

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 009**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2011** **E 22174931 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2022** **EP 4066856**

54 Título: **Liposomas pegilados para la administración de ARN que codifica para inmunógeno**

30 Prioridad:

31.08.2010 US 37882610 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2023

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

GEALL, ANDREW y
VERMA, AYUSH

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 935 009 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

Liposomas pegilados para la administración de ARN que codifica para inmunógeno

5 **Campo técnico**

Esta invención se encuentra en el campo de la administración viral de ARN para inmunización, mediante liposomas dentro de los cuales está encapsulado el ARN que codifica para un inmunógeno de interés.

10 **Técnica anterior**

La administración de ácidos nucleicos para inmunizar a animales ha sido un objetivo desde hace varios años. Se han sometido a prueba diversos enfoques, incluyendo el uso de ADN o ARN, de vehículos de administración viral o no viral (o incluso sin vehículo de administración, en una vacuna “desnuda”), de vectores replicantes o no replicantes, o vectores virales o no virales.

Mockey *et al*, Cancer Gene Therapy 2007 14(9): 802-814, da a conocer una vacuna contra el cáncer basada en ARNm para terapia para melanoma.

20 Sigue existiendo una necesidad de vacunas de ácido nucleico adicionales y mejoradas y, en particular, de maneras mejoradas de administrar vacunas de ácido nucleico.

Divulgación de la invención

25 Según la invención, la inmunización de ácido nucleico se logra administrando ARN encapsulado dentro de un liposoma. El ARN codifica para un inmunógeno de interés, que es un polipéptido de la espícula de coronavirus. El liposoma incluye un lípido pegilado, es decir, el lípido está modificado mediante unión covalente de un polietilenglicol. PEG proporciona a los liposomas un recubrimiento que puede conferir características farmacocinéticas favorables, por ejemplo, puede aumentar la estabilidad y prevenir la adsorción no específica de los liposomas. Los inventores han encontrado que la longitud del PEG puede afectar a la expresión *in vivo* de ARN encapsulado y, por tanto, la invención usa liposomas que comprenden PEG que tiene un peso molecular promedio de entre 1 kDa y 3 kDa. PEG con un peso molecular inferior (por ejemplo, de 500 o 750 Da) no forma liposomas estables.

35 Por tanto, la invención proporciona un liposoma dentro del cual está encapsulado ARN que codifica para un inmunógeno de interés, en el que el liposoma comprende al menos un lípido que incluye un resto polietilenglicol, de tal manera que polietilenglicol está presente en el exterior del liposoma, en el que el peso molecular promedio del polietilenglicol es de entre 1 kDa y 3 kDa y en el que el inmunógeno es un polipéptido de la espícula de coronavirus. Estos liposomas son adecuados para la administración *in vivo* del ARN a una célula de vertebrado y, por tanto, son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para inmunizar a sujetos contra diversas enfermedades.

40 La invención también proporciona un procedimiento para preparar un liposoma que contiene ARN, que comprende una etapa de mezclar ARN con uno o más lípidos, en condiciones tales que los lípidos forman un liposoma en el que se encapsula el ARN, en el que al menos un lípido incluye un resto polietilenglicol que se ubica en el exterior del liposoma durante el procedimiento, y en el que el peso molecular promedio del polietilenglicol es de entre 1 kDa y 45 3 kDa, y en el que el ARN codifica para un inmunógeno que es un polipéptido de la espícula de coronavirus.

El liposoma

50 La invención usa liposomas dentro de los cuales está encapsulado ARN que codifica para inmunógeno. Por tanto, el ARN está separado (como en un virus natural) de cualquier medio externo. Se ha encontrado que la encapsulación dentro del liposoma protege al ARN frente a la digestión por ARNasa. Los liposomas pueden incluir algún ARN externo (por ejemplo, en su superficie), pero al menos la mitad del ARN (y, de manera ideal, la totalidad del mismo) está encapsulado en el núcleo del liposoma. La encapsulación dentro de liposomas es distinta, por ejemplo, de los complejos de lípido/ARN dados a conocer en la referencia 1, en los que se mezcla ARN con liposomas previamente formados.

Diversos lípidos anfífilos pueden formar bicapas en un entorno acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza hidrófilo aniónico, catiónico o zwitteriónico. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos se remonta a la década de 1960, y los lípidos que forman liposomas catiónicos se han estudiado desde la década de 1990. Algunos fosfolípidos son aniónicos mientras que otros son zwitteriónicos y otros son catiónicos. Las clases adecuadas de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas y fosfatidil-glicerol, y en la tabla 1 se indican algunos fosfolípidos útiles. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero no se limitan a, dioleoil-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-diésteriloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleoil-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-

dilinoileoxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DlinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los lípidos zwitteriónicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos zwitteriónicos de acilo y lípidos zwitteriónicos de éter. Ejemplos de lípidos zwitteriónicos útiles son DPPC, DOPC, DSPC, dodecilsfosfocolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) y 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE). Los lípidos pueden estar saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido insaturado para preparar liposomas. Si un lípido insaturado tiene dos colas, ambas colas pueden estar insaturadas, o puede tener una cola saturada y una cola insaturada. Un lípido puede incluir un grupo esteroide en una cola, por ejemplo como en RV05.

Por tanto, en una realización la invención proporciona un liposoma que tiene una bicapa lipídica que encapsula un núcleo acuoso, en el que: (i) la bicapa lipídica comprende al menos un lípido que incluye un resto polietilenglicol, de tal manera que polietilenglicol está presente en el exterior del liposoma, en el que el peso molecular promedio del polietilenglicol es de entre 1 kDa y 3 kDa; y (ii) el núcleo acuoso incluye un ARN que codifica para un inmunógeno; y en el que el inmunógeno es un polipéptido de la espícula de coronavirus.

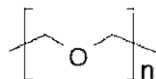
Pueden formarse liposomas de la invención a partir de un único lípido o a partir de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos, (ii) una mezcla de lípidos catiónicos, (iii) una mezcla de lípidos zwitteriónicos, (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos, (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos zwitteriónicos, (vi) una mezcla de lípidos zwitteriónicos y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos zwitteriónicos. De manera similar, una mezcla puede comprender lípidos tanto saturados como insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (zwitteriónico, saturado), DlinDMA (catiónico, insaturado) y/o DMG (aniónico, saturado). Cuando se usa una mezcla de lípidos, no se necesita que todos los lípidos componentes en la mezcla sean anfífilos, por ejemplo pueden mezclarse uno o más lípidos anfífilos con colesterol.

Cuando se forma un liposoma de la invención a partir de una mezcla de lípidos, se prefiere que la proporción de los lípidos que están pegilados tal como se describe en el presente documento sea de menos del 10% de la cantidad total de lípidos, por ejemplo entre el 0,5-5%, entre el 1-4% o aproximadamente el 2%. Por ejemplo, a continuación se muestran liposomas útiles en los que el 2% del lípido total es un PEG-DMG. El resto puede estar compuesto, por ejemplo, por colesterol (por ejemplo, el 35-50% de colesterol) y/o lípido catiónico (por ejemplo, el 30-70%) y/o DSPC (por ejemplo, el 5-15%). Tales mezclas se usan a continuación. Estos valores de porcentajes son porcentajes en moles.

Por tanto, puede formarse un liposoma a partir de un lípido catiónico (por ejemplo, DlinDMA, RV05), un lípido zwitteriónico (por ejemplo, DSPC, DPyPE), un colesterol y un lípido pegilado. En los ejemplos se usa una mezcla de DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol, así como varias mezclas adicionales.

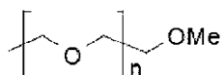
Al menos un lípido dentro del liposoma incluye un resto polietilenglicol. Los liposomas que incluyen estos lípidos pegilados tendrán PEG orientado de modo que está presente al menos en el exterior del liposoma (pero parte del PEG también puede estar expuesto en el interior del liposoma, es decir en el núcleo acuoso). Esta orientación puede lograrse uniendo el PEG a una parte apropiada del lípido. Por ejemplo, en un lípido anfílico, el PEG se unirá a la cabeza hidrófila, ya que es esta cabeza la que se orienta hacia el exterior orientado al entorno acuoso de la bicapa lipídica. La pegilación de esta manera puede lograrse mediante unión covalente de un PEG a un lípido, por ejemplo usando técnicas tales como las dadas a conocer en las referencias 2 y 3.

Por tanto, los lípidos pegilados comprenderán la estructura de PEG:

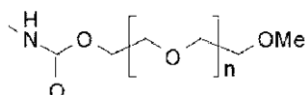


en la que n proporciona un peso molecular para el PEG de entre 1 kDa y 3 kDa, por ejemplo entre 23 y 68, o aproximadamente 45 para una pegilación de 2 kDa (por ejemplo, véase la figura 16).

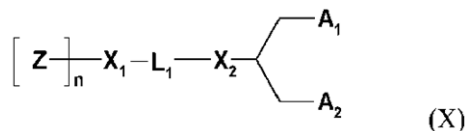
El resto PEG puede terminar con un grupo -O-metilo y, por tanto, un lípido pegilado puede comprender:



Por tanto, incluyendo la unión a un nitrógeno en el grupo de cabeza de un lípido, un lípido pegilado útil con la invención puede comprender:



Un lípido pegilado adecuado para su uso con la invención es PEG-DMG, tal como se usa en los ejemplos. Las figuras 17A a 17E muestran lípidos pegilados útiles adicionales. También puede usarse colesterol pegilado. Pueden usarse otros lípidos pegilados, por ejemplo lípidos de fórmula (X):



en la que:

10 Z es un componente de grupo de cabeza hidrófilo seleccionado de PEG y polímeros basados en polioxazolina, poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poliglicerol, poli(N-vinilpirrolidona), poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida] y poliaminoácidos, en el que el polímero puede ser lineal o ramificado, y en el que el polímero puede estar opcionalmente sustituido;

15 Z está polimerizado por n subunidades;

n es un grado de polimerización promedio en número de entre 10 y 200 unidades de Z (y puede optimizarse para diferentes grupos Z);

20 L₁ es un grupo de unión de alquileo C₁₋₁₀ o heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que incluye ninguno, uno o dos de un éter (por ejemplo, -O-), éster (por ejemplo, -C(O)O-), succinato (por ejemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por ejemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por ejemplo, -OC(O)O-), urea (por ejemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por ejemplo, -NR'-), amida (por ejemplo, -C(O)NR'-), imina (por ejemplo, -C(NR')-), tioéter (por ejemplo, -S-), xantato (por ejemplo, -OC(S)S-) y fosfodiéster (por ejemplo, -OP(O)₂O-), en el que R' se selecciona independientemente de -H, -NH-, -NH₂-, -O-, -S-, un fosfato o un alquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido;

X₁ y X₂ se seleccionan independientemente de un carbono o un heteroátomo seleccionado de -NH-, -O-, -S- o un fosfato;

30 A₁ y A₂ o bien se seleccionan independientemente de un alquilo C₆₋₃₀, alqueno C₆₋₃₀ y alquino C₆₋₃₀, en los que A₁ y A₂ pueden ser iguales o diferentes, o bien A₁ y A₂ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un esteroide opcionalmente sustituido.

Un liposoma de la invención incluirá normalmente un gran número de restos PEG, que pueden ser iguales o diferentes. 35 El peso molecular promedio del PEG en un liposoma de la invención es de entre 1 kDa y 3 kDa, por ejemplo entre 1,5-2,5 kDa, entre 1,7-2,3 kDa, entre 1,8-2,2 kDa, entre 1,9-2,1 kDa o 2 kDa. Por tanto, el PEG puede ser un PEG que se conoce habitualmente como "PEG 2000" o "PEG 2k", aunque también pueden usarse el "PEG 1000" más corto y "PEG 3000" más largo.

40 El PEG comprenderá habitualmente cadenas de polímero lineales pero, en algunas realizaciones, el PEG puede comprender cadenas de polímero ramificadas.

También es posible que una única molécula de lípido incluya más de un grupo PEG, por ejemplo unidos a diferentes átomos de carbono en el grupo de cabeza de un lípido (por ejemplo, véase la figura 18). En estas circunstancias, la 45 referencia al peso molecular de PEG en un liposoma es el peso molecular por cada molécula de lípido, en vez de por cada sustituyente PEG. Por tanto, en un liposoma en el que el único lípido pegilado tiene la estructura mostrada en la figura 18, en la que el peso molecular en el recuadro es de 2 kDa y está compuesto por dos cadenas de 1 kDa cada una, el peso molecular promedio del PEG es de 2 kDa y no de 1 kDa.

50 En algunas realizaciones, el PEG puede ser un PEG sustituido, por ejemplo en el que uno o más átomos de carbono en el polímero están sustituidos con uno o más grupos alquilo, alcoilo, acilo o arilo.

En algunas realizaciones, el PEG puede incluir grupos de copolímero, por ejemplo uno o más monómeros de propileno, para formar un polímero de PEG-polipropileno.

55 Los liposomas se dividen habitualmente en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares pequeñas (SUV); y vesículas unilamelares grandes (LUV). Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, que forman varios compartimentos acuosos independientes. Las SUV y las LUV tienen una única bicapa que encapsula un núcleo acuoso; las SUV tienen normalmente un diámetro ≤50 nm, y las LUV tienen un diámetro >50 nm. Los 60 liposomas de la invención son de manera ideal LUV con un diámetro en el intervalo de 60-180 nm y preferiblemente en el intervalo de 80-160 nm.

Un liposoma de la invención puede formar parte de una composición que comprende una pluralidad de liposomas, y los liposomas dentro de la pluralidad pueden tener un intervalo de diámetros. Para una composición que comprende una población de liposomas con diferentes diámetros: (i) al menos el 80% en número de los liposomas deben tener diámetros en el intervalo de 60-180 nm, y preferiblemente en el intervalo de 80-160 nm, y/o (ii) el diámetro promedio (por intensidad, por ejemplo promedio Z) de la población está de manera ideal en el intervalo de 60-180 nm y preferiblemente en el intervalo de 80-160 nm. Los diámetros dentro de la pluralidad deben tener de manera ideal un índice de polidispersidad $<0,2$. Se espera que los complejos de liposoma/ARN de la referencia 1 tengan un diámetro en el intervalo de 600-800 nm y tengan una alta polidispersidad.

En la técnica se conocen bien técnicas para preparar liposomas adecuados, véanse, por ejemplo, las referencias 4 a 6. En la referencia 7 se describe un método útil e implica mezclar (i) una disolución etanólica de los lípidos, (ii) una disolución acuosa del ácido nucleico y (iii) tampón, seguido por mezclado, equilibración, dilución y purificación. Los liposomas preferidos de la invención pueden obtenerse mediante este procedimiento de mezclado.

Para obtener liposomas con el/los diámetro(s) deseado(s), puede realizarse el mezclado usando un procedimiento en el que se combinan dos corrientes de alimentación de disolución acuosa de ARN en una única zona de mezclado con una corriente de disolución etanólica de lípido, todas a la misma velocidad de flujo, por ejemplo en un canal de microfluído tal como se describe a continuación.

El ARN

Los liposomas de la invención incluyen una molécula de ARN que (a diferencia de ARNip, como en la referencia 2) codifica para un inmunógeno que es un polipéptido de la espícula de coronavirus. Tras la administración *in vivo* de las partículas, se libera ARN a partir de las partículas y se traduce en el interior de una célula para proporcionar el inmunógeno *in situ*.

El ARN es de cadena positiva y, por tanto, puede traducirse por células sin necesitar ninguna etapa de replicación intermedia tal como transcripción inversa. También puede unirse a receptores de TLR7 expresados por células inmunitarias, iniciando de ese modo un efecto adyuvante.

Los ARN de cadena positiva preferidos son autorreplicantes. Una molécula de ARN autorreplicante (replicón) puede conducir, cuando se administra a una célula de vertebrado incluso sin ninguna proteína, a la producción de múltiples ARN hijos mediante transcripción a partir de sí misma (mediante una copia antisentido que genera a partir de sí misma). Por tanto, una molécula de ARN autorreplicante es normalmente una molécula de cadena positiva que puede traducirse directamente tras la administración a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que después produce transcritos tanto antisentido como sentido a partir del ARN administrado. Por tanto, el ARN administrado conduce a la producción de múltiples ARN hijos. Estos ARN hijos, así como transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse por sí mismos para proporcionar la expresión *in situ* de un inmunógeno codificado, o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN administrado que se traducen para proporcionar la expresión *in situ* del inmunógeno. El resultado global de esta secuencia de transcripciones es una enorme amplificación del número de los ARN de replicón introducidos y, por tanto, el inmunógeno codificado pasa a ser un producto polipeptídico principal de las células.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación es usar un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones de cadena positiva se traducen tras la administración a una célula para dar una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como poliproteína que se autescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias genómicas de cadena negativa del ARN administrado de cadena positiva. Estos transcritos de cadena negativa pueden transcribirse a su vez para dar copias adicionales del ARN original de cadena positiva y también para dar un transcrito subgenómico que codifica para el inmunógeno. Por tanto, la traducción del transcrito subgenómico conduce a la expresión *in situ* del inmunógeno por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa a partir de un virus Sindbis, un virus del bosque Semliki, un virus de la encefalitis equina del Este, un virus de la encefalitis equina de Venezuela, etc. Pueden usarse secuencias de virus mutantes o de tipo natural, por ejemplo se ha usado el mutante TC83 atenuado de VEEV en replicones [8].

Por tanto, una molécula de ARN autorreplicante preferida codifica para (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN a partir de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un inmunógeno. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, por ejemplo que comprende una o más de las proteínas de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4.

Aunque los genomas de alfavirus se codifican para proteínas de virión estructurales además de la poliproteína replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN autorreplicante de la invención no codifique para proteínas estructurales de alfavirus. Por tanto, un ARN autorreplicante preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contienen ARN. La

incapacidad de producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo natural, la molécula de ARN autorreplicante no puede perpetuarse de forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para la perpetuación en virus de tipo natural están ausentes de los ARN autorreplicantes de la invención y su lugar ha sido ocupado por gen(es) que codifica(n) para el inmunógeno de interés, de tal manera que el transcrito subgenómico codifica para el inmunógeno en vez de las proteínas de virión de alfavirus estructurales.

Por tanto, una molécula de ARN autorreplicante útil con la invención puede tener dos marcos de lectura abiertos. El primer marco de lectura abierto (en 5') codifica para una replicasa; el segundo marco de lectura abierto (en 3') codifica para un inmunógeno. En algunas realizaciones, el ARN puede tener marcos de lectura abiertos adicionales (por ejemplo, en el sentido de 3') por ejemplo para codificar para inmunógenos adicionales (véase a continuación) o para codificar para polipéptidos auxiliares.

Una molécula de ARN autorreplicante puede tener una secuencia en 5' que es compatible con la replicasa codificada.

Las moléculas de ARN autorreplicante pueden tener diversas longitudes, pero normalmente tienen 5000-25000 nucleótidos de longitud, por ejemplo 8000-15000 nucleótidos o 9000-12000 nucleótidos. Por tanto, el ARN es más largo de lo que se observa en la administración de ARNip.

Una molécula de ARN útil con la invención puede tener una caperuza en 5' (por ejemplo, una 7-metilguanosina). Esta caperuza puede potenciar la traducción *in vivo* del ARN.

El nucleótido en 5' de una molécula de ARN útil con la invención puede tener un grupo trifosfato en 5'. En un ARN con caperuza, esto puede estar unido a una 7-metilguanosina a través de un puente de 5' a 5'. Un trifosfato en 5' puede potenciar la unión a RIG-I y, por tanto, fomentar los efectos adyuvantes.

Una molécula de ARN puede tener una cola de poli-A en 3'. También puede incluir una secuencia de reconocimiento de poli-A polimerasa (por ejemplo, AAUAAA) cerca de su extremo 3'.

Una molécula de ARN útil con la invención será normalmente monocatenaria. Los ARN monocatenarios pueden iniciar generalmente un efecto adyuvante mediante unión a TLR7, TLR8, ARN helicasas y/o PKR. El ARN administrado en forma bicatenaria (ARNbc) puede unirse a TLR3, y este receptor también puede activarse mediante ARNbc que se forma o bien durante la replicación de un ARN monocatenario o bien dentro de la estructura secundaria de un ARN monocatenario.

Una molécula de ARN útil con la invención puede prepararse de manera conveniente mediante transcripción *in vitro* (IVT). IVT puede usar un molde (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias, o creado de manera sintética (por ejemplo, mediante métodos de ingeniería de síntesis génica y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, puede usarse una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como las ARN polimerasas de bacteriófago T7, T3 o SP6) para transcribir el ARN a partir de un molde de ADN. Pueden usarse reacciones apropiadas de adición de caperuza y adición de poli-A según se requiera (aunque la poli-A del replicón se codifica habitualmente dentro del molde de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener requisitos rigurosos para el/los nucleótido(s) en 5' transcrito(s) y, en algunas realizaciones, estos requisitos deben hacerse corresponder con los requisitos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito por IVT puede funcionar de manera eficiente como sustrato para su replicasa codificada por sí mismo.

