a 1 mg, 0.5 µg a 500 µg, 1 µg a 200 µg, 1 µg a 100 µg, 1 µg a 50 µg, 5 µg a 25 µg, 5 µg a 15 µg, 50 µg a 150 µg, 1 µg a 5 µg, 2 µg a 5 µg, 1 µg a 10 µg, 5 µg a 10 µg, 5 µg a 15 µg, 10 µg a 15 µg, 10 µg a 20 µg o 15 µg a 25 µg del ácido nucleico se combinan con una sal, como sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de calcio o sulfato de magnesio. En una realización específica, el ácido nucleico se combina con 100 microlitros de sulfato de sodio 50 mM. En determinadas realizaciones, la mezcla de la composición de p-GlcNAc disuelta/diluida y ácido nucleico se agita mediante vórtex durante un determinado período de tiempo (p. ej., 5 a 10 segundos, 5 a 15 segundos, 5 a 20 segundos, 10 a 20 segundos, 20 a 30 segundos, 20 a 40 segundos, 30 a 40 segundos, 40 a 50 segundos, 50 a 60 segundos, 1 a 2 minutos, 2 a 4 minutos o 2 a 5 minutos). En una realización específica, la mezcla de la composición de p-GlcNAc disuelta/diluida y ácido nucleico se agitan mediante vórtex durante 20 segundos. En determinadas realizaciones, un adyuvante, así como el ácido nucleico, se combina con la composición de p-GlcNAc disuelta/diluida. Ver la sección 5.3, *supra*, para los ejemplos de adyuvantes que pueden agregarse a las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico.

Un ácido nucleico puede prepararse para uso en el método de elaboración de una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico mediante la combinación o la mezcla con una sal, como sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de calcio o sulfato de magnesio y, opcionalmente, incubar la combinación o mezcla resultante a una temperatura determinada (p. ej., 45 °C a 55 °C, 50 °C a 55 °C, 50 °C a 60 °C, 55 °C a 60 °C, 55 °C a 65 °C, 60 °C a 75 °C o 45 °C a 75 °C) durante un determinado período de tiempo (p. ej., 5 a 10 minutos, 5 a 15 minutos, 10 a 15 minutos, 10 a 20 minutos, 15 a 30 minutos, 30 a 45 minutos, 30 minutos a 1 hora, 45 minutos a 1 hora, 5 minutos a 1 hora, 10 minutos a 1 hora o durante al menos 5 o 10 minutos). En una realización específica, 0.1 µg a 2 mg, 0.2 µg a

1 mg, 0.5 µg a 500 µg, 1 µg a 200 µg, 1 µg a 100 µg, 1 µg a 50 µg, 5 µg a 25 µg, 5 µg a 15 µg, 50 µg a 150 µg, 1 µg a 5 µg, 2 µg a 5 µg, 1 µg a 10 µg, 5 µg a 10 µg, 5 µg a 15 µg, 10 µg a 15 µg, 10 µg a 20 µg o 15 µg a 25 µg de ácido nucleico se combinan con una sal, como sulfato de sodio. En una realización específica, el ácido nucleico se combina con 100 microlitros de sulfato de sodio 50 mM. En realizaciones específicas, 0.5 mg/ml a 100 mg/ml, 1 mg/ml a 50 mg/ml, 1 mg/ml a 30 mg/ml, 1 mg/ml a 20 mg/ml, 2 mg/ml a 50 mg/ml, 2 mg/ml a 30 mg/ml, 2 mg/ml a 20 mg/ml, 3 mg/ml a 30 mg/ml, 3 mg/ml a 20 mg/ml, 4 mg/ml a 15 mg/ml, 5 mg/ml a 15 mg/ml, 5 mg/ml a 10 mg/ml o 6 mg/ml a 8 mg/ml de sulfato de sodio se combinan con un ácido nucleico.

En una realización específica, la metodología descrita en la sección 6.1, *infra*, se utiliza para producir una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico.

10 5.5 Usos de composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico

En la presente memoria se describen métodos para la administración *in vivo* y *ex vivo* de un ácido nucleico a un sujeto.

En el contexto de la invención, las referencias a los métodos de tratamiento o los métodos de administración deben comprenderse como referencias a la composición de la invención para uso en dichos métodos. Por consiguiente, los aspectos y realizaciones que se refieren a tales métodos deben comprenderse como los que se refieren a compuestos o composiciones para el uso en el sentido anterior.

En una realización específica, se contemplan los métodos para la administración de un ácido nucleico a un sujeto *in vivo* con fines de terapia génica o vacunación. Los métodos comprenden, en general, administrar una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico a un sujeto. En determinadas realizaciones, la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico comprende un adyuvante además de un ácido nucleico. En otras realizaciones, se administra un adyuvante de manera separada antes, durante o después de la administración de una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico.

En una realización, la administración de una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico produce una expresión sostenida de un ácido nucleico en la composición. En determinadas realizaciones, la administración de una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico produce la expresión de un ácido nucleico en la composición durante 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 1.5 meses, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 1 año o más. En determinadas realizaciones, la administración de una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico produce la expresión de un ácido nucleico durante un período de tiempo entre 2 horas y 3 meses, 2 horas y 2 meses, 2 horas y 1 mes, 2 horas y 2 semanas, 6 horas y 3 meses, 6 horas y 2 meses, 6 horas y 1 mes, 6 horas y 2 semanas, 12 horas y 3 meses, 12 horas y 2 meses, 12 horas y 1 mes, 12 horas y 2 semanas, 1 día y 3 meses, 1 día y 2 meses, 1 día y 1 mes, 1 día y 2 semanas, 2 días y 3 meses, 2 días y 2 meses, 2 días y 1 mes o 2 días y 2 semanas después de la administración.

En otra realización, la administración de una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico que comprende un adyuvante puede administrar en conjunto ácidos nucleicos y adyuvantes a un sujeto. En una realización específica, la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico puede liberar de manera eficiente adyuvantes, como GM-CSF e IL-12, para una liberación simultánea sostenida de tanto ácido nucleico como adyuvante. Sin limitarse a ninguna teoría, la administración en conjunto de ácidos nucleicos y adyuvante mediante la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico aumenta la probabilidad de que las células presentadoras de antígeno absorban el ácido nucleico en condiciones de estimulación adecuadas. Esta condición de estimulación será útil, p. ej., al administrar un ácido nucleico que codifica un antígeno.

Se puede administrar una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico a un sujeto como parte de un protocolo de terapia génica o un protocolo de vacunación. La terapia génica o vacunación pueden utilizarse para tratar y/o prevenir una variedad de trastornos o sus síntomas. Por ejemplo, se puede utilizar la terapia génica para tratar y/o prevenir el cáncer, enfermedades infecciosas, deficiencias genéticas de determinadas proteínas necesarias y/o desequilibrios de regulación o metabólicos adquiridos.

Se puede administrar una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico a un sujeto mediante cualquier vía que permita la expresión del ácido nucleico, que incluyen parenteral, tópica, intradérmica, intranasal, mucosa, intraperitoneal, epidural, sublingual, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, mediante inhalación, intratumoral y tópica. En la presente memoria se proporciona una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico para administrarse a un sujeto de manera subcutánea, intramuscular o intravenosa. En una realización específica, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra mediante inyección subcutánea. En determinados casos, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico no se administra de manera intravenosa.

En una realización específica, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra a las células epiteliales, p. ej., las células de la piel, epidermis o dermis. En una realización, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra de manera subcutánea, p. ej., mediante inyección, para dirigirse a las células de la piel. La ventaja de las administraciones subcutáneas es que tal administración puede dirigirse a las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, que tienen un papel central en la iniciación y el establecimiento de una respuesta inmunitaria específica al antígeno potente. La administración de las composiciones descritas en la presente memoria en la piel de un sujeto permite el direccionamiento de un antígeno

codificado por el ácido nucleico a las células dendríticas. En determinadas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra en combinación con un adyuvante p. ej., una citocina. La administración subcutánea de un antígeno codificado por ácido nucleico y un activador de respuesta inmunitaria, como una citocina, es ventajosa dado que puede inducir la activación y/o maduración de las células dendríticas. La administración de tal composición puede facilitar la activación de las células dendríticas y es fundamental para que las células dendríticas ceben de manera cruzada el antígeno con los linfocitos T y generen una inmunidad efectiva.

