

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 649 896**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011 PCT/US2011/043108**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006380**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11738344 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2590625**

(54) Título: **Emulsiones catiónicas de aceite en agua**

(30) Prioridad:

06.07.2010 US 361892 P

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

16.01.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**BRITO, LUIS;
GEALL, ANDREW;
O'HAGAN, DEREK y
SINGH, MANMOHAN**

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 649 896 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

Emulsiones catiónicas de aceite en agua

Antecedentes de la Invención

- 5 Los agentes terapéuticos de ácido nucleico son prometedores para tratar enfermedades que varían desde trastornos hereditarios hasta afecciones adquiridas tales como cáncer, trastornos infecciosos (SIDA), enfermedad cardiaca, artritis y trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, Parkinson y Alzheimer). No solo pueden los genes funcionales 10 pueden ser suministrados para reparar una deficiencia genética o inducir la expresión de productos génicos exógenos, sino que el ácido nucleico también puede ser suministrado para inhibir la expresión de genes endógenos para proporcionar un efecto terapéutico. La inhibición de la expresión génica puede ser mediada por, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, moléculas de ARN de doble hebra (por ejemplo, moléculas de ARNsi, moléculas de ARNm), o ribozimas.
- 15 Un paso clave para esta terapia es suministrar moléculas de ácido nucleico a células *in vivo*. Sin embargo, el suministro *in vivo* de moléculas de ácido nucleico, en particular moléculas de ARN, enfrenta un número de obstáculos técnicos. Primero, debido a que a las nucleasas celulares y séricas, la vida media de ARN inyectado *in vivo* es de solo aproximadamente 70 segundos (véase, por ejemplo, Kurreck, Eur. J. Bioch. 270:1628-44 (2003)). Se han hecho esfuerzos por incrementar la estabilidad de ARN inyectado mediante el uso de modificaciones químicas; sin embargo, existen varios casos en los que las alteraciones químicas llevaron a efectos citotóxicos incrementados o a pérdida de función reducida. En un ejemplo específico, las células fueron intolerantes a dosis de un dúplex de ARNi en el cual cada segundo fosfato fue reemplazado por fosforotioato (Harborth, et al., Antisense Nucleic Acid Drug Rev. 13(2): 83-105 (2003)). De esta manera, existe la necesidad por desarrollar sistemas de suministro que 20 pueden desarrollar cantidades suficientes de moléculas de ácido nucleico (en particular moléculas de ARN) *in vivo* para provocar una respuesta terapéutica, pero que no sean tóxicas para el anfitrión.
- 25 Las vacunas a base de ácido nucleico son un enfoque alternativo a la vacunación. Por ejemplo, la inmunización intramuscular (IM) de ADN plasmídico que codifica para antígenos puede inducir respuestas inmunes celulares y humorales y proteger contra ataques. Las vacunas de ADN ofrecen ciertas ventajas sobre las vacunas tradicionales que usan antígenos de proteínas, o patógenos atenuados. Por ejemplo, en comparación con las vacunas de proteínas, las vacunas de ADN pueden ser más efectivas para producir un antígeno adecuadamente dobrado en su conformación nativa y para generar una respuesta inmune celular. Las vacunas de ADN tampoco tienen algunos de 30 los problemas de seguridad asociados con los patógenos eliminados o atenuados. Por ejemplo, una preparación viral eliminada puede contener virus vivos residuales, y un virus atenuado puede mutar y revertirse a un fenotipo patógeno.
- 35 Otra limitación de las vacunas a base de ácido nucleico es que grandes dosis de ácido nucleico generalmente se requieren para tener potentes respuestas inmunes en primates no humanos y humanos. Por lo tanto, se requieren sistemas de suministro y adyuvantes para incrementar la potencia de las vacunas a base de ácido nucleico. Se han desarrollado varios procedimientos para introducir moléculas de ácido nucleico en células, tales como transfección por fosfato de calcio, transfección por polipreno, función de protoplastos, electroporación, microinyección y lipofección.
- 40 Los lípidos catiónicos han sido ampliamente formulados como liposomas para suministrar genes dentro de células. Sin embargo, incluso una pequeña cantidad de suero (~10%) puede reducir dramáticamente la actividad de transfección de complejos liposoma/ADN debido a que el suero contiene materiales aniónicos. Recientemente, se desarrolló una emulsión lípida catiónica para suministrar moléculas de ADN a células. Véase, por ejemplo, Kim, et al., International Journal of Pharmaceuticas, 295, 35-45 (2005).
- 45 Las patentes de E.U.A. Nos. 6,753,015 y 6,855,492 describen un procedimiento para suministrar moléculas de ácido nucleico a un sujeto vertebrado usando micropartículas catiónicas. Las micropartículas comprenden un polímero, tal como poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxi butírico, una policaprolactona, un polioritoéster, un polianhídrido y similares, y se forman usando tensioactivos catiónicos. Las moléculas de ácido nucleico son adsorbidas sobre las superficies de las micropartículas.
- 50 Kim et al. (Pharmaceutical Research, vol. 18, páginas 54-60, 2001) y Chung et al. (Journal of Controlled Release, volumen 71, páginas 339-350, 2001) describen varias formulaciones de emulsión de aceite en agua que se usa para incrementar la eficiencia de transfección *in vitro* e *in vivo* de moléculas de ADN.
- 55 Ott et al. (Journal of Controlled Release, volumen 79, páginas 1-5, 2002) describe un enfoque que incluye una emulsión en sub-micras catiónicas como un sistema de suministro/adyuvante para ADN. El enfoque de emulsión en sub-micras se basa en MF59, un potente adyuvante de escualeno en agua que ha sido fabricado a gran escala y se ha usado en un producto aprobado comercialmente (Fluad[®]). 1,2-Dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) se usó para facilitar el suministro intracelular de ADN plasmídico. El documento WO00/005799 describe emulsiones y micropartículas con macromoléculas adsorbidas tales como ADN.

Aunque las vacunas a base de ADN son ampliamente promisorias para la prevención y tratamiento de enfermedades, se han originado preocupaciones generales con respecto a su seguridad. Las moléculas de ADN introducidas podrían integrarse potencialmente en el genoma del anfitrión o, debido a su distribución a varios tejidos, podrían llevar a una expresión prolongada de antígenos no deseable. Además, ciertos virus de ADN también se han usado como un vehículo para suministrar moléculas de ADN. Debido a sus propiedades infecciosas, estos virus logran una velocidad de transfección muy alta. Los virus usados se modifican genéticamente de tal manera que no se formen partículas infecciosas funcionales en la célula transfetada. A pesar de estas precauciones, sin embargo, no es posible descartar el riesgo de una propagación incontrolada del gen y genes virales introducidos, por ejemplo debido a eventos de recombinación potenciales. Esto implica también el riesgo de que el ADN sea insertado en un gen intacto del genoma de la célula hospedera mediante, por ejemplo, recombinación, con la consecuencia de que este gen puede ser mutado y de esta manera completa o parcialmente inactivado o puede dar origen a información errónea. En otras palabras, la síntesis de un producto génico que es vital para la célula puede ser completamente suprimida o, como alternativa, un producto génico modificado o incorrecto ser expresado. Además, generalmente es difícil escalar la fabricación y purificación de vectores virales grado clínico.

Un riesgo particular se presenta si el ADN es integrado en un gen que esté implicado en la regulación de crecimiento celular. En este caso, la célula hospedera puede volverse degenerada y llevar a cáncer o formación de tumores. Además, si el ADN introducido en la célula va a ser expresado, es necesario que el vehículo de ADN correspondiente contenga un promotor fuerte, tal como el promotor de CMV viral. La integración de estos promotores en el genoma de la célula tratada puede traducirse en alteraciones no deseadas de la regulación de la expresión génica en la célula. Otro riesgo de usar ADN como un agente para inducir una respuesta inmune (por ejemplo, como una vacuna) es la inducción de anticuerpos anti-ADN patógenos en el paciente en quien se ha introducido el ADN extraño, ocasionando de esta manera una respuesta inmune indeseable.

Las moléculas de ARN que codifican para un antígeno o un derivado de las mismas también pueden usarse como vacunas. Las vacunas de ARN ofrecen ciertas ventajas en comparación con las vacunas de ARN. Primero, el ARN no puede integrarse en el genoma del anfitrión de esta manera eliminando el riesgo de malignidades. Segundo, debido a la rápida degradación de ARN, la expresión del transgén extraño comúnmente tiene una vida corta, evitando la expresión a largo plazo descontrolada del antígeno. Tercero, las moléculas de ARN solo tienen que ser suministradas al citoplasma para expresar el antígeno codificado, mientras que las moléculas de ADN deben permear a través de la membrana nuclear.

No obstante, en comparación con las vacunas a base de ADN, relativamente menor atención se ha dado a las vacunas a base de ARN. Las moléculas de ARN y oligonucleótidos son moléculas hidrófilas y cargadas negativamente que son altamente susceptibles a la degradación por nucleasas cuando se administra como un terapéutico o vacuna. Además, las moléculas de ARN y oligonucleótidos no son activamente transportadas al interior de células. Véase, por ejemplo, Vajdy, M., et al., *Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA –based vaccines*, Immunol Cell Biol, 2004. 82(6): páginas 617-27.

Ying et al. (Nature Medicine, vol. 5, páginas 823-827, 1999) describe una vacuna de ARN de auto-replicación en la cual se suministró ARN desnudo que codifica para β-galactosidasa y se reportó la inducción de células CD8+.

Montana et al. (Bioconjugate Chem. 2007, 18, páginas 302-308) describe el uso de nanopartículas sólidas-lípidas catiónicas como portadores de ARN para transferencia génica. Se demostró que las nanopartículas sólidas-líquidas protegían la molécula de ARN contra la degradación, y la expresión de la proteína reportera (fluoresceína) se detectó después de microinyectar el complejo de ARN-partícula en huevos de erizo de mar.

WO 2010/009277 describe Partículas Péptidas Nano Lípidas (NLPP, por sus siglas en inglés) que comprenden (a) un péptido anfífatico, (b) un lípido y (c) al menos una especie inmunogénica. En ciertas modalidades, las NLPPs también incorporan un “agente de captura” cargado positivamente tal como un lípido catiónico. El agente de captura se usa para anclar una especie inmunogénica cargada negativamente (por ejemplo, una molécula de ADN o una molécula de ARN). La preparación de NLPP requiere péptidos anfífaticos, los cuales se usan para solubilizar el componente lípido y para formar nano-partículas.

Por lo tanto, existe la necesidad por proporcionar sistemas de suministro para moléculas de ácido nucleico u otras moléculas cargadas negativamente. Los sistemas de suministro son útiles para vacunas a base de ácido nucleico, en particular vacunas a base de ARN.

Sumario de la invención

Esta invención se refiere generalmente a emulsiones catiónicas de aceite en agua que se pueden usar para suministrar moléculas cargadas negativamente, tales como una molécula de ARN a células. Las partículas de la emulsión comprenden un núcleo de aceite y un lípido catiónico. El lípido catiónico puede interactuar con la molécula cargada negativamente anclando de esta manera la molécula a las partículas de la emulsión. Las emulsiones catiónicas descritas aquí son particularmente adecuadas para suministrar moléculas de ácido nucleico (tales como una molécula de ARN que codifica para un antígeno) a células y formular vacunas a base de ácido nucleico.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite que está en fase líquida a 25°C, y (b) un lípido catiónico. De preferencia, la partícula de la emulsión catiónica de aceite en agua no es una partícula péptida nanolípida (NLPP). De preferencia, el núcleo de aceite está en fase líquida a 4°C. Opcionalmente, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de alrededor de 80 nm a aproximadamente 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la emulsión es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de alrededor de 6,0 a aproximadamente 8,0; de preferencia a alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8, y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la emulsión comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, un alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la emulsión.

En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende además un tensioactivo, tal como un tensioactivo no iónico. Ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen, por ejemplo, SPAN85 (trioleato de sorbitan), Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxietilensorbitan), o una combinación de los mismos. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,01% a aproximadamente 2,5% (v/v) de tensioactivo. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,08% (v/v) de Tween 80, o como alternativa, alrededor de 0,5% (v/v) de Tween 80 y aproximadamente 0,5% (v/v) de SPAN85. También puede usarse un polietilenglicol (PEG) o PEG-lípido, tal como PEG₂₀₀₀PE, PEG₅₀₀₀PE, PEG₁₀₀₀DMG, PEG₂₀₀₀DMG, PEG₃₀₀₀DMG o una combinación de los mismos.

La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,005% a aproximadamente 1,25% (v/v) de tensioactivo. Por ejemplo, la composición que comprende el complejo ARN-emulsión puede comprender aproximadamente 0,04% (v/v) de Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxietilensorbitan), o como alternativa, alrededor de 0,25% (v/v) de Tween 80 y aproximadamente 0,25% (v/v) de SPAN85 (trioleato de sorbitan).

En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende además un fosfolípido. Ejemplos de fosfolípidos incluyen, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE), o fosfatidilcolina de huevo (PC de huevo). Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml (de preferencia, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml) DOPE, o como alternativa, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml (de preferencia, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml) DPyPE, o como alternativa, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml (de preferencia, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml) PC de huevo.