Tal como se comenta en la referencia 9, el ARN autorreplicante puede incluir (además de cualquier estructura de caperuza en 5') uno o más nucleótidos que tienen una nucleobase modificada. Por tanto, el ARN puede comprender m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina), m2A (2-metiladenosina), Am (2'-O-metiladenosina), ms2m6A (2-metiltio-N6-metiladenosina), i6A (N6-isopenteniladenosina), ms2i6A (2-metiltio-N6-isopenteniladenosina), io6A (N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina), ms2io6A (2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina), g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina), t6A (N6-treonilcarbamoiladenosina), ms2t6A (2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina), m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina), hn6A (N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina), ms2hn6A (2-metiltio-N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina), Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m11 (1-metilinosina); m1m (1,2'-O-dimetilinosina); m3C (3-metilcitidina); Cm (2T-O-metilcitidina); s2C (2-tiocitidina); ac4C (N4-acetilcitidina); f5C (5-fonnilcitidina); m5Cm (5,2-O-dimetilcitidina); ac4Cm (N4-acetil-2TO-metilcitidina); k2C (lisidina); m1G (1-metilguanosina); m2G (N2-metilguanosina); m7G (7-metilguanosina); Gm (2'-O-metilguanosina); m22G (N2,N2-dimetilguanosina); m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanosina); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosina); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)); yW (wibutosina); o2yW (peroxiwibutosina); OHyW (hidroxiwibutosina); OHyW* (hidroxiwibutosina sin modificar); imG (wiosina); mimG (metilguanosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galtactosil-queuosina); manQ (manosil-queuosina); preQo (7-ciano-7-desazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-desazaguanosina); G* (arqueosina); D (dihidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp3U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho5U (5-hidroxiuridina); mo5U (5-metoxiuridina); cmo5U (ácido uridin-5-oxiacético); mcmo5U (éster metílico del ácido uridin-5-oxiacético);

chm5U (5-(carboxihidroximetil)uridina)); mchm5U (éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)uridina); mcm5U (5-metoxycarbonil-metiluridina); mcm5Um (S-metoxycarbonilmetil-2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm5U (5-metilaminometiluridina); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetiluridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina); cmnm5Um (5-carboximetilaminometil-2-L-O-metiluridina); cmnm5s2U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m62A (N6,N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitidina); m4Cm (N4,2-O-dimetilcitidina); hm5C (5-hidroximetilcitidina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carboximetiluridina); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosina); rn62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosina); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosina); m3Um (3,2T-O-dimetiluridina); m5D (5-metildihidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m'Am (1,2-O-dimetiladenosina)irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina)); imG-14 (4-desmetilguanosina); imG2 (isoguanosina); o ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados sustituidos en siete de la misma, dihidouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(alquil C1-C6)-uracilo, 5-metiluracilo, 5-(alquenil C2-C6)-uracilo, 5-(alquil C2-C6)-uracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(alquil C1-C6)-citosina, 5-metilcitosina, 5-(alquenil C2-C6)-citosina, 5-(alquil C2-C6)-citosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 7-desazaguanina, 8-azaguanina, 7-desaza-guanina sustituida en 7, 7-desaza-7-(alquil C2-C6)guanina, 7-desaza-guanina sustituida en 8, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-desazapurina sustituida, 7-desaza-purina sustituida en 7, 7-desaza-purina sustituida en 8, o un nucleótido abásico. Por ejemplo, un ARN autorreplicante puede incluir una o más nucleobases de pirimidina modificadas, tales como residuos de pseudouridina y/o 5-metilcitosina. Sin embargo, en algunas realizaciones, el ARN no incluye ninguna nucleobase modificada, y puede no incluir ningún nucleótido modificado, es decir, todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos de A, C, G y U convencionales (excepto por cualquier estructura de caperuza en 5', que puede incluir una 7'-metilguanosina). En otras realizaciones, el ARN puede incluir una caperuza en 5' que comprende una 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos en 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

De manera ideal, un ARN usado con la invención solo incluye uniones fosfodiéster entre nucleósidos, pero, en algunas realizaciones, puede contener uniones fosforamidoato, fosforotioato y/o metilfosfonato.

De manera ideal, un liposoma incluye menos de 10 especies diferentes de ARN, por ejemplo 5, 4, 3 o 2 especies diferentes; lo más preferiblemente, un liposoma incluye una única especie de ARN, es decir, todas las moléculas de ARN en el liposoma tienen la misma secuencia y la misma longitud.

La cantidad de ARN por cada liposoma puede variar. El número de moléculas de ARN autorreplicante individuales por cada liposoma es normalmente de ≤ 50 , por ejemplo < 20 , < 10 , < 5 o 1-4 por cada liposoma.

El inmunógeno

Las moléculas de ARN usadas con la invención codifican para un inmunógeno polipeptídico, que es un polipéptido de la espícula de coronavirus. Tras la administración de los liposomas, el ARN se traduce *in vivo* y el inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta de anticuerpos (que habitualmente incluye IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células.

La molécula de ARN puede codificar para un único inmunógeno polipeptídico o múltiples polipéptidos. Múltiples inmunógenos pueden presentarse como un único inmunógeno polipeptídico (polipéptido de fusión) o como polipéptidos independientes. Si los inmunógenos se expresan como polipéptidos independientes a partir de un replicón, entonces uno o más de los mismos pueden estar dotados de un IRES en el sentido de 5' o un elemento de promotor viral adicional.

Alternativamente, pueden expresarse múltiples inmunógenos a partir de una poliproteína que codifica para inmunógenos individuales fusionados a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo, proteína 2A del virus de la enfermedad de pies y boca) o como inteínas.

A diferencia de las referencias 1 y 10, el ARN codifica para un inmunógeno que es un polipéptido de la espícula de coronavirus. Para evitar cualquier duda, la invención no abarca ARN que codifica para una luciferasa de luciérnaga o que codifica para una proteína de fusión de β -galactosidasa de *E.coli* o que codifica para una proteína verde fluorescente (GFP). Tales polipéptidos pueden ser útiles como marcadores, o incluso en un contexto de terapia génica, pero la invención se refiere a la administración de ARN para provocar un sistema de respuesta inmunológica. Por tanto, el inmunógeno tampoco es una autoproteína que se administra para complementar o sustituir una proteína huésped defectuosa (como en terapia génica). Además, el ARN no es ARN de timo de ratón total.

El polipéptido de la espícula de coronavirus provoca una respuesta inmunitaria contra un coronavirus. El polipéptido de la espícula de coronavirus incluye, pero no se limita a, los derivados de un coronavirus de SARS, bronquitis

infecciosa aviar (VBI), virus de la hepatitis del ratón (VHR) y virus de gastroenteritis transmisible porcina (VGET).

Composiciones farmacéuticas

5 Los liposomas de la invención son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para inmunizar a sujetos contra diversas enfermedades. Estas composiciones incluirán normalmente un portador farmacéuticamente aceptable además de los liposomas. En la referencia 29 está disponible una discusión exhaustiva sobre portadores farmacéuticamente aceptables.

10 Una composición farmacéutica de la invención puede incluir uno o más inmunopotenciadores de molécula pequeña. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (por ejemplo, Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (por ejemplo, un fosfato de aminoalquil-glucosaminida, tal como E6020), un agonista de TLR7 (por ejemplo, imiquimod), un agonista de TLR8 (por ejemplo, resiquimod) y/o un agonista de TLR9 (por ejemplo, IC31). De manera ideal, cualquiera de tales agonistas tiene un peso molecular de <2000 Da. En algunas realizaciones, tal(es) agonista(s) 15 también está(n) encapsulado(s) con el ARN dentro de liposomas, pero, en otras realizaciones, no está(n) encapsulado(s).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir los liposomas en agua pura (por ejemplo, w.f.i.) o en un tampón, por ejemplo un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón 20 histidina o un tampón citrato. Normalmente se incluirán sales de tampón en el intervalo de 5-20 mM.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden tener un pH de entre 5,0 y 9,5, por ejemplo entre 6,0 y 8,0.

Las composiciones de la invención también pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar 25 tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl resulta típica, por ejemplo de aproximadamente 9 mg/ml.

Las composiciones de la invención pueden incluir quelantes de iones metálicos. Estos pueden prolongar la estabilidad de ARN eliminando iones que pueden acelerar la hidrólisis de fosfodiéster. Por tanto, una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, etc. Tales quelantes están normalmente presentes a entre 10- 30 500 μ M, por ejemplo 0,1 mM. Una sal de citrato, tal como citrato de sodio, también puede actuar como quelante, al tiempo que también proporciona ventajosamente actividad tamponante.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden tener una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, por ejemplo entre 240-360 mOsm/kg o entre 290-310 mOsm/kg. 35

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefieren composiciones libres de mercurio y pueden prepararse vacunas libres de conservantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferiblemente estériles. 40

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferiblemente no pirogénicas, conteniendo, por ejemplo, <1 UE (unidad de endotoxina, una medida convencional) por dosis, y preferiblemente <0,1 UE por dosis.

Las composiciones farmacéuticas de la invención están preferiblemente libres de gluten. 45

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en una forma de dosis unitaria. En algunas realizaciones, una dosis unitaria puede tener un volumen de entre 0,1-1,0 ml, por ejemplo de aproximadamente 0,5 ml.

Las composiciones pueden prepararse como productos inyectables, o bien como disoluciones o bien como 50 suspensiones. La composición puede prepararse para su administración pulmonar, por ejemplo mediante un inhalador, usando una pulverización fina. La composición puede prepararse para su administración nasal, aural u ocular, por ejemplo como pulverización o colirios. Los productos inyectables para administración intramuscular resultan típicos.

Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de liposomas, así como cualquier otro 55 componente, según se necesite. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" quiere decirse que la administración de esa cantidad a un individuo, o bien en una única dosis o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y el estado físico del individuo que va a tratarse, la edad, el grupo taxonómico del individuo que va a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la 60 vacuna, la evaluación del médico encargado sobre la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encontrará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina. El contenido en liposoma y ARN de las composiciones de la invención se expresará generalmente en cuanto a la cantidad de ARN por dosis. Una dosis preferida tiene ≤ 100 μ g de ARN (por ejemplo, desde 10-100 μ g, tal como aproximadamente 10 μ g, 25 μ g, 50 μ g, 75 μ g o 100 μ g), pero puede observarse expresión a niveles mucho menores,

por ejemplo $\leq 1 \mu\text{g/dosis}$, $\leq 100 \text{ ng/dosis}$, $\leq 10 \text{ ng/dosis}$, $\leq 1 \text{ ng/dosis}$, etc.

La invención también proporciona un dispositivo de administración (por ejemplo, jeringa, nebulizador, pulverizador, inhalador, parche dérmico, etc.) que contiene una composición farmacéutica de la invención. Este dispositivo puede usarse para administrar la composición a un sujeto vertebrado.

Los liposomas de la invención no contienen ribosomas.

Usos médicos

En contraste con las partículas dadas a conocer en la referencia 10, los liposomas y las composiciones farmacéuticas de la invención son para su uso *in vivo* para provocar una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno de interés.

La invención también proporciona un liposoma o una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método para producir una respuesta inmunitaria en un vertebrado.

Produciendo una respuesta inmunitaria en el vertebrado mediante estos usos y métodos, puede protegerse al vertebrado contra diversas enfermedades y/o infecciones, por ejemplo contra enfermedades bacterianas y/o virales tal como se comentó anteriormente. Los liposomas y las composiciones son inmunogénicos y, más preferiblemente, son composiciones de vacuna. Las vacunas según la invención pueden ser o bien profilácticas (es decir, para prevenir una infección) o bien terapéuticas (es decir, para tratar una infección), pero normalmente serán profilácticas.

El vertebrado es preferiblemente un mamífero, tal como un ser humano o un mamífero veterinario grande (por ejemplo, caballos, ganado, ciervos, cabras, cerdos). Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferiblemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferiblemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

Las vacunas preparadas según la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Por tanto, un paciente humano puede tener menos de 1 año de edad, menos de 5 años de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son las personas ancianas (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad y preferiblemente ≥ 65 años), las personas jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), los pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, personal militar y de las fuerzas armadas, mujeres embarazadas, los enfermos crónicos o pacientes inmunodeficientes. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos y pueden usarse de manera más general en una población.

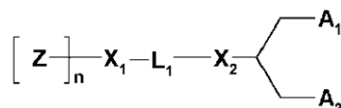
Generalmente, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede lograrse mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica o en el espacio intersticial de un tejido; a diferencia de la referencia 1, normalmente no se usa inyección intraglosal con la presente invención). Las vías de administración alternativas incluyen rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverización), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración mucosa. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas. La inyección puede realizarse mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

La invención puede usarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa, preferiblemente para provocar una inmunidad sistémica y/o mucosa potenciada.

La dosificación puede realizarse mediante un esquema de una única dosis o un esquema de múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en un esquema de inmunización primaria y/o en un esquema de inmunización de refuerzo. En un esquema de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por la misma vía o diferentes vías, por ejemplo una sensibilización parenteral y refuerzo mucoso, una sensibilización mucosa y refuerzo parenteral, etc. Normalmente se administrarán múltiples dosis separadas al menos 1 semana (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). En una realización, pueden administrarse múltiples dosis aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas tras el nacimiento, por ejemplo a la edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, tal como se usa con frecuencia en el programa ampliado de inmunización ("PAI") de la Organización Mundial de la Salud. En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias separadas aproximadamente dos meses, por ejemplo separadas aproximadamente 7, 8 o 9 semanas, seguidas por una o más dosis de refuerzo aproximadamente de 6 meses a 1 año tras la segunda dosis primaria, por ejemplo aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses tras la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias separadas aproximadamente dos meses, por ejemplo separadas aproximadamente 7, 8 o 9 semanas, seguidas por una o más dosis de refuerzo aproximadamente de 6 meses a 1 año tras la tercera dosis primaria, por ejemplo aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses tras la tercera dosis primaria.

Fórmula (X)

Los compuestos de fórmula (X) contienen un grupo de cabeza de polímero hidrófilo unido a un resto lipídico. Pueden describirse como "lípidos furtivos" y tienen la fórmula:



en la que:

Z es un componente de grupo de cabeza hidrófilo seleccionado de PEG y polímeros basados en polioxazolina, poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poliglicerol, poli(N-vinilpirrolidona), poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida] y poliaminoácidos, en el que el polímero puede ser lineal o ramificado, y en el que el polímero puede estar opcionalmente sustituido;

en la que Z está polimerizado por n subunidades;

n es un grado de polimerización promedio en número de entre 10 y 200 unidades de Z, en el que n se optimiza para diferentes tipos de polímero;

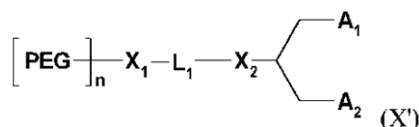
L₁ es un grupo de unión de alquileo C₁₋₁₀ o heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que incluye ninguno, uno o dos de un éter (por ejemplo, -O-), éster (por ejemplo, -C(O)O-), succinato (por ejemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por ejemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por ejemplo, -OC(O)O-), urea (por ejemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por ejemplo, -NR'-), amida (por ejemplo, -C(O)NR'-), imina (por ejemplo, -C(NR')-), tioéter (por ejemplo, -S-), xantato (por ejemplo, -OC(S)S-) y fosfodiéster (por ejemplo, -OP(O)₂O-),

en el que R' se selecciona independientemente de -H, -NH-, -NH₂, -O-, -S-, un fosfato o un alquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido;

X₁ y X₂ se seleccionan independientemente de un carbono o un heteroátomo seleccionado de -NH-, -O-, -S- o un fosfato;

A₁ y A₂ se seleccionan independientemente de un alquilo C₆₋₃₀, alquenilo C₆₋₃₀ y alquinilo C₆₋₃₀, en los que A₁ y A₂ pueden ser iguales o diferentes, o A₁ y A₂ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un esteroide opcionalmente sustituido.

En una realización, el compuesto de fórmula (X) tiene la fórmula (X')



en la que

PEG es una subunidad de polietilenglicol, en el que el PEG puede ser lineal o ramificado;

n es un grado de polimerización promedio en número de entre 10 y 200 unidades de PEG, preferiblemente de aproximadamente 45 unidades;

L₁ es un grupo de unión de heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que contiene uno o dos de un éter, éster, succinato, carbamato, carbonato, urea, amina, amida, imina, tioéter, xantato y fosfodiéster;

X₁ y X₂ son oxígeno;

A₁ y A₂ se seleccionan independientemente de un alquilo C₆₋₃₀, alquenilo C₆₋₃₀ y alquinilo C₆₋₃₀, en los que A₁ y A₂ pueden ser iguales o diferentes, o en los que A₁ y A₂ junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un esteroide opcionalmente sustituido.

Los lípidos de las fórmulas (X) y (X'), cuando se formulan con lípidos catiónicos para formar liposomas, pueden aumentar la duración de tiempo durante el cual puede existir un liposoma *in vivo* (por ejemplo, en la sangre). Pueden

proteger la superficie de una superficie de liposoma y de ese modo reducir la opsonización mediante proteínas de la sangre y captación mediante macrófagos. Se encuentran detalles adicionales en las referencias 30 y 31. En una realización, el lípido comprende un grupo seleccionado de PEG (algunas veces denominado poli(óxido de etileno)) y polímeros basados en polioxazolina, poli(alcohol vinílico), poliglicerol, poli(N-vinilpirrolidona), poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida] y poliaminoácidos.

Los lípidos pegilados adecuados para su uso con la invención incluyen conjugados de polietilenglicol-diacilglicerol o polietilenglicol-dialquilglicerol (PEG-DAG) incluyendo aquellos que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglicerol que tiene una longitud de cadena de alquilo que comprende independientemente desde aproximadamente C₄ hasta aproximadamente C₄₀ átomos de carbono saturados o insaturados. El grupo dialquilglicerol o dialquilglicerol puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos. El lípido pegilado puede seleccionarse de PEG-dilaurilglicerol, PEG-dimiristilglicerol (n.º de catálogo GM-020 de NOF), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-diesterilglicerol, PEG-dilaurilglicerol, PEG-dimiristilglicerol, PEG-dipalmitoil-glicerol, y PEG-diesterilglicerol, PEG-colesterol (1-[8'-(colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-metil-polietilenglicol, PEG-DMB (3,4-ditetradecoxilbencil-[omega]-metil-polietilenglicol éter), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (n.º de catálogo 880150P de Avanti Polar Lipids). Otros lípidos pegilados útiles son S001, S002, S003, S004, S005, S006, S007, S008, S009, S010, S011 y CS-020SA (NOF); S010 y S011 se dan a conocer en la referencia 32 en las etiquetas IVa y IVc, respectivamente. En la referencia 32, se usa una síntesis diferente de la notificada en el presente documento para preparar IVa y IVc.

Términos químicos y definiciones

Halo

El término "halógeno" (o "halo") incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Alquilo, alquilenilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, etc.

Los términos "alquilo", "alquilenilo", "alquenilo" y "alquinilo" se usan en el presente documento para hacer referencia a formas acíclicas de cadena tanto lineal como ramificada. Los análogos cíclicos de los mismos se denominan cicloalquilo, etc.

El término "alquilo" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos monovalentes, lineales o ramificados, saturados. En una realización, alquilo es alquilo C₁₋₁₀, en otra realización alquilo C₁₋₆, en otra realización alquilo C₁₋₄, tal como grupos metilo, etilo, n-propilo, i-propilo o t-butilo.

El término "cicloalquilo" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos monovalentes, saturados. En una realización cicloalquilo es cicloalquilo C₃₋₁₀, en otra realización cicloalquilo C₃₋₆ tal como ciclopentilo y ciclohexilo.

El término "alcoxilo" significa alquil-O-.

El término "alquenilo" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos monovalentes, lineales o ramificados, insaturados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún triple enlace carbono-carbono. En una realización alquenilo es alquenilo C₂₋₁₀, en otra realización alquenilo C₂₋₆, en otra realización alquenilo C₂₋₄.

El término "cicloalquenilo" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos monovalentes, parcialmente insaturados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún triple enlace carbono-carbono. En una realización cicloalquenilo es cicloalquenilo C₃₋₁₀, en otra realización cicloalquenilo C₅₋₁₀, por ejemplo ciclohexenilo o benzociclohexilo.

El término "alquinilo" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos monovalentes, lineales o ramificados, insaturados que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún doble enlace carbono-carbono. En una realización, alquinilo es alquinilo C₂₋₁₀, en otra realización alquinilo C₂₋₆, en otra realización alquinilo C₂₋₄.

El término "cicloalquinilo" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos monovalentes, parcialmente insaturados que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún doble enlace carbono-carbono. En una realización cicloalquinilo es cicloalquenilo C₃₋₁₀, en otra realización cicloalquinilo C₅₋₁₀.

El término "alquilenilo" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos divalentes, lineales o ramificados, saturados. En una realización alquilenilo es alquilenilo C₁₋₁₀, en otra realización alquilenilo C₁₋₆, en otra realización alquilenilo C₁₋₄, tal como grupos metileno, etileno, n-propileno, i-propileno o t-butileno.

El término "alquenileno" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos divalentes, lineales o ramificados, insaturados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún triple enlace carbono-carbono. En una

realización alquenileno es alquenileno C₂₋₁₀, en otra realización alquenileno C₂₋₆, en otra realización alquenileno C₂₋₄.

El término “alquinileno” incluye grupos hidrocarbilo acíclicos divalentes, lineales o ramificados, insaturados que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y, en una realización, ningún doble enlace carbono-carbono. En una

Heteroalquilo, etc.

El término “heteroalquilo” incluye grupos alquilo en los que hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si (y preferiblemente O, S(O)_q o N), siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de alquilo. El grupo heteroalquilo puede estar unido en C o unido en heteroátomo, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si.

El término “heterocicloalquilo” incluye grupos cicloalquilo en los que hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de cicloalquilo. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen oxiranilo, tiaranilo, aziridinilo, oxetanilo, tiatanilo, azetidínilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, 1,4-oxatíanilo, morfolínilo, 1,4-ditíanilo, piperazinilo, 1,4-azatíanilo, oxepanilo, tiepanilo, azepanilo, 1,4-dioxepanilo, 1,4-oxatiepanilo, 1,4-oxaazepanilo, 1,4-ditiepanilo, 1,4-tieazepanilo y 1,4-diazeapanilo. El grupo heterocicloalquilo puede estar unido en C o unido en N, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de un átomo de nitrógeno.

El término “heteroalquenilo” incluye grupos alquenilo en los que hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de alquenilo. El grupo heteroalquenilo puede estar unido en C o unido en heteroátomo, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_q o N.

El término “heterocicloalquenilo” incluye grupos cicloalquenilo en los que hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de cicloalquenilo. Los ejemplos de grupos heterocicloalquenilo incluyen 3,4-dihidro-2H-piranilo, 5-6-dihidro-2H-piranilo, 2H-piranilo, 1,2,3,4-tetrahidropiridinilo y 1,2,5,6-tetrahidropiridinilo. El grupo heterocicloalquenilo puede estar unido en C o unido en N, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de un átomo de nitrógeno.