En algunas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se utiliza para la administración repetida. En algunas realizaciones, la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra tres veces por día, dos veces por día, una vez por día, una vez cada dos días, una vez por semana, una vez cada dos semanas o una vez al mes durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses, un año o más de un año. En otras realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico es para una única administración no recurrente.

En algunas realizaciones, se administra a un sujeto una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico que comprende 0.1 µg, 0.5 µg, 1 µg, 1.5 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg, 60 µg, 75 µg, 80 µg, 90 µg, 100 µg, 125 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg o 500 µg de ácido nucleico. En determinadas realizaciones, se administra a un sujeto una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico que comprende 0.1 µg a 2 mg, 0.2 µg a 1 mg, 0.5 µg a 500 µg, 1 µg a 200 µg, 1 µg a 100 µg, 1 µg a 50 µg, 5 µg a 25 µg, 5 µg a 15 µg, 50 µg a 150 µg, 1 µg a 5 µg, 2 µg a 5 µg, 1 µg a 10 µg, 5 µg a 10 µg, 5 µg a 15 µg, 10 µg a 15 µg, 10 µg a 20 µg o 15 µg a 25 µg de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico es ventajosa porque reduce la frecuencia de administración de sus componentes al permitir la liberación sostenida y/o expresión de tales componentes mientras mantiene la concentración terapéutica de tales componentes a un nivel deseado.

Los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan de manera intercambiable para referirse a un animal, que incluye un animal no humano y un animal humano. En determinadas realizaciones, se administra una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico a un mamífero que tiene de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses, 1 a 5 años, 5 a 10 años, 10 a 15 años, 15 a 20 años, 20 a 25 años, 25 a 30 años, 30 a 35 años, 35 a 40 años, 40 a 45 años, 45 a 50 años, 50 a 55 años, 55 a 60 años, 60 a 65 años, 65 a 70 años, 70 a 75 años, 75 a 80 años, 80 a 85 años, 85 a 90 años, 90 a 95 años o 95 a 100 años. En determinadas realizaciones, el mamífero es un mamífero no humano. En algunas realizaciones, el mamífero es un modelo animal para un trastorno particular. En determinadas realizaciones, el mamífero se encuentra en riesgo o es propenso a desarrollar un trastorno particular. En otras realizaciones, el mamífero ha sido diagnosticado con un trastorno particular. En algunas realizaciones, el mamífero manifiesta síntomas de un trastorno particular.

En realizaciones específicas, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra a un humano. En determinadas realizaciones, se administra una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico a un humano que tiene de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses, 1 a 5 años, 5 a 10 años, 5 a 12 años, 10 a 15 años, 15 a 20 años, 13 a 19 años, 20 a 25 años, 25 a 30 años, 20 a 65 años, 30 a 35 años, 35 a 40 años, 40 a 45 años, 45 a 50 años, 50 a 55 años, 55 a 60 años, 60 a 65 años, 65 a 70 años, 70 a 75 años, 75 a 80 años, 80 a 85 años, 85 a 90 años, 90 a 95 años o 95 a 100 años. En algunas realizaciones, el humano se encuentra en riesgo o es propenso a desarrollar un trastorno particular. En otras realizaciones, el humano ha sido diagnosticado con un trastorno particular. En algunas realizaciones, el humano manifiesta síntomas de un trastorno particular.

En determinadas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra a una mascota, p. ej., un perro o gato. En determinadas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra a un animal de granja o ganado, p. ej., cerdo, vacas, caballos, gallinas, etc. En algunas realizaciones, la mascota, animal de granja o ganado se encuentra en riesgo o es propenso a un trastorno particular. En otras realizaciones, la mascota, animal de granja o ganado ha sido diagnosticado con un trastorno particular. En algunas realizaciones, la mascota, animal de granja o ganado manifiesta síntomas de un trastorno particular.

En algunas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra a un sujeto que es refractario a una terapia estándar. En algunas realizaciones, una composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico se administra a un sujeto que es susceptible a reacciones adversas a una terapia o terapias convencionales.

Además, las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico pueden utilizarse para transfectar (p. ej., transfectar de manera estable) las células para producir grandes cantidades del producto génico de ácido nucleico para usos *in vitro* y/o *in vivo*. En una realización, las células utilizadas para la administración de los ácidos nucleicos son líneas celulares. En otras realizaciones, las células utilizadas para la administración de los ácidos nucleicos son células primarias de un sujeto (preferiblemente, un sujeto humano). En una realización específica, las células utilizadas para la administración de los ácidos nucleicos son células cancerosas. Las células transfectadas con la composición de administración de ácido nucleico también pueden administrarse a un sujeto (preferiblemente, un sujeto humano) como parte de un protocolo de terapia génica.

5.6 Kits

- En la presente memoria se proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más ingredientes para producir la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico. En una realización específica, un paquete o kit farmacéutico comprende un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada (p. ej., un derivado de lactato), en un recipiente. En determinadas realizaciones, el paquete o kit farmacéutico también comprende uno o más de los siguientes: (i) amortiguador de ácido acético-acetato de sodio pH 5.7 (p. ej., amortiguador de ácido acético-acetato de sodio 25 mM pH 5.7), en un recipiente; (ii) sulfato de sodio (p. ej., sulfato de sodio 50 mM), en un recipiente; (iii) un ácido nucleico en un recipiente; y (iv) un adyuvante en un recipiente.
- En determinadas realizaciones, un paquete o kit farmacéutico comprende un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada (p. ej., un derivado de lactato), un ácido nucleico y, opcionalmente, un adyuvante. En algunas realizaciones, un paquete o kit farmacéutico comprende un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada (p. ej., un derivado de lactato), un ácido nucleico y, opcionalmente, un adyuvante, en donde el derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina está en un recipiente separado del ácido nucleico y, opcionalmente, el adyuvante. En algunas realizaciones, un paquete o kit farmacéutico comprende un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada (p. ej., un derivado de lactato), un ácido nucleico y un adyuvante, en donde cada uno del derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina, el ácido nucleico y el adyuvante se sitúa en un recipiente separado. En otras realizaciones, el ácido nucleico y el adyuvante están en el mismo recipiente del paquete o kit farmacéutico. En determinadas realizaciones, el paquete o kit farmacéutico comprende además uno o más de los siguientes: (i) un amortiguador de ácido acético como amortiguador de ácido acético-acetato de amonio o amortiguador de ácido acético-acetato de sodio (p. ej., pH 5.7 como amortiguador de ácido acético-acetato de sodio 25 mM pH 5.7), en un recipiente; y/o (ii) sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de calcio o sulfato de magnesio (p. ej., sulfato de sodio 50 mM), en un recipiente. En algunas realizaciones, el derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina se encuentra en el mismo recipiente que un amortiguador de ácido acético, como amortiguador de ácido acético-acetato de sodio o amortiguador de ácido acético-acetato de amonio. En otras realizaciones, el derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina se encuentra en un recipiente diferente que un amortiguador de ácido acético, como amortiguador de ácido acético-acetato de sodio o amortiguador de ácido acético-acetato de amonio. En algunas realizaciones, el ácido nucleico se encuentra en el mismo recipiente que el sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de calcio o sulfato de magnesio. En aun otras realizaciones, el ácido nucleico se encuentra en un recipiente diferente que el sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de calcio o sulfato de magnesio.
- Opcionalmente asociado con dicho/s recipiente/s puede haber un aviso de la forma prescrita por un organismo estatal que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por parte del organismo de la fabricación, uso o venta para administración en humanos.

Los kits abarcados en la presente memoria se pueden usar en los métodos anteriores.

6. EJEMPLOS

6.1 Ejemplo 1: Preparación de la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ácido nucleico

Primera etapa: Determinación de la concentración de la suspensión de p-GlcNAc

- 1.1 Diluir solución madre de suspensión de p-GlcNAc con 20 litros de agua desionizada (DI) y mezclar durante la noche durante 24 horas en agitador.
- 1.2 Filtrar tres veces 10 mL de la suspensión diluida con el uso de una membrana de filtro Supro 800 (volumen total 30 mL). Incubar las tres membranas en un horno de 85 °C hasta que estén secas.
- 1.3 Pesar las tres membranas y tomar el peso promedio.
- 1.4 Calcular la concentración mediante la división del peso promedio por 10.