La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (de preferencia, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml) DOPE, o como alternativa, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (de preferencia, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml) DPyPE, o como alternativa, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (de preferencia, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml) PC de huevo.

En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende además un polímero o un tensioactivo en la fase acuosa de la invención. Ejemplos de polímeros incluyen poloxámeros tales como Pluronic® F127 (copolímero de bloques de óxido de etileno/óxido de propileno: H(OCH₂CH₂)_x(OCH₃CH(CH₃))_y(OCH₂CH₂)_zOH). Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de alrededor de 0,05% a aproximadamente 20% (p/v) de polímero, o de aproximadamente 0,1% a alrededor de 10% (p/v) de polímero, tal como 0,5% (p/v) o 1% (p/v) de Pluronic® F127. La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de alrededor de 0,025% a aproximadamente 10% (v/v) de polímero, o de alrededor de 0,5% a aproximadamente 5% (v/v) de polímero, tal como 0,25% (p/v), o 0,5% (p/v) de Pluronic® F127.

Las emulsiones pueden comprender componentes que puedan promover la formación de partículas, mejoren la formación de complejos entre las moléculas cargadas negativamente y las partículas catiónicas, faciliten la ruptura del complejo/liberación adecuada de las moléculas cargadas negativamente (tales como una molécula de ARN), incrementen la estabilidad de la molécula cargada negativamente (por ejemplo, para prevenir la degradación de una molécula de ARN), o prevengan la agregación de las partículas de la emulsión.

En ciertas modalidades, el núcleo de aceite puede comprender un aceite que se seleccione de los siguientes: aceite de ricino, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de onagra, aceite de pescado, aceite de jojoba, aceite de manteca de cerdo, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de cacahuate, aceite de cártamo, aceite de ajonjolí, aceite de soja, escualeno, aceite de girasol, aceite de germe de trigo, aceite mineral o una combinación de los mismos. De preferencia, el aceite es aceite de soja, aceite de girasol, aceite de oliva, escualeno o una combinación de los mismos. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de alrededor de 0,2% a aproximadamente 20% (v/v) de aceite, de preferencia alrededor de 0,08% a aproximadamente 5% de aceite, alrededor de 0,08% de aceite, aproximadamente 4% a alrededor de 5% de aceite, aproximadamente 4% de aceite,

alrededor de 4,3% de aceite o aproximadamente 5% de aceite. La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de alrededor de 0,1% a aproximadamente 10% (v/v) de aceite, preferiblemente de alrededor de 2% a aproximadamente 2,5% (v/v) de aceite.

- 5 En ciertas modalidades, el lípido catiónico se selecciona de uno de los siguientes: 1,2-dioleoiloxy-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3β-[N-(N,N'-dimetilaminoetan)-carbamoyl]colesterol (colesterol DC), dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-dimristoil-3-trimetilamoniopropano (DMTAP), dipalmitoil(C_{16:0})trimetilamonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP), lípidos E0001-E0118 o E0119-E0180 como se describe en la tabla 6 (páginas 112-139) de WO 2011/076807, o una combinación de los mismos. Los lípidos catiónicos que se prefieren particularmente incluyen DOTAP, colesterol DC y DDA.

En ciertas modalidades, el lípido catiónico se selecciona de uno de los siguientes: 1,2-dioleoiloxy-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3β-[N-(N,N'-dimetilaminoetan)-carbamoyl]colesterol (colesterol DC), dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-dimristoil-3-trimetilamoniopropano (DMTAP), dipalmitoil(C_{16:0})trimetilamonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP), lípidos E0001-E0118 o E0119-E0180 como se describe en la tabla 6 (páginas 112-139) de WO 2011/076807, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleo-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), 1,2-dilinoleiloxy-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), o una combinación de los mismos. Los lípidos catiónicos que se prefieren particularmente incluyen DOTAP, colesterol DC, DDA, DOTMA, DOEPC, DSTAP, DODAC, DODAP y DLinDMA.

- 20 En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente de 3 mg/ml, de preferencia de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml de DOTAP.

La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de preferencia de alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml de DOTAP. Opcionalmente, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 0,62 mg/ml a aproximadamente 4,92 mg/ml de colesterol DC.

La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender 0,31 mg/ml a alrededor de 2,46 mg/ml de colesterol DC. Opcionalmente, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0; de preferencia alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8, y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende de aproximadamente 0,73 mg/ml a alrededor de 1,45 mg/ml de DDA.

45 La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de alrededor de 0,365 mg/ml a aproximadamente 0,725 mg/ml de DDA. Opcionalmente, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de aproximadamente 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0; de preferencia alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8, y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml de DOTMA.

55 La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender aproximadamente 0,4 mg/ml a alrededor de 1,5 mg/ml, de preferencia de alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml de DOTMA. Opcionalmente, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la

emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0; de preferencia alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8, y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende de aproximadamente 0,8 mg/ml a alrededor de 3 mg/ml, de preferencia alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,8 mg/ml de DOEPC.

La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender aproximadamente 0,4 mg/ml a alrededor de 1,5 mg/ml, de preferencia de alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 0,9 mg/ml de DOEPC. Opcionalmente, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0; de preferencia alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8, y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En ciertas modalidades, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 0,73 mg/ml a aproximadamente 1,45 mg/ml de DODAC.

La composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de aproximadamente 0,365 mg/ml a alrededor de 0,725 mg/ml de DODAC. Opcionalmente, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0; de preferencia alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8, y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En un ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la emulsión catiónica de aceite en agua comprende (a) alrededor de 0,5% (v/v) de aceite, y (b) un lípido catiónico.

En un ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la composición comprende (a) alrededor de 0,25% (v/v) de aceite, y (b) un lípido catiónico.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula y una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite, (b) un lípido catiónico y (c) un fosfolípido. Los fosfolípidos que se prefieren incluyen, por ejemplo, DPyPE, DOPE y PC de huevo. De preferencia, la composición (complejo de molécula cargada negativamente-emulsión) comprende de aproximadamente 0,05 mg/ml a alrededor de 10 mg/ml (muy preferiblemente, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml) de DOPE, o como alternativa, alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (muy preferiblemente, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml) de DPyPE, o como alternativa, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (muy preferiblemente, de alrededor de 0,05 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml) de PC de huevo.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) DOTAP, y en donde la emulsión de aceite en agua comprende de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 3,0 mg/ml de DOTAP, de preferencia de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml de DOTAP. En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) DOTAP, y en donde la composición comprende de alrededor de 0,4 mg/ml a

aproximadamente 1,5 mg/ml de DOTAP, tal como 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, etc. En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0, preferiblemente de alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) colesterol DC, y en donde la emulsión de aceite en agua comprende alrededor de 2,46 mg/ml a aproximadamente 4,92 mg/ml de colesterol DC. En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0, preferiblemente de alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) colesterol DC, y en donde la composición comprende de alrededor de 1,23 mg/ml a aproximadamente 2,46 mg/ml de colesterol DC, tal como 1,23 mg/ml. En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0, preferiblemente de alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) DDA, y en donde la emulsión de aceite en agua comprende alrededor de 0,73 mg/ml a aproximadamente 1,45 mg/ml de DDA. En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0, preferiblemente de alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) DDA, y en donde la composición comprende de alrededor de 0,365 mg/ml a aproximadamente 0,725 mg/ml de DDA, tal como 0,725 mg/mL. En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0, preferiblemente de alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) DOTMA, y en donde la composición comprende alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de preferencia de alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml de DOTMA. En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0, preferiblemente de alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) DOEPC, y en donde la composición comprende alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de preferencia de alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 0,9 mg/ml de DOEPC.

En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0, preferiblemente de alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

En otro ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite y (b) DODAC, y en donde la composición comprende alrededor de 0,365 mg/ml a aproximadamente 0,725 mg/ml de DODAC. En algunas modalidades, la molécula cargada negativamente es ARN, el diámetro promedio de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm y la N/P de la emulsión es de al menos 4:1. Opcionalmente, la composición es regulada en pH (por ejemplo, con un regulador de pH de citrato, un regulador de pH de succinato, un regulador de pH de acetato, etc.) y tiene un pH de aproximadamente 6,0 a alrededor de 8,0, preferiblemente de alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8; y contiene no más de 30 mM de sal inorgánica (por ejemplo, NaCl). Opcionalmente, la composición comprende además un agente tonificador no iónico, tal como un azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos, en una cantidad suficiente para hacer isotónica la composición.

Ejemplos de moléculas cargadas negativamente incluyen antígenos que contienen péptidos cargados negativamente, moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN) que codifican para uno o más antígenos que contienen péptidos, moléculas pequeñas cargadas negativamente y adyuvantes inmunológicos cargados negativamente. Los adyuvantes inmunológicos cargados negativamente incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos inmunoestimuladores (por ejemplo, CpG oligonucleótidos), moléculas de ARN de una sola hebra, potenciadores inmunológicos de molécula pequeña (SMIPs), etc. Las moléculas pequeñas cargadas negativamente incluyen, por ejemplo, fosfonato, fluorofosfonato, etc.

La molécula cargada negativamente es una molécula de ARN, tal como una molécula de ARN, que codifica para un antígeno. En ciertas modalidades, la molécula de ARN es una molécula de ARN de auto-replicación, tal como un replicón de ARN derivado de alfavirus.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, que comprende: (i) proporcionar una emulsión catiónica de aceite en agua, en la que las partículas de la emulsión comprenden (a) un núcleo de aceite que está en fase líquida a 25 °C, y (b) un lípido catiónico, y opcionalmente (c) un fosfolípido; (ii) proporcionar una solución acuosa que comprende la molécula cargada negativamente, en la que la molécula cargada negativamente es una molécula de ARN, por ejemplo, una molécula de ARN autoreplicante; y (iii) combinar la emulsión de aceite en agua de (i) y la solución acuosa de (ii) de manera que la molécula cargada negativamente se compleje con una partícula de la emulsión catiónica de aceite en agua, opcionalmente en la que la emulsión de aceite en agua catiónica y la solución acuosa se combinan en una relación de aproximadamente 1:1 (v/v).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición como se describe en el presente documento para su uso como un medicamento, por ejemplo, para su uso en el aumento o la potenciación de una respuesta inmunitaria.

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 muestra la estabilidad de ARN de timo de ratón en presencia de RNasa después de que la molécula de ARN formara complejo con partículas de nano-emulsión catiónica (CNE, por sus siglas en inglés). Todas las muestras se incubaron con RNasa durante 30 minutos. RNasa se inactivó con proteinasa K. En las muestras que se formularon con CNEs se rompió el complejo y se analizaron para la integridad de ARN mediante electroforesis en gel de desnaturización. El carril no marcado contiene marcadores de peso molecular. Carriles 1 y 2: ARN de timo de ratón antes (1) y después (2) de digestión con RNasa; carriles 3 y 4: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE01 a una relación N/P de 10:1 antes (3) y después (4) de digestión con RNasa; carriles 5 y 6: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE01 a una relación N/P de 4:1 antes (5) y después (6) de digestión con RNAs; carriles 7 y 8: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE17 a una relación N/P de 10:1 antes (7) y después (8) de digestión con RNasa; carril 9 ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE17 a una relación N/P de 4:1 antes (9) de la digestión con RNasa.

La figura 2 muestra la estabilidad de ARN de timo de ratón en presencia de RNasa después de que la molécula de ARN formara complejo con partículas CNE. Todas las muestras se incubaron con RNasa durante 30 minutos. RNasa se inactivó con proteinasa K. En las muestras que se formularon con CNEs se rompió el complejo y se analizaron para integridad de ARN por electroforesis en gel de desnaturización. El carril no marcado contiene marcadores de peso molecular. Carril 10: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE17 a una relación N/P de 4:1 después (10) de digestión con RNasa; carriles 11 y 12: ARN de timo de ratón antes (11) y después (12) de digestión con RNasa; carriles 13 y 14: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE12 a una relación N/P de 10:1 antes (13) y después (14) de digestión con RNasa; carriles 15 y 16: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE12 a una relación N/P de 4:1 antes (15) y después (16) de digestión con RNasa; carriles 17 y 18: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE13 a una relación N/P de 10:1 antes (17) y después (18) de digestión con RNasa; carriles 19 y 20: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE13 a una relación N/P de 4:1 antes (19) y después (20) de digestión con RNasa.

La figura 3 muestra la estabilidad de ARN de timo de ratón en presencia de RNasa después de que la molécula de ARN formara complejo con partículas CNE. Todas las muestras se incubaron con RNasa durante 30 minutos. RNasa se inactivó con proteinasa K. En las muestras que se formularon con CNEs se rompió el complejo y se analizaron para integridad de ARN mediante electroforesis en gel de desnaturización. El carril no marcado contiene marcadores de peso molecular. Carriles 1 y 2: ARN de timo de ratón antes (1) y después (2) de digestión con RNasa; carriles 3 y 4: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE01 a una relación N/P de 10:1 antes (3) y después (4) de digestión con RNasa; carriles 5 y 6: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE01 a una relación N/P de 4:1 antes (5) y después (6) de digestión con RNAs; carriles 7 y 8: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE17 a una relación N/P de 10:1 antes (7) y después (8) de digestión con RNasa; carril 9 ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE17 a una relación N/P de 4:1 antes (9) de la digestión con RNasa.