El término “heteroalquinilo” incluye grupos alquinilo en los que hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de alquinilo. El grupo heteroalquinilo puede estar unido en C o unido en heteroátomo, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_q o N.

El término “heterocicloalquinilo” incluye grupos cicloalquinilo en los que hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de cicloalquinilo. El grupo heterocicloalquinilo puede estar unido en C o unido en N, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de un átomo de nitrógeno.

El término “heteroalquileno” incluye grupos alquileno en los que hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de alquileno.

El término “heteroalquenileno” incluye grupos alquenileno en los que hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de alquenileno.

El término “heteroalquinileno” incluye grupos alquinileno en los que hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que quede al menos uno de los átomos de carbono de alquinileno.

Arilo

5 El término “arilo” incluye grupos hidrocarbilo cíclicos, monovalentes, aromáticos, tales como fenilo o naftilo (por ejemplo, 1-naftilo o 2-naftilo). En general, los grupos arilo pueden ser grupos aromáticos monocíclicos o policíclicos de anillos condensados. Los arilos preferidos son arilo C₆-C₁₄.

10 Otros ejemplos de grupos arilo son derivados monovalentes de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiaden, pireno, pirantreno y rubiceno.

El término “arilalquilo” significa alquilo sustituido con un grupo arilo, por ejemplo bencilo.

15 El término “arileno” incluye grupos hidrocarbilo cíclicos, divalentes, aromáticos, tales como fenileno. En general, los grupos arileno pueden ser grupos aromáticos monocíclicos o policíclicos de anillos condensados. Los arileno preferidos son arileno C₆-C₁₄. Otros ejemplos de grupos arileno son derivados divalentes de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiaden, pireno, pirantreno y rubiceno.

20 Heteroarilo

El término “heteroarilo” incluye grupos hidrocarbilo cíclicos monovalentes, heteroaromáticos que contienen adicionalmente uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y NR^N, en los que R^N se define a continuación (y en una realización es H o alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆)).

25 En general, los grupos heteroarilo pueden ser grupos heteroaromáticos monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclicos) de anillos condensados. En una realización, los grupos heteroarilo contienen 5-13 miembros de anillo (preferiblemente 5-10 miembros) y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos de anillo independientemente seleccionados de O, S, N y NR^N. En una realización, un grupo heteroarilo puede tener 5, 6, 9 o 10 miembros, por ejemplo monocíclico de 5 miembros, monocíclico de 6 miembros, bicíclico de anillos condensados de 9 miembros o bicíclico de anillos condensados de 10 miembros.

30 Los grupos heteroaromáticos monocíclicos incluyen grupos heteroaromáticos que contienen 5-6 miembros de anillo y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados de O, S, N o NR^N.

35 En una realización, los grupos heteroarilo monocíclicos de 5 miembros contienen 1 miembro de anillo que es un grupo -NR^N-, un átomo de -O- o un átomo de -S- y, opcionalmente, 1-3 miembros de anillo (por ejemplo, 1 o 2 miembros de anillo) que son átomos de =N- (en los que el resto de los 5 miembros de anillo son átomos de carbono).

40 Ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de 5 miembros son pirrolilo, furanilo, tiofenilo, pirazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, tiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, 1,3,5-triazinilo, 1,2,4-triazinilo, 1,2,3-triazinilo y tetrazolilo.

45 Ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de 6 miembros son piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo.

En una realización, los grupos heteroarilo monocíclicos de 6 miembros contienen 1 o 2 miembros de anillo que son átomos de =N- (en los que el resto de los 6 miembros de anillo son átomos de carbono).

50 Los grupos heteroaromáticos bicíclicos incluyen grupos heteroaromáticos de anillos condensados que contienen 9-13 miembros de anillo y 1, 2, 3, 4 o más heteroátomos seleccionados de O, S, N o NR^N.

55 En una realización, los grupos heteroarilo bicíclicos de 9 miembros contienen 1 miembro de anillo que es un grupo -NR^N-, un átomo de -O- o un átomo de -S- y, opcionalmente, 1-3 miembros de anillo (por ejemplo, 1 o 2 miembros de anillo) que son átomos de =N- (en los que el resto de los 9 miembros de anillo son átomos de carbono).

60 Ejemplos de grupos heteroarilo bicíclicos de anillos condensados de 9 miembros son benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, bencimidazolilo, indazolilo, benzotriazolilo, pirrolo[2,3-b]piridinilo, pirrolo[2,3-c]piridinilo, pirrolo[3,2-c]piridinilo, pirrolo[3,2-b]piridinilo, imidazo[4,5-b]piridinilo, imidazo[4,5-c]piridinilo, pirazolo[4,3-d]piridinilo, pirazolo[4,3-c]piridinilo, pirazolo[3,4-c]piridinilo, pirazolo[3,4-b]piridinilo, isoindolilo, indazolilo, purinilo, indolinilo, imidazo[1,2-a]piridinilo, imidazo[1,5-a]piridinilo, pirazolo[1,2-a]piridinilo, pirrolo[1,2-b]piridazinilo y imidazo[1,2-c]pirimidinilo.

En una realización, los grupos heteroarilo bicíclicos de 10 miembros contienen 1-3 miembros de anillo que son átomos de =N- (en los que el resto de los 10 miembros de anillo son átomos de carbono).

Ejemplos de grupos heteroarilo bicíclicos de anillos condensados de 10 miembros son quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, 1,6-naftiridinilo, 1,7-naftiridinilo, 1,8-naftiridinilo, 1,5-naftiridinilo, 2,6-naftiridinilo, 2,7-naftiridinilo, pirido[3,2-d]pirimidinilo, pirido[4,3-d]pirimidinilo, pirido[3,4-d]pirimidinilo, pirido[2,3-d]pirimidinilo, pirido[2,3-b]pirazinilo, pirido[3,4-b]pirazinilo, pirimido[5,4-d]pirimidinilo, pirazino[2,3-b]pirazinilo y pirimido[4,5-d]pirimidinilo.

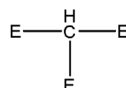
El término “heteroarilalquilo” significa alquilo sustituido con un grupo heteroarilo.

- 10 El término “heteroarileno” incluye grupos hidrocarbilo cíclicos, heteroaromáticos, divalentes que contienen adicionalmente uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y NR^N, en los que R^N se define a continuación (y en una realización es H o alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆)). En general, los grupos heteroarileno pueden ser grupos heteroaromáticos monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclicos) de anillos condensados. En una realización, los grupos heteroarileno contienen 5-13 miembros de anillo (preferiblemente 5-10 miembros) y 1, 2, 3 o 4 ring heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y NR^N. En una realización, un grupo heteroarileno puede tener 5, 6, 9 o 10 miembros, por ejemplo monocíclico de 5 miembros, monocíclico de 6 miembros, bicíclico de anillos condensados de 9 miembros o bicíclico de anillos condensados de 10 miembros. El término “heteroarileno” incluye derivados divalentes de cada uno de los grupos heteroarilo comentados anteriormente.

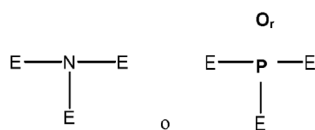
- 20 Los términos “arilo”, “aromático”, “heteroarilo” y “heteroaromático” también incluyen grupos que están parcialmente reducidos. Por tanto, por ejemplo, “heteroarilo” incluye especies condensadas en las que uno de los anillos se ha reducido para dar un anillo saturado (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-ilo).

General

- 25 A menos que se indique explícitamente lo contrario, cuando se hace referencia a combinaciones de grupos en el presente documento como un resto, por ejemplo arilalquilo, el último grupo mencionado contiene el átomo por el que el resto se une al resto de la molécula.
- 30 Cuando se hace referencia a que un átomo de carbono de un grupo alquilo u otro grupo está sustituido por O, S(O)_q, N o P(O)_r, lo que quiere decirse es que:



- 35 se sustituye por



(en los que E no puede ser H);

- 40 -CH= se sustituye por -N= o -P(O)_r;

=C-H se sustituye por ≡N o ≡P(O)_r; o

- 45 -CH₂- se sustituye por -O-, -S(O)_q-, -NR^N- o -P(O)_rR^N-, en los que R^N es H o alquilo C₁₋₆, heteroalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, heterocicloalquilo C₃₋₆, alquenilo C₂₋₆, heteroalquenilo C₂₋₆, cicloalquenilo C₃₋₆, heterocicloalquenilo C₃₋₆, fenilo o heteroarilo que contiene 5 o 6 miembros de anillo opcionalmente sustituidos. R^N es preferiblemente H, alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₃₋₆.

- 50 q es independientemente 0, 1 o 2. En una realización, q es 0.

r es independientemente 0 o 1. En una realización, r es 0.

Cuando se hace referencia a que un átomo de carbono está sustituido por Si, lo que quiere decirse es que el átomo

de carbono se intercambia por un átomo de silicio, pero que los enlaces permanecen por lo demás iguales. Por tanto, por ejemplo, $-\text{CH}_2-$ se sustituye por $-\text{SiH}_2-$; $-\text{CH}=\text{}$ se sustituye por $-\text{SiH}=\text{}$; y $\equiv\text{C}-\text{H}$ se sustituye por $\equiv\text{Si}-\text{H}$.

A modo de aclaración/clarificación, con respecto a los grupos que contienen heteroátomo anteriormente mencionados (tales como heteroalquilo, etc.), cuando se facilita un número de átomos de carbono, por ejemplo heteroalquilo C_{3-6} , lo que quiere decirse es un grupo basado en alquilo C_{3-6} en el que uno o más de los 3-6 átomos de carbono de la de cadena están sustituidos por O, $\text{S}(\text{O})_q$ o N. Por consiguiente, un grupo heteroalquilo C_{3-6} contendrá, por ejemplo, menos de 3-6 átomos de carbono de la cadena. Como otro, un grupo piridilo se clasificará como un grupo heteroarilo C_6 aunque contiene 5 átomos de carbono.

Sustitución

Los grupos de los compuestos de la invención (por ejemplo, grupos alquilo, cicloalquilo, alcoxilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, alquilenilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, heteroalqueno, heterocicloalqueno, heteroalquino, heteroalquilenilo, heteroalquilenarilo, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo o heteroarilheteroalquilo, etc.) pueden estar sustituidos o no sustituidos, en una realización no sustituidos. Normalmente, la sustitución implica el remplazo teórico de un átomo de hidrógeno por un grupo sustituyente, o dos átomos de hidrógeno en el caso de sustitución por $=\text{O}$.

Cuando están sustituidos, habrá generalmente de 1 a 5 sustituyentes en cada grupo, en una realización de 1 a 3 sustituyentes, en una realización 1 o 2 sustituyentes, en una realización 1 sustituyente. Una realización incluye más de un sustituyente en el mismo átomo, por ejemplo un grupo acetal.

En una realización, el/los sustituyente(s) es/son independientemente Sub^1 o Sub^2 (en una realización Sub^2) en los que:

Sub^1 es independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{N}^+(\text{R}^s)_2\text{O}^-$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2\text{R}^s$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SOR}^s$, $-\text{SO}_2\text{R}^s$, $-\text{SO}_3\text{R}^s$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}^s$, $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^s$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^s$, $=\text{O}$, $-\text{NR}^s$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^s$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{C}(=\text{O})\text{OR}^s$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{C}(=\text{O})\text{NR}^s$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^s$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{C}(=\text{O})\text{R}^s$, $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}^s$, $-\text{NR}^s\text{C}(=\text{S})\text{R}^s$, $-\text{SO}_2\text{NR}^s$, $-\text{NR}^s\text{SO}_2\text{R}^s$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{C}(=\text{S})\text{NR}^s$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{SO}_2\text{NR}^s$, $-\text{R}^s$ o $-\text{Z}^s\text{R}^s$, en los que;

Z^s es independientemente O, S o NR^s ;

R^s es independientemente H o alquilo C_{1-6} , heteroalquilo C_{1-6} , $-(\text{Alk}^a)_f\text{-cicloalquilo } \text{C}_{3-6}$, $-(\text{Alk}^a)_f\text{-heterocicloalquilo } \text{C}_{3-6}$, alqueno C_{2-6} , heteroalqueno C_{2-6} , $-(\text{Alk}^a)_f\text{-cicloalqueno } \text{C}_{3-6}$, $-(\text{Alk}^a)_f\text{-heterocicloalqueno } \text{C}_{3-6}$, alquino C_{2-6} , heteroalquino C_{2-6} , $-(\text{Alk}^a)_f\text{-arilo } \text{C}_{6-14}$, $-(\text{Alk}^a)_f\text{-arilo } \text{C}_{6-14}$ o $-(\text{Alk}^a)_f\text{-heteroarilo}$ (en el que el heteroarilo contiene 5-13 miembros de anillo), en los que

f es 0 o 1;

Alk^a es alquilenilo C_{1-6} o heteroalquilenilo C_{1-6} ; y

R^s está a su vez opcionalmente sustituido (en una realización no sustituido) con de 1 a 3 sustituyentes Sub^2 ;

Sub^2 es independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{N}^+(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2\text{O}^-$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{SO}_2\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{SO}_3\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{O-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $=\text{O}$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})\text{C}(=\text{O})\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})\text{C}(=\text{S})\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})\text{SO}_2\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})\text{SO}_2\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{heteroalquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{cicloalquilo } \text{C}_{3-6}$, $-\text{heterocicloalquilo } \text{C}_{3-6}$, $-\text{alqueno } \text{C}_{2-6}$, $-\text{heteroalqueno } \text{C}_{2-6}$, $-\text{cicloalqueno } \text{C}_{3-6}$, $-\text{heterocicloalqueno } \text{C}_{3-6}$, $-\text{alquino } \text{C}_{2-6}$, $-\text{heteroalquino } \text{C}_{2-6}$, $-\text{arilo } \text{C}_{6-14}$, $-\text{heteroarilo } \text{C}_{5-13}$, $-\text{Z}^l\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{Z}^l\text{-cicloalquilo } \text{C}_{3-6}$, $-\text{Z}^l\text{-alqueno } \text{C}_{2-6}$, $-\text{Z}^l\text{-cicloalqueno } \text{C}_{3-6}$ o $-\text{Z}^l\text{-alquino } \text{C}_{2-6}$; y

Z^l es independientemente O, S, NH o $\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})$.

Aunque R^s en Sub^1 puede estar opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes Sub^2 , Sub^2 no está sustituido. Sin embargo, en una realización, R^s no está sustituido.

En una realización, R^s es H o alquilo C_{1-6} , opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes Sub^2 .

En una realización, Sub^2 es independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{N}^+(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2\text{O}^-$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{SO}_2\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$, $=\text{O}$, $-\text{N}(\text{alquil } \text{C}_{1-6})_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{alquilo } \text{C}_{1-6}$, $-\text{cicloalquilo } \text{C}_{3-6}$, $-\text{heterocicloalquilo } \text{C}_{3-6}$, $-\text{Z}^l\text{-alquilo } \text{C}_{1-6}$ o $-\text{Z}^l\text{-cicloalquilo } \text{C}_{3-6}$.

En una realización, cuando el grupo sustituido es acíclico (por ejemplo, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, etc.), Sub¹ no es -R^S y Sub² no es -alquilo C₁₋₆, -heteroalquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -heteroalquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆ o -heteroalquinilo C₂₋₆.

5 Cuando un grupo distinto de Sub² tiene al menos 2 posiciones que pueden estar sustituidas, el grupo puede estar sustituido con ambos extremos de una cadena de alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilenilo o heteroalquinilenilo (en una realización, que contiene de 1 a 6 átomos, en una realización adicional de 3 a 6 átomos, y en una realización adicional 3 o 4 átomos) para formar un resto cíclico. Esa cadena está
10 opcionalmente sustituida con de 1 a 3 sustituyentes Sub². En una realización, esa cadena no está sustituida. Por tanto, los términos "cicloalquilo", "cicloalquenilo", "cicloalquinilo", "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", "heterocicloalquinilo", "arilo" y "heteroarilo" opcionalmente sustituidos incluyen especies condensadas. Por ejemplo, "cicloalquilo opcionalmente sustituido" incluye una especie en la que dos anillos de cicloalquilo están condensados, y
15 "heteroarilo opcionalmente sustituido" incluye una especie en la que un anillo de heterocicloalquilo está condensado al anillo aromático (por ejemplo, 5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-ilo).

20 Cuando un grupo distinto de Sub² tiene un átomo que puede estar sustituido dos veces, ese átomo puede estar sustituido con ambos extremos de una cadena de alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilenilo o heteroalquinilenilo (en una realización, que contiene de 2 a 8 átomos, en una realización adicional de 3 a 6 átomos, y en una realización adicional 4 o 5 átomos) para formar un resto cíclico. Esa cadena está opcionalmente sustituida con de 1 a 3 sustituyentes Sub². En una realización, esa cadena no está sustituida. Por tanto, los términos "cicloalquilo", "cicloalquenilo", "cicloalquinilo", "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", "heterocicloalquinilo", "arilo" y "heteroarilo" opcionalmente sustituidos incluyen especies espiro.

25 A modo de aclaración, cuando un grupo tiene un heteroátomo, un sustituyente puede estar unido al heteroátomo. Por tanto, por ejemplo, "heteroalquilo opcionalmente sustituido" incluye -CH₂-N(Sub¹)-CH₂-, -CH(Sub¹)-NH-CH₂- y -CH(Sub¹)-N(Sub¹)-CH₂-, etc.

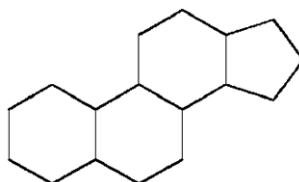
Términos modificadores

30 Cuando una lista va seguida por un modificador, se pretende que se entienda que el modificador se aplica a cada uno de los elementos en la lista. Por ejemplo, la expresión "grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido" significa que cada uno de los cuatro elementos en la lista, concretamente el grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀, el grupo heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, el grupo
35 heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ y el grupo heteroarilo C₆₋₂₀, puede estar opcionalmente sustituido.

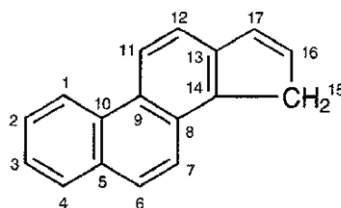
40 Cuando un grupo se caracteriza por un primer modificador y después, más adelante, el mismo grupo se caracteriza por un modificador posterior, lo que se pretende es que el grupo se caracterice por ambos modificadores simultáneamente. Por ejemplo, si se describe que un grupo es un grupo "heterocicloalquinilo C₃₋₂₀" (primer modificador) y después se describe que el mismo grupo es un grupo "C₅₋₁₆" (modificador posterior), lo que quiere decirse es un grupo heterocicloalquinilo C₅₋₁₆.

Esteroides

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "esteroide" se refiere a cualquier grupo que comprende la siguiente estructura (estructura que se denomina en el presente documento "esqueleto de esteroide").



50 Meramente con fines de ilustración, el esqueleto de esteroide se ha dibujado anteriormente como completamente saturado. Sin embargo, también se pretende que el término esteroide cubra casos en los que hay insaturación en el esqueleto de esteroide. Por ejemplo, el término esteroide cubre un grupo que comprende el esqueleto básico completamente insaturado (mancude), 15H-ciclopenta[a]fenantreno:

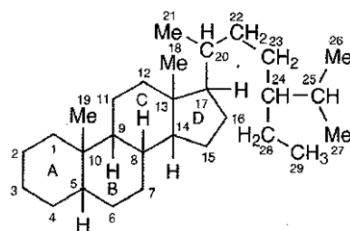


El término esteroide también cubre un grupo que comprende un esqueleto de esteroide parcialmente insaturado.

- 5 El término esteroide también cubre derivados “seco” del esqueleto de esteroide, es decir grupos en los que se ha realizado escisión de anillo; derivados “nor” y “homo” del esqueleto de esteroide que implican contracción y expansión de anillo, respectivamente (véase Systemic Nomenclature of Organic Chemistry, de D. Hellwinkel, publicado por Springer, 2001, ISBN: 3-540-41138-0, página 203 para “seco” y página 204 para “nor” y “homo”). Sin embargo, en una realización, tales derivados seco no están abarcados por el término “esteroide”. En otra realización, tales derivados
- 10 nor no están abarcados por el término “esteroide”. En otra realización, tales derivados homo no están abarcados por el término “esteroide”. Por tanto, en una realización, tales derivados seco, nor y homo no están abarcados por el término “esteroide”.

- 15 El término esteroide también cubre casos en los que uno o más de los átomos de carbono en la estructura denominada esqueleto de esteroide están sustituidos por un heteroátomo. En una realización de este tipo, hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, están cada uno sustituido independientemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si (y preferiblemente O, S(O)_q o N). Sin embargo, en una realización, el término “esteroide” comprende especies en las que el “esqueleto
- 20 básico de esteroide” no contiene ningún heteroátomo.

Un sistema de anillos de esteroide se numera según el convenio expuesto a continuación.



- 25 El término esteroide abarca esteroides, hormonas esteroideas, ácidos biliares y sales de ácidos biliares. Un esteroide es cualquier esteroide con un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A.

Insaturación

- 30 Según el uso convencional, la posición omega-3 se refiere al tercer enlace desde el extremo terminal (metilo) de la cadena; la posición omega-6 se refiere al sexto enlace desde el extremo terminal (metilo) de la cadena y la posición omega-9 se refiere al noveno enlace desde el extremo terminal (metilo) de la cadena.

General

- 35 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, las referencias 33-39, etc.

- 40 El término “que comprende” abarca “que incluye” así como “que consiste”, por ejemplo una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

- El término “aproximadamente” con respecto a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, x+10%.

- 45 El término “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el término “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

- 50 Se entiende que las referencias a carga, a cationes, a aniones, a zwitteriones, etc., son a pH 7.

TLR3 es el receptor de tipo Toll 3. Es un único receptor que se extiende por la membrana que desempeña un papel clave en el sistema inmunitario innato. Los agonistas de TLR3 conocidos incluyen poli(I:C). “TLR3” es el nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica para este receptor, y su ID de HGNC único es HGNC: 11849. La secuencia de RefSeq para el gen de TLR3 humano es GI:2459625.