Por ejemplo, la suspensión de p-GlcNAc resultante puede tener un peso promedio = 6.3 mg y una concentración = 6.3 mg/10 mL = 0.63 mg/mL

Segunda etapa: Calcular el volumen necesario para formar tapetes

La dimensión de la caja de tapete es 22 cm x 22 cm, por tanto, el área de la caja es de 484 cm².

- 2.1 La cantidad de polímero que puede utilizarse o es necesaria es 0.5 mg/cm², por lo tanto, la cantidad necesaria para un tapete es 0.5 mg/cm² x 484 cm², es decir, 242 mg.
- 2.2 El volumen que puede utilizarse o es necesario para un tapete es 242 mg/0.63 mg/mL, es decir, 384 mL.
- 2.3 Verter 384 mL de suspensión diluida en la caja de metal con el filtro metálico, filtrar y retirar el tapete. Incubar el tapete en un horno de 50 °C hasta secarse o dejarlo secar a temperatura ambiente en servilletas de papel.

Tercera etapa: Desacetilación de membrana (tapete)

- 3.1 Hacer la solución de hidróxido de sodio de Sigma al 40 % (copos de NaOH) un día antes de la reacción de desacetilación dado que la solución demora 24 horas en enfriarse. Esta es una formulación de peso a volumen; por lo tanto, 40 gramos de copos de NaOH por 60 mL de agua DI (peso a volumen). Una vez la solución se enfrió, verter en una botella de 1 litro.
- 5 3.2 Encender el baño de agua y configurarlo a 80 °C. Empapar la membrana en la solución de NaOH al 40 % para aflojarla del filtro y transferirla a una botella de vidrio de 1 litro. Colocar el filtro de metal en un matraz de 4 litros. Una vez que todas las membranas se transfieren a la botella de vidrio, llenar la botella con la solución de NaOH al 40 % restante por encima de la marca de 1000 mL y colocar la botella en el baño de agua.
- 10 3.3 Incubar la botella con las membranas durante 3 horas. Retirar y agitar la botella cada 30 minutos para mezclarla. Tres horas de incubación producirán una medición de desacetilación de aproximadamente 75 %.
- 3.4 Retirar la botella y apagar el baño de agua. Dejar enfriar las membranas, verter la solución de NaOH al 40 % en un matraz de 4 litros y lavar las membranas con agua DI hasta que el pH sea neutro (7). Empapar las membranas en agua DI durante la noche y deshacerse de la solución de NaOH al 40 % de manera adecuada.
- 3.5 Situar las membranas desacetiladas en el filtro de metal y secarlas en el horno de 50 °C y medir la desacetilación.

15 Cuarta etapa: Medición del porcentaje de desacetilación

- 4.1 Hacer el estándar de ácido acético (0.01, 0.02 y 0.03M) y estándar de glucosamina (0.005, 0.015 y 0.035 mg/mL) y procesarlos en el espectrofotómetro programado para obtener una curva estándar.
- 20 4.2 Ponderar dos pesos por muestra entre 0.5 mg y 1.0 mg. Disolver la muestra con 100 µL de ácido acético durante 20 minutos, aumentar el volumen hasta 1 mL con 900 µL de agua DI. Tomar una alícuota de 50 µL, 100 µL, 150 µL de la muestra en tres tubos eppendorf que contienen 950 µL, 900 µL, 850 µL de ácido acético 0.01 M, mezclar y leer la muestra en el espectrofotómetro.
- 4.3 Calcular el porcentaje de desacetilación con una plantilla de Excel una vez que se obtuvieron las lecturas del estándar y la muestra.

25 Quinta etapa: Después de la medición de desacetilación, calcular la cantidad de ácido láctico necesario para producir el gel.

Ejemplo para membrana desacetilada al 69 %:

$$\text{Acetilglucosamina } 221.2 \times .31 = 6857.2$$

$$\text{Glucosamina } 215.6 \times .69 = 14876.4$$

30 $\text{Suma} = \frac{21733.6}{100} = 217$ - MW promedio

$$\text{Peso del polímero } \frac{10 \text{ g}}{217} = 0.046 \text{ M}$$

$$\text{Ácido Láctico al 30 \%} = 3.33 \text{ M}$$

Para alcanzar una relación molar 1:1 de p-GlcNAc:AL

35 $\frac{46}{3.33} = 13.81$ mL de Ácido Láctico necesario para esta muestra.

Sexta etapa: Verter 13.81 mL de ácido láctico al 30 % en un matraz con 986 mL de agua DI con membranas DEAC. Dejar agitar las membranas durante la noche para obtener una solución uniforme. Filtrar el material de gel a través del filtro de vidrio. Congelar en freezer de -20 °C en bandejas cubiertas en plástico y liofilizar.

40 Séptima etapa: Disolver 2 g de material liofilizado en 100 mL de agua DI para obtener 100 ml de gel de p-GlcNAc al 2 %. Esterilizar el gel con autoclave 120 °C 20 min.

Octava etapa: Este protocolo está ajustado para 1 inyección a un animal:

- (1) Diluir el gel de p-GlcNAc 100 veces en amortiguador de ácido acético-acetato de sodio 25 mM pH 5.7 y colocarlo en un baño de agua 55 °C durante 15 min (concentración de p-GlcNAc final después de la dilución es un gel al 0.02 %).
- 45 (2) Agregar 10 microgramos de plásmido de ADN a 100 microlitros de sulfato de sodio 50 mM y colocarlo en un baño de agua a 55 °C durante 10 min. (3) Agregar 100 microlitros de gel de p-GlcNAc diluido a la solución de sulfato de sodio-ADN, mientras la muestra se agita por vórtex a una alta velocidad. (4) Continuar la agitación por vórtex de la mezcla durante 20 segundos. (5) Mantener la mezcla a temperatura ambiente antes de la inyección a un sujeto durante menos de 2 horas. La composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN resultante se utiliza para la inyección a un
- 50 sujeto.

La Figura 1 muestra micrográficos electrónicos de barrido de nanopartículas de p-GlcNAc.

6.2 Ejemplo 2: Vacunación de ADN *in vivo* con el uso del gen de luciferasa con o sin la composición de nanopartícula de p-GlcNAc.

El protocolo mencionado en la sección 6.1 se utilizó para producir la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN que comprende el ADN plasmídico que codifica la luciferasa. Las preparaciones plasmídicas que comprenden ADN que codifican la luciferasa (pcDNA Luc) se inyectaron (100 μ g/ratón) por vía intramuscular (“i.m”) como preparaciones de ADN desnudo o subcutáneamente (“s.c.”) como ADN desnudo o composiciones de nanopartícula de pGlcNAc/ADN. Se detectó la actividad de luciferasa mediante imagenología por bioluminiscencia con el uso del sistema IVS después de la inyección intraperitoneal del sustrato de luciferina en los días 1, 7 y 14 después de la administración de la composición de ADN. La Figura 2 muestra la actividad de luciferasa en todos los ratones inyectados con composiciones pcDNA Luc . La actividad de luciferasa general más alta se detectó en los ratones inyectados subcutáneamente con las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN. Cabe destacar que la expresión de ADN se detectó en los mismos animales que recibieron una única inyección subcutánea de la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN a niveles comparables con los ratones que recibieron una inyección intramuscular hasta cuatro días después de la inyección. Asimismo, la Figura 2 muestra que la expresión del transgén fue detectable hasta 14 días después de la vacunación con la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN, lo que sugiere una disponibilidad sostenida del antígeno de manera local en el sitio de administración. Estos datos muestran que las nanopartículas de polímero de p-GlcNAc son capaces de liberar ADN plasmídico de una manera que produce la expresión sostenida del antígeno codificado.