La figura 4 muestra la estabilidad de ARN de timo de ratón en presencia de RNasa después de que la molécula de ARN seacomplejó con partículas de CNE. Todas las muestras se incubaron con RNasa durante 30 minutos. RNasa fue inactivada con proteinasa K y las muestras que se formularon se descomplejaron y analizaron por integridad de ARN por electroforesis en gel de desnaturización. El carril no marcado contiene marcadores de peso molecular. Carriles 15 y 16: ARN de timo de ratón antes (15) y después (16) de digestión con RNasa; carriles 17 y 18: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE04 a una relación N/P de 10:1 antes (17) y después (18) de digestión con RNasa; carriles 19 y 20: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE04 a una relación N/P de 4:1 antes (19) y después (20) de digestión con RNasa; carriles 21 y 22: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE05 a una relación N/P de 10:1 antes (21) y después (22) de digestión con RNasa; carriles 23 y 24: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE05 a una relación N/P de 4:1 antes (23) y después (24) de digestión con RNasa.

La figura 5 muestra la estabilidad de ARN de timo de ratón en presencia de RNasa después de que la molécula de ARN formara complejo con partículas de CNE. Todas las muestras fueron incubadas con RNasa durante 30 minutos. RNasa se inactivó con proteinasa K y las muestras que se formularon fueron descomplejadas y analizadas para integridad de ARN mediante electroforesis en gel de desnaturización. Los carriles no marcados contienen marcadores de peso molecular. Carriles 1 y 2: ARN de timo de ratón antes (1) y después (2) de digestión con RNasa; carriles 3 y 4: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE01 a una relación N/P de 10:1 antes (3) y después (4) de digestión con RNasa; carriles 5 y 6: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE01 a una relación N/P de 4:1 antes (5) y después (6) de digestión con RNAs; carriles 7 y 8: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE17 a una relación N/P de 10:1 antes (7) y después (8) de digestión con RNasa; carriles 9 y 10: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE27 a una relación N/P de 4:1 antes (9) y después (10) de digestión con RNasa; carriles 11 y 12: ARN de timo de ratón antes (11) y después (12) de digestión con RNasa; carriles 13 y 14: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE32 a una relación N/P de 10:1 antes (13) y después (14) de digestión con RNasa; carriles 15 y 16: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE32 a una relación N/P de 4:1 antes (15) y después (16) de digestión con RNasa.

La figura 6 muestra la estabilidad de ARN de timo de ratón en presencia de RNasa después de que la molécula de ARN formara complejo con partículas de CNE. Todas las muestras se incubaron con RNasa durante 30 minutos. RNasa se inactivó con proteinasa K y en las muestras que se formularon se rompió el complejo y se analizaron para integridad de ARN mediante electroforesis en gel de desnaturización. Los carriles no marcados contienen marcadores de peso molecular. Carriles 1 y 2: ARN de timo de ratón antes (1) y después (2) de digestión con RNasa; carriles 3 y 4: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE35 a una relación N/P de 10:1 antes (3) y después (4) de digestión con RNasa; carriles 5 y 6: ARN de timo de ratón que forma complejo con CNE35 a una relación N/P de 4:1 antes (5) y después (6) de digestión con RNasa; carril 7: ARN de timo de ratón antes de digestión con RNasa.

Las figuras 7A, 7B y 7C muestran la secuencia de los vectores usados en los ejemplos. La figura 7A muestra la secuencia del plásmido A317 (SEQ ID NO: 1), que codifica para el antígeno RSV-F. La figura 7B muestra la secuencia de plásmido A306 (SEQ ID NO:2) que codifica para fosfatasa alcalina placentaria humana secretada (SEAP, por sus siglas en inglés). La figura 7C muestra la secuencia del plásmido A375 (SEQ ID NO: 3), que codifica para un antígeno RSV-F.

La figura 8A muestra los resultados del ensayo SEAP *in vivo*, usando 1 µg del replicón de ARN A306 que formó complejo con CNE17 a una relación N/P de 10:1. La figura 8B muestra los títulos de IgG totales en ratones BALB/c en los puntos de tiempo 2wp1 y 2wp2 (replicón de ARN A317 que formó complejo con CNE17 se administraron a los BALB/c).

- 5 Las figuras 9A, 9B y 9C muestran los efectos de diferentes composiciones reguladoras de pH en el tamaño de partícula. La figura 9A muestra los efectos de azúcar, sal y polímero F127 en el tamaño de partícula de emulsiones CNE17 con ARN que formó complejo a N/P de 10:1. La figura 9B muestra el efecto de regulador de pH de citrato en el tamaño de partícula de la emulsión de CNE17. La figura 9C muestra el efecto de polímeros (F68, F127 y PEG300) en el tamaño de partícula.

10 **Descripción Detallada de la Invención**

1. PERSPECTIVA GENERAL

Esta invención se refiere generalmente a emulsiones catiónicas de aceite en agua que pueden usarse para suministrar moléculas cargadas negativamente, tales como una molécula de ARN a células. Las partículas de la emulsión comprenden un núcleo de aceite y un lípido catiónico. El lípido catiónico puede interactuar con la molécula cargada negativamente, por ejemplo a través de fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas/hidrófilas, anclando de esta manera la molécula a las partículas de la emulsión. Las emulsiones catiónicas descritas aquí son particularmente adecuadas para suministrar moléculas de ácido nucleico, tal como moléculas de ARN (por ejemplo, ARN que codifica para una proteína o péptido, ARN de interferencia pequeño, ARN de auto-replicación y similares) a células *in vivo*.

20 La presente invención se basa en el descubrimiento de que las emulsiones catiónicas de aceite en agua pueden usarse para suministrar moléculas cargadas negativamente a células. Las partículas de la emulsión comprenden un núcleo de aceite y un lípido catiónico que puede interactuar con la molécula cargada negativamente. En modalidades preferidas, una molécula de ARN forma complejo, por ejemplo a través de fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas/hidrófilas, con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua. La molécula de ARN que formó complejo es estabilizada y protegida contra la degradación mediada por RNasa, y es absorbida más eficiente por células en relación con ARN libre. Además, cuando el ARN es suministrado para inducir la expresión de una proteína codificada, tal como en el contexto de una vacuna de ARN, la inmunogenicidad de la proteína codificada puede ser incrementada debido a los efectos adyuvantes de la emulsión. Por lo tanto, además de un suministro más eficiente de una molécula cargada negativamente (por ejemplo, una molécula de ARN que codifica para un antígeno), las emulsiones catiónicas también pueden incrementar la respuesta inmune a través de actividad adyuvante.

30 Por ejemplo, como se describe y ejemplifica en la presente, los inventores evaluaron los efectos *in vivo* de una serie de emulsiones catiónicas de aceite en agua, usando un modelo de ratón y un modelo de rata de algodón de inmunización con virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés). Los resultados demuestran que las formulaciones en las cuales las moléculas de ARN formaron complejo con emulsiones catiónicas generaron respuestas inmunes significativamente más altas en comparación con las formulaciones de ARN libre. En algunos casos, los títulos de anticuerpo promedio contra una proteína codificada por ARN que se obtuvieron después de la administración de 1 µg de ARN que formó complejo con emulsiones catiónicas de aceite en agua, fueron comparables con los títulos obtenidos usando 10 veces más ARN libre (dosis de 10 µg de ARN libre). Otra ventaja de las formulaciones descritas en la presente, además de respuestas inmunes más altas en el anfitrión, es que hubo menos fluctuación en las respuestas inmunes en los animales hospederos entre diferentes estudios y diferentes animales hospederos, en comparación con ARN libre (no formulado).

40 En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en donde la partícula comprende (a) un núcleo de aceite que está en fase líquida a 25°C, y (b) un lípido catiónico. De preferencia, la partícula de la emulsión catiónica de aceite en agua no es una partícula péptida nanolípida (NLPP). Preferiblemente, el núcleo de aceite está en fase líquida a 4°C.

45 Las partículas de la emulsión catiónica pueden comprender además un tensioactivo (por ejemplo, Tween 80 (polisorbato 80; monoleato de polioxietilensorbitan), SPAN85 (trioleato de sorbitan), SPAN 85 (trioleato de sorbitan), o una combinación de los mismos), un fosfolípido, o una combinación de los mismos. La emulsión también puede comprender un polímero (por ejemplo, Pluronic® F127) en la fase acuosa (la fase continua) de la emulsión.

50 Las emulsiones catiónicas de la invención se pueden usar para suministrar ARN. Las composiciones pueden administrarse a un sujeto que las requiera para generar o potenciar una respuesta inmune. Las composiciones también pueden ser co-suministradas con otra molécula inmunogénica, composición o vacuna inmunogénica para incrementar la efectividad de la respuesta inmune inducida.

2. DEFINICIONES

Según se usa en la presente, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a

menos que el contexto claramente dicte lo contrario.

El término "aproximadamente", según se usa aquí, se refiere a +/- 10% de un valor.

El término "polímero" se refiere a una molécula que consiste en porciones químicas individuales, las cuales pueden ser iguales o diferentes, que son unidas entre sí. Según se usa en la presente, el término "polímero" se refiere a porciones químicas individuales que son unidas de extremo a extremo para formar una molécula lineal, así como a porciones químicas individuales unidas juntas en forma de una estructura ramificada (por ejemplo, de "varios brazos" o "en forma de estrella"). Ejemplos de polímeros incluyen, por ejemplo, poloxámeros. Los poloxámeros son copolímeros de tres bloques no iónicos que tienen una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (óxido de polí(propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (óxido de polí(etileno)).

10 Un "regulador de pH" se refiere a una solución acuosa que resiste los cambios en el pH de la solución.

Según se usa aquí, "análogo de nucleótido" o "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que contiene una o más modificaciones químicas (por ejemplo, sustituciones) en o sobre la base nitrogenosa del nucleósido (por ejemplo, citosina (C), timina (T) o uracilo (U)), adenina (A) o guanina (G)). Un análogo de nucleósido puede contener modificaciones químicas adicionales en o sobre la porción de azúcar del nucleósido (por ejemplo, ribosa, desoxirribosa, ribosa modificada, desoxirribosa modificada, análogo de azúcar de seis miembros o análogo de azúcar de cadena abierta), o el fosfato.

15 Según se usa en la presente, "sacárido" abarca monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos en formas de cadena recta o de anillo, o una combinación de los mismos para formar una cadena de sacáridos. Los oligosacáridos son sacáridos que tienen dos o más residuos de monosacáridos. Ejemplos de sacáridos incluyen glucosa, maltosa, 20 maltotriosa, maltotetraosa, sucrosa y trehalosa.

25 Los términos "ARN de auto-replicación", "replicón de ARN" o "vector de ARN" es un término de la técnica y se refieren generalmente a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o auto-replicación *in vivo*, típicamente dentro de una célula objetivo. El replicón de ARN se usa directamente, sin la necesidad de introducción de ADN en una célula y transporte al núcleo en donde ocurriría la transcripción. Mediante el uso del vector de ARN para suministro directo dentro del citoplasma de la célula hospedera, se presenta eficientemente una replicación autónoma y traducción de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. Un ARN de auto-replicación derivado de alfavírus puede contener los siguientes elementos en orden secuencial: secuencias virales 5' requeridas en *cis* para replicación (conocidas también como 5'CSE, en antecedentes), secuencias que, cuando sean expresadas, codifiquen para proteínas no estructurales de alfavírus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), secuencias virales 3' requeridas en *cis* para replicación (conocidas también como 3' CSE, en antecedentes), y un tracto de poliadenilato. El ARN de auto-replicación derivado de alfavírus también puede contener un promotor de "región de unión" subgenómico viral, secuencias de uno o más genes de proteínas estructurales o porciones de las mismas, moléculas de ácido nucleico extrañas que sean de un tamaño suficiente 30 para permitir la producción de partículas de alfavírus recombinantes, así como secuencias heterólogas que serán expresadas.

35 El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que ayude o modifique la acción de un farmacéutico, incluyendo pero no limitados a adyuvantes inmunológicos, los cuales incrementan y/o diversifican la respuesta inmune a un antígeno. En consecuencia, los adyuvantes inmunológicos incluyen compuestos que son capaces de potenciar una respuesta inmune a antígenos. Los adyuvantes inmunológicos pueden potenciar inmunidad humoral y/o celular. Las sustancias que estimulan una respuesta inmune innata están incluidas dentro de la definición de adyuvantes inmunológicos en la presente. Los adyuvantes inmunológicos también pueden ser llamados "immunopotenciadores".