TLR7 es el receptor de tipo Toll 7. Es un único receptor que se extiende por la membrana que desempeña un papel clave en el sistema inmunitario innato. Los agonistas de TLR7 conocidos incluyen, por ejemplo, imiquimod. “TLR7” es el nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica para este receptor, y su ID de HGNC único es HGNC: 15631. La secuencia de RefSeq para el gen de TLR7 humano es GI:67944638.

TLR8 es el receptor de tipo Toll 8. Es un único receptor que se extiende por la membrana que desempeña un papel clave en el sistema inmunitario innato. Los agonistas de TLR8 conocidos incluyen, por ejemplo, resiquimod. “TLR8” es el nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica para este receptor, y su ID de HGNC único es HGNC: 15632. La secuencia de RefSeq para el gen de TLR8 humano es GI:20302165.

La familia de receptor de tipo RIG-I (“RLR”) incluye diversas ARN helicasas que desempeñan papeles clave en el sistema inmunitario innato [40]. RLR-1 (también conocido como RIG-I o gen inducible por ácido retinoico I) tiene dos dominios de reclutamiento de caspasa cerca de su extremo N-terminal. El nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica para la RLR-1 helicasa es “DDX58” (por polipéptido 58 de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)) y el ID de HGNC único es HGNC:19102. La secuencia de RefSeq para el gen de RLR-1 humano es GI:77732514. RLR-2 (también conocido como MDA5 o gen asociado con diferenciación de melanoma 5) también tiene dos dominios de reclutamiento de caspasa cerca de su extremo N-terminal. El nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica para la RLR-2 helicasa es “IFIH1” (por interferón inducido con dominio de helicasa C 1) y el ID de HGNC único es HGNC:18873. La secuencia de RefSeq para el gen de RLR-2 humano es GI: 27886567. RLR-3 (también conocido como LGP2 o laboratorio de genética y fisiología 2) no tiene ningún dominio de reclutamiento de caspasa. El nombre de HGNC aprobado para el genoma que codifica para la RLR-3 helicasa es “DHX58” (por polipéptido 58 de caja DEXH (Asp-Glu-X-His)) y el ID de HGNC único es HGNC:29517. La secuencia de RefSeq para el gen de RLR-3 humano es GI: 149408121.

PKR es una proteína cinasa dependiente de ARN bicatenario. Desempeña un papel clave en el sistema inmunitario innato. “EIF2AK2” (por factor de iniciación de traducción eucariota 2-alfa cinasa 2) es el nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica para esta enzima, y su ID de HGNC único es HGNC:9437. La secuencia de RefSeq para el gen de PKR humano es GI:208431825.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un gel con ARN teñido. Los carriles muestran (1) marcadores, (2) replicón desnudo, (3) replicón tras tratamiento con ARNasa, (4) replicón encapsulado en liposoma, (5) liposoma tras tratamiento con ARNasa, (6) liposoma tratado con ARNasa y después sometido a extracción con fenol/cloroformo.

La figura 2 es una micrografía electrónica de liposomas.

La figura 3 muestra la expresión de proteína (como unidades de luz relativas, ULR) en los días 1, 3 y 6 tras la administración de ARN en liposomas con PEG de diferentes longitudes: 1 kDa (triángulos); 2 kDa (círculos); 3 kDa (cuadrados).

La figura 4 muestra un gel con ARN teñido. Los carriles muestran (1) marcadores, (2) replicón desnudo, (3) replicón encapsulado en liposoma, (4) liposoma tratados con ARNasa y después sometidos a extracción con fenol/cloroformo.

La figura 5 muestra la expresión de proteína en los días 1, 3 y 6 tras la administración de ARN como replicón empaquetado en virión (cuadrados), como ARN desnudo (rombos) o en liposomas (+ = 0,1 µg, x = 1 µg).

La figura 6 muestra la expresión de proteína en los días 1, 3 y 6 tras la administración de cuatro dosis diferentes de ARN encapsulado en liposoma.

La figura 7 muestra títulos de IgG anti-F en animales que reciben replicón empaquetado en virión (VRP o VSRP), 1 µg de ARN desnudo y 1 µg de ARN encapsulado en liposoma.

La figura 8 muestra títulos de IgG anti-F en animales que reciben VRP, 1 µg de ARN desnudo y 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposoma.

La figura 9 muestra títulos de anticuerpos neutralizantes en animales que reciben VRP u o bien 0,1 g o bien 1 µg de ARN encapsulado en liposoma.

La figura 10 muestra niveles de expresión tras la administración de un replicón como ARN desnudo (círculos), ARN encapsulado en liposoma (triángulo y cuadrado) o como lipoplejo (triángulo invertido).

- 5 La figura 11 muestra títulos de IgG específica de F (2 semanas tras la segunda dosis) tras la administración de un replicón como ARN desnudo (0,01-1 µg), ARN encapsulado en liposoma (0,01-10 µg) o empaquetado como un virión (VRP, 10⁶ unidades infecciosas o UI).

- 10 La figura 12 muestra títulos de IgG específica de F (círculos) y títulos de PRNT (cuadrados) tras la administración de un replicón como ARN desnudo (1 µg), ARN encapsulado en liposoma (0,1 o 1 µg) o empaquetado como un virión (VRP, 10⁶ UI). También se muestran los títulos en ratones no sometidos a tratamiento. Las líneas continuas muestran las medias geométricas.

- 15 La figura 13 muestra la producción de citocinas intracelulares tras la reestimulación con péptidos sintéticos que representan los epítomos principales para la proteína F, 4 semanas tras una segunda dosis. El eje de las y muestra el % positivos para citocina de CD8+CD4-.

La figura 14 muestra la estructura del lípido "RV05".

- 20 La figura 15 muestra títulos de IgG específica de F (media de log₁₀ de títulos ± desv. est.) a lo largo de 210 días tras la inmunización de terneros. Las tres líneas se distinguen fácilmente en el día 63 y, desde abajo hacia arriba, son: control negativo de PBS; ARN administrado con liposoma; y el producto "Triangle 4".

La figura 16 muestra las estructuras de tres lípidos de DMG conjugada con PEG (1-3 kDa).

- 25 Las figuras 17A a 17E muestran las estructuras de diversos lípidos conjugados con PEG, en los que R es PEG de una longitud deseada.

- 30 La figura 18 muestra la estructura de un lípido conjugado con PEG "dividido" útil. El recuadro muestra el MW total de PEG en el lípido (que, en el ejemplo específico a continuación, era de 2000).

Ejemplos de referencia

Replicones de ARN

- 35 A continuación se usan diversos replicones. En general, se basan en un genoma de alfavirus híbrido con proteínas no estructurales de virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEEV), una señal de empaquetamiento de VEEV y una 3'-UTR de virus Sindbis o un mutante de VEEV. El replicón tiene aproximadamente 10 kb de longitud y tiene una cola de poli-A.

- 40 ADN de plásmido que codifica para replicones de alfavirus (denominados: pT7-mVEEV-FL.RSVF o A317; pT7-mVEEV-SEAP o A306; pSP6-VCR-GFP o A50) sirvió como molde para la síntesis de ARN *in vitro*. Los replicones contienen los elementos genéticos de alfavirus requeridos para la replicación de ARN, pero carecen de los que codifican para productos génicos necesarios para el ensamblaje de partículas; en vez de eso, las proteínas estructurales están sustituidas por una proteína de interés (o bien un indicador, tal como SEAP o GFP, o bien un inmunógeno, tal como proteína F de VSR de longitud completa) y, por tanto, los replicones no pueden inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago (T7 o SP6) en el sentido de 5' del ADNc de alfavirus facilita la síntesis del ARN de replicón *in vitro* y una ribozima de virus de la hepatitis delta (VHD) inmediatamente en el sentido de 3' de la cola de poli(A) genera el extremo 3' correcto mediante su actividad de autoescisión.

- 50 Tras la linealización del ADN de plásmido en el sentido de 3' de la ribozima de VHD con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron transcritos de tipo *run-off in vitro* usando ARN polimerasa dependiente de ADN derivada de bacteriófago T7 o SP6. Se realizaron transcripciones durante 2 horas a 37°C en presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa de T7) o 5 mM (ARN polimerasa de SP6) de cada uno de los trifosfatos de nucleósido (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion). Tras la transcripción, se digirió el ADN de molde con ADNasa TURBO (Ambion). Se precipitó el ARN de replicón con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. Se añadió una caperuza a ARN sin caperuza tras la transcripción con enzima de adición de caperuza de vaccinia (VCE) usando el sistema de adición de caperuza ScriptCap m7G (Epicentre Biotechnologies) tal como se expone en el manual del usuario; a los replicones con caperuza añadida de esta manera se les proporciona el prefijo "v", por ejemplo vA317 es el replicón A317 con caperuza añadida mediante VCE. Se precipitó ARN con caperuza añadida tras la transcripción con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. Se determinó la concentración de las muestras de ARN midiendo la DO_{260 nm}. Se confirmó la integridad de los transcritos *in vitro* mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

Encapsulación liposomal

Se encapsuló ARN en liposomas realizados esencialmente mediante el método de las referencias 7 y 41. Los liposomas estaban compuestos por el 10% de DSPC (zwitteriónico), el 40% de DlinDMA (catiónico), el 48% de colesterol y el 2% de DMG conjugada con PEG. Estas proporciones se refieren al % en moles en el liposoma total.

Se sintetizó DlinDMA (1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) usando el procedimiento de la referencia 2. Se adquirió DSPC (1,2-diastearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) de Genzyme. Se obtuvo colesterol de Sigma-Aldrich. DMG conjugada con PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol), sal de amonio), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, sal de cloruro) y DC-chol (clorhidrato de 3β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoyl]colesterol) eran de Avanti Polar Lipids.

En resumen, se disolvieron los lípidos en etanol (2 ml), se disolvió un replicón de ARN en tampón (2 ml, citrato de sodio 100 mM, pH 6) y se mezclaron con 2 ml de tampón seguido por 1 hora de equilibración. Se diluyó la mezcla con 6 ml de tampón y después se filtró. El producto resultante contenía liposomas, con una eficiencia de encapsulación de ~95%. La figura 2 muestra una micrografía electrónica de ejemplo de liposomas preparados mediante estos métodos. Estos liposomas contienen ARN encapsulado que codifica para antígeno F de VSR de longitud completa. La dispersión de luz dinámica de un lote mostró un diámetro promedio de 141 nm (por intensidad) o 78 nm (en número).

En un método de encapsulación particular, se prepararon disoluciones madre de lípido recientes en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de DMG conjugada con PEG y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. Se usaron cinco PEG conjugados diferentes: PEG-500, PEG-750, PEG-1000, PEG-2000 o PEG-3000. Se balanceó suavemente la disolución madre de lípido recién preparada a 37°C durante aproximadamente 15 min para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 226,7 μ l de la disolución madre a 1,773 ml de etanol para preparar una disolución madre de lípido de trabajo de 2 ml. También se prepararon 2 ml de disolución de trabajo de ARN a partir de una disolución madre de ~1 μ g/ μ l en tampón citrato 100 mM (pH 6). Se aclararon tres viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con disolución de RNase Away y se lavaron con una gran cantidad de agua MilliQ antes de su uso para descontaminar los viales con respecto a ARNasas. Se usó uno de los viales para la disolución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípido y de ARN (tal como se describe a continuación). Se calentaron las disoluciones de trabajo de lípido y de ARN a 37°C durante 10 min antes de cargarse en jeringas de tipo Luer-lock de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Se conectaron las jeringas que contenían ARN y los lípidos a una mezcladora en T (PEEK™, DI de unión de 500 μ m) usando tubos de FEP (etileno-propileno fluorado; todos los tubos de FEP usados tenían un diámetro interno de 2 mm y un diámetro externo de 3 mm; obtenidos de Idex Health Science). La salida de la mezcladora en T también tenía tubos de FEP. Se conectó la tercera jeringa que contenía el tampón citrato a un fragmento independiente de tubo. Después se accionaron todas las jeringas a una velocidad de flujo de 7 ml/min usando una bomba de jeringa. Se posicionaron las salidas de tubos para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). Se extrajo la barra de agitación y se dejó equilibrar la disolución de etanol/acuosa hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se cargó la mezcla en una jeringa de 5 cc, que estaba ajustada a un fragmento de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cc con igual longitud de tubo de FEP, se cargó un volumen igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Se accionaron las dos jeringas a una velocidad de flujo de 7 ml/min usando una bomba de jeringa y se recogió la mezcla final en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). A continuación, se concentraron los liposomas hasta 2 ml y se sometieron a diálisis frente a 10-15 volúmenes de 1X PBS usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) antes de recuperar el producto final. El sistema de TFF y las membranas de filtración de fibras huecas se adquirieron de Spectrum Labs y se usaron según las directrices del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibras huecas con un punto de corte de tamaño de poro de 100 kD y un área de superficie de 20 cm². Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, se diluyeron las formulaciones hasta la concentración de ARN requerida con 1X PBS.

Se determinó el porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN mediante el kit de reactivo de ARN Quant-iT RiboGreen (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó el patrón de ARN ribosómico proporcionado en el kit para generar una curva patrón. Se diluyeron los liposomas 10 veces o 100 veces en tampón 1X TE (del kit) antes de la adición del colorante. Por separado, se diluyeron los liposomas 10 veces o 100 veces en tampón 1X TE que contenía Triton X al 0,5% antes de la adición del colorante (para alterar los liposomas y, por tanto, para someter a ensayo el ARN total). Después de eso, se añadió una cantidad igual de colorante a cada disolución y después se cargaron por duplicado ~180 μ l de cada disolución tras la adición de colorante en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Se leyó la fluorescencia (ex. de 485 nm, em. de 528 nm) en un lector de microplacas. Se dosificaron todas las formulaciones de liposomas *in vivo* basándose en la cantidad de ARN encapsulado.

Para obtener liposomas más pequeños, se sustituyó el método de jeringa/tubo por un método en el que se mezclaron disoluciones de lípido y de ARN en canales en un chip de microfluído. Se prepararon disoluciones madre de lípido recientes en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. Se balanceó suavemente la disolución madre de lípido recién preparada a 37°C durante aproximadamente 15 min para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 226,7 μ l de la disolución madre a 1,773 ml de etanol para preparar una disolución madre de lípido de trabajo de 2 ml. También se

prepararon 4 ml de disolución de trabajo de ARN a partir de una disolución madre de ~ 1 µg/µl en tampón citrato 100 mM (pH 6). Se aclararon cuatro 20 ml viales de vidrio (con barras de agitación) con disolución de RNase Away y se lavaron con una gran cantidad de agua MilliQ antes de su uso para descontaminar los viales con respecto a ARNasas. Se usaron dos de los viales para la disolución de trabajo de ARN (2 ml en cada vial) y los otros para recoger las mezclas de lípido y de ARN. Se calentaron las disoluciones de trabajo de lípido y de ARN a 37°C durante 10 min antes de cargarse en jeringas de tipo Luer-lock de 3 cc. Se conectaron las jeringas que contenían ARN y los lípidos a un chip de unión Mito Droplet (un dispositivo de microfluidos de vidrio obtenido de Syrris, n.º de pieza 3000158) usando tubos de PTFE con un DI de 1/16 pulgadas x DE de 1/16 pulgadas (Syrris) usando un conector de borde de 4 vías. Se accionaron dos corrientes de ARN y una corriente de lípido mediante bombas de jeringa y se realizó el mezclado de la fase de etanol y la acuosa en la unión en X (100 µm x 105 µm) del chip. Se mantuvo la velocidad de flujo de las tres corrientes a 1,5 ml/min, por tanto, la razón de la velocidad de flujo total acuosa con respecto a etanólica era de 2:1. Se posicionó la salida del tubo para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). Se extrajo la barra de agitación y se dejó equilibrar la disolución de etanol/acuosa hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se cargó la mezcla en una jeringa de 5 cc que estaba ajustada a un fragmento de tubo de PTFE con un DI de 0,03 pulgadas x DE de 1/16 pulgadas y en otra jeringa de 5 cc con igual longitud de tubo de PTFE, se cargó un volumen igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Se accionaron las dos jeringas a una velocidad de flujo de 3 ml/min usando una bomba de jeringa y se recogió la mezcla final en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). A continuación, se concentraron los liposomas hasta 2 ml y se sometieron a diálisis frente a 10-15 volúmenes de 1X PBS usando el sistema de TFF antes de recuperar el producto final. Se usaron membranas de filtración de fibras huecas con un punto de corte de tamaño de poro de 100 kDa y un área de superficie de 20 cm². Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, se diluyeron las formulaciones hasta la concentración de ARN requerida con 1X PBS. Mientras que los liposomas preparados usando el método de jeringa/tubo con 75 µg de ARN tenían un diámetro promedio Z (Zprom) de 148 nm y un índice de polidispersidad (pdl) de 0,122, el mezclado con chip produjo liposomas con un Zprom de 97 nm y un pdl de 0,086. La proporción de ARN encapsulado disminuyó ligeramente desde el 90% hasta el 87%.

Se mostró que la encapsulación en liposomas protege al ARN frente a la digestión por ARNasa. Los experimentos usaron 3,8 mUA de ARNasa A por microgramo de ARN, incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se inactivó la ARNasa con proteinasa K a 55°C durante 10 minutos. Después se añadió una mezcla 1:1 v/v de muestra con respecto a 25:24:1 v/v/v de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para extraer el ARN a partir de los lípidos al interior de la fase acuosa. Se mezclaron las muestras mediante agitación con vórtex durante unos pocos segundos y después se colocaron en una centrífuga durante 15 minutos a 12k RPM. Se retiró la fase acuosa (que contenía el ARN) y se usó para analizar el ARN. Antes de la carga (400 ng de ARN por pocillo), se incubaron todas las muestras con colorante de carga de formaldehído, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65°C y se enfriaron hasta temperatura ambiente. Se usaron marcadores Ambion Millennium para aproximar el peso molecular del constructo de ARN. Se hizo pasar el gel a 90 V. Se tiñó el gel usando SYBR oro al 0,1% según las directrices del fabricante en agua mediante balanceo a temperatura ambiente durante 1 hora. La figura 1 muestra que la ARNasa digiere completamente el ARN en ausencia de encapsulación (carril 3). No puede detectarse ARN tras la encapsulación (carril 4) y no se observa ningún cambio si se tratan estos liposomas con ARNasa (carril 4). Tras someter los liposomas tratados con ARNasa a extracción con fenol, se observa ARN no digerido (carril 6). Incluso después de 1 semana a 4°C, pudo observarse el ARN sin ninguna fragmentación (figura 4, flecha). La expresión de proteína *in vivo* no cambió después de 6 semanas a 4°C y un ciclo de congelación-descongelación. Por tanto, el ARN encapsulado en liposoma es estable.

Para evaluar la expresión *in vivo* del ARN, se codificó una enzima indicadora (SEAP; fosfatasa alcalina secretada) en el replicón, en vez de en un inmunógeno. Se midieron los niveles de expresión en sueros diluidos 1:4 en 1X tampón de dilución Phospha-Light usando un sustrato de fosfato alcalino quimioluminiscente. A ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad (5/grupo) se les inyectaron por vía intramuscular, en el día 0, 50 µl por pata de una dosis de 0,1 µg o 1 µg de ARN. También se administró el mismo vector sin los liposomas (en 1X PBS libre de ARNasa) a 1 µg. También se sometieron a prueba replicones empaquetados en virión. Los replicones empaquetados en virión usados en el presente documento (denominados "VRP") se obtuvieron mediante los métodos de la referencia 42, en la que el replicón de alfavirus se derivó a partir del VEEV mutante o una quimera derivada a partir del genoma de VEEV modificado por ingeniería para contener la 3'-UTR del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento (PS) del virus Sindbis, empaquetados mediante electroporación conjunta en células BHK con ARN auxiliares defectuosos que codifican para los genes de glicoproteína y cápsida de virus Sindbis.

Tal como se muestra en la figura 5, la encapsulación aumentó los niveles de SEAP en aproximadamente ½ log a la dosis de 1 µg, y en el día 6 la expresión a partir de una dosis encapsulada de 0,1 µg coincidió con los niveles observados con una dosis sin encapsular de 1 µg. En el día 3, los niveles de expresión superaron los logrados con VRP (cuadrados). Por tanto, la expresión aumentó cuando se formuló el ARN en los liposomas con respecto al control de ARN desnudo, incluso a una dosis 10 veces inferior. La expresión también fue superior con respecto al control de VRP, pero la cinética de expresión fue muy diferente (véase la figura 5). La administración del ARN con electroporación dio como resultado una expresión aumentada con respecto al control de ARN desnudo, pero estos niveles fueron menores que con liposomas.

Para evaluar si el efecto observado en los grupos de liposoma se debía simplemente a los componentes de liposoma

o estaba asociado con la encapsulación, se administró el replicón en forma encapsulada (con dos protocolos de purificación diferentes, 0,1 µg de ARN) o mezclado con los liposomas tras su formación (un "lipoplejo" no encapsulado, 0,1 µg de ARN) o como ARN desnudo (1 µg). La figura 10 muestra que el lipoplejo dio los niveles de expresión más bajos, mostrando que la encapsulación de muestra es esencial para una expresión potente.

Experimentos de SEAP adicionales mostraron una clara respuesta a la dosis *in vivo*, con expresión observada tras la administración de tan solo 1 ng de ARN (figura 6). Experimentos adicionales que compararon la expresión a partir de replicones encapsulados y desnudos indicaron que 0,01 µg de ARN encapsulado era equivalente a 1 µg de ARN desnudo. A una dosis de 0,5 µg de ARN, el material encapsulado dio una expresión 12 veces superior en el día 6; a una dosis de 0,1 µg los niveles fueron 24 veces superiores en el día 6.

En vez de considerar los niveles promedio en el grupo, también se estudiaron los animales individuales. Mientras que varios animales no presentaron respuesta a replicones desnudos, la encapsulación eliminó los animales sin respuesta.