6.3 Ejemplo 3: Absorción y transporte efectivos del antígeno codificado por ADN al ganglio linfático de drenaje por las células presentadoras de antígeno profesionales con el uso de la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN

Para determinar si el ADN fue absorbido efectivamente por las células presentadoras de antígeno y transportado al ganglio linfático de drenaje, seis ratones fueron inyectados en la almohadilla de la pata con la nanopartícula de p-GlcNAc sola o con la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN que comprende 100 μ g de ADN plasmídico que codifica GFP. Se utilizó el protocolo en la sección 6.1 para generar la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN. Se extirparon los ganglios linfáticos de drenaje un día después de la inyección y se tiñeron las suspensiones celulares con el anticuerpo monoclonal contra MHC clase II conjugado con PE. Se analizaron las suspensiones celulares mediante citometría de flujo para la expresión dual de MHC clase II y la proteína verde fluorescente (GFP). La Figura 3 muestra el análisis de citometría de flujo de las suspensiones celulares de los ganglios linfáticos de drenaje de ratones inmunizados con composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/pGFP y de los ratones inmunizados con la nanopartícula de p-GlcNAc sola, en donde los ratones vacunados con las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN mostraron una señal de GFP en \approx 30 % de las células MHC clase II positivas de los ganglios linfáticos extirpados. Esto indica que la nanopartícula de p-GlcNAc es capaz de administrar el ADN al sitio de inyección local, lo que produce la expresión exitosa del producto codificado que ha sido absorbido y transportado a los ganglios linfáticos de drenaje por las células presentadoras de antígeno profesionales (APC).

6.4 Ejemplo 4: Proliferación de células Pmel donantes en respuesta a la vacunación de ADN hgp100

Se utilizó el protocolo en la sección 6.1 para producir las nanopartículas de p-GlcNAc que comprenden el ADN hgp100. Los ratones fueron vacunados con ADN hgp100 desnudo (intramuscular y subcutáneamente), con nanopartícula de p-GlcNAc/hgp100 (subcutáneamente) o no fueron vacunados 24 horas después de la transferencia adoptiva de 10^6 esplenocitos Pmel (células Pmel sin tratamiento: linfocitos T CD8 $^+$ TCR transgénicos para un epítipo con gp100 humana (es decir, hgp100)). Los niveles de células Pmel en circulación se determinaron mediante citometría de flujo de las muestras de sangre. La Figura 4 muestra la proliferación de las células Pmel en respuesta a la vacunación con hgp100DNA desnudo o nanopartícula de p-GlcNAc/hgp100DNA en el bazo, sangre periférica (“sangre”) y ganglios linfáticos (“LN”). Las frecuencias más altas de células Pmel donantes proliferantes se encontraron en los ganglios linfáticos. Las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN activaron efectivamente las respuestas de linfocitos T CD8 $^+$ específicos al antígeno, como se demuestra con la proliferación de las células Pmel sin tratamiento en respuesta a la inmunización con las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/phgp100.

6.5 Ejemplo 5: Administración conjunta de poli I:C potencia la eficacia terapéutica de las vacunas de ADN que codifican los antígenos tumorales propios

Se utilizó un modelo de vacunación previamente establecido que emplea ADN que codifica TRP2, un antígeno de diferenciación de melanocito con una alta expresión en los melanomas de ratón y humano. Estudios anteriores han demostrado que la eficacia terapéutica de la vacunación con ADN desnudo que codifica TRP2 es mínima. Se utilizaron dos enfoques experimentales, es decir, modelo terapéutico subcutáneo y modelo terapéutico de metástasis, para evaluar la eficacia de las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN y nanopartícula de p-GlcNAc/ADN/adyuvante.

Respecto al modelo terapéutico de metástasis, cinco ratones fueron inyectados de manera intravenosa con 3×10^4 células de melanoma B16 para cada uno de entre el control salino de PBS, nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp y nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp/Poli I:C. Los ratones fueron vacunados de manera subcutánea con tres días de separación (tres vacunaciones), con inicio el día 3 de la inyección del tumor con solución salina de PBS, nanopartícula

de p-GlcNAc/ADNp y nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp/Poli I:C. Se sacrificaron todos los animales después de la inyección tumoral y se extirparon y pesaron los pulmones. La Figura 5A muestra que el peso del pulmón promedio de los ratones inyectados con nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp es menor que el peso del pulmón de los ratones inyectados con la solución salina de PBS. Cabe destacar que la Figura 5A muestra que el peso del pulmón promedio de los ratones inyectados con nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp/adyuvante es significativamente menor que el peso del pulmón de los ratones inyectados con nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp o la solución salina de PBS.

5
10
15

Respecto al modelo terapéutico subcutáneo, cinco ratones fueron inyectados de manera subcutánea con 10^5 células de melanoma B16 para cada uno de entre el control salino de PBS, nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp y nanopartícula de p-GlcNAc/ADNp/Poli I:C. Se dieron tres vacunaciones subcutáneas con intervalos de tres días, con inicio el quinto día después de la inyección de células tumorales con solución salina, nanopartícula de p-GlcNAc/pTRP2 o nanopartícula de p-GlcNAc/pTRP2/adyuvante (donde el adyuvante es Poli I:C). Se monitoreó la evolución del tumor tres veces a la semana después del tratamiento. La Figura 5B muestra el efecto de las composiciones de nanopartícula de p-GlcNAc en el tamaño tumoral. La Figura 5B demuestra que la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN inhibe el crecimiento tumoral con respecto al control salino; también demuestra que la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN/adyuvante muestra una mayor inhibición del crecimiento tumoral que la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN sin un adyuvante.

En conjunto, la Figura 5 sugiere que la adición de adyuvante a la composición de nanopartícula de p-GlcNAc/ADN en el contexto de una vacunación terapéutica mejora la inmunidad antitumoral y retrasa la evolución del tumor tanto en los modelos de metástasis como subcutáneo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, una enfermedad infecciosa o una deficiencia genética de una proteína necesaria,
- 5 en donde la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico comprende poli-N-acetilglucosamina y el ácido nucleico, en donde las nanopartículas tienen un tamaño entre 5 nm y 500 nm y en donde 40 % a 80 % de la poli-N-acetilglucosamina está desacetilada; y
- en donde el método comprende administrar la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico de manera subcutánea al sujeto.
- 10 2. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto es humano.
3. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un animal no humano.
- 15 4. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la administración de la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico produce una expresión sostenida del ácido nucleico durante al menos 1 semana, 2 semanas o 4 semanas en el sitio de administración al sujeto.
5. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método comprende la administración repetida.
- 20 6. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un adyuvante, preferiblemente, el adyuvante es una citocina o un ácido poliinosínico:policitidílico ("poli I:C").
7. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de la reivindicación 6, que proporciona una liberación sostenida simultánea de tanto el ácido nucleico como el adyuvante.
- 25 8. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde:
- (a) la poli-N-acetilglucosamina desacetilada comprende un derivado de sal de amonio de poli-N-acetilglucosamina desacetilada, preferiblemente un derivado de lactato de poli-N-acetilglucosamina desacetilada; o
- (b) la poli-N-acetilglucosamina desacetilada se ha solubilizado con un ácido orgánico o mineral, preferiblemente con un ácido láctico.
- 30 9. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde al menos 50 % de las nanopartículas tienen un tamaño de entre 20 nm y 200 nm o entre 25 nm y 150 nm.
10. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tamaño se determina mediante microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido.
- 35 11. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el método es parte de un protocolo de terapia génica o protocolo de vacunación.
12. Un método de elaboración de una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico que comprende:
- 40 (a) agregar una base a la poli-N-acetilglucosamina para desacetilar al menos 40 % a 80 % de la poli-N-acetilglucosamina;
- (b) agregar un ácido láctico para formar un derivado de lactato de poli-N-acetilglucosamina desacetilada;
- (c) agregar un amortiguador para facilitar la dilución; y
- 45 (d) agregar un ácido nucleico, lo que elabora una composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el amortiguador en la etapa (c) es amortiguador acético-acetato de sodio.
14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde el ácido nucleico se ha combinado con una sal, preferiblemente, sulfato de sodio.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende además:
- (i) agregar un adyuvante en la etapa (d); o
 - (ii) combinar la composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico con un adyuvante, en donde el adyuvante es preferiblemente poli I:C.
- 5 16. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde la poli-N-acetilglucosamina está de 60 % a 80 % desacetilada.
- 10 17. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde la poli-N-acetilglucosamina está de 65 % a 75 % desacetilada.
18. La composición de nanopartícula de poli-N-acetilglucosamina/ácido nucleico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o 16 a 17, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 o 16 a 17, en donde el ácido nucleico es ADN.