40 Según se usa aquí, un "antígeno" o "inmunógeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítopos (por ejemplo, lineales, conformacionales o ambos) que provocan una respuesta inmunológica. Según se usa en la presente, un "epítopo" es aquella porción de especies dadas (por ejemplo, una molécula antigénica o complejo antigénico) que determina su especificidad inmunológica. Un epítopo está dentro del alcance de la presente definición de antígeno. El término "antígeno" o "inmunógeno" según se usa aquí incluye antígenos de subunidad, es decir, antígenos que están separados e individuales de un organismo entero con el cual el antígeno está asociado 45 en la naturaleza. Anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotípico, o fragmentos de los mismos, y mimótopos de péptidos sintéticos, los cuales pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también son capturados bajo la definición de antígeno según se usa aquí.

50 Una "respuesta inmunológica" o "respuesta inmune" es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a un antígeno o a un adyuvante inmunológico.

55 Las respuestas inmunes incluyen respuestas inmunes innatas y adaptivas. Las respuestas inmunes innatas son respuestas de acción rápida que proporcionan una primera línea de defensa para el sistema inmunológico. En contraste, la inmunidad adaptativa usa la selección y expansión clonal de células inmunes que tienen genes receptores redispuestos somáticamente (por ejemplo, receptores de células T y B) que reconocen antígenos de un patógeno o trastorno dado (por ejemplo, un tumor), proporcionando así especificidad y memoria inmunológica. Las

5 respuestas inmunes innatas, entre sus muchos efectos, llevan a un rápido estallido de citocinas inflamatorias y activación de células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) tales como macrófagos y células dendríticas. Para distinguir patógenos de auto-componentes, el sistema inmunológico innato usa una variedad de receptores relativamente invariables que detectan firmas de patógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos, o PAMPs. La adición de componentes microbianos a vacunas experimentales se sabe que lleva al desarrollo de respuestas inmunes robustas y adaptivas durables. El mecanismo detrás de esta potenciación de las respuestas inmunes se ha reportado que incluye receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), los cuales se expresan diferencialmente en una variedad de células inmunes, incluyendo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales, células B y algunas células no inmunes,

10 tales como células epiteliales y endoteliales. El acoplamiento de PRRs lleva a la activación de algunas de estas células y a su secreción de citocinas y quimiocinas, así como a la maduración y migración de otras células. En tandem, esto crea un ambiente inflamatorio que lleva al establecimiento de la respuesta inmune adaptiva. Los PRRs incluyen receptores no fagocíticos, tales como receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) y proteínas de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés), y receptores que inducen fagocitosis, tales como receptores de depuración, receptores de manosa y receptores de β -glucano. Los TLR reportados (junto con ejemplos de algunos ligandos reportados, que se pueden usar como molécula inmunogénica en varias modalidades de la invención) incluyen los siguientes: TLR1 (lipoproteínas bacterianas de micobacterias, Neisseria), TLR2 (partículas de levadura de zimosan, peptidoglicano, lipoproteínas, lipopéptidos, glicolípidos, lipopolisacárido), TLR3 (ARN viral de doble hebra, poli:IC), TLR4 (lipopolisacáridos bacterianos, taxol de producto vegetal), TLR5 (flagelinas bacterianas), TLR6 (partículas de zimosan de levadura, ácido lipotocoico, lipopéptidos de microplasma), TLR7 (ARN de una sola hebra, imiquimod, resimiquimod y otros compuestos sintéticos tales como loxoribina y bropirimina), TLR8 (ARN de una sola hebra, resimiquimod) y TLR9 (oligonucleótidos CpG), entre otros.

15 Las células dendríticas son reconocidas como algunos de los tipos de células más importantes para iniciar el cebado de células T auxiliares (T_H) CD4 $^+$ naives y para inducir la diferenciación de células T CD8 $^+$ a células asesinas. La señalización de TLR se ha reportado que juega un papel importante en determinar la calidad de estas respuestas a células T auxiliares, por ejemplo, con la naturaleza de la señal TLR determinando el tipo específico de respuesta T_H que se observa (por ejemplo, respuesta T_{H1} contra T_{H2}). Una combinación de inmunidad de anticuerpo (humoral) y celular se produce como parte de una respuesta tipo T_{H1} , mientras que una respuesta tipo T_{H2} es predominantemente una respuesta de anticuerpo. Varios ligandos TLR tales como ADN CpG (TLR9) e imidazoquinolinas (TLR7, TLR8) se han documentado que estimulan una producción de citocinas a partir de células inmunes *in vitro*. Las imidazoquinolinas son los primeros compuestos tipo fármaco pequeños que mostraron ser agonistas de TLR. Para más información, véase, por ejemplo, A. Pashine, N. M. Valiante and J. B. Ulmer, *Nature Medicine* 11, S63-S68 (2005), K. S. Rosenthal and D. H. Zimmerman, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(8), 821-829 (2006), y las referencias citadas ahí.

20 30

25 35

30 40

35 45

40 50

45 55

50 60

Una composición tal como una composición inmunogénica o una vacuna que provoca una respuesta inmune celular puede entonces servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación de un antígeno en asociación con moléculas MHC en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por células es dirigida a, o cerca de, células que presentan antígenos en su superficie. Además, los linfocitos T específicos de antígenos pueden generarse para permitir la futura protección de un anfitrión inmunizado. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse por un número de ensayos conocidos en la técnica, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, al ensayar para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante medición de la producción de citocinas por células T en respuesta a re-estimulación con antígeno. Estos ensayos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson et al. (1993) *J. Immunol* 151:4189-4199; Doe et al. (1994) *Eur. J. Immunol* 24:2369-2376. Así, una respuesta inmunológica según se usa en la presente puede ser una que estimule la producción de CTL y/o la producción o activación de células T auxiliares. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmune mediada por anticuerpos. En consecuencia, una respuesta inmunológica puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes efectos entre otros: la producción de anticuerpos por, por ejemplo, células B; y/o la activación de células T supresoras y/o células T $\gamma\delta$ dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir, por ejemplo, para neutralizar infectividad y/o mediar anticuerpo-complemento, o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) para proporcionar protección a un

anfitrón inmunizado. Estas respuestas pueden determinarse usando inmunoensayos y ensayos de neutralización estándares, bien conocidos en la técnica.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención despliegan "inmunogenicidad mejorada" para un antígeno dado cuando poseen una mayor capacidad para provocar una respuesta inmune que la respuesta inmune provocada por una cantidad equivalente del antígeno en una composición diferente (por ejemplo, en donde el antígeno se administra como una proteína soluble). Así, una composición puede desplegar inmunogenicidad mejorada, por ejemplo, debido a que la composición genere una respuesta inmune más fuerte, o debido a que sea necesaria una dosis más baja o menos dosis de antígeno para lograr una respuesta inmune en el sujeto al cual se le administre. Esta inmunogenicidad incrementada puede determinarse, por ejemplo, al administrar una composición de la invención y un control de antígeno a animales y comparando los resultados del ensayo de los dos.

3. EMULSIONES CATIONICAS DE ACEITE EN AGUA

Las emulsiones catiónicas de aceite en agua descritas aquí generalmente se describen de la manera que es convencional en la técnica, por concentraciones de componentes que se usan para preparar las emulsiones. Se entiende en la técnica que durante el procedimiento de producir emulsiones, incluyendo esterilización y otros procedimientos hacia abajo, cantidades pequeñas de aceite (por ejemplo, escualeno), lípido catiónico (por ejemplo, DOTAP), y otros componentes pueden perderse, y las concentraciones reales de estos componentes en el producto final (por ejemplo, una emulsión esterilizada y envasada que esté lista para su administración) pueden ser ligeramente más bajas que las cantidades iniciales, algunas veces de hasta alrededor de 10% o en hasta alrededor de 20%.

Esta invención se refiere generalmente a emulsiones catiónicas de aceite en agua que se pueden usar para suministrar moléculas cargadas negativamente, tales como una molécula de ARN. Las partículas de la emulsión comprenden un núcleo de aceite y un lípido catiónico. El lípido catiónico puede interactuar con la molécula cargada negativamente, por ejemplo a través de fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas/hidrófilas, anclando de esta manera la molécula a las partículas de la emulsión. Las emulsiones catiónicas descritas aquí son particularmente adecuadas para suministrar una molécula cargada negativamente, tal como una molécula de ARN que codifica para un antígeno o ARN de interferencia pequeño a células *in vivo*. Por ejemplo, las emulsiones catiónicas descritas en la presente proporcionan ventajas para suministrar ARN que codifica para antígenos, incluyendo moléculas de ARN de auto-replicación, como vacunas.

Las partículas de las emulsiones de aceite en agua simulan una micela con un núcleo central de aceite. El núcleo de aceite está recubierto con un lípido catiónico, el cual dispersa la gotita de aceite en la fase acuosa (continua) como gotitas tipo micela. Uno o más componentes opcionales pueden estar presentes en la emulsión, tales como tensioactivos y/o fosfolípidos como los descritos abajo. Por ejemplo, uno o más tensioactivos pueden usarse para promover la formación de partículas y/o para estabilizar las partículas de la emulsión. En ese caso, el núcleo de aceite es recubierto con el lípido catiónico así como los tensioactivos para formar gotitas tipo micela. En forma similar, uno o más lípidos (por ejemplo, lípidos neutros, lípidos glicólicos o fosfolípidos) también pueden estar presentes en la superficie de las partículas de la emulsión, si estos lípidos se usan como emulsionantes para dispersar las gotitas de aceite.

Las partículas de las emulsiones de aceite en agua tienen un diámetro promedio (es decir, el diámetro promedio en número) de una micra o menos. Es particularmente deseable que el tamaño de partícula promedio (es decir, el diámetro promedio en número) de las emulsiones catiónicas sea de aproximadamente 900 nm o menos, alrededor de 800 nm o menos, aproximadamente 700 nm o menos, alrededor de 600 nm o menos, aproximadamente 500 nm o menos, alrededor de 400 nm o menos, 300 nm o menos, 200 nm o menos, por ejemplo, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 1 µm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 900 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 800 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 700 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 600 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 500 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 400 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 300 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 200 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 175 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 150 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 125 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 100 nm, de aproximadamente 1 nm a alrededor de 75 nm, o de aproximadamente 1 nm a alrededor de 50 nm.

Es particularmente deseable que el diámetro de partícula promedio de las emulsiones catiónicas sea de aproximadamente 180 nm o menos, alrededor de 170 nm o menos, aproximadamente 160 nm o menos, alrededor de 150 nm o menos, aproximadamente 140 nm o menos, alrededor de 130 nm o menos, aproximadamente 120 nm o menos, alrededor de 110 nm o menos, o aproximadamente 100 nm o menos; por ejemplo, de aproximadamente 80 nm a 180 nm, de alrededor de 80 nm a 170 nm, de aproximadamente 80 nm a 160 nm, de alrededor de 80 nm a 150 nm, de aproximadamente 80 nm a 140 nm, de alrededor de 80 nm a 130 nm, de aproximadamente 80 nm a 120 nm; de alrededor de 80 nm a 110 nm o de aproximadamente 80 nm a 100 nm. Un diámetro de partícula promedio que se prefiere particularmente es de alrededor de 100 nm.

El tamaño de las partículas de la emulsión puede ser variado al cambiar la relación de tensioactivo a aceite (incrementar la relación reduce el tamaño de la gotita), presión operativa de homogeneización (incrementar la

presión operativa de la homogeneización típicamente reduce el tamaño de la gotita), temperatura (incrementar la temperatura reduce el tamaño de la gotita), cambiar el tipo de aceite, y otros parámetros de procedimiento, como los descritos en detalle abajo. La inclusión de ciertos tipos de reguladores de pH en la fase acuosa también puede afectar el tamaño de partícula.

- 5 En algunos casos, en el contexto de una vacuna de ARN, el tamaño de las partículas de la emulsión puede afectar la inmunogenicidad del complejo ARN-emulsión. Por lo tanto, el intervalo preferido del tamaño de partícula promedio para emulsiones debe ser de aproximadamente 80 nm a alrededor de 180 nm de diámetro.

Las partículas de la emulsión descritas en la presente pueden formar complejo con una molécula cargada negativamente. Antes de la formación de complejo con la molécula cargada negativamente, la carga neta total de las 10 partículas (medida típicamente como potencial zeta) debe ser positiva (catiónica). La carga neta total de las partículas puede variar, dependiendo del tipo del lípido catiónico y de la cantidad de lípido catiónico en la emulsión, la cantidad de aceite en la emulsión (por ejemplo, un porcentaje más alto de aceite típicamente se traduce en menos carga sobre la superficie de las partículas), y también puede ser afectada por cualquier componente adicional (por 15 ejemplo, tensioactivos y/o fosfolípidos) que esté presente en la emulsión. En las modalidades de ejemplo, el potencial zeta de las partículas de pre-formación de complejos es típicamente de más de 10 mV.