Experimentos adicionales sustituyeron DlinDMA por DOTAP. Aunque los liposomas de DOTAP dieron una expresión mejor que el replicón desnudo, fueron inferiores a los liposomas de DlinDMA (diferencia de 2 a 3 veces en el día 1).

Para evaluar la inmunogenicidad *in vivo*, se construyó un replicón para expresar proteína F de longitud completa a partir de virus sincitial respiratorio (VSR). Esto se administró de manera desnuda (1 µg), encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg) o empaquetado en viriones (10^6 UI; "VRP") en los días 0 y 21. La figura 7 muestra títulos de IgG anti-F 2 semanas después de la segunda dosis, y los liposomas potencian claramente la inmunogenicidad. La figura 8 muestra títulos 2 semanas después, momento en el cual no había ninguna diferencia estadística entre el ARN encapsulado a 0,1 µg, el ARN encapsulado a 1 µg o el grupo de VRP. Los títulos de neutralización (medidos como reducción de placa del 60%, "PRNT60") no fueron significativamente diferentes en estos tres grupos 2 semanas después de la segunda dosis (figura 9). La figura 12 muestra títulos tanto de IgG como de PRNT 4 semanas después de la segunda dosis.

La figura 13 confirma que el ARN provoca una respuesta de células T CD8 robusta.

Experimentos adicionales compararon los títulos de IgG específica de F en ratones que recibieron VRP, 0,1 µg de ARN encapsulado en liposoma o 1 µg de ARN encapsulado en liposoma. Las razones de títulos (VRP:liposoma) en diversos momentos después de la segunda dosis fueron las siguientes:

	2 semanas	4 semanas	8 semanas
0,1 µg	2,9	1,0	1,1
1 µg	2,3	0,9	0,9

Por tanto, el ARN encapsulado en liposoma induce esencialmente la misma magnitud de respuesta inmunitaria que la observada con la administración de viriones.

Experimentos adicionales mostraron respuestas de IgG específica de F superiores con una dosis de 10 µg, respuestas equivalentes para dosis de 1 µg y 0,1 µg, y una respuesta inferior con una dosis de 0,01 µg. La figura 11 muestra títulos de IgG en ratones que reciben el replicón en forma desnuda a 3 dosis diferentes, en liposomas a 4 dosis diferentes o como VRP (10^6 UI). La respuesta observada con 1 µg de ARN encapsulado en liposoma fue estadísticamente insignificante (ANOVA) en comparación con VRP, pero la respuesta superior observada con 10 µg de ARN encapsulado en liposoma fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en comparación con ambos de estos grupos.

Un estudio adicional confirmó que 0,1 µg de ARN encapsulado en liposoma dio respuestas de IgG anti-F mucho mayores (15 días tras la segunda dosis) que 0,1 µg de ADN administrado y fue incluso más inmunogénico que 20 µg de ADN de plásmido que codifica para el antígeno F, administrado mediante electroporación (sistema de administración de ADN Elgen™, Inovio).

Métodos de producción de liposomas

En general, se han usado ocho métodos diferentes para preparar liposomas según la invención. En el texto, se denominan métodos (A) a (H) y difieren principalmente con respecto a las etapas de filtración y TFF. Los detalles son los siguientes:

(A) Se prepararon disoluciones madre de lípido recientes en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG DMG 2000 y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. Se balanceó suavemente la disolución madre de lípido recién preparada a 37°C durante aproximadamente 15 min para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 755 µl de la disolución madre a 1,245 ml de etanol para preparar una disolución madre de lípido de trabajo de 2 ml. Se usó esta cantidad de lípidos para formar liposomas con 250 µg de ARN. También

se preparó una disolución de trabajo de ARN de 2 ml a partir de una disolución madre de ~1 µg/µl en tampón citrato 100 mM (pH 6). Se aclararon tres viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con disolución de RNase Away (Molecular BioProducts, San Diego, CA) y se lavaron con una gran cantidad de agua MilliQ antes de su uso para descontaminar los viales de ARNasas. Se usó uno de los viales para la disolución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípido y de ARN (tal como se describe a continuación). Se calentaron las disoluciones de trabajo de lípido y de ARN a 37°C durante 10 min antes de cargarse en jeringas de tipo Luer-lock de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Se conectaron las jeringas que contenían ARN y los lípidos a una mezcladora en T (PEEK™, DI de unión de 500 µm, IDEX Health Science, Oak Harbor, WA) usando tubos de FEP (etileno-propileno fluorado; todos los tubos de FEP tenían un diámetro interno de 2 mm x diámetro externo de 3 mm, suministrados por IDEX Health Science). La salida de la mezcladora en T también tenía tubos de FEP. Se conectó la tercera jeringa que contenía el tampón citrato a un fragmento independiente de tubo de FEP. Después se accionaron todas las jeringas a una velocidad de flujo de 7 ml/min usando una bomba de jeringa. Se posicionaron las salidas de tubos para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). Se extrajo la barra de agitación y se dejó equilibrar la disolución de etanol/acuosa hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cc, que estaba conectada a un fragmento de tubo de FEP, y en otra jeringa de 5 cc conectada a una longitud igual de tubo de FEP, se cargó una cantidad igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Se accionaron las dos jeringas a una velocidad de flujo de 7 ml/min usando la bomba de jeringa y se recogió la mezcla final en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). A continuación, se hizo pasar la mezcla recogida a partir de la segunda etapa de mezclado (liposomas) a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que se une a, y retira, moléculas aniónicas, obtenida de Pall Corporation, Ann Arbor, MI, EE.UU.). Antes de hacer pasar los liposomas, se hicieron pasar sucesivamente 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6) a través de la membrana Mustang. Se calentaron los liposomas durante 10 min a 37°C antes de pasar a través de la membrana. A continuación, se concentraron los liposomas hasta 2 ml y se sometieron a diálisis frente a 10-15 volúmenes de 1X PBS usando TFF antes de recuperar el producto final. El sistema de TFF y las membranas de filtración de fibras huecas se adquirieron de Spectrum Labs y se usaron según las directrices del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibras huecas de polisulfona (número de pieza P/N: X1AB-100-20P) con un punto de corte de tamaño de poro de 100 kD y un área de superficie de 8 cm². Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, se diluyeron las formulaciones hasta la concentración de ARN requerida con 1X PBS.

(B) Como el método (A) excepto porque, tras el balanceo, se añadieron 226,7 µl de la disolución madre a 1,773 ml de etanol para preparar una disolución madre de lípido de trabajo de 2 ml, modificando por tanto la razón de lípido:ARN.

(C) Como el método (B) excepto porque se omitió la filtración en Mustang, de modo que los liposomas pasaron del vial de vidrio de 20 ml a la diálisis de TFF.

(D) Como el método (C) excepto porque la TFF usó membranas de fibras huecas de polietersulfona (PES) (número de pieza P-C1-100E-100-01N) con un punto de corte de tamaño de poro de 100 kD y un área de superficie de 20 cm².

(E) Como el método (D) excepto porque se usó una membrana Mustang, como en el método (A).

(F) Como el método (A) excepto porque se omitió la filtración en Mustang, de modo que los liposomas pasaron del vial de vidrio de 20 ml a la diálisis de TFF.

(G) Como el método (D) excepto porque se preparó una disolución de trabajo de ARN de 4 ml a partir de una disolución madre de ~1 µg/µl en tampón citrato 100 mM (pH 6). Después, se prepararon cuatro viales de vidrio de 20 ml de la misma manera. Dos de ellos se usaron para la disolución de trabajo de ARN (2 ml en cada vial) y los otros para recoger las mezclas de lípido y de ARN, como en (C). En vez de usar una mezcladora en T, se conectaron las jeringas que contenían ARN y los lípidos a un chip de unión Mitos Droplet (un dispositivo de microfluidos de vidrio obtenido de Syrris, n.º de pieza 3000158) usando tubos de PTFE (diámetro interno de 0,03 pulgadas x diámetro externo de 1/16 pulgadas) usando un conector de borde de 4 vías (Syrris). Se accionaron dos corrientes de ARN y una corriente de lípido mediante bombas de jeringa y se realizó el mezclado de la fase de etanol y la acuosa en la unión en X (100 µm x 105 µm) del chip. Se mantuvo la velocidad de flujo de las tres corrientes a 1,5 ml/min, por tanto, la razón de la velocidad de flujo total acuosa con respecto a etanólica era de 2:1. Se posicionó la salida del tubo para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). Se extrajo la barra de agitación y se dejó equilibrar la disolución de etanol/acuosa hasta temperatura ambiente durante 1 h. Después, se cargó la mezcla en una jeringa de 5 cc, que estaba ajustada a otro fragmento del tubo de PTFE; en otra jeringa de 5 cc con igual longitud de tubo de PTFE, se cargó un volumen igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Se accionaron las dos jeringas a una velocidad de flujo de 3 ml/min usando una bomba de jeringa y se recogió la mezcla final en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). A continuación, se concentraron los liposomas hasta 2 ml y se sometieron a diálisis frente a 10-15 volúmenes de 1X PBS usando TFF, como en (D).

(H) Como el método (A) excepto porque la disolución madre de lípido de trabajo de 2 ml se preparó mezclando 120,9 µl de la disolución madre de lípido con 1,879 ml de etanol. Además, después de mezclar en la mezcladora en T, se cargaron los liposomas del vial de 20 ml en un casete de diálisis Pierce Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, fuerza extra,

capacidad de 0,5-3 ml) y se sometieron a diálisis frente a 400-500 ml de 1X PBS durante la noche a 4°C en un recipiente de plástico sometido a esterilización en autoclave antes de recuperar el producto final.

Immunogenicidad de VSR

Se administró el replicón autorreplicante vA317 que codificaba para proteína F de VSR a ratones BALB/c, 4 u 8 animales por grupo, mediante vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con el replicón (1 µg) solo o formulado como liposomas con DlinDMA ("RV01") o DOTAP ("RV13") o el lípido mostrado en la figura 14 ("RV05"). Los liposomas RV01 tenían el 40% de DlinDMA, el 10% de DSPC, el 48% de colesterol y el 2% de PEG-DMG, pero con diferentes cantidades de ARN. Los liposomas RV05 tenían o bien el 40% de RV05, el 10% de DSPC, el 48% de colesterol y el 2% de PEG-DMG o bien el 60% de RV05, el 38% de colesterol y el 2% de PEG-DMG. Los liposomas RV13 tenían el 40% de DOTAP, el 10% de DOPE, el 48% de colesterol y el 2% de PEG-DMG. En todos los casos, el PEG era PEG-2000 (es decir PEG de 2 kDa). Para comparación, se administró ADN de plásmido desnudo (20 µg) que expresaba el mismo antígeno F de VSR o bien usando electroporación o bien con liposomas RV01(10) (0,1 µg de ADN). Se usaron cuatro ratones como grupo de control no sometido a tratamiento.

Se prepararon liposomas mediante el método (A) o el método (B). Para algunos liposomas preparados mediante el método (A), se usó una cantidad doble o la mitad de ARN. El diámetro de partícula promedio Z y el índice de polidispersidad fueron:

RV	Zprom (nm)	pdl	Preparación
RV01 (10)	158,6	0,088	(A)
RV01 (08)	156,8	0,144	(A)
RV01 (05)	136,5	0,136	(B)
RV01 (09)	153,2	0,067	(A)
RV01 (10)	134,7	0,147	(A)
RV05 (01)	148	0,127	(A)
RV05 (02)	177,2	0,136	(A)
RV13 (02)	128,3	0,179	(A)

Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14, 36 y 49. Se extirparon los bazo a partir de los ratones en el día 49 para el análisis de células T.

Los títulos de IgG en suero específica de F (GMT) fueron los siguientes:

RV	Día 14	Día 36
Plásmido de ADN desnudo	439	6712
ARN A317 desnudo	78	2291
RV01 (10)	3020	26170
RV01 (08)	2326	9720
RV01 (05)	5352	54907
RV01 (09)	4428	51316
RV05 (01)	1356	5346
RV05 (02)	961	6915
RV01 (10), ADN	5	13
RV13 (02)	644	3616

La proporción de células T que son positivas para citocina y específicas para péptido F51-66 de VSR son las siguientes, mostrando únicamente cifras que son estadísticamente significativamente por encima de cero:

RV	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
Plásmido de ADN desnudo	0,04	0,07		0,10	0,57	0,29		0,66
ARN A317 desnudo	0,04	0,05		0,08	0,57	0,23		0,67
RV01 (10)	0,07	0,10		0,13	1,30	0,59		1,32
RV01 (08)	0,02	0,04		0,06	0,46	0,30		0,51
RV01 (05)	0,08	0,12		0,15	1,90	0,68		1,94
RV01 (09)	0,06	0,08		0,09	1,62	0,67		1,71
RV01 (10), ADN				0,03				0,08
RV13 (02)	0,03	0,04		0,06	1,15	0,41		1,18

Por tanto, las formulaciones de liposoma potenciaron significativamente la inmunogenicidad con respecto a los controles de ARN desnudo, tal como se determina mediante aumento de títulos de IgG específica de F y frecuencias

de células T. El ADN de plásmido formulado con liposomas, o administrado de manera desnuda usando electroporación, fue significativamente menos inmunogénico que ARN autorreplicante formulado en liposomas.

- 5 Se prepararon liposomas de RV01 adicionales mediante el método (H), de nuevo usando PEG de 2 kDa conjugado con DMG, y o bien encapsulando 150 µg de ARN (replicón vA375 que codifica para glicoproteína de fusión de superficie de VSR) o bien encapsulando solo tampón. Por tanto, estos liposomas tenían el 40% de DlinDMA, el 10% de DSPC, el 48% de Chol y el 2% de PEG-DMG. Los tamaños y la encapsulación fueron los siguientes:

RV	Zprom (nm)	pdl	ARN	Encapsulación
RV01 (36)	152,1	0,053	+	92,5%
RV01 (36)	144	0,13	-	-

- 10 Se administraron los liposomas a ratones BALB/c (10 por grupo) mediante inyección intramuscular bilateral (50 µl por pata) en los días 0 y 21. Las dosis fueron de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 o 1 µg. Los títulos de IgG en suero específica de F y PRNT60 (GMT) fueron los siguientes, 2 semanas tras la primera o segunda inyección:

RV	ARN (µg)	2wp1	2wp2	PRNT60 (2wp2)
Control de tampón	0	-	-	10
RV01 (36)	0	-	-	10
RV01 (36)	0,01	3399	50691	37
RV01 (36)	0,03	3446	53463	83
RV01 (36)	0,1	8262	76808	238
RV01 (36)	0,3	5913	82599	512
RV01 (36)	1	8213	85138	441

15 *Inmunogenicidad de citomegalovirus*

- Se usaron liposomas de RV01 con DlinDMA como lípido catiónico y PEG de 2 kDa para administrar replicones de ARN que codificaban para glicoproteínas de CMV. El replicón "vA160" codifica para glicoproteínas de longitud completa H y L (gH/gL), mientras que el replicón "vA322" codifica para una forma soluble (gHsol/gL). Las dos proteínas están bajo el control de promotores subgenómicos independientes en un único replicón; la administración conjunta dos vectores independientes, uno que codificaba para gH y uno que codificaba para gL, no dio buenos resultados.

- 25 A ratones BALB/c, 10 por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0, 21 y 42 con VRP que expresaban gH/gL (1×10^6 UI), VRP que expresaban gHsol/gL (1×10^6 UI) y PBS como controles. Dos grupos de prueba recibieron 1 µg del replicón vA160 o vA322 formulado en liposomas (el 40% de DlinDMA, el 10% de DSPC, el 48% de Chol, el 2% de PEG-DMG; preparado usando el método (D) pero con un tamaño de lote de 150 µg de ARN).

- 30 Los liposomas vA160 tenían un diámetro Zprom de 168,8 nm, un pdl de 0,144 y el 87,4% de encapsulación. Los liposomas vA322 tenían un diámetro Zprom de 162 nm, un pdl de 0,131 y el 90% de encapsulación.

Los replicones pudieron expresar dos proteínas a partir de un único vector.

- 35 Se recogieron sueros para análisis inmunológico en el día 63 (3wp3). Los títulos de neutralización de CMV (la recíproca de la dilución en suero que produce una reducción del 50% del número de focos de virus positivos por pocillo, con respecto a los controles) fueron los siguientes:

gH/gL, VRP	gHsol/gL, VRP	gH/gL, liposoma	gHsol/gL, liposoma
4576	2393	4240	10062

- 40 Por tanto, ARN que expresaba una forma o bien de longitud completa o bien soluble del complejo de gH/gL de CMV provocó altos títulos de anticuerpos neutralizantes, tal como se somete a ensayo en células epiteliales. Los títulos promedio provocados por los ARN encapsulados en liposoma fueron al menos tan altos como para los VRP correspondientes.

- 45 Experimentos repetidos confirmaron que el replicón podía expresar dos proteínas a partir de un único vector. El replicón de ARN dio un título de 3wp3 de 11457, en comparación con 5516 con VRP.

Cinética de expresión

- 50 Se usó un replicón de ARN autorreplicante ("vA311") que expresa un gen indicador de luciferasa (luc) para estudiar la cinética de la expresión de proteína tras la inyección. Ratones BALB/c, 5 animales por grupo, recibieron vacunaciones

intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0 con:

Grupo 1: ADN que expresa luciferasa, administrado usando electroporación (10 µg)

- 5 Grupo 2: ARN autorreplicante (1 µg) formulado en liposomas (el 40% de DiInDMA, el 10% de DSPC, el 48% de colesterol, el 2% de PEG-2000 conjugado con DMG)

Grupo 3: ARN autorreplicante (1 µg) formulado con una nanoemulsión catiónica (CNE17)

- 10 Grupo 4: ARN autorreplicante (1 µg) formulado con una nanoemulsión catiónica diferente

Grupo 5: VRP (1×10^6 UI) que expresa luciferasa

- 15 Antes de la vacunación se depiló a los ratones. Se anestesió a los ratones (isoflurano al 2% en oxígeno), en primer lugar se retiró el pelo con una máquina de afeitar eléctrica y después el producto químico Nair. Después se adquirieron datos de bioluminiscencia usando un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS 200 (Caliper Life Sciences) en los días 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63 y 70. Cinco minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal 8 mg/kg de disolución de luciferina. Después se anestesió a los animales y se les transfirió al sistema de obtención de imágenes. Se mantuvieron los tiempos de adquisición de imágenes constantes a medida que se midió la señal de bioluminiscencia con una cámara de CCD enfriada.

- 25 En términos visuales, se observó que las células que expresaban luciferasa permanecían principalmente en el sitio de inyección de ARN y los animales de los que se obtuvieron imágenes tras la retirada de los dispositivos quad no mostraron ninguna señal.

En términos cuantitativos, se midió la expresión de luciferasa como radiancia promedio a lo largo de un periodo de 70 días (p/s/cm²/sr) y los resultados fueron los siguientes para los 5 grupos:

Días	1	2	3	4	5
3	8,69E+07	3,33E+06	2,11E+06	9,71E+06	1,46E+07
7	1,04E+08	8,14E+06	1,83E+07	5,94E+07	1,64E+07
14	8,16E+07	2,91E+06	9,22E+06	3,48E+07	8,49E+05
21	1,27E+07	3,13E+05	6,79E+04	5,07E+05	6,79E+05
28	1,42E+07	6,37E+05	2,36E+04	4,06E+03	2,00E+03
35	1,21E+07	6,12E+05	2,08E+03		
42	1,49E+07	8,70E+05			
49	1,17E+07	2,04E+05			
63	9,69E+06	1,72E+03			
70	9,29E+06				

- 30 El ARN autorreplicante formulado con nanoemulsiones catiónicas mostró una bioluminiscencia medible en el día 3, que alcanzó un pico en el día 7 y después se redujo hasta niveles de fondo en los días 28 a 35. Cuando se formuló en liposomas, el ARN mostró una bioluminiscencia medible en el día 3, que alcanzó un pico en el día 7 y se redujo hasta niveles de fondo en el día 63. El ARN administrado usando VRP mostró una bioluminiscencia potenciada en el día 21 en comparación con el ARN formulado, pero la expresión se había reducido hasta niveles de fondo en el día 28. El ADN sometido a electroporación mostró el nivel más alto de bioluminiscencia en todos los puntos de tiempo medidos y los niveles de bioluminiscencia no se redujeron hasta niveles de fondo dentro del plazo de los 70 días del experimento.

Volumen de administración

- 40 La administración hidrodinámica emplea la fuerza generada por la rápida inyección de un gran volumen de disolución para superar las barreras físicas de las membranas celulares que evitan que compuestos grandes e impermeables con respecto a la membrana entren en las células. Anteriormente se ha mostrado que este fenómeno es útil para la administración intracelular de vacunas de ADN.

- 45 Un volumen de administración para ratones típico para inyección intramuscular es de 50 µl en la pata trasera, lo cual es un volumen relativamente alto para el músculo de la pata de un ratón. En cambio, una dosis intramuscular para seres humanos de ~0,5 ml es relativamente pequeña. Si la inmunogenicidad en ratones fuera dependiente del volumen, entonces la eficacia de las vacunas de replicón podría deberse, al menos en parte, a fuerzas hidrodinámicas, lo cual no motivaría el uso de las mismas vacunas en seres humanos y animales más grandes.

Se administró el replicón vA317 a ratones BALB/c, 10 por grupo, mediante vacunaciones intramusculares bilaterales (5 o 50 por pata) en los días 0 y 21:

Grupo 1: recibió replicón desnudo, 0,2 µg en 50 µl por pata

Grupo 2: recibió replicón desnudo, 0,2 µg en 5 µl por pata

Grupo 3: recibió replicón formulado en emulsión (0,2 µg, 50 µl por pata)

Grupo 4: recibió replicón formulado en emulsión (0,2 µg, 5 µl por pata)

Grupo 5: recibió replicón formulado en liposoma (0,2 µg, 50 µl por pata)

Grupo 6: recibió replicón formulado en liposoma (0,2 µg, 5 µl por pata)

Los liposomas para los grupos 5 y 6 fueron el 40% de DlinDMA, el 10% de DSPC, el 48% de colesterol y el 2% de PEG-2000 conjugado con DMG.

Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 y 35. Los GMT de IgG en suero específica de F fueron:

Día	1	2	3	4	5	6
14	42	21	783	760	2669	2610
35	241	154	2316	2951	17655	18516

Por tanto, la inmunogenicidad del replicón formulado no varió según el volumen administrado, indicando por tanto que estas vacunas de ARN no se basan en la administración hidrodinámica para su eficacia.

Ratas algodoneras

Se realizó un estudio con ratas algodoneras (*Sigmodon hispidus*) en vez de ratones. A una dosis de 1 µg, la encapsulación en liposomas aumentó los títulos de IgG específica de F en 8,3 veces en comparación con desnudo y aumentó los títulos de PRNT en 9,5 veces. La magnitud de la respuesta de anticuerpos fue equivalente a la inducida por 5×10^6 UI de VRP. Tanto ARN desnudo como encapsulado en liposoma pudieron proteger a las ratas algodoneras frente a la exposición a VSR (1×10^5 unidades de formación de placa), reduciendo la carga viral en los pulmones en al menos 3,5 log. La encapsulación aumentó la reducción en aproximadamente 2 veces.

Un trabajo adicional con ratas algodoneras usó cuatro replicones diferentes: vA317 expresa VSR-F de longitud completa; vA318 expresa VSR-F truncada (parte transmembrana y cola citoplasmática retiradas); vA142 expresa VSR-F con su péptido de fusión eliminado; vA140 expresa la VSR-F truncada también sin su péptido. A ratas algodoneras, de 4 a 8 animales por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares (100 µl en una pata) en los días 0 y 21 con los cuatro replicones diferentes a dos dosis (1,0 y 0,1 µg) formuladas en liposomas preparados usando DMG conjugada con PEG de 2 kDa mediante el método (D), pero con un tamaño de lote de 150 µg de ARN. Los grupos de control recibieron una vacuna de proteína de subunidad de VSR-F (5 µg) con adyuvante de alumbre (8 animales/grupo), VRP que expresaban VSR-F de longitud completa (1×10^6 UI, 8 animales/grupo) o control no sometido a tratamiento (4 animales/grupo). Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 0, 21 y 34.

Los títulos de IgG en suero específica de F y títulos de anticuerpos neutralizantes en suero de VSR en los días 21 y 34 fueron:

Grupo	IgG, día 21	IgG, día 34	NT, día 21	NT, día 34
1 µg de vA317	915	2249	115	459
0,1 µg de vA317	343	734	87	95
1 µg de vA318	335	1861	50	277
0,1 µg de vA318	129	926	66	239
1 µg de vA142	778	4819	92	211
0,1 µg de vA142	554	2549	78	141
1 µg de vA140	182	919	96	194
0,1 µg de vA140	61	332	29	72
5 µg de subunidad de trímero de F/alumbre	13765	86506	930	4744
1×10^6 UI de VRP-F completa	1877	19179	104	4528
No sometidos a tratamiento	5	5	10	15

Los cuatro replicones evaluados en este estudio (vA317, vA318, vA142, vA140) fueron inmunogénicos en ratas algodoneras cuando se administraron mediante liposoma, aunque los títulos de neutralización en suero fueron al

menos diez veces menores que los inducidos mediante vacunas de proteína con adyuvante o mediante VRP. Las vacunas de liposoma/ARN provocaron IgG específica de F en suero y anticuerpos neutralizantes de VSR tras la primera vacunación, y una segunda vacunación reforzó la respuesta eficazmente. Los títulos de IgG específica de F tras la segunda vacunación con 1 µg de replicón fueron de 2 a 3 veces superiores tras la segunda vacunación con 0,1 µg de replicón. Los cuatro replicones provocaron títulos de anticuerpos comparables, lo que sugiere que la VSR-F de longitud completa y truncada, cada una con o sin el péptido de fusión, son inmunogénicas de manera similar en ratas algodoneras.

Un trabajo adicional con ratas algodoneras usó de nuevo los replicones vA317, vA318 y vA142. A ratas algodoneras, 2-8 animales por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares (100 µl en una pata) en los días 0 y 21 con los replicones (0,1 o 1 µg) encapsulados en liposomas RV01 (con PEG-2000) preparados mediante el método (D) pero con un tamaño de lote de 150 µg de ARN. Los grupos de control recibieron la vacuna de proteína de subunidad de VSR-F (5 µg) con adyuvante de alumbre o VRP que expresaban VSR-F de longitud completa (1×10^6 UI, 8 animales/grupo). Todos estos animales recibieron una tercera vacunación (día 56) con vacuna de proteína de subunidad de VSR-F (5 µg) con adyuvante de alumbre. Además, hubo un control no sometido a tratamiento (4 animales/grupo). Además, a un grupo adicional se le administraron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 56 con 1 µg de ARN de vA317 en liposomas pero no recibió una tercera vacunación con la vacuna de proteína de subunidad.

Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 0, 21, 35, 56, 70, más los días 14, 28 y 42 para el grupo adicional. Los títulos de IgG en suero específica de F (GMT) fueron los siguientes:

	Día 21	Día 35	Día 56	Día 70
1 µg de vA318	260	1027	332	14263
0,1 µg de vA318	95	274	144	2017
1 µg de vA142	483	1847	1124	11168
0,1 µg de vA142	314	871	418	11023
1 µg de vA317	841	4032	1452	13852
1×10^6 de VRP (F completa)	2075	3938	1596	14574
5 µg de subunidad de trómero de F/alumbre	12685	54526	25846	48864
No sometidos a tratamiento	5	5	5	5

Los títulos de neutralización en suero fueron los siguientes (títulos de neutralización de VSR al 60% para 2 combinaciones de 3-4 animales por grupo, GMT de estas 2 combinaciones por grupo):

	Día 21	Día 35	Día 56	Día 70
1 µg de vA318	58	134	111	6344
0,1 µg de vA318	41	102	63	6647
1 µg de vA142	77	340	202	5427
0,1 µg de vA142	35	65	56	2223
1 µg de vA317	19	290	200	4189
1×10^6 de VRP (F completa)	104	1539	558	2876
5 µg de subunidad de trómero de F/alumbre	448	4457	1630	3631
No sometidos a tratamiento	10	10	10	

Los títulos en suero y títulos neutralizantes para el grupo adicional fueron los siguientes:

Día	14	21	28	35	42	56	70
IgG	397	561	535	501	405	295	3589
NT	52	82	90	106	80	101	1348

Por tanto, se confirmó que los replicones eran inmunogénicos en ratas algodoneras, provocando IgG específica de F en suero y anticuerpos neutralizantes de VSR tras la primera vacunación. Una segunda vacunación reforzó las respuestas eficazmente. Los títulos de IgG específica de F tras la segunda vacunación con 1,0 µg de replicón fueron de 1,5 a 4 veces superiores después la segunda vacunación con 0,1 µg de replicón.

La tercera vacunación (proteína en el día 56) no reforzó los títulos en ratas algodoneras anteriormente vacunadas con subunidad de trómero de F + alumbre, pero sí que proporcionó un gran refuerzo a los títulos en ratas algodoneras anteriormente vacunadas con replicón. En la mayoría de los casos, los títulos de neutralización en suero de VSR tras dos vacunaciones con replicón seguidas por refuerzo con proteína fueron iguales o superiores a los títulos inducidos mediante dos o tres vacunaciones con proteína secuenciales.

Este estudio también evaluó la cinética de la respuesta de anticuerpos frente a 1,0 µg de vA317. Los títulos de IgG en

suero específica de F y de neutralización de VSR inducidos mediante una única vacunación alcanzaron su pico aproximadamente en el día 21 y se mantuvieron al menos hasta el día 56 (disminución del 50-70% del título de IgG específica de F, poco cambio en el título de neutralización de VSR). Se administró una segunda vacunación homóloga a estos animales en el día 56 y reforzó los títulos de anticuerpos hasta un nivel al menos igual al alcanzado cuando se administró la segunda vacunación en el día 21.

Experimentos adicionales implicaron una exposición viral. El replicón vA368 codifica para la glicoproteína de fusión de superficie de tipo natural de longitud completa de VSR con el péptido de fusión eliminado, con la expresión impulsada por el IRES de EV71. A ratas alodoneras, 7 por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares (100 µl por pata) en los días 0 y 21 con vA368 en liposomas preparados mediante el método (H), tamaño de lote de 175 µg de ARN, o con VRP que tenían el mismo replicón. Los liposomas incluyeron PEG de 2 kDa, conjugado a DMG. Un grupo de control recibió 5 µg de proteína con adyuvante de alumbre y también se inoculó un grupo de control no sometido a tratamiento.

Todos los grupos recibieron una exposición intranasal (i.n.) con 1×10^6 UFP de VSR cuatro semanas tras la inmunización final. Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 0, 21, 35. Se midieron los títulos virales en el pulmón 5 días tras la exposición. Los resultados fueron los siguientes:

	Liposoma	VRP	Proteína	No sometidos a tratamiento
<i>Títulos de IgG en suero específica de F (GMT)</i>				
Día 21	370	1017	28988	5
Día 35	2636	2002	113843	5
<i>Títulos neutralizantes (GMT)</i>				
Día 21	47	65	336	10
Día 35	308	271	5188	10
<i>Carga viral en el pulmón (ufp por gramo de pulmón)</i>				
Día 54	422	225	124	694110

Por tanto, la vacuna de ARN redujo la carga viral en el pulmón en más de tres log, desde aproximadamente 10^6 UFP/g en ratas alodoneras de control no vacunadas hasta menos de 10^3 UFP/g en ratas alodoneras vacunadas.

Estudio con mamíferos grandes

Se realizó un estudio con animales grandes con ganado. Se inmunizó a terneros (4-6 semanas de edad, ~60-80 kg, 5 por grupo) con 66 µg de replicón vA317 que codificaba para proteína F de VSR de longitud completa en los días 0, 21, 86 y 146. Se formularon los replicones dentro de liposomas mediante el método (E) pero con un tamaño de lote de 1,5 mg de ARN; tenían el 40% de DiInDMA, el 10% de DSPC, el 48% de colesterol y el 2% de PEG-2000 conjugado con DMG. Se usó PBS solo como control negativo y se usó una vacuna licenciada como control positivo ("Triangle 4" de Fort Dodge, que contenía virus muerto). Todos los terneros recibieron 15 µg de proteína F con adyuvante de la emulsión MF59 en el día 146.

Las vacunas de ARN codificaban para F de VSR humano mientras que la vacuna de "Triangle 4" contiene F de VSR bovino, pero la proteína F de VSR está altamente conservada entre VSRB y VSRH.

Los terneros recibieron 2 ml de cada vacuna experimental, administrados por vía intramuscular como 2×1 ml en cada lado del cuello. En cambio, la vacuna de "Triangle 4" se administró como una única dosis de 2 ml en el cuello.

Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 0, 14, 21, 35, 42, 56, 63, 86, 100, 107, 114, 121, 128, 135, 146, 160, 167, 174, 181, 188, 195 y 202. Si un animal individual tenía un título por debajo del límite de detección, se le asignó un título de 5.

La figura 15 muestra títulos de IgG específica de F a lo largo de 210 días. A lo largo de los primeros 63 días, el replicón de ARN fue inmunogénico en las vacas mediante liposomas, aunque dio títulos inferiores a la vacuna licenciada. Todas las vacas vacunadas mostraron anticuerpos específicos de F después de la segunda dosis y los títulos fueron muy estables a partir del periodo de 2 a 6 semanas después de la segunda dosis (y fueron particularmente estables para las vacunas de ARN). Los títulos hasta el día 202 fueron los siguientes:

	D0	3wp1 D21	2wp2 D35	5wp2 D56	~9wp2 D86	2wp3 D100	5wp3 D121	8wp3 D146	2wp4 D160	5wp4 D181	8wp4 D202
PBS	5	5	5	5	5	5	5	5	46	98	150
Liposoma	5	5	12	11	20	768	428	74	20774	7022	2353
Triangle 4	5	5	1784	721	514	3406	2786	336	13376	4775	2133

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero de VSR fueron los siguientes:

	D0	2wp2 D35	5wp2 D56	2wp3 D100	3wp3 D107	4wp3 D114	8wp3 D146	2wp4 D160	3wp4 D167	4wp4 D174
PBS	12	10	10	14	18	20	14	10	10	10
Liposoma	13	10	10	20	13	17	13	47	26	21
Triangle 4	12	15	13	39	38	41	13	24	26	15

El material usado para la segunda dosis de liposoma no se preparó de manera reciente y el mismo lote de ARN mostró una disminución de potencia en un estudio de inmunogenicidad con ratones. Por tanto, es posible que la vacuna hubiera sido más inmunogénica si se hubiera usado material reciente para todas las vacunaciones.

Cuando se sometió a ensayo con complemento, se detectaron anticuerpos neutralizantes en todas las vacas vacunadas. En este ensayo, todos los terneros vacunados tuvieron buenos títulos de anticuerpos neutralizantes tras la segunda vacunación de ARN. Además, la vacuna de ARN provocó títulos de IgG en suero específica de F que se detectaron en unos pocos terneros tras la segunda vacunación y en todos los terneros tras la tercera.

VSR-F con adyuvante de MF59 pudo reforzar la respuesta de IgG en todos los terneros anteriormente vacunados y reforzar los títulos de neutralización independientes del complemento de terneros anteriormente vacunados con ARN.

La prueba de concepto para vacunas de ARN en animales grandes es particularmente importante a la vista de la pérdida de potencia observada anteriormente con vacunas basadas en ADN cuando se pasa de modelos de animales pequeños a animales más grandes y seres humanos. Una dosis típica para una vacuna de ADN de vaca será de 0,5-1 mg [43, 44] y, por tanto, es muy alentador que se indujeran respuestas inmunitarias con tan solo 66 µg de ARN.

Efecto de la longitud de PEG

Tal como se mencionó anteriormente, se prepararon liposomas usando DMG al que se conjugaron cinco PEG diferentes. El peso molecular promedio del PEG era de 500 Da, 750 Da, 1 kDa, 2 kDa o 3 kDa.

Los liposomas formados usando los PEG más cortos (500 Da y 750 Da) fueron inestables o se agregaron durante la purificación de TFF. PEG-750 dio liposomas con un diámetro promedio Z (669 nm) e índice de polidispersidad (0,21) significativamente superiores, con el 77% de encapsulación. Los liposomas de PEG-500 se agregaron visiblemente en disolución durante el procedimiento de TFF y se terminó el experimento. Por tanto, estos liposomas de PEG corto fueron inestables, pero los PEG más largos formaron liposomas estables.

Las diferentes longitudes de PEG (figura 16) tuvieron un pequeño efecto sobre el diámetro e índice de polidispersidad del liposoma. El diámetro promedio Z fue de 197 nm (pdl de 0,119) para el PEG de 1 kDa, 142 nm (pdl de 0,137) para el PEG de 2 kDa, y 147 nm (pdl de 0,075) para el PEG de 3 kDa. La encapsulación de ARN aumentó gradualmente a medida que aumentó la longitud de PEG, desde el 81,7% hasta el 85,9% hasta el 91,5% (aunque esta relación no siempre se observó en experimentos posteriores).

Se administraron los liposomas a ratones mediante inyección intramuscular en el día 0. Se midieron los niveles de SEAP en suero en los días 1, 3 y 6 mediante ensayo quimioluminiscente. Tal como se muestra en la figura 3, las tres longitudes de PEG fueron eficaces, pero variar la longitud del PEG tuvo algún efecto sobre los niveles de SEAP en suero, dando PEG 2000 la expresión más alta.

Diferentes lípidos y longitudes de PEG

Se administró el replicón vA317 en liposomas que tenían una variedad de lípidos diferentes con longitudes de PEG diferentes. Todos los liposomas tenían el 40% de DlinDMA, el 10% de DSPC y el 48% de colesterol, pero el 2% restante varió, con diferentes lípidos pegilados (por ejemplo, las figuras 17A a 17E) y diferentes longitudes de PEG.

Las características físicas de los liposomas, preparados mediante el método (H), fueron:

Nombre	Lípido pegilado	Longitud de PEG	Zprom (nm)	pdl	% de encapsulación
A	DMG	2000	136,3	0,087	85,35
B	DMG	3000	120,9	0,087	72,06
C	DMG	1000	175,9	0,111	92,52
D	Figura 17A	2000	157,9	0,094	97,44
E	Figura 17D	2000	122,2	0,122	77,84
F	Figura 17E	2000	129,8	0,125	82,57
G	Colesterol	2000	122,9	0,087	87,1
H	Figura 17C	2000	138	0,137	78,48

I	Figura 17B	2000	113,4	0,091	89,12
---	------------	------	-------	-------	-------

A ratones BALB/c, 8 por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con el replicón, o bien desnudo (1 µg) o bien encapsulado en estos liposomas (0,1 µg). Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 y 35.

5 Los títulos de IgG en suero específica de F (GMT) fueron los siguientes, 2 semanas tras las dos inyecciones (2wp1):

RV	2wp1	2wp2
ARN desnudo	216	1356
A	3271	15659
B	3860	22378
C	1691	7412
D	1025	1767
E	1618	9536
F	2684	11221
G	3514	10566
H	4142	22810
I	952	10410

10 Los resultados muestran una tendencia, que indica que grupos de cabeza de PEG de peso molecular superior son más inmunogénicos. A medida que aumenta la longitud de PEG conjugado con DMG desde 1000 Da hasta 3000 Da, los títulos de IgG específica de F 2wp2 aumentan desde 7412 hasta 15659 hasta 22378.

15 Cambiar la región de grupo de unión de éster a éter no tuvo ningún impacto sustancial sobre los títulos. Además, al mismo peso molecular del grupo de cabeza (2000) hubo una tendencia de que aumentar la longitud de las colas de lípido reduce los títulos (H con dialquilo C14 frente a I con dialquilo C18). Sustituir una cola de PEG-dialquil-lípido por colesterol tuvo poco impacto sobre la inmunogenicidad (A con DMG frente a G con colesterol).

20 Se realizaron experimentos similares con diferentes lípidos en los que se dividen los 2 kDa de PEG en 2 grupos de 1 kDa (figura 18, siendo el MW total en la región en el recuadro de 2000). Se uso de nuevo el replicón vA317, con ratones BALB/c, 8 por grupo, a los que se les administraron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con 1 µg de ARN desnudo o 0,1 µg de ARN encapsulado en liposoma. Todos los liposomas tenían el 40% de lípido catiónico (DlinDMA), el 10% de DSPC y el 48% de colesterol, pero el 2% restante varió, con diferentes lípidos pegilados (pero todos con PEG de 2 kDa). Se prepararon mediante el método (H).

25 Las características físicas de los liposomas fueron:

Nombre	Lípido pegilado	Zprom (nm)	pdl	% de encapsulación
A	DMG	121	0,101	84,84
B	Dividido; R= C14 saturado	141,3	0,049	95,41
C	Dividido; R= C16 saturado	114,6	0,101	96,79
D	Dividido; R= C18 saturado	116,5	0,088	98,63
E	Dividido; R= C18, 1 insaturación	129,4	0,149	93,37

30 Se prepararon liposomas adicionales con RV05. Los liposomas tenían el 40% de lípido catiónico (RV05) y el 2% de DMG pegilada (PEG de 2 kDa), mientras que los componentes restantes variaron (pero siempre se incluyó colesterol). Los liposomas se prepararon mediante el método (H) pero con pH 5. Las características físicas fueron:

Nombre	Otros componentes	Zprom (nm)	pdl	% de encapsulación
F	el 10% de DSPC, el 48% de chol	102,2	0,12	76,81
G	el 10% de DSPC, el 46% de chol, el 2% de αGC	103,7	0,107	72,58
H	el 10% de DPyPE, el 48% de chol	99,6	0,115	78,34
I	el 10% de PC 18:3, el 48% de chol	130	0,14	87,92
J	el 10% de PC 18:2, el 48% de chol	101,1	0,133	76,64
K	el 30% de PC 18:2, el 28% de chol	134,3	0,158	57,76
αGC = α-galactosilceramida				

35 A ratones BALB/c, 8 por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con el replicón, o bien desnudo (1 µg) o bien encapsulado (0,1 µg). Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 y 35. Los títulos de IgG en suero específica de F (GMT) fueron los siguientes, 2 semanas

tras las dos inyecciones (2wp1):

RV	2wp1	2wp2
ARN desnudo	321	915
A	2761	17040
B	866	3657
C	1734	5209
D	426	2079
E	2696	15794
F	551	955
G	342	2531
H	1127	3881
I	364	1741
J	567	5679
K	1251	5303

- 5 Por tanto, dividir los grupos de cabeza de PEG redujo los títulos *in vivo*. Incluir un doble enlace (1 grado de insaturación por cola de alquilo) en las colas de PEG-lípido aumentó los títulos de IgG, 6 veces en el día 14 y 7 veces en el día 35. Para un lípido catiónico con una cola de lípido asimétrica (alquilo + colesterol), cambiar el lípido neutro de DSPC (cola de lípido C18 saturado) a PC 18:2 o 18:3 (con 2 y 3 dobles enlaces insaturados por cola) aumentó los títulos de IgG totales. Se observaron resultados comparables con la sustitución de DSPC por DPyPE.