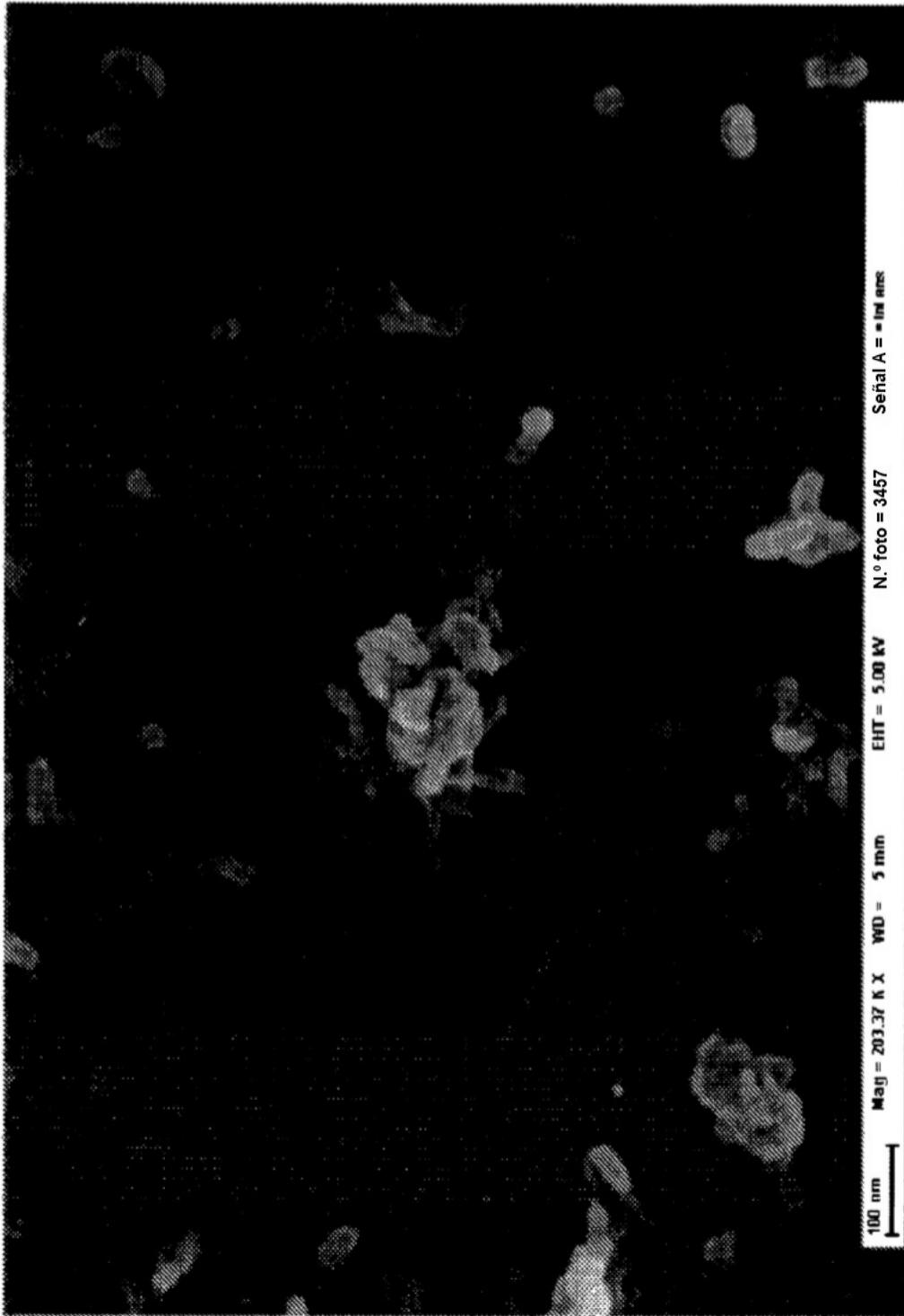


Figura 1A

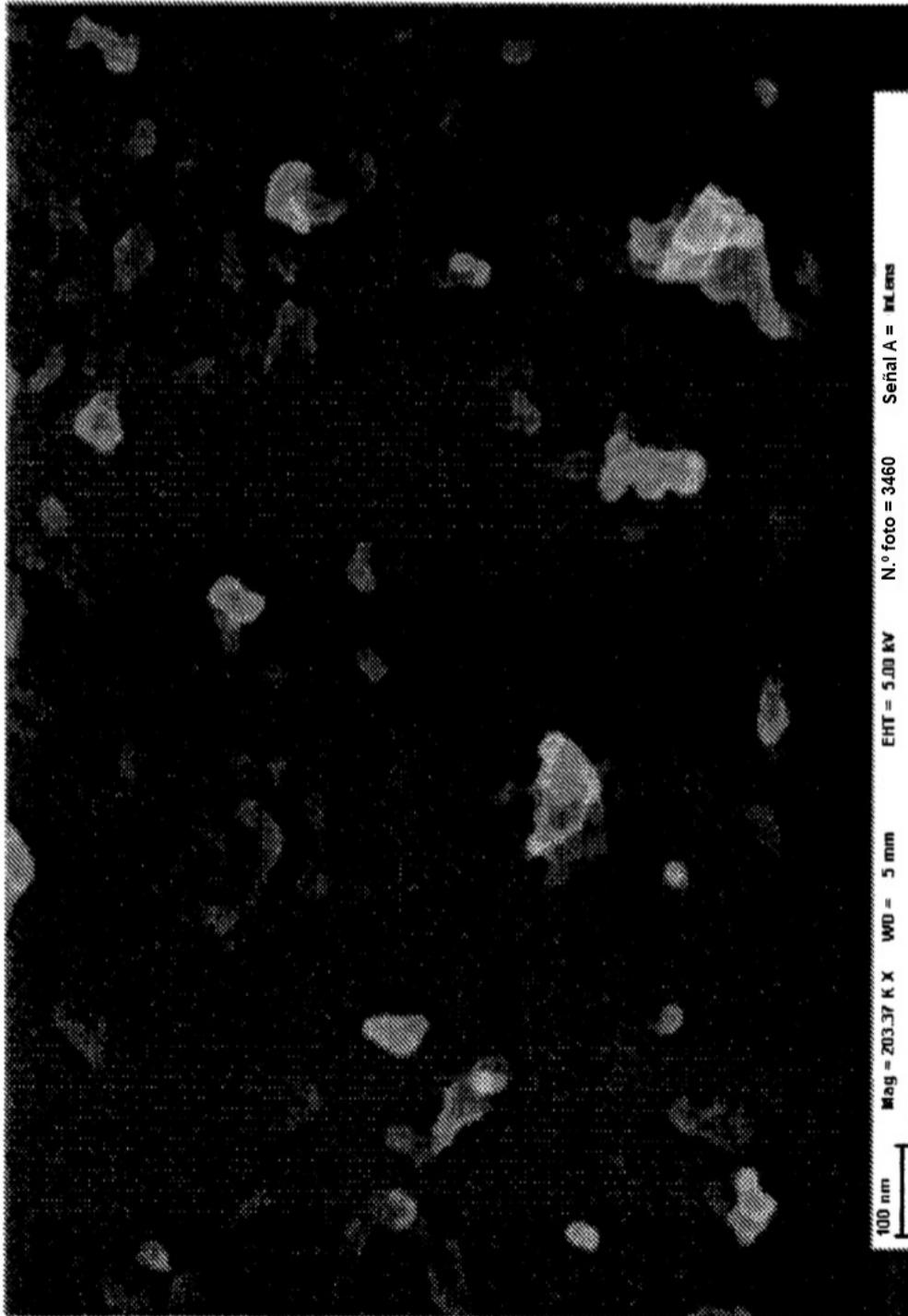


Figura 1B