De preferencia, el potencial zeta de las partículas antes de la formación de complejos no es mayor que aproximadamente 50 mV, no más de aproximadamente 45 mV, no más de alrededor de 40 mV, no más que aproximadamente 35 mV, no más de alrededor de 30 mV, no más que aproximadamente 25 mV, no más de alrededor de 20 mV; de aproximadamente 5 mV a alrededor de 50 mV, de aproximadamente 10 mV a alrededor de 50 mV, de aproximadamente 10 mV a alrededor de 45 mV, de aproximadamente 10 mV a alrededor de 40 mV, de 20 10 mV, de aproximadamente 10 mV a alrededor de 35 mV, de aproximadamente 10 mV a alrededor de 30 mV, de aproximadamente 10 mV a alrededor de 25 mV, o de aproximadamente 10 mV a alrededor de 20 mV. El potencial zeta puede ser afectado por (i) el pH de la emulsión, (ii) la conductividad de la emulsión (por ejemplo, salinidad) y (iii) 25 la concentración de varios componentes de la emulsión (polímero, tensioactivos no iónicos, etc.). El potencial zeta de CNEs se mide usando una Malvern Nanoseries Zetasizer (Westborough, MA). La muestra se diluye 1:100 en agua (viscosidad: 0,8872cp, RI: 1,330, constante dieléctrica: 78,5) y se añade a una celda capilar de látex de poliestireno (Malvern, Westborough, MA). El potencial zeta se mide a 25°C con un tiempo de equilibrio de 2 minutos y se analiza usando el modelo de Smoluchowski (valor F (Ka) = 1,5). Los datos se reportan en mV.

30 Un ejemplo de emulsión catiónica de la invención es CNE17. El núcleo de aceite de CNE17 es escualeno (a 4,3% p/v) y el lípido catiónico es DOTAP (a 1,4 mg/mL). CNE17 Incluye también los tensioactivos SPAN85 (trioleato de sorbitan) a 0,5% v/v) y Tween 80 ((polisorbato 80; monooleato de polioxietilensorbitan) a 0,5% v/v). Así, las partículas de CNE17 comprenden un núcleo de escualeno recubierto con SPAN85, Tween80, y DOTAP. Las moléculas de ARN mostraron formar complejos con partículas de CNE17 eficientemente a una relación N/P de 4:1 y una relación N/P de 10:1. Otros ejemplos de emulsiones catiónicas incluyen, por ejemplo, CNE05 (0,5% p/v de escualeno, 0,08% de Tween 80 y 1,2 mg/mL de DOTAP), CNE12 (4,3% de escualeno, 0,5% de SPAN85, 0,5% de tween 80 y 2,46 mg/mL de colesterol DC), CNE13 (4,3% de escualeno, 0,5% de SPAN85, 0,5% de Tween 80 y 1,45 mg/mL de DDA), y otras emulsiones descritas en la presente.

40 Los componentes individuales de las emulsiones de aceite en agua de la presente invención se conocen en la técnica, aunque estas composiciones aún no han sido combinadas de la manera descrita aquí. En consecuencia, los componentes individuales, aunque descritos abajo tanto genéricamente como en cierto detalle para modalidades preferidas, se conocen bien en la técnica, y los términos usados en la presente, tales como núcleo de aceite, tensioactivo, fosfolípidos, etc., se entienden suficientemente bien por alguien experto en la técnica sin descripción adicional. Además, aunque se proporcionan intervalos preferidos de la cantidad de los componentes individuales de 45 las emulsiones, las relaciones reales de los componentes de una emulsión particular pueden tener que ser ajustadas de tal manera que las partículas de la emulsión de tamaño deseado y propiedades físicas se puedan formar adecuadamente. Por ejemplo, si una cantidad particular de aceite se usa (por ejemplo, 5% v/v de aceite), entonces la cantidad de tensioactivo debe estar al nivel que sea suficiente para dispersar la gotita de aceite en fase acuosa para formar una emulsión estable. La cantidad real de tensioactivo requerida para dispersar la gotita de aceite en fase acuosa depende del tipo de tensioactivo y del tipo de núcleo de aceite usado para la emulsión; y la cantidad de aceite también puede variar de acuerdo con el tamaño de la gotita (ya que esto cambia el área superficial entre las 50 dos fases). Las cantidades reales y las proporciones relativas de los componentes de una emulsión deseada se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica.

A. Núcleo de aceite

55 Las partículas de las emulsiones catiónicas de aceite en agua comprenden un núcleo de aceite. De preferencia, el aceite es un aceite metabolizable y no tóxico; muy preferiblemente uno de aproximadamente 6 a alrededor de 30 átomos de carbono que incluye, pero no está limitado a, alcanos, alquenos, alquinos y sus ácidos y alcoholes correspondientes, los éteres y ésteres de los mismos, y mezclas de los mismo. El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite preparado sintéticamente que pueda ser metabolizado por el cuerpo del sujeto al cual se le administrará la emulsión, y no sea tóxico para el sujeto. El sujeto puede ser un animal, típicamente un mamífero, y de preferencia un humano.

En ciertas modalidades, el núcleo de aceite está en fase líquida a 25°C. El núcleo de aceite está en fase líquida a 25°C, cuando despliega las propiedades de un fluido (según se distingue de sólido y gas; y tiene un volumen definido pero una forma no definida) cuando se almacena a 25°C. Sin embargo, la emulsión puede almacenarse y usarse a cualquier temperatura adecuada. De preferencia, el núcleo de aceite está en fase líquida a 4°C.

5 El aceite puede ser cualquier alcano, alqueno o alquino de cadena larga, o un derivado de ácido o alcohol del mismo ya sea como el ácido libre, su sal o un éster tal como un mono-, o di- o triéster, tal como los triglicéridos y ésteres de 1,2-propanodiol o poli-hidroxialcoholes similares. Los alcoholes pueden ser acilados empleando un ácido mono- o poli-funcional, por ejemplo ácido acético, ácido propanoico, ácido cítrico o similares. También se pueden usar éteres derivados de alcoholes de cadena larga los cuales son aceites y cumplen los demás criterios establecidos en la

10 presente.

La porción de alcano, alqueno o alquino individual y sus derivados de ácido o alcohol generalmente tendrán alrededor de 6 a aproximadamente 30 átomos de carbono. La porción puede tener una estructura de cadena recta o ramificada. Puede ser completamente saturada o tener uno o más dobles o triples enlaces. Cuando se emplean aceites a base de mono- o poli-éster o éter, la limitación de aproximadamente 6 a alrededor de 30 carbonos aplica a las porciones individuales de ácido graso o alcohol graso, no al recuento de carbonos total.

15 Es particularmente deseable que el aceite pueda ser metabolizado por el anfitrión al cual se administra la emulsión.

Cualquier aceite adecuado de una fuente animal, de pescado o vegetal puede ser usado. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos, y los aceites adecuados son aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva y similares. Otros aceites de semillas adecuados incluyen aceite de cártamo, aceite 20 de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de ajonjolí y similares. En el grupo de granos, también pueden usarse aceite de maíz y el aceite de otros granos de cereal tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticale y similares. La tecnología para obtener aceites vegetales está bien desarrollada y es bien conocida. Las composiciones de éstos y otros aceites similares pueden encontrarse en, por ejemplo, el Índice Merck y los materiales de origen en alimentos, y tecnología y nutrición de alimentos.

25 Ésteres de ácido graso de aproximadamente seis a alrededor de diez carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se presentan naturalmente en aceites de semilla, pueden prepararse por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados iniciando a partir de los aceites de nuez y semilla. Estos productos están disponibles comercialmente con el nombre NEOBEES de PVO International, Inc., Chemical Specialties Division, 416 Division Street, Boonton, N.J. y otros.

30 Los aceites y grasas animales comúnmente están en fase sólida a temperaturas fisiológicas debido al hecho de que existen como triglicéridos y tienen un grado de saturación más alto que los aceites de pescado o vegetales. Sin embargo, los ácidos grasos pueden obtenerse de grasas animales mediante saponificación parcial o completa de triglicéridos que proporciona los ácidos grasos libres. Las grasas y aceites de leche de mamífero son metabolizables y pueden por lo tanto usarse en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la separación, purificación, 35 saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros a partir de fuentes animales se conocen bien en la técnica.

40 La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden ser fácilmente recuperados. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceite de hígado de tiburón y aceite de ballena tales como espermaceti ejemplifican varios de los aceites de pescado que pueden usarse en la presente. Un número de aceites de cadena ramificada son sintetizados bioquímicamente en las unidades isopreno de cinco carbonos y se conocen generalmente como terpenoides. Escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno), un terpenoide ramificado e insaturado, se prefiere particularmente aquí. Una principal fuente de escualeno es aceite de hígado de tiburón, aunque también son fuentes adecuadas los aceites de plantas (principalmente aceites vegetales), incluyendo aceites de semilla de amaranto, salvado de arroz, germe de trigo y olivo. Escualano, el análogo saturado de escualeno, 45 también se prefiere. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

50 En ciertas modalidades, el núcleo de aceite comprende un aceite que se selecciona del grupo que consiste en: aceite de ricino, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de onagra, aceite de pescado, aceite de jojoba, aceite de manteca de cerdo, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de cacahuate, aceite de cártamo, aceite de ajonjolí, aceite de soja, escualeno, aceite de girasol, aceite de germe de trigo y aceite mineral. En modalidades de ejemplo, el grupo de aceite comprende aceite de soja, aceite de girasol, aceite de olivo, escualeno o una combinación de los mismos. También se puede usar escualano como el aceite. En modalidades exemplares, el núcleo de ácido comprende escualeno, escualano o una combinación de los mismos.

55 El componente de aceite de la emulsión puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,2% a alrededor de 20% (v/v). Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de aproximadamente 0,2% a alrededor de 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 15% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 10% (v/v) de aceite, de alrededor de 0,2% a alrededor de 9% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 8% (v/v) de aceite, de alrededor de 0,2% a aproximadamente

7% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 6% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 5% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 4,3% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,3% a alrededor de 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,4% a alrededor de 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,5% a alrededor e 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 1% a alrededor de 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 2% a alrededor de 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 3% a alrededor de 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 4% a alrededor de 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 5% a alrededor de 20% (v/v) de aceite, de aproximadamente 0,5% (v/v) de aceite, alrededor de 1% (v/v) de aceite, aproximadamente 1,5% (v/v) de aceite, alrededor de 2% (v/v) de aceite, aproximadamente 2,5% (v/v) de aceite, alrededor de 3% (v/v) de aceite, aproximadamente 3,5% (v/v) de aceite, alrededor de 4% (v/v) de aceite, aproximadamente 4,3% (v/v) de aceite, alrededor de 5% (v/v) de aceite, o aproximadamente 10% (v/v) de aceite.

Como alternativa, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender aproximadamente 0,2% a alrededor de 10% (p/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 9% (p/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 8% (p/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 7% (p/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 6% (p/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 5% (p/v) de aceite, de aproximadamente 0,2% a alrededor de 4,3% (p/v) de aceite o de aproximadamente 4,3% (p/v) de aceite.

En una modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende aproximadamente 0,5% (v/v) de aceite. En otra modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 4,3% (v/v) de aceite. En otra modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 5% (v/v) de aceite. En otra modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 4,3% (p/v) de escualeno.

Como se indicó arriba, el porcentaje de aceite descrito arriba se determina con base en la cantidad inicial del aceite que se usa para preparar las emulsiones. Se entiende en la técnica que la concentración real del aceite en el producto final (por ejemplo, una emulsión envasada y esterilizada que está lista para su administración) podría ser ligeramente más baja, algunas veces de hasta alrededor de 10% o aproximadamente 20%.

B. Lípidos catiónicos

Las partículas de la emulsión descrita en la presente comprenden un lípido catiónico, el cual puede interactuar con la molécula cargada negativamente anclando de esta manera la molécula a las partículas de la emulsión.