10

Tabla 1: fosfolípidos útiles

DDPC	1,2-Didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfato
DEPC	1,2-Erucoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG	1,2-Miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPS	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfato
DOPC	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOPS	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPS	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-Difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfato
DSPC	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPS	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenada
HSPC	PC de soja hidrogenada de alta pureza
HSPC	PC de soja hidrogenada
LYSOPC MIRÍSTICA	1-Miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMÍTICA	1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC ESTEÁRICA	1-Estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

MPPC de esfingomielina de la leche	1-Miristoil-2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
MSPC	1-Miristoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PMPC	1-Palmitoil-2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol)...]
PSPC	1-Palmitoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-Estearoil-2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-Estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-Estearoil-2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

Bibliografía

- [1] Johanning *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res* 23:1495-1501.
- [2] Heyes *et al.* (2005) *J Controlled Release* 107:276-87.
- [3] Documento WO2005/121348.
- [4] *Liposomes: Methods and Protocols*, volumen 1: *Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols*. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [5] *Liposome Technology*, volúmenes I, II y III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [6] *Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes)*. (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002.
- [7] Jeffs *et al.* (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372.
- [8] Documento WO2005/113782.
- [9] Documento WO2011/005799.
- [10] El Ouahabi *et al.* (1996) *FEBS Letts* 380:108-12.
- [29] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [30] Romberg *et al.* (2008) *Pharmaceutical Research* 25:55-71.
- [31] Hoekstra *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52
- [32] Documento WO2009/086558
- [33] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [34] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [35] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [36] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [37] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5ª edición (Current Protocols).
- [38] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press)
- [39] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [40] Yoneyama & Fujita (2007) *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18:545-51.
- [41] Maurer *et al.* (2001) *Biophysical Journal*, 80: 2310-2326.
- [42] Perri *et al.* (2003) *J Virol* 77:10394-10403.

[43] Boxus *et al.* (2007) J Virol 81:6879-89.

[44] Taylor *et al.* (2005) Vaccine 23:1242-50.

REIVINDICACIONES

1. Liposoma dentro del cual está encapsulado ARN que codifica para un inmunógeno de interés, en el que el liposoma comprende al menos un lípido que incluye un resto polietilenglicol, de tal manera que polietilenglicol está presente en el exterior del liposoma, en el que el peso molecular promedio del polietilenglicol es de entre 1 kDa y 3 kDa, en el que el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria contra un coronavirus y en el que el inmunógeno es un polipéptido de la espícula de coronavirus.
2. Liposoma según la reivindicación 1, en el que el peso molecular promedio del polietilenglicol es de 2 kDa.
3. Liposoma según cualquier reivindicación anterior, en el que el liposoma tiene un diámetro en el intervalo de 80-160 nm.
4. Liposoma según cualquier reivindicación anterior, en el que el liposoma comprende un lípido con un grupo de cabeza catiónico.
5. Liposoma según cualquier reivindicación anterior, en el que el liposoma comprende un lípido con un grupo de cabeza zwitteriónico.
6. Liposoma según cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN es ARN autorreplicante.
7. Composición farmacéutica que comprende un liposoma según cualquier reivindicación anterior, en la que la composición farmacéutica comprende una pluralidad de tales liposomas.
8. Liposoma según las reivindicaciones 1-6 o composición farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso en un método para producir una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado, que comprende la etapa de administrar al vertebrado una cantidad eficaz de dicho liposoma o de dicha composición farmacéutica.
9. Procedimiento para preparar un liposoma que contiene ARN, que comprende una etapa de mezclar ARN con uno o más lípidos, en condiciones tales que los lípidos forman un liposoma en el que se encapsula el ARN, en el que al menos un lípido incluye un resto polietilenglicol que se ubica en el exterior del liposoma durante el procedimiento, y en el que el peso molecular promedio del polietilenglicol es de entre 1 kDa y 3 kDa, y en el que el ARN codifica para un inmunógeno que provoca una respuesta inmunitaria contra un coronavirus y en el que el inmunógeno es un polipéptido de la espícula de coronavirus; opcionalmente en el que el procedimiento es para preparar un liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 2-6.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende además preparar una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable además del liposoma.