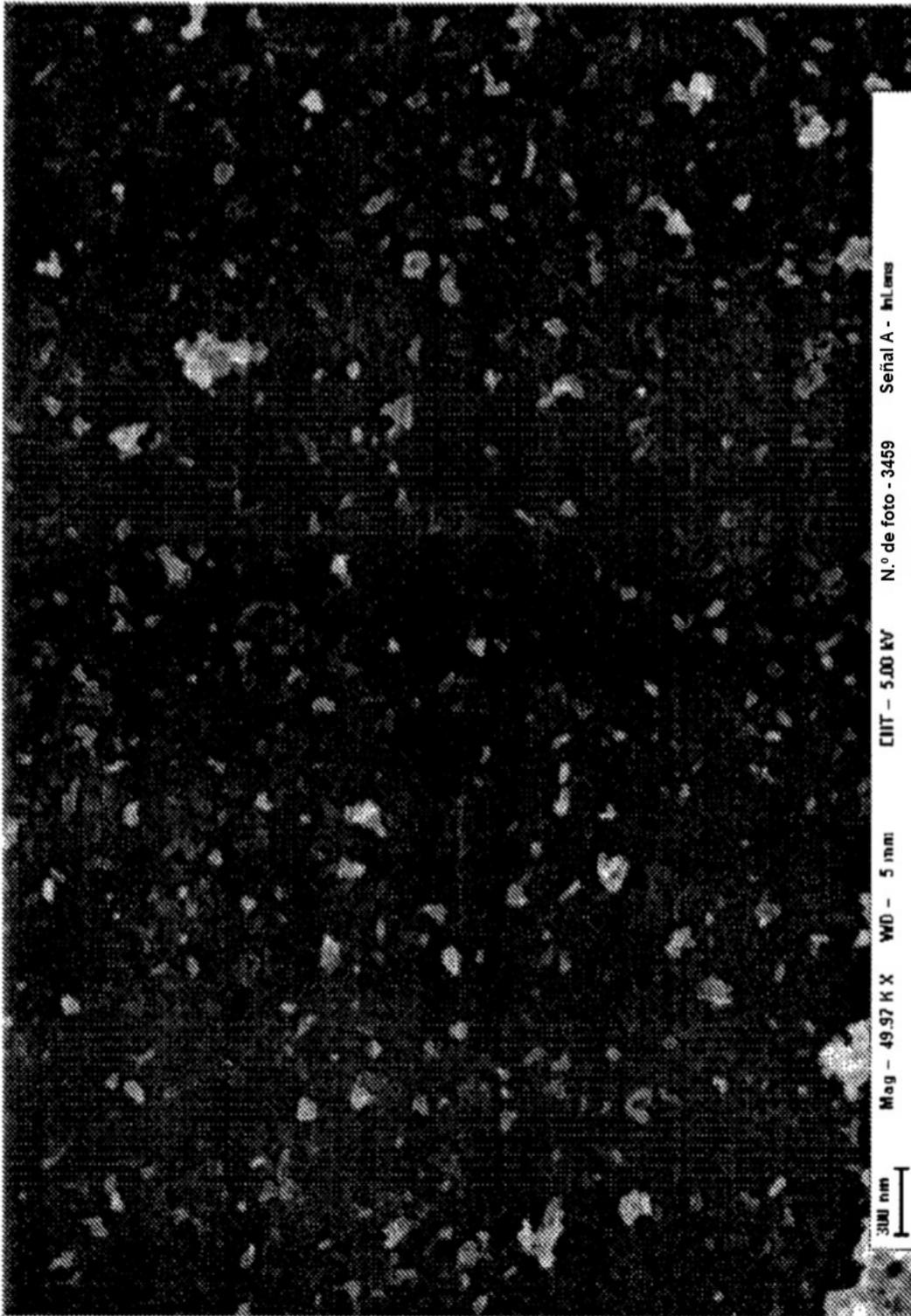


Figura 1C

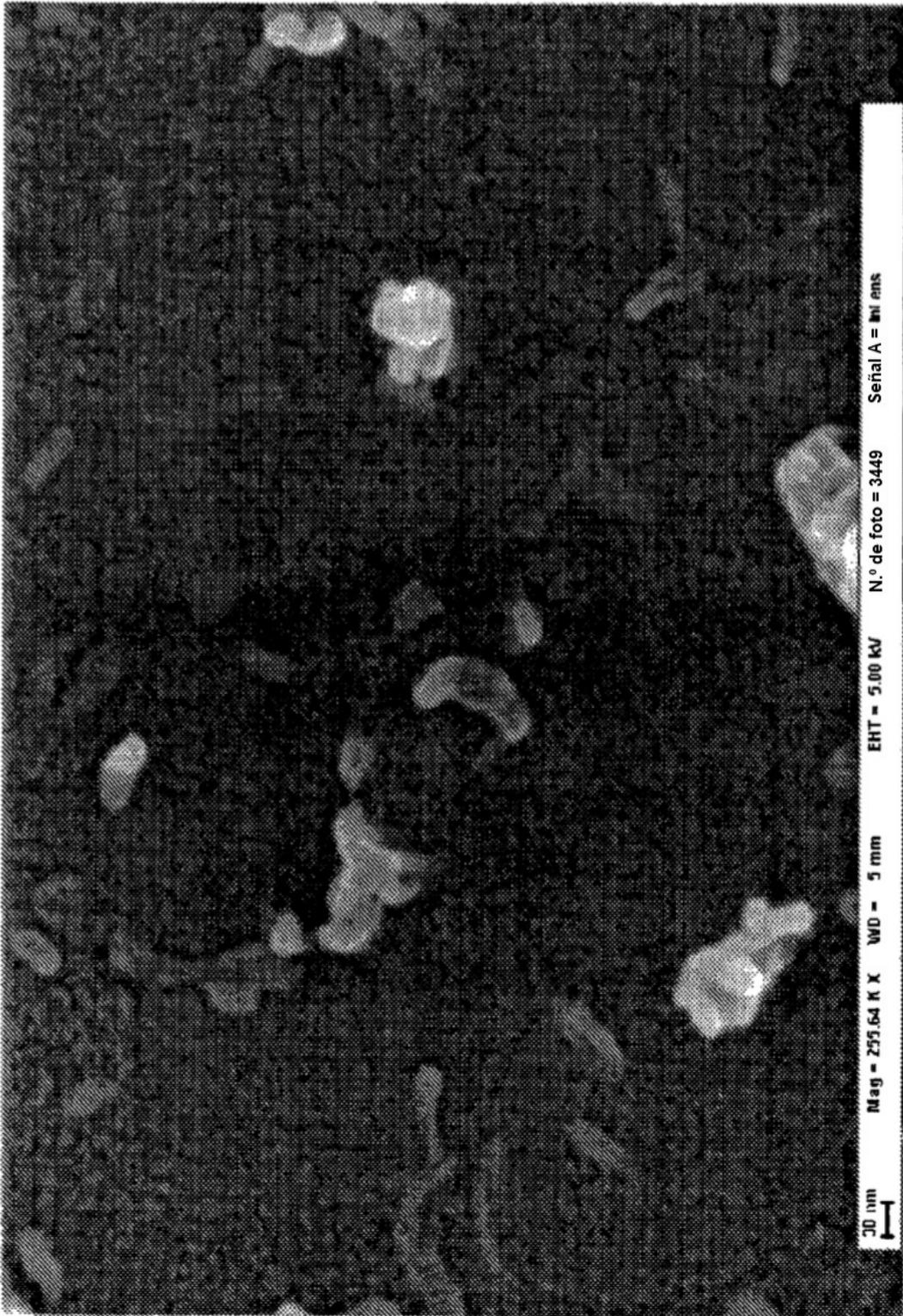


Figura 1D

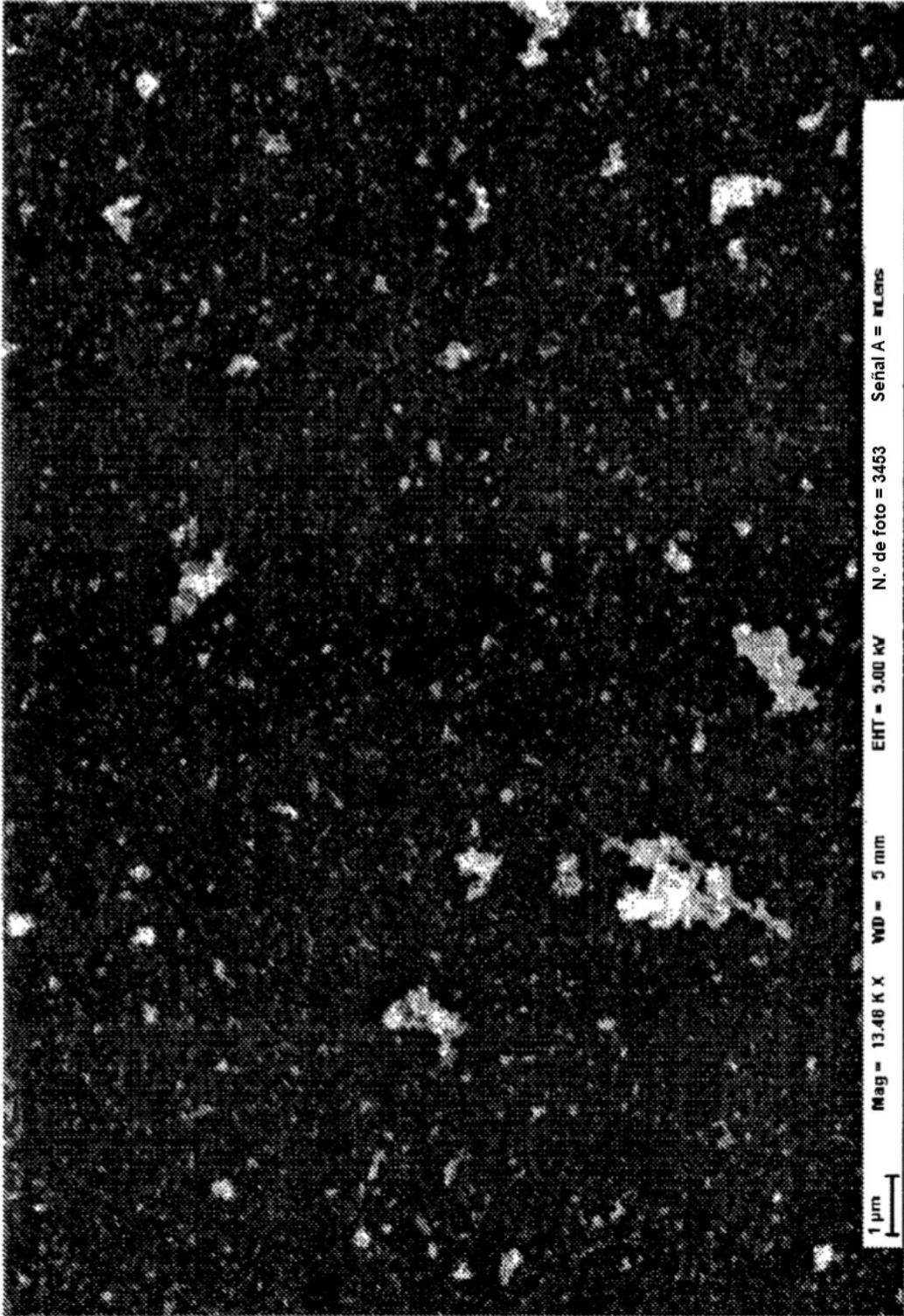