Cualquier lípido catiónico adecuado puede ser usado. Generalmente, el lípido catiónico contiene un átomo de nitrógeno que está cargado positivamente bajo condiciones fisiológicas. Los lípidos catiónicos adecuados incluyen, cloruro de benzalconio (BAK), cloruro de bencetonio, cetrimida (la cual contiene bromuro de tetradeciltrimetilamonio y posiblemente pequeñas cantidades de bromuro de dodeciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de cetil trimetilamonio (CTAC), aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, incluyendo pero no limitadas a bromuro de N,N',N'-polioxietileno (10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, otras sales de amina cuaternarias, incluyendo pero no limitadas a bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de alquil-trimetil-amonio mixto, cloruro de bencildimetildodecilmonio, cloruro de bencildimethylhexadecilmonio, metóxido de benciltrimetilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de dimetildioctadecilmonio (DDAB), cloruro de metilbenzetonio, cloruro de decametonio, cloruro de trialquilamonio mezclado con metilo, cloruro de metil triocitilamonio), cloruro de N,N-dimetil-N-[2(2-metil-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxi)-etoxi]-bencenemetanaminio (DEBDA), sales de dialquildimetilamonio, cloruro de [1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio, 1,2-diacyl-3-(trimetilamonio)propano (grupo acilo = dimiristoilo, dipalmitoilo, distearoilo, dioleoilo), 1,2-diacyl-3-(dimetilamonio)propano (grupo acilo = dimiristoilo, dipalmitoilo, distearoilo, dioleoilo), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetil-amonio)butanoilo-sn-glicerol, éster colínico de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol, colesterilo (4'-trimetilamonio)butanoato), sales de N-alquil piridinio (por ejemplo, bromuro de cetilpiridinio y cloruro de cetilpiridinio), sales de N-alquilpiperidinio, electrolitos bolaformes dicatiónicos ($C_{12}Me_6$; $C_{12}Bu_6$), dialquiglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L-a dioleoilfosfatidiletanolamina, éster colínico de hemisuccinato de colesterol, lipopoliaminas, incluyendo pero no limitadas a dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS), dipalmitoilo fosfatidiletanol-amidospermina (DPPES), lipopoli-L (o D)-lisina (LPLL, LPDL), poli (L (o D)-lisina conjugada a N-glutarilfosfatidiletanolamina, éster glutamato de didodecilo con un grupo amino pendiente ($C_{12}GluPhC_nN^+$), éster ditetradecil glutamato con grupo amino pendiente ($C_{14}GluC_nN^+$), derivados catiónicos de colesterol, incluyendo, pero no limitados a sal β -oxisuccinamidoetilentrimetilamonio de colesterilo-3, β -oxisuccinamidoetilendimetilamina de colesterilo-3, sal β -carboxiamidoetilentrimetilamonio de colesterilo-3, β -carboxiamidoetilendimetilamina de colesterilo-3 y 3γ -[N-(N',N-dimetilaminoetancarbomoi]colesterol) (DC-colesterol), 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), dimetildioctadecilmonio (DDA), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamoniopropano (DMTAP), dipalmitoil($C_{16:0}$)trimetilamonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP) y combinaciones de los mismos.

Otros lípidos catiónicos adecuados para usarse en la invención incluyen, por ejemplo, los lípidos catiónicos descritos en las patentes de E.U.A. No. de publicación 2008/0085870 (publicada el 10 de Abril de 2008) y 2008/0057080 (publicada el 6 de Marzo, 2008).

Otros lípidos catiónicos adecuados para usarse en la invención incluyen, por ejemplo, lípidos E0001-E018 o E0119-

E0180 como los descritos en la tabla 6 (páginas 112-139) de WO 2011/076807 (la cual describe también procedimientos para hacer, y un procedimiento para usar estos lípidos catiónicos. Los lípidos catiónicos adecuados adicionales incluyen cloruro de N[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DOPAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA).

La emulsión puede comprender cualquier combinación de dos o más de los lípidos catiónicos descritos aquí.

En modalidades preferidas, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoi]colesterol (colesterol DC), dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamoniopropano (DMTAP), dipalmitoil(C_{16,0})trimetilamonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP), lípidos E0001-E0118 o E0119-E0180 como se describe en la tabla 6 (páginas 112-139) de WO 2011/076807, y combinaciones de los mismos.

En otras modalidades preferidas, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoi]colesterol (colesterol DC), dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamoniopropano (DMTAP), dipalmitoil(C_{16,0})trimetilamonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), lípidos E0001-E0118 o E0119-E0180 como se describe en la tabla 6 (páginas 112-139) de WO 2011/076807, y combinaciones de los mismos.

En ciertas modalidades, el lípido catiónico es DOTAP. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml de DOTAP. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender DOTAP a alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,9 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,0 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,2 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,3 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,4 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 24 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 22 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 18 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 12 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,9 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,8 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,7 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, de alrededor de 0,6 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, de alrededor de 0,7 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 3,0 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, alrededor de 0,7 mg/ml, aproximadamente 0,8 mg/ml, alrededor de 0,9 mg/ml, aproximadamente 1,0 mg/ml, alrededor de 1,1 mg/ml, aproximadamente 1,2 mg/ml, alrededor de 1,3 mg/ml, aproximadamente 1,4 mg/ml, alrededor de 1,5 mg/ml, aproximadamente 1,6 mg/ml, alrededor de 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, aproximadamente 21,8 mg/ml, alrededor de 24 mg/ml, etc.

En una modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende de alrededor de 0,8 mg/ml a alrededor de 1,6 mg/ml de DOTAP, tal como 0,8 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,4 mg/ml o 1,6 mg/ml.

En ciertas modalidades, el lípido catiónico es colesterol DC. La emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender colesterol DC a de aproximadamente 0,1 mg/ml a alrededor de 5 mg/ml de colesterol DC. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender colesterol DC de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,62 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 1,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 2,46 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 3,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 4,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,92 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,5 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 3,5 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 2,46 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,62 mg/ml, de alrededor de 0,15 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml, alrededor de 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,62 mg/ml, alrededor de 0,9 mg/ml, aproximadamente 1,2 mg/ml, alrededor de 2,46 mg/ml, aproximadamente 4,92 mg/ml, etc.

aproximadamente 12 mg/ml, alrededor de 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, alrededor de 22,5 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, etc.

En una modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende de 0,73 mg/ml a alrededor de 1,45 mg/ml de DODAC, tal como 1,45 mg/ml.

- 5 En ciertas modalidades, el lípido catiónico es DODAP. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml de DODAP. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender DODAP a alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,9 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,0 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,2 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,3 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,4 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 1,7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 24 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 22 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 18 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 12 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,9 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,8 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,7 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml, de alrededor de 0,6 mg/ml a aproximadamente 1,7 mg/ml, de alrededor de 0,7 mg/ml a aproximadamente 1,7 mg/ml, de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,7 mg/ml, de alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 3,0 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml, a aproximadamente 0,6 mg/ml, alrededor de 0,7 mg/ml, aproximadamente 0,8 mg/ml, alrededor de 0,9 mg/ml, aproximadamente 1,0 mg/ml, alrededor de 1,1 mg/ml, aproximadamente 1,15 mg/ml, alrededor de 1,16 mg/ml, aproximadamente 11,17 mg/ml, alrededor de 1,2 mg/ml, aproximadamente 1,3 mg/ml, alrededor de 1,4 mg/ml, aproximadamente 1,5 mg/ml, alrededor de 1,6 mg/ml, aproximadamente 1,7 mg/ml, alrededor de 1,8 mg/ml, aproximadamente 1,9 mg/ml, alrededor de 2,0 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, alrededor de 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, alrededor de 22,5 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, etc.

En una modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 0,8 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml de DODAP, tal como 0,8 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,4 mg/ml o 1,6 mg/ml.

- 35 En algunos casos, puede ser deseable usar un lípido catiónico que sea soluble en el núcleo de aceite. Por ejemplo, DOTAP, DOEPC, DODAC y DOTMA son solubles en escualeno o escualano. En otros casos, puede ser deseable usar un lípido catiónico que no sea soluble en el núcleo de aceite. Por ejemplo, DDA y DSTAP no son solubles en escualeno. Está dentro del conocimiento de la técnica determinar si un lípido particular es soluble o insoluble en el aceite y seleccionar una combinación de aceite y lípidos adecuada en consecuencia. Por ejemplo, la solubilidad puede predecirse con base en las estructuras del lípido y aceite (por ejemplo, la solubilidad de un lípido puede determinarse por la estructura de su cola). Por ejemplo, los lípidos que tienen una o dos cadenas de ácido graso insaturadas (por ejemplo, colas de oleoilo), tales como DOTAP, DOEPC, DODA, DOTMA, son solubles en escualeno o escualano; mientras que los lípidos que tienen cadenas de ácido graso saturadas (por ejemplo, colas de estearoilo) no son solubles en escualeno. Como alternativa, la solubilidad puede determinarse de acuerdo con la cantidad del lípido que se disuelve en una cantidad dada del aceite para formar una solución saturada).

- 40 Como se indicó arriba, la concentración de un lípido descrito arriba se determina con base en la cantidad inicial del lípido que se usa para preparar las emulsiones. Se entiende en la técnica que la concentración real del aceite en el producto final (por ejemplo, una emulsión envasada y esterilizada que esté lista para su administración) puede ser ligeramente más baja, algunas veces en hasta aproximadamente 20%.

C. Componentes adicionales

- 45 Las emulsiones catiónicas de aceite en agua descritas en la presente pueden comprender además componentes adicionales. Por ejemplo, las emulsiones pueden comprender componentes que puedan promover la formación de partículas, mejorar la formación de complejos entre las moléculas cargadas negativamente y las partículas catiónicas, o incrementar la estabilidad de la molécula cargada negativamente (por ejemplo, para evitar la degradación de una molécula de ARN).

Tensioactivos

- 50 En ciertas modalidades, las partículas de la emulsión catiónica de aceite en agua comprenden además un tensioactivo.

Se ha usado un número sustancial de tensioactivos en las ciencias farmacéuticas. Estos incluyen materiales derivados naturalmente tales como gomas de árboles, proteína vegetal, polímeros a base de azúcar tales como

5 alginatos y celulosa, y similares. Ciertos oxipolímeros o polímeros que tienen un sustituyente hidróxido u otro hidrófilo en el esqueleto de carbono tienen actividad tensioactiva, por ejemplo, povidona, alcohol polivinílico y compuestos mono- y poli-funcionales a base de éter glicólico. Los compuestos derivados de ácidos grasos de cadena larga forman un tercer grupo sustancial de agentes emulsionantes y de suspensión que podrían usarse en esta invención.

Ejemplos específicos de tensioactivos adecuados incluyen los siguientes:

1. Jabones hidrosolubles, tales como las sales sodio, potasio, amonio y alcanolamonio de ácidos grasos superiores (C_{10} - C_{22}), en particular jabones de sebo y coco de sodio y potasio.

10 2. Tensioactivos no de jabón sintéticos aniónicos, los cuales pueden representarse por las sales hidrosolubles de productos de reacción con ácido sulfúrico orgánico que tienen en su estructura molecular un radical alquilo que contiene alrededor de 8 a 22 átomos de carbono y un radical seleccionado del grupo que consiste en radicales de éster de ácido sulfónico y ácido sulfúrico. Ejemplos de éstos son los alquilsulfatos de sodio o potasio, derivados de aceite de sebo o coco; alquilbencensulfonatos de sodio o potasio; alquil gliceril éter sulfonatos de sodio; sulfonatos y sulfatos de monoglicerídos de ácidos grasos de aceite de coco de sodio; sales sodio o potasio de ésteres de ácido sulfúrico del producto de reacción de 1 mol de un alcohol graso superior y alrededor de 1 a 6 moles de óxido de etileno; éter sulfonatos de óxido de alquil fenol etileno de sodio o potasio, con 1 a 10 unidades de óxido de etileno por molécula y en los cuales los radicales alquilo contienen de 8 a 12 átomos de carbono; el producto de reacción de ácidos grasos esterificados con ácido isetiónico y neutralizados con el óxido de sodio; sales sodio o potasio de amida de ácido graso de una metil taurida; y sales sodio y potasio de α -olefinas de C_{10} - C_{24} SO_3 -sulfonadas.

15 3. Tensioactivos no iónicos sintéticos hechos mediante la condensación de grupos de óxido de alquíleno con un compuesto hidrófobo orgánico. Los grupos hidrófobos típicos incluyen productos de condensación de óxido de propileno con propilenglicol, alquilenoles, productos de condensación de óxido de propileno y etilen diamina, alcoholes alifáticos que tienen de 8 a 22 átomos de carbono, y amidas de ácidos grasos.

20 4. Tensioactivos no iónicos, tales como óxidos de amina, óxidos de fosfina y sulfóxidos, que tienen características semipolares. Ejemplos específicos de óxidos de amina terciaria de cadena larga incluyen óxido de dimetildodecilamina y bis-(2-hidroxietil)dodecilamina. Ejemplos específicos de óxidos de fosfina se encuentran en la patente de E.U.A. No. 3,304,263, expedida el 14 de Febrero de 1967, e incluyen óxido de dimetildodecifosfina y óxido de dimetil-(2-hidroxidodecil)fosfina.

25 5. Sulfóxidos de cadena larga, incluyendo aquellos que corresponden a la fórmula R^1-SO-R^2 en donde R^1 y R^2 son radicales alquilo sustituidos o no sustituidos, los primeros conteniendo alrededor de 10 a aproximadamente 28 átomos de carbono, mientras que R^2 contiene de 1 a 3 átomos de carbono. Ejemplos específicos de estos sulfóxidos incluyen sulfóxido de dodecilmetilo y sulfóxido de 3-hidroxitrídecilmétilo.

30 6. Tensioactivos anfolíticos sintéticos, tales como 3-dodecaminopropionato de sodio y 3-dodecaminopropan sulfonato de sodio.

35 7. Tensioactivos zwitteriónicos sintéticos, tales como 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilamonio)propan-1-sulfonato y 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilamonio)-2-hidroxipropan-1-sulfonato.