FIG. 1

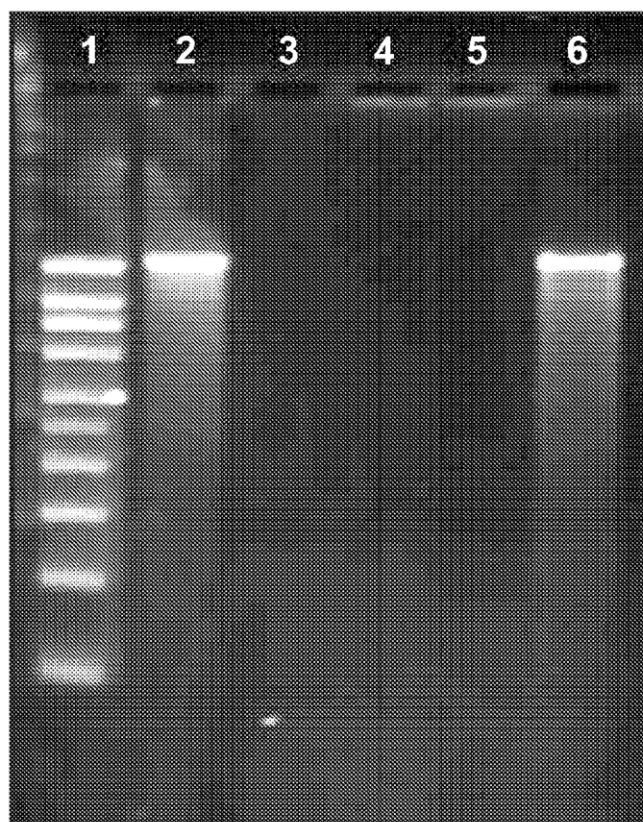


FIG. 2

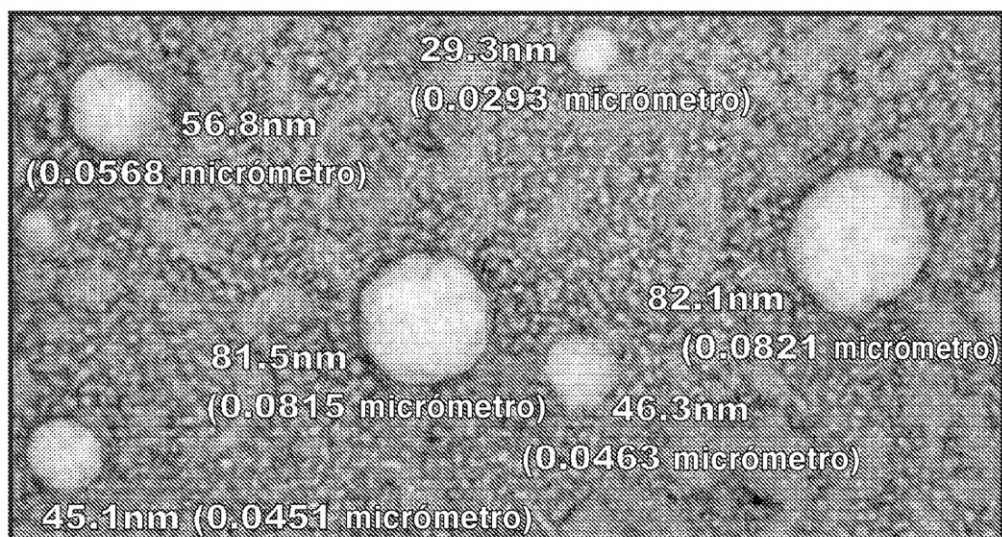


FIG. 3

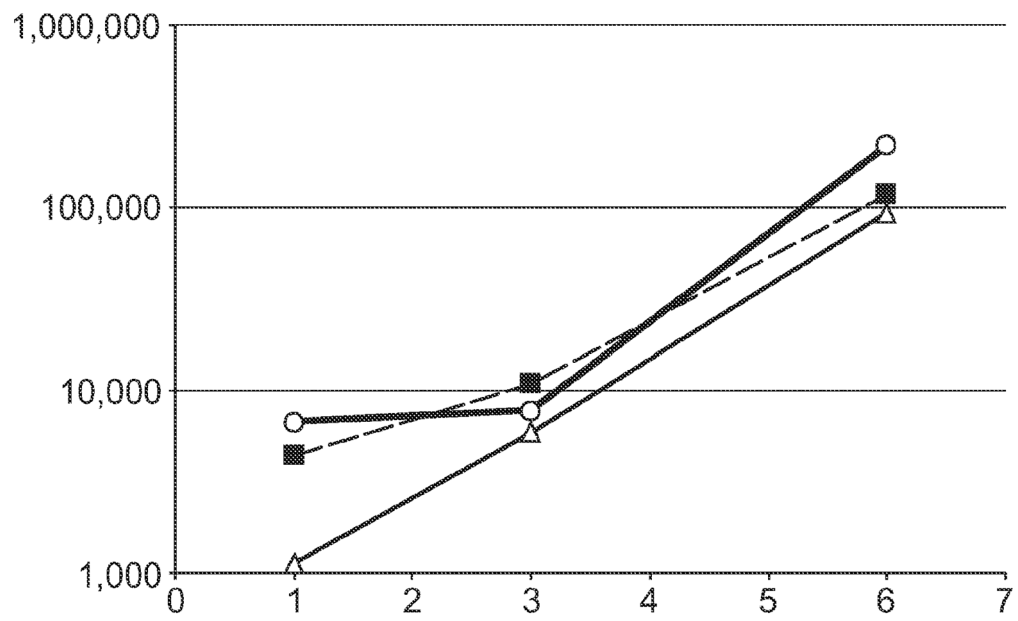


FIG. 4

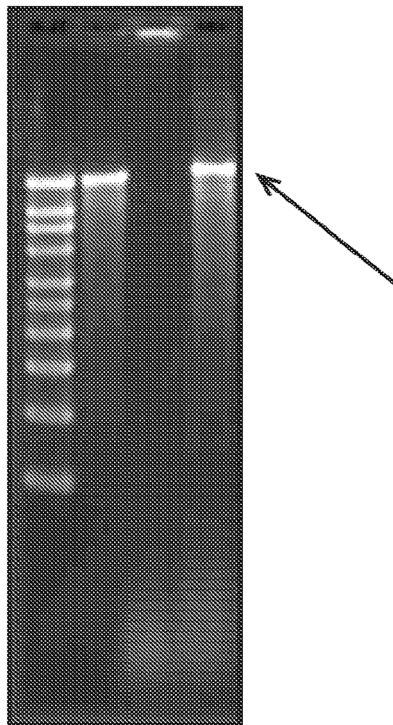


FIG. 5

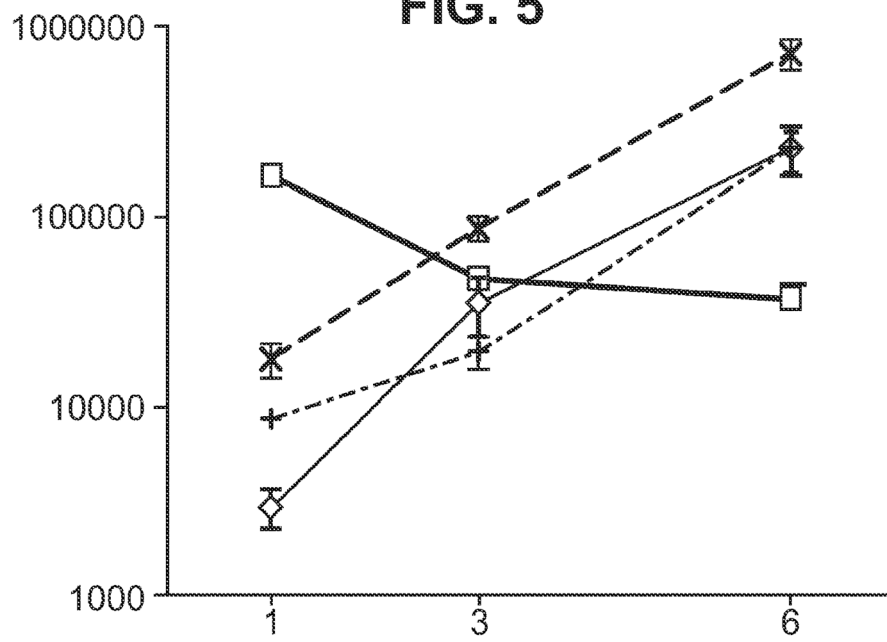


FIG. 6

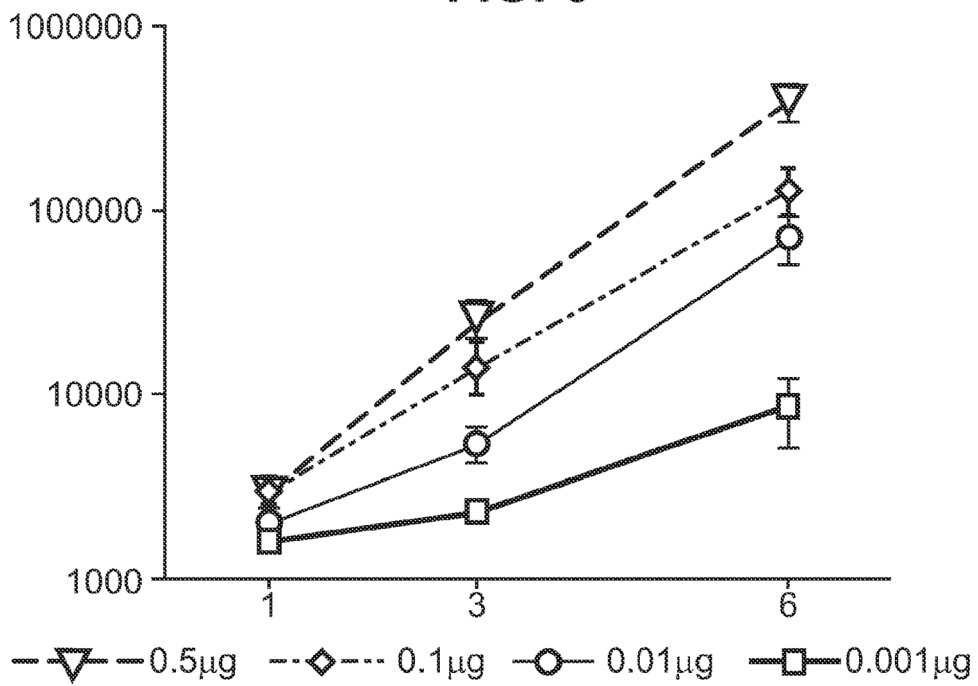


FIG. 7

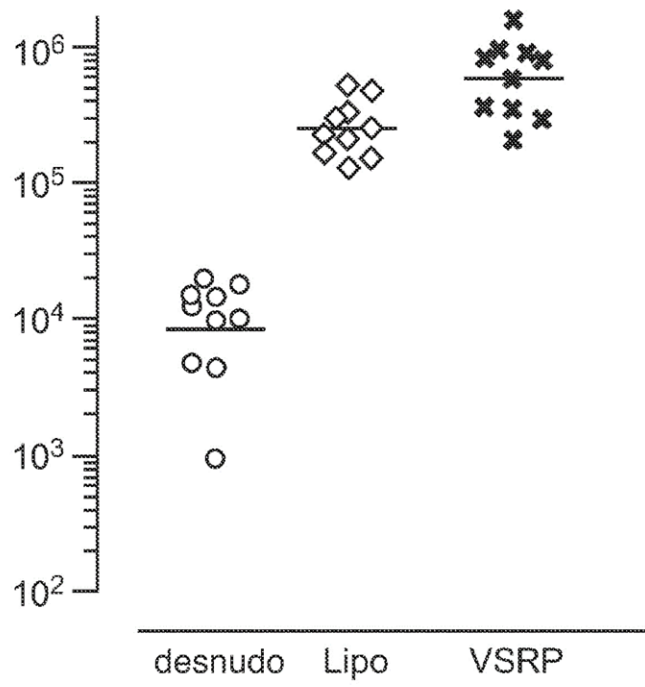


FIG. 8

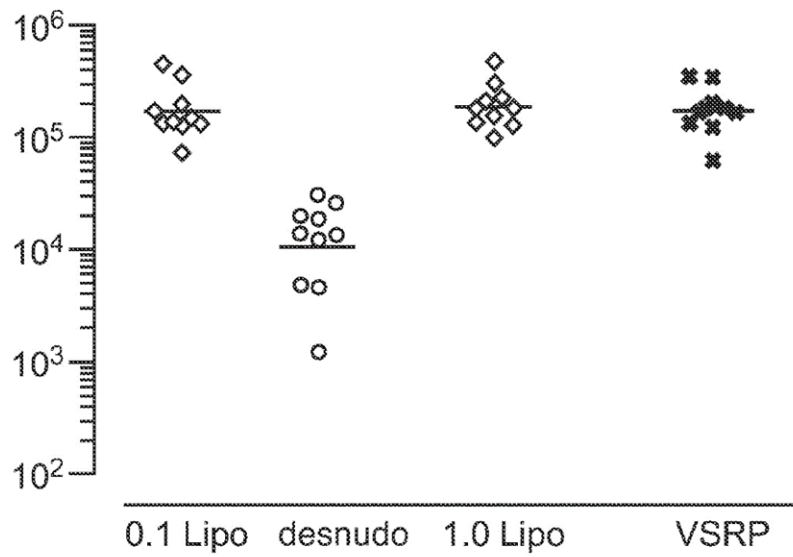


FIG. 9

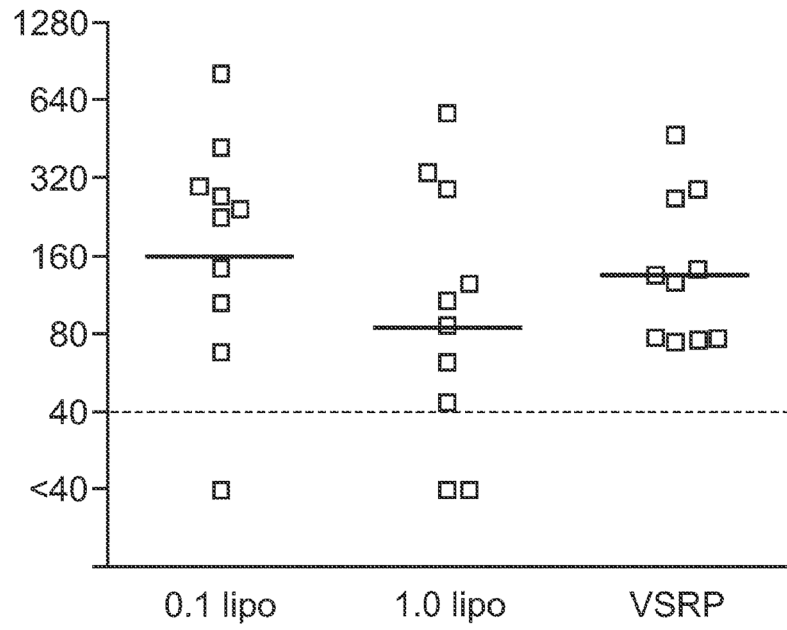


FIG. 10

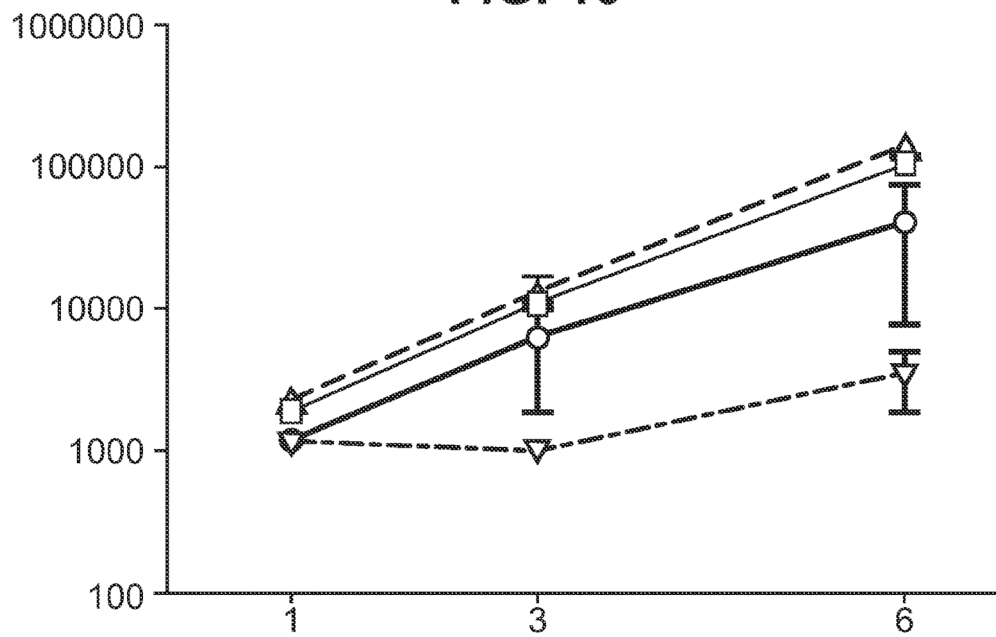


FIG. 11

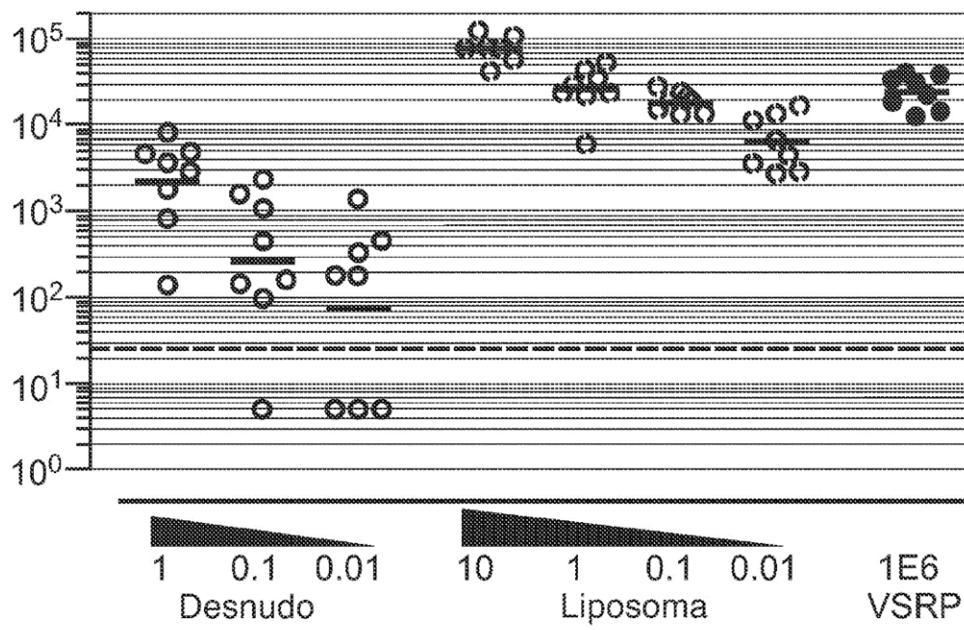


FIG. 12

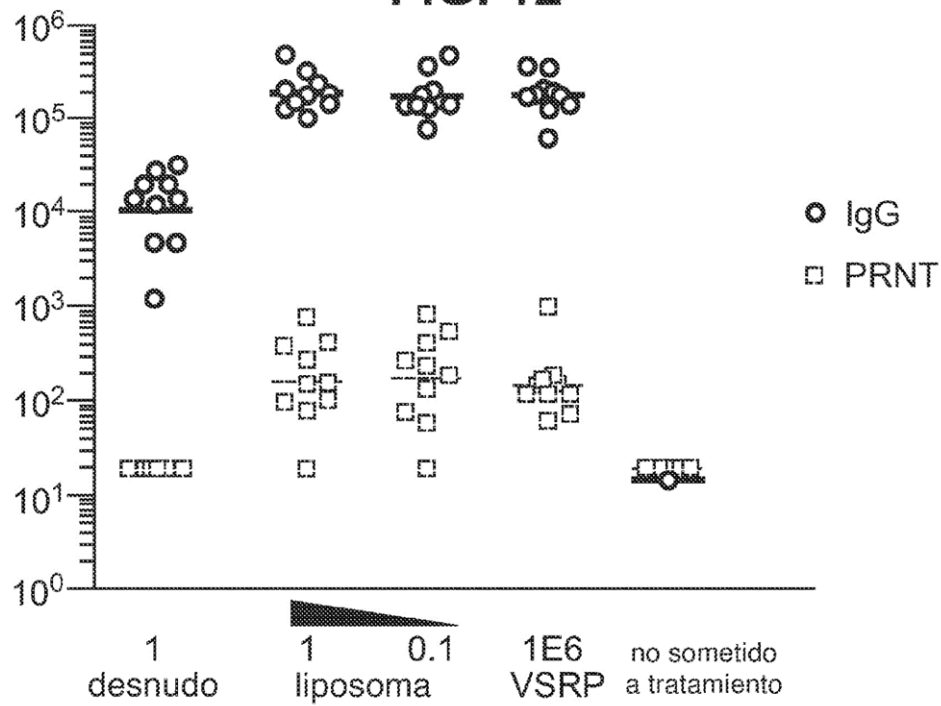


FIG. 13

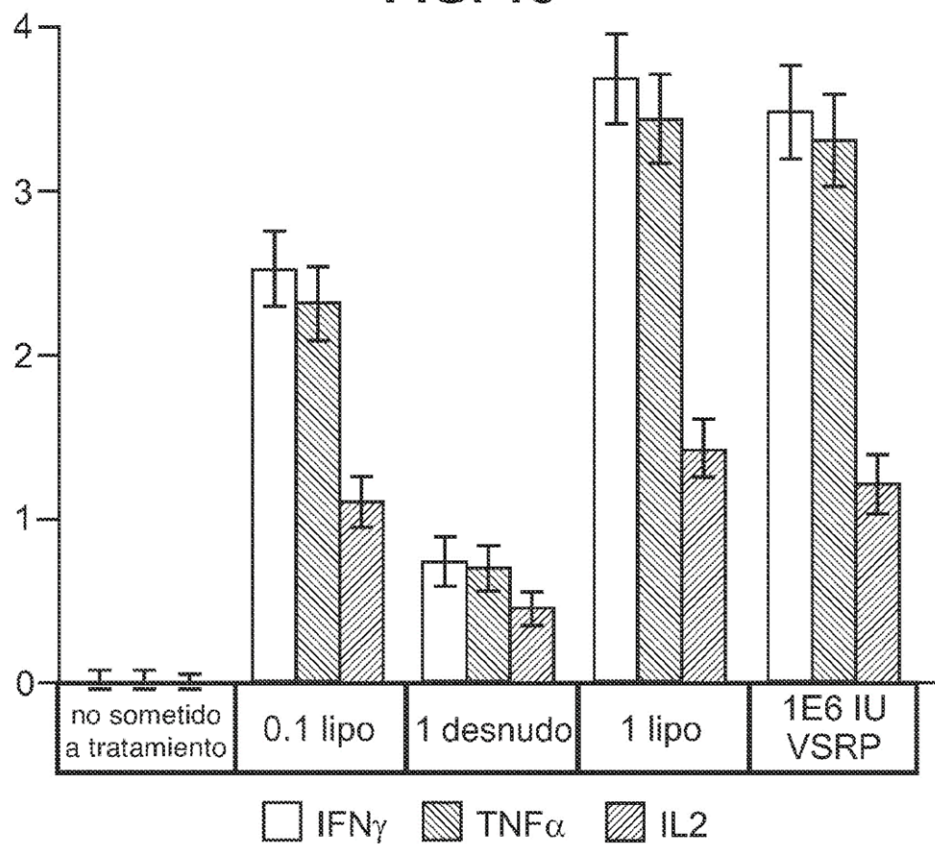
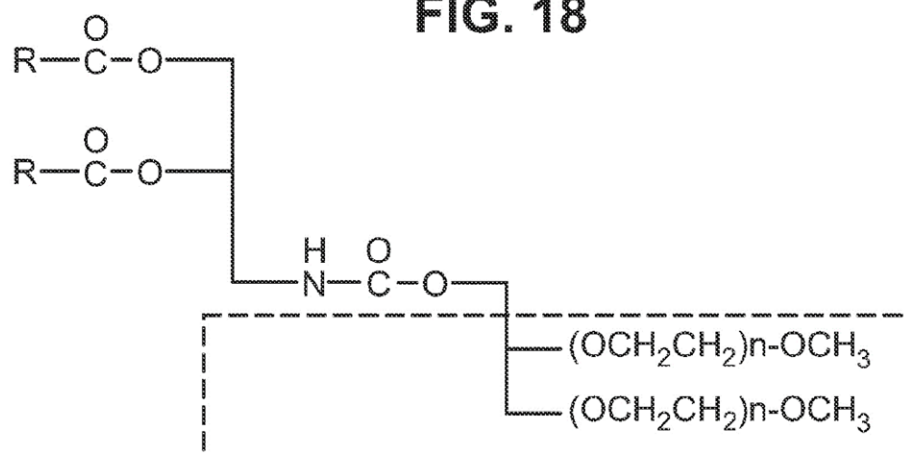


FIG. 18



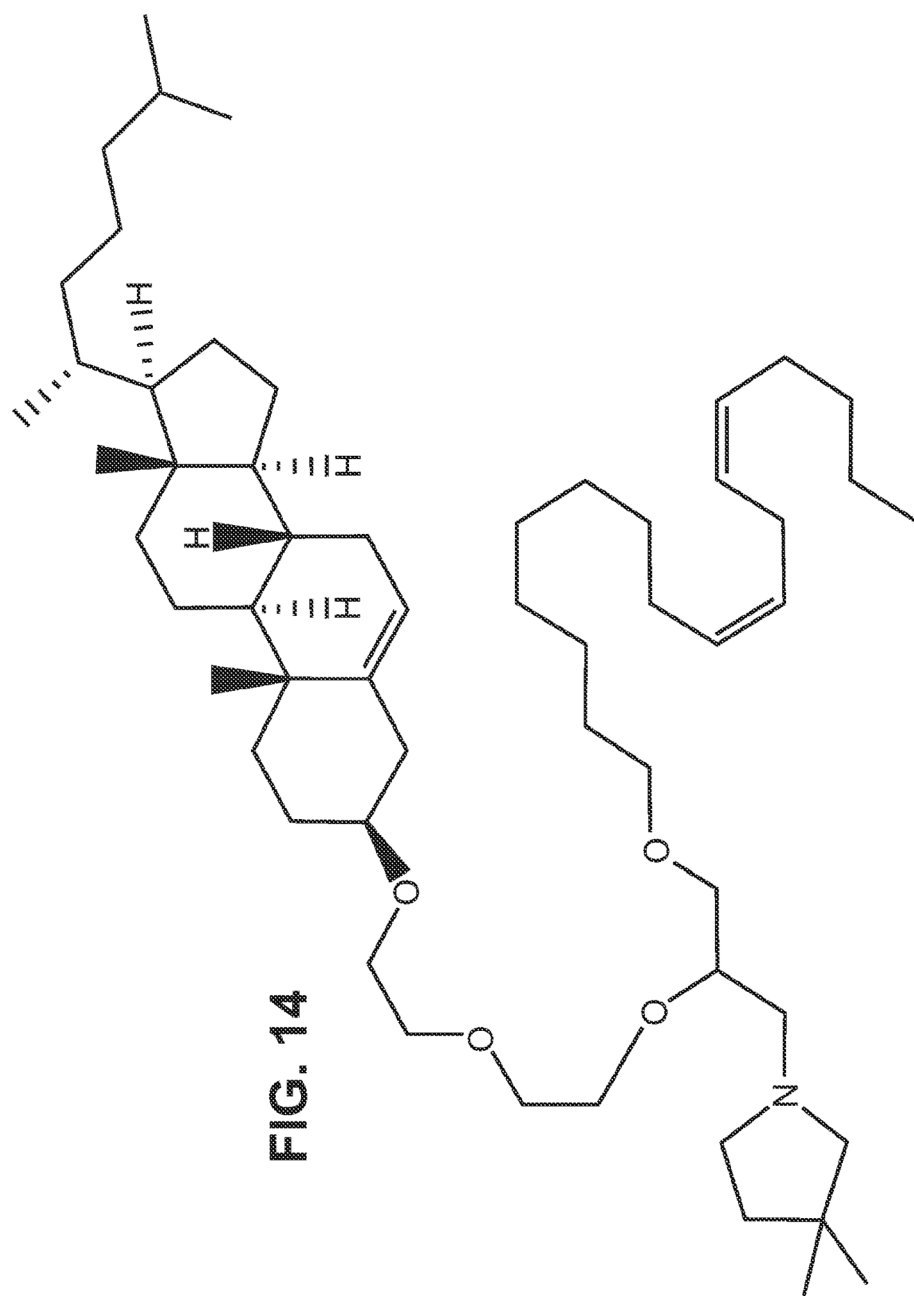
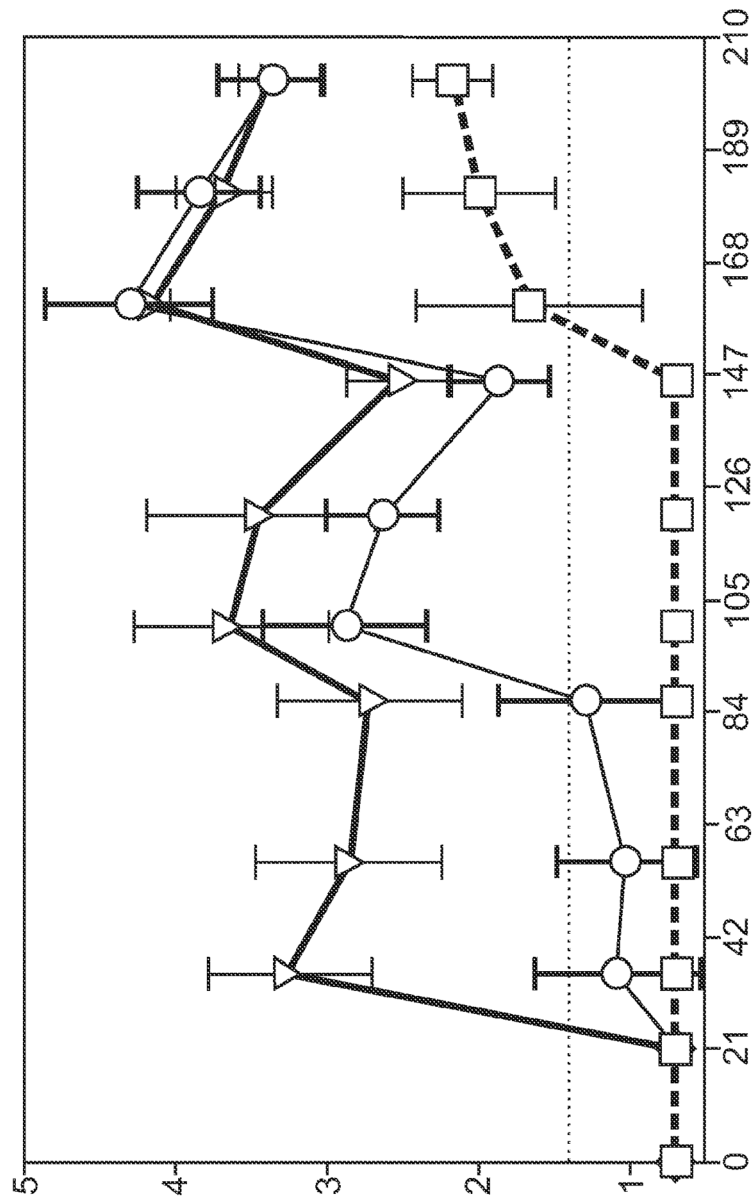


FIG. 15



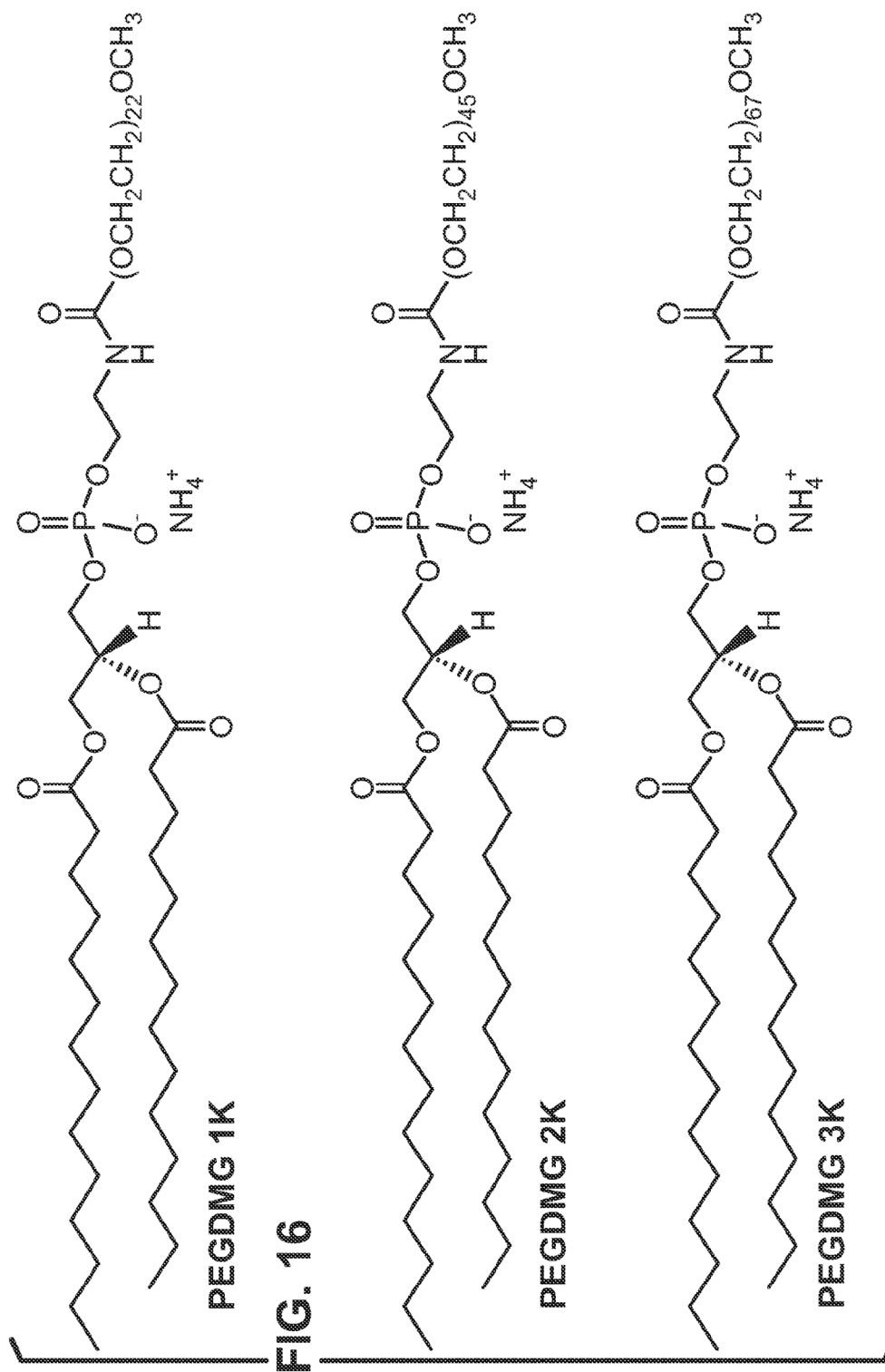


FIG. 16

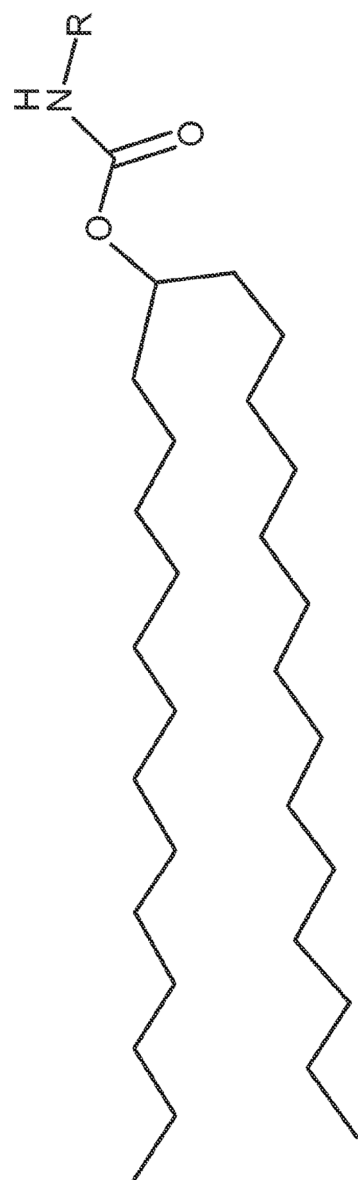


FIG. 17A

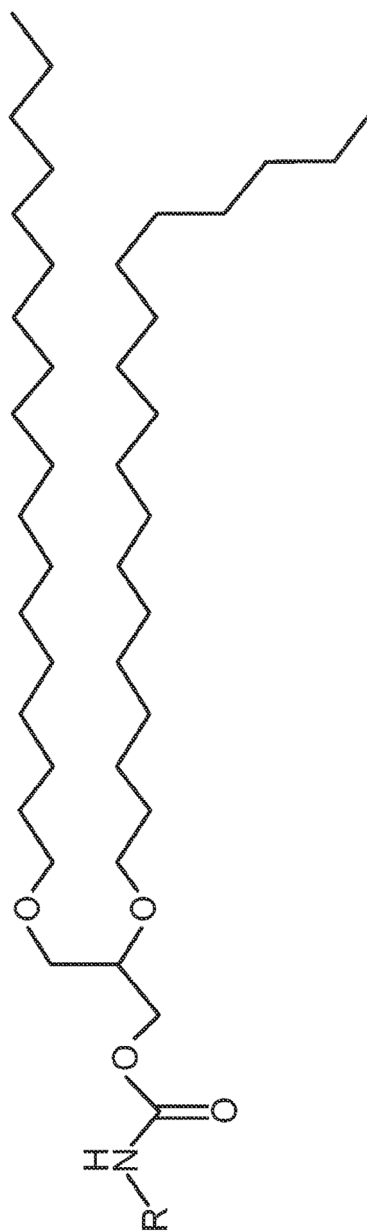


FIG. 17B

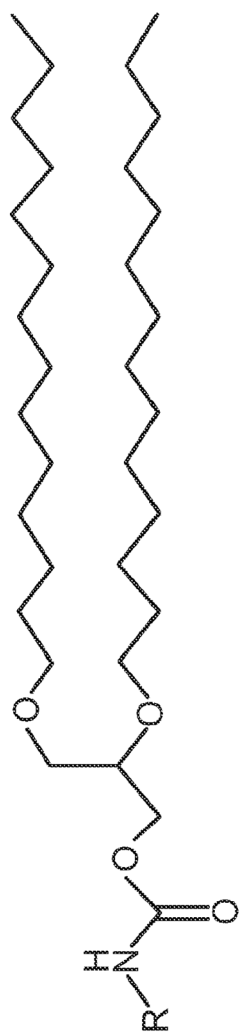


FIG. 17C

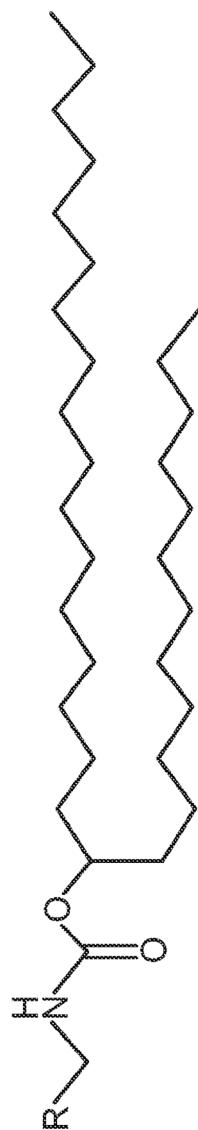


FIG. 17D

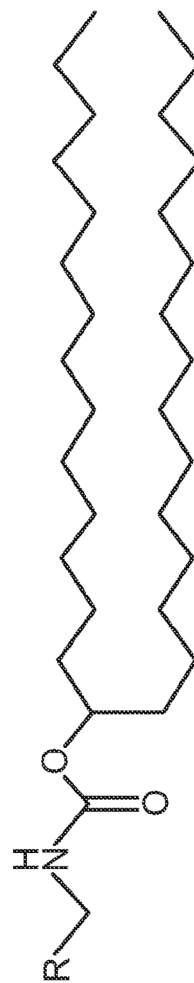


FIG. 17E