Figura 1E



Figura 1F

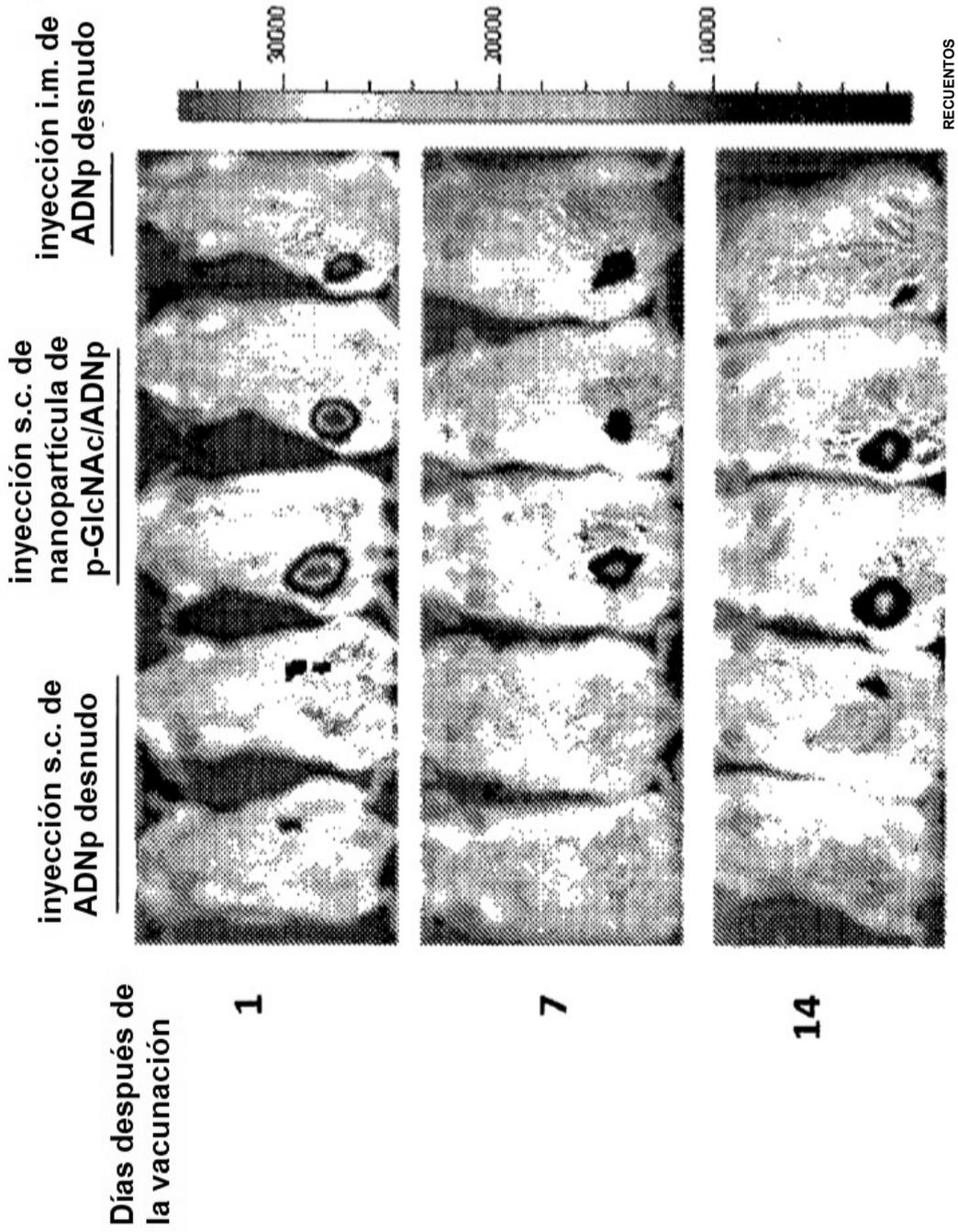


Figura 2

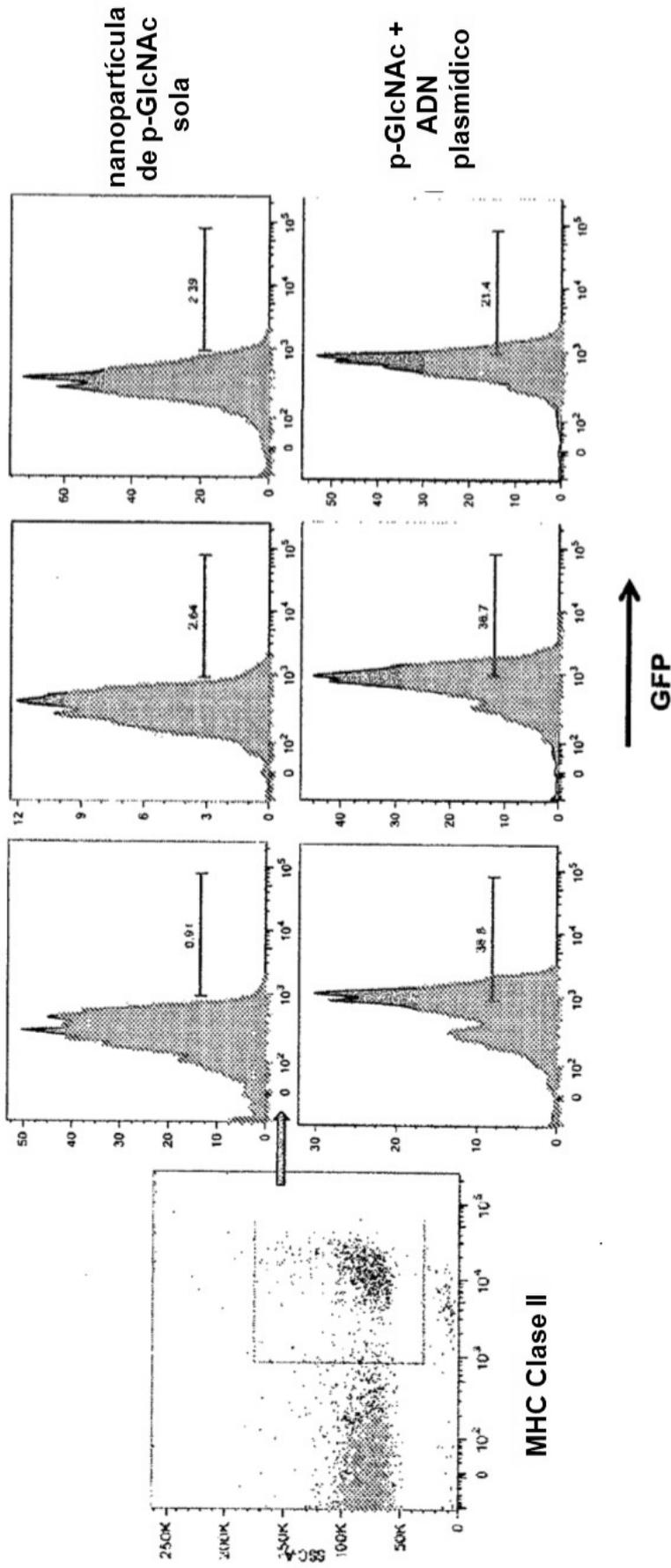