Además, todos los tipos siguientes de tensioactivos pueden usarse en una composición de la presente invención: (a) jabones (es decir, sales alcalinas) de ácidos grasos, ácidos de colofonia y aceite de sebo; (b) alquil aren sulfonatos; (c) alquil sulfatos, incluyendo tensioactivos con grupos hidrófobos tanto de cadena ramificada como de cadena recta, así como grupos sulfato primarios y secundarios; (d) sulfatos y sulfonatos que contienen un enlace intermedio entre los grupos hidrófobos e hidrófilos, tales como las metil tauridas aciladas grasas y los monoglicerídos grasos sulfatados; (e) ésteres de ácido de cadena larga de polietilenglicol, especialmente los ésteres de aceite de sebo; (f) éteres polietilenglicólicos de alquilenoles; (g) éteres polietilenglicólicos de alcoholes de cadena larga y mercaptanos; y (h) acil dietanolamidas grasas. Ya que los tensioactivos pueden clasificarse en más de una manera, un número de clases de tensioactivos mostrado en este párrafo se superpone con las clases de tensioactivos descritas previamente.

40 Hay un número de tensioactivos diseñados específicamente para y usados comúnmente en situaciones biológicas. Estos tensioactivos se dividen en cuatro tipos básicos: aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos (anfotéricos) y no iónicos.

45 50 Los tensioactivos aniónicos ejemplares incluyen, por ejemplo, perfluorooctanoato (PFOA o PFO), perfluorooctansulfonato (PFOS), sales alquil sulfato tales como dodecil sulfato de sodio (SDS) o lauril sulfato de amonio, laureth sulfato de sodio (conocido también como lauril éter sulfato de sodio, SLES), alquilbencen sulfonato y sales de ácido graso. Ejemplos de tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, sales de alquiltrimetilamonio tales como bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB, o bromuro de hexadecil trimetil amonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), sebo amina polietoxilada (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de benzetonio (BZT). Ejemplos de tensioactivos zwitteriónicos (anfotéricos) incluyen, por ejemplo, dodecil betáina, cocamidopropil betáina y coco anfo glicinato. Ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen, por ejemplo, óxido de alquil poli(etileno), óxido de alquilfenol poli(etileno), copolímeros de óxido de poli(etileno) y óxido de poli(propileno) (llamados comercialmente poloxámeros

o poloxaminas), poliglucósidos de alquilo (por ejemplo, glucósido de octilo o maltósido de decilo), alcoholes grasos (por ejemplo, alcohol cetílico o alcohol oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, Pluronic® F-68 (copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno), y polisorbatos, tales como Tween 20 (polisorbato 20), Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxietilensorbitan), óxido de dodecil dimetilamina y succinato de propilenglicol de tocoferol de vitamina E (vitamina E TPGS).

Un grupo particularmente útil de tensioactivos son los tensioactivos no iónicos a base de sorbitan. Estos tensioactivos se preparan mediante deshidratación de sorbitol para dar 1,4-sorbitan que luego se hace reaccionar con uno o más equivalentes de un ácido graso. La porción sustituida con ácido graso puede hacerse reaccionar más con óxido de etileno para dar un segundo grupo de tensioactivos.

10 Los tensioactivos de sorbitan sustituidos con ácido graso se hacen al hacer reaccionar 1,4-sorbitan con un ácido graso tal como ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico o un ácido graso de cadena larga similar para dar el monoéster de 1,4-sorbitan, sesquiéster de 1,4-sorbitan o triéster de 1,4-sorbitan. Los nombres comunes para estos tensioactivos incluyen, por ejemplo, monolaurato de sorbitan, monopalmitato de sorbitan, monoestearato de sorbitan, monooleato de sorbitan, sesquioleato de sorbitan y trioleato de sorbitan. Estos tensioactivos están disponibles comercialmente con el nombre SPAN® o ARLACEL®, normalmente con una designación de letra o número que distingue entre los diferentes sorbitanes sustituidos con mono, di- y triéster.

15 Los tensioactivos SPAN® y ARLACEL® son hidrófilos y son generalmente solubles o dispersables en aceite. También son solubles en la mayoría de los solventes orgánicos. En agua son generalmente insolubles pero dispersables. Generalmente estos tensioactivos tendrán un número de balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de entre 1,8 a 8,6. Estos tensioactivos pueden hacerse fácilmente por medios conocidos en la técnica o están disponibles comercialmente.

20 Un grupo relacionado de tensioactivos comprende monoésteres de olioxyetilen sorbitan y triésteres de olioxyetilen sorbitan. Estos materiales se preparan mediante la adición de óxido de etileno a un monoéster o triéster de 1,4-sorbitan. La adición de polioxietileno convierte el tensioactivo de mono- o triéster de sorbitan lipófilo en un tensioactivo hidrófilo generalmente soluble o dispersable en agua y soluble a grados variables en líquidos orgánicos.

25 Estos materiales, disponibles comercialmente con la marca TWEEN®, son útiles para preparar emulsiones y dispersiones de aceite en agua, o para la solubilización de aceites y elaboración de pomadas anhidras hidrosolubles o lavables. Los tensioactivos TWEEN® pueden combinarse con tensioactivos de monoéster o triéster de sorbitan relacionados para promover la estabilidad de la emulsión. Los tensioactivos TWEEN® generalmente tienen un valor HLB que está entre 9,6 a 16,7. Los tensioactivos TWEEN® están disponibles comercialmente.

30 Un tercer grupo de tensioactivos no iónicos que podrían usarse solos o en conjunto con los tensioactivos SPANS, ARLACEL® y TWEENS son los ácidos grasos de polioxietileno hechos mediante la reacción de óxido de etileno con un ácido graso de cadena larga. El tensioactivo más comúnmente disponible de este tipo se vende con el nombre MYRJS y es un derivado de polioxietileno de ácido esteárico. Los tensioactivos MYRJ® son hidrófilos y solubles o dispersables en agua como los tensioactivos TWEEN®. Los tensioactivos MYRJ® pueden ser mezclados con tensioactivos TWEEN® o con mezclas de tensioactivos TWEEN®, SPAN® o ARLACEL® para usarse en la formación de emulsiones. Los tensioactivos MYRJ® pueden hacerse mediante procedimientos conocidos en la técnica o están disponibles comercialmente.

35 Un cuarto grupo de tensioactivos no iónicos a base de polioxietileno son los éteres de ácido graso de polioxietileno derivados de alcoholes laurílicos, acetílicos, estearílicos y oleílicos. Estos materiales se preparan como arriba mediante la adición de óxido de etileno a un alcohol graso. El nombre comercial para estos tensioactivos es BRIJ®. Los tensioactivos BRIJ® pueden ser hidrófilos o lipófilos dependiendo del tamaño de la porción de polioxietileno en el tensioactivo. Aunque la preparación de estos compuestos está disponible de la técnica, también están fácilmente disponibles fuentes comerciales.

40 Otros tensioactivos no iónicos que podrían usarse potencialmente son, por ejemplo, polioxietileno, ésteres de ácido graso de poliol, éter polioxietilénico, éteres grasos de polioxipropileno, derivados de cera de abeja que contienen polioxietileno, derivado de lanolina de polioxietileno, glicéridos grasos de polioxietileno, ésteres de ácido graso de glicerol u otros derivados de alcohol o éter de ácido de polioxietileno de ácidos grasos de cadena larga de 12-22 átomos de carbono.

45 Ya que las emulsiones y formulaciones de la invención están diseñadas para ser sistemas de varias fases, es preferible seleccionar un tensioactivo no iónico formador de emulsión que tenga un valor HLB en el intervalo de aproximadamente 7 a 16. Este valor puede obtenerse a través del uso de un solo tensioactivo no iónico tal como un tensioactivo TWEEN® o puede lograrse mediante el uso de una mezcla de tensioactivos tal como con un tensioactivo a base de mono, di- o triéster de sorbitan; un ácido graso de polioxietileno de éster de sorbitan; un éster de sorbitan en combinación con un tensioactivo derivado de polioxietileno lanolina; un tensioactivo de éster de sorbitan en combinación con un tensioactivo de éter graso de polioxietileno de alto HLB; o un tensioactivo de éter graso de polioxietileno o ácido graso de polioxietileno sorbitan.

50 En ciertas modalidades, la emulsión comprende un solo tensioactivo no iónico, más particularmente un tensioactivo TWEEN®, como el tensioactivo no iónico de estabilización de la emulsión. En una modalidad ejemplar, la emulsión

comprende un TWEEN® 80, conocido de otra forma como polisorbato 80 o monooleato de polioxietilen 20 sorbitan. En otras modalidades, la emulsión comprende dos o más tensioactivos no iónicos, en particular un tensioactivo TWEEN® y un tensioactivo SPAN®. En una modalidad ejemplar, la emulsión comprende TWEEN® 80 y SPAN® 85.

Las emulsiones de aceite en agua pueden contener alrededor de 0,01% a aproximadamente 2,5% de tensioactivo (v/v o p/v), alrededor de 2% de tensioactivo, 0,01% a aproximadamente 1,5% de tensioactivo, 0,01% a alrededor de 1% de tensioactivo, 0,01% a aproximadamente 0,5% de tensioactivo, 0,05% a alrededor de 0,5% de tensioactivo, 0,08% a aproximadamente 0,5% de tensioactivo, alrededor de 0,08% de tensioactivo, alrededor de 0,1% de tensioactivo, aproximadamente 0,2% de tensioactivo, alrededor de 0,3% de tensioactivo, aproximadamente 0,4% de tensioactivo, alrededor de 0,5% de tensioactivo, aproximadamente 0,6% de tensioactivo, alrededor de 0,7% de tensioactivo, alrededor de 0,8% de tensioactivo, alrededor de 0,9% del tensioactivo o aproximadamente 1% tensioactivo.

Como alternativa o además, las emulsiones de aceite en agua pueden contener 0,05% a aproximadamente 1%, 0,05% a alrededor de 0,9%, 0,05% a aproximadamente 0,8%, 0,05% a alrededor de 0,7%, 0,05% a aproximadamente 0,6%, 0,05 a alrededor de 0,08%, aproximadamente 0,1%, alrededor de 0,2%, aproximadamente 0,3%, alrededor de 0,4%, aproximadamente 0,5%, alrededor de 0,6%, aproximadamente 0,7%, alrededor de 0,8%, aproximadamente 0,9%, o alrededor de 1% de Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxietilensorbitan).

En una modalidad ejemplar, la emulsión de aceite en agua contiene 0,08% de Tween 80.

Como alternativa o además, las emulsiones de aceite en agua pueden contener 0,05% a alrededor de 1%, 0,05% a aproximadamente 0,9%, 0,05% a alrededor de 0,8%, 0,05% a aproximadamente 0,7%, 0,05% a alrededor de 0,6%, 0,05% a alrededor de 0,5%, 0,08% a alrededor de 0,1%, 0,2% a alrededor de 0,3%, 0,4%, aproximadamente 0,5%, alrededor de 0,6%, aproximadamente 0,7%, alrededor de 0,8%, aproximadamente 0,9% o alrededor de 1% de SPAN85 (trioleato de sorbitan).

Como alternativa o además, las emulsiones de aceite en agua pueden contener una combinación de tensioactivos descritos aquí. Por ejemplo, se puede usar una combinación de Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxietilensorbitan) y SPAN85 (trioleato de sorbitan). Las emulsiones pueden contener varias cantidades de Tween80 y SPAN85 (por ejemplo, aquellas ejemplificadas arriba) incluyendo cantidades iguales de estos tensioactivos. Por ejemplo, las emulsiones de aceite en agua pueden contener alrededor de 0,05% de Tween 80 y aproximadamente 0,05% de SPAN85, alrededor de 0,1% de Tween 80 y aproximadamente 0,1% de SPAN85, alrededor de 0,2% de Tween 80 y aproximadamente 0,2% de SPAN85, alrededor de 0,3% de Tween 80 y aproximadamente 0,3% de SPAN85, alrededor de 0,4% de Tween 80 y aproximadamente 0,4% de SPAN85, alrededor de 0,5% de Tween 80 y aproximadamente 0,5% de SPAN85, alrededor de 0,6% de Tween 80 y aproximadamente 0,6% de SPAN85, alrededor de 0,7% de Tween 80 y aproximadamente 0,7% de SPAN85, alrededor de 0,8% de Tween 80 y aproximadamente 0,8% de SPAN85, alrededor de 0,9% de Tween 80 y aproximadamente 0,9% de SPAN85 o alrededor de 1% de Tween 80 y aproximadamente 1,0% de SPAN85.

Los lípidos de polietilenglicol (PEG), tales como PEG acoplado a dialquiloxypropilos (PEG-DAA), PEG acoplado a diaciglicerol (PEG-DAG), PEG acoplado a fosfatidiletanolamina (PE) (PEG-PE) o algunos otros fosfolípidos (PEG-fosfolípidos), PEG conjugado a ceramidas (PEG-Cer), o una combinación de los mismos, también se pueden usar como tensioactivos (véase, por ejemplo, patente de E.U.A. No. 5,885,613; solicitudes de patentes de E.U.A. Nos. de publicación 2003/0077829, 2005/0175682 y 2006/0025366). Otros lípidos de PEG adecuados incluyen, por ejemplo, lípidos de PEG-dialquiloxypropilo (DAA) o lípidos de PEG-diaciglicerol (DAG). Ejemplos de lípidos de PEG-DAG incluyen, por ejemplo, lípidos de PEG-dilauroilglicerol (C_{12}), lípidos de PEG-dimiristoilglicerol (C_{14}), lípidos de PEG-dipalmitoilglicerol (C_{16}) o lípidos de PEG-diestearoilglicerol (C_{18}). Ejemplos de lípidos de PEG-DAA, incluyen, por ejemplo, lípidos de PEG-dilauroloxiropilo (C_{12}), lípidos de PEG-miristiloxiropilo (C_{14}), lípidos de PEG-dipalmitloxiropilo (C_{16}) o lípidos de PEG-disteariloxiropilo (C_{18}).

Los PEGs se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2,000 daltons, y PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5,000 daltons. Los PEGs están disponibles comercialmente de Sigma Chemical Co., así como de otras compañías e incluyen, por ejemplo, los siguientes: monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxi polietilenglicol-succinimidilsuccinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amino (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilado (MePEG-TRES) y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM). Además, monometoxipolietilenglicol-ácido acético (MePEG-CH₂COOH), es particularmente útil para preparar los conjugados de PEG-lípidos que incluyen, por ejemplo, conjugados de PEG-DAA.

De preferencia, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 1,000 a alrededor de 5,000 daltons (por ejemplo, PEG₁₀₀₀, PEG₂₀₀₀, PEG₃₀₀₀, PEG₄₀₀₀, PEG₅₀₀₀). El PEG puede sustituirse opcionalmente por un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. El PEG puede conjugarse directamente al lípido o puede enlazarse al lípido por medio de una porción enlazadora. Cualquier porción enlazadora adecuada para acoplar el PEG a un lípido puede usarse incluyendo, por ejemplo, porciones enlazadoras que no contengan éster y porciones enlazadoras que contengan éster.

En modalidades ejemplares, PEG₂₀₀₀PE, PEG₅₀₀₀PE, PEG₁₀₀₀DMG, PEG₂₀₀₀DMG, PEG₃₀₀₀DMG, o una combinación de los mismos, se usa como un tensioactivo. En ciertas modalidades ejemplares, la emulsión de aceite en agua contiene alrededor de 1 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml de PEG₂₀₀₀PE, PEG₅₀₀₀PE, PEG₁₀₀₀DMG, PEG₂₀₀₀DMG, o PEG₃₀₀₀DMG.

5 Fosfolípidos

En ciertas modalidades, las partículas de la emulsión catiónica de aceite en agua comprenden además un fosfolípido.

Los fosfolípidos son ésteres de ácidos grasos en los cuales el componente de alcohol de la molécula contiene un grupo fosfato. Los fosfolípidos incluyen glicerofosfátidos (que contienen glicerol) y las esfingomielinas (que contienen esfingosina). Ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomielina; y fosfolípidos sintéticos que comprenden dimiristoil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, distearoil fosfatidilcolina, distearoil fosfatidilglicerol, dipalmitoil fosfatidilglicerol, dimiristoil fosfatidil serina, distearoil fosfatidil serina y dipalmitoil serina.

Pueden usarse los siguientes ejemplos de fosfolípidos.

DDPC	1,2-didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA-NA	1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfato (sal sodio)
DEPC	1,2-erucoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG-NA	1,2-dierucoil-sn-glicero-3(fosfatidil-rac-(1-glicerol...))
DLOPC	1,2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA-NA	1,2-dilaurooil-sn-glicero-3-fosfato (sal sodio)
DLPC	1,2-dilaurooil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-dilaurooil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG-NA	1,2-dilaurooil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] (sal sodio)
DLPG-NH4	1,2-dilaurooil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS-NA	1,2-dilaurooil-sn-glicero-3-fosfatidilserina (sal sodio)
DMPA-NA	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato(sal sodio)
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG-NA	1,2-miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPG-NH4	1,2-miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-gicerol...)]
DMPG-NH4/NA	1,2-miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-gicerol...)]
DMPS-NA	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina (sal sodio)
DOPA-NA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato (sal sodio)
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG-NA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-gicerol...)]
DOPS-NA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina (sal sodio)
DPPA-NA	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato (sal sodio)

ES 2 649 896 T3

DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG-NA	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DPPG-NH4	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)

(continuación)

DPPS-NA	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina (sal sodio)
DPyPE	1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA-NA	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfato (sal sodio)
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG-NA	1,2-distearoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPG-NH4	1,2-distearoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPS-NA	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina (sal sodio)
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenado
HSPC	PC de soya hidrogenado de alta pureza
HSPC	PC de soya hidrogenado
LYSOPC MYRISTIC	1-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMITIC	1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC STEARIC	1-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
MPPC de esfingomielina de 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-oleoiloil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG-NA	1,2-dioleoiloil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] (sal sodio)
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

En ciertas modalidades, puede ser adecuado usar un lípido neutro. También puede ser adecuado usar un fosfolípido, incluyendo un fosfolípido zwitteriónico, por ejemplo, un fosfolípido que contenga uno o más radicales alquilo o alquenilo de aproximadamente 12 a alrededor de 22 carbonos de largo (por ejemplo, alrededor de 12 a aproximadamente 14, a alrededor de 16, a aproximadamente 18, a alrededor de 20, a alrededor de 22 carbonos), radicales que pueden contener, por ejemplo, de 0 a 1 a 2 a 3 dobles enlaces. Puede ser adecuado usar un fosfolípido zwitteriónico.

Los fosfolípidos que se prefieren incluyen, por ejemplo, 1,2-dioleoiloil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina de huevo (PC de huevo), palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC), dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dioleoiloil fosfatidilcolina (DOPC), DPPC, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoil linoleoil fosfatidilcolina (PLPC), DPyPE, o una combinación de los mismos.

En ciertas modalidades, el fosfolípido es DOPE. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de DOPE. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender DOPE a alrededor de 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o de alrededor de 1,5 mg/ml a aproximadamente 7,5 mg/ml de DOPE.

En una modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende alrededor de 1,5 mg/ml de DOPE.

En ciertas modalidades, el fosfolípido es PC de huevo. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de PC de huevo. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender PC de huevo a alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de alrededor de 1,0 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o de alrededor de 1,5 mg/ml a aproximadamente 3,5 mg/ml de PC de huevo.

5 En una modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende aproximadamente 1,55 mg/ml de PC de huevo.

En ciertas modalidades, el fosfolípido es DPyPE. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de DPyPE. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender DPyPE a alrededor de 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de alrededor de 1,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o de alrededor de 1,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de DPyPE.

10 En una modalidad ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende aproximadamente 1,6 mg/ml de DPyPE.

15 En ciertas modalidades, las partículas de la emulsión pueden comprender una combinación de un tensioactivo y un fosfolípido descrito en la presente.

D. Fase acuosa (fase continua)

La fase acuosa (fase continua) de las emulsiones de aceite en agua es una solución de sal de pH regulado (por ejemplo, salina) o agua. La solución de sal de pH regulado es una solución acuosa que comprende una sal (por ejemplo, NaCl), un regulador de pH (por ejemplo, un regulador de pH de citrato) y puede comprender además un agente de ajuste de osmolaridad (por ejemplo, un sacárido), un polímero, un tensioactivo o una combinación de los mismos. Si las emulsiones se formulan para administración parenteral, es preferible constituir soluciones de pH regulado finales de tal manera que la tonicidad, es decir, osmolaridad, sea esencialmente la misma que la de los fluidos fisiológicos normales para evitar así consecuencias post-administración no deseadas, tales como hinchazón post-administración o rápida absorción de la composición. También es preferible regular el pH de la fase acuosa para mantener un pH compatible con condiciones fisiológicas normales. Asimismo, en ciertos casos, puede ser deseable mantener el pH a un nivel particular para de esta manera asegurar la estabilidad de ciertos componentes de la emulsión.

30 Por ejemplo, puede ser deseable preparar una emulsión que sea isotónica (es decir, la misma concentración de soluto permeable (por ejemplo, sal) que la de las células normales del cuerpo y la sangre) e isoosmótica. Para controlar la tonicidad, la emulsión puede comprender una sal fisiológica, tal como una sal sodio. Se puede usar cloruro de sodio (NaCl), por ejemplo, a alrededor de 0,9% (p/v) (solución salina fisiológica). Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, fosfato diácido de potasio, fosfato disódico, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc. Agentes tonificadores no iónicos también se pueden usar para controlar la tonicidad. Un número de agentes modificadores de tonicidad no iónicos ordinariamente conocidos por aquellos en la técnica pueden ser usados. Estos son típicamente carbohidratos de varias clasificaciones (véase, por ejemplo, Voet y Voet (1990) Biochemistry (John Wiley & Sons, Nueva York). Los monosacáridos clasificados como aldosas tales como glucosa, manosa, arabinosa y ribosa, así como aquellos clasificados como cetosas tales como fructosa, sorbosa y xilulosa pueden usarse como agentes tonificadores no iónicos en la presente invención. También se pueden usar disacáridos tales como sucrosa, maltosa, trehalosa y lactosa. Además, los alditoles (polihidroxi alcoholes acíclicos, conocidos también como alcoholes de azúcar) tales como glicerol, manitol, xilitol y sorbitol son agentes tonificadores no iónicos útiles en la presente invención. Los agentes modificadores de tonicidad no iónicos pueden estar presentes en una concentración de alrededor de 0,1% a aproximadamente 10% o alrededor de 1% a aproximadamente 10%, dependiendo del agente que se use.

45 La fase acuosa puede ser de pH regulado. Se puede usar en la presente cualquier regulador de pH fisiológicamente aceptable, tales como agua, reguladores de pH de citrato, reguladores de pH de fosfato, reguladores de pH de acetato, reguladores de pH Tris, reguladores de pH de bicarbonato, reguladores de pH de carbonato, regulador de pH de succinato, o similares. El pH del componente acuoso estará de preferencia entre 6,0-8,0, preferiblemente alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8. En una modalidad ejemplar, el regulador de pH es 10 mM de regulador de pH de citrato con un pH a 6,5. En otra modalidad ejemplar, la fase acuosa es, o el regulador de pH se prepara usando, agua libre de RNasa o agua tratada con DEPC. En algunos casos, la alta concentración de sal en el regulador de pH podría interferir con la formación de complejos de la molécula cargada negativamente a la partícula de emulsión por lo tanto es evitada. En otros casos, cierta cantidad de sal en el regulador de pH puede ser incluida.

50 En una modalidad ejemplar, el regulador de pH es 10 mM de regulador de pH de citrato, con un pH de 6,5. En otra modalidad ejemplar, la fase acuosa es, o el regulador de pH se prepara usando, agua libre de RNasa o agua tratada con DEPC.

55 La fase acuosa también puede comprender componentes adicionales tales como moléculas que cambian la osmolaridad de la fase acuosa o moléculas que estabilicen la molécula cargada negativamente después de la formación de complejos. De preferencia, la osmolaridad de la fase acuosa se ajusta usando un agente de

tonificación no iónico, tal como un azúcar (por ejemplo, trehalosa, sucrosa, dextrosa, fructosa, palatinosa reducida, etc.), un alcohol de azúcar (tal como manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, maltitol, glicerol, etc.), o combinaciones de los mismos. Si se desea, se puede usar un polímero no iónico (por ejemplo, un polialquilglicol) tal como polietilenglicol, polipropilenglicol o polibutilenglicol) o tensioactivo no iónico.

- 5 En algún caso, se puede preferir agua no adulterada como la fase acuosa de la emulsión cuando la emulsión se prepara inicialmente. Por ejemplo, incrementar la concentración de sal puede hacer más difícil lograr el tamaño de partícula deseable (por ejemplo, menos de aproximadamente 200 nm).

En ciertas modalidades, la fase acuosa de la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender además un polímero o un tensioactivo, o una combinación de los mismos. En una modalidad ejemplar, la emulsión de aceite en agua contiene un poloxámero. Los poloxámeros son copolímeros de tres bloques no iónicos que tienen una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (óxido de poli(propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (óxido de poli(etileno)). Los poloxámeros también se conocen por el nombre comercial polímeros Pluronic®. Los polímeros de poloxámero pueden llevar a mayor estabilidad y resistencia a RNasa incrementada de la molécula de ARN después de la formación de complejo de ARN.

- 10 15 Como alternativa o además, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender alrededor de 0,1% a aproximadamente 20% (p/v) de polímero, o de alrededor de 0,05% a aproximadamente 10% (p/v) de polímero. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender un polímero (por ejemplo, un poloxámero tal como Pluronic® F127) a alrededor de 0,1% a aproximadamente 20% (p/v), de alrededor de 0,1% a aproximadamente 10% (p/v), de alrededor de 0,05% a aproximadamente 10% (p/v), o de alrededor de 0,05% a aproximadamente 5% (p/v).

20 En una modalidad ejemplar, la emulsión de aceite en agua comprende aproximadamente 4% (p/v), o alrededor de 8% (p/v) de Pluronic® F127.

25 La cantidad del componente acuoso empleada en estas composiciones será aquella cantidad necesaria para llevar el valor de la composición a la unidad. Es decir, una cantidad