Figura 3

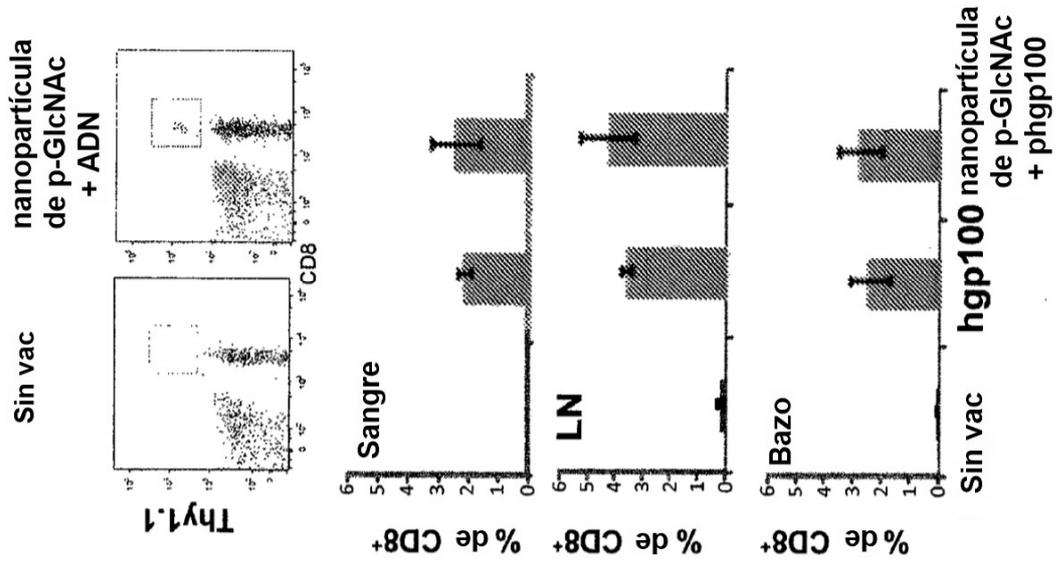


Figura 4

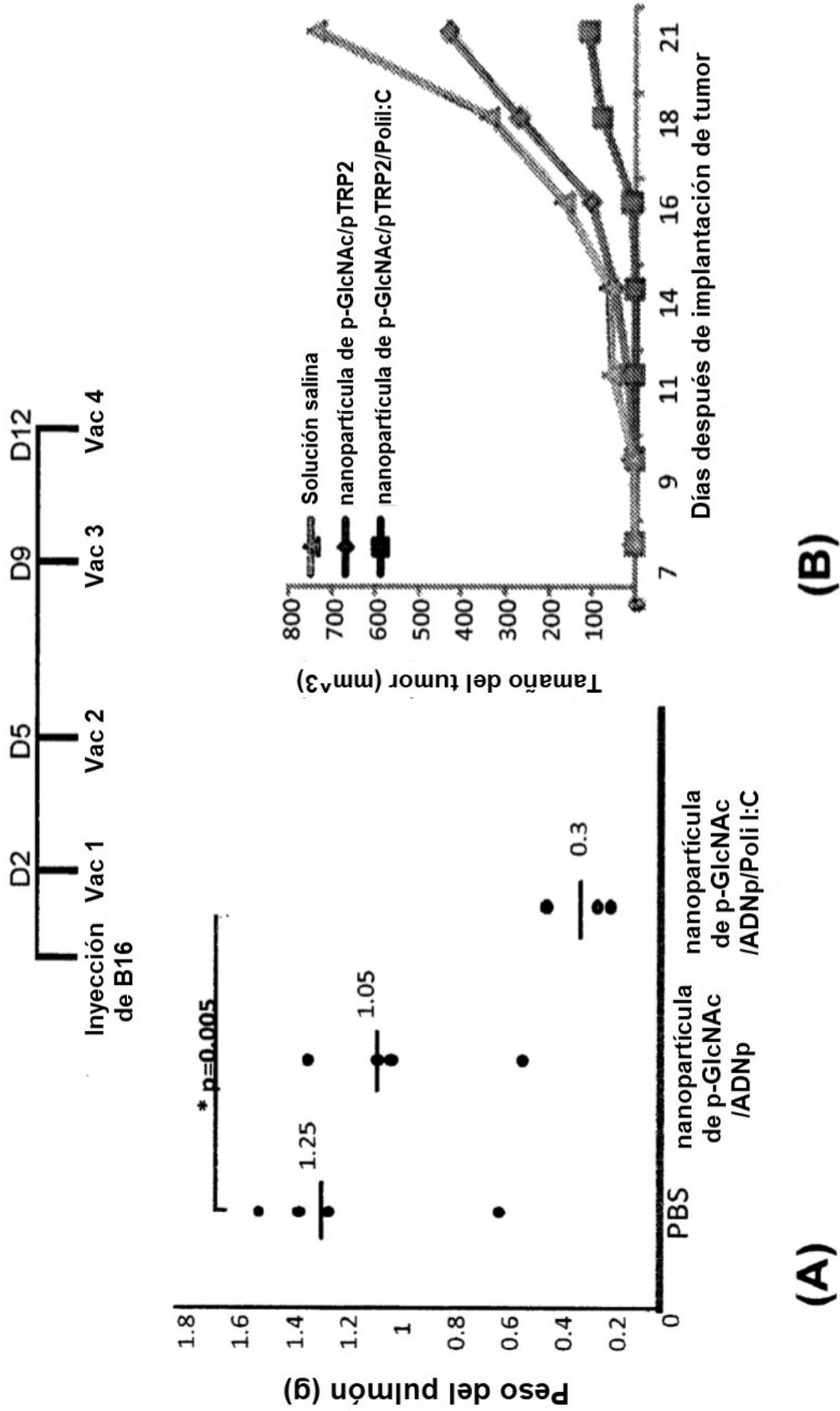


Figura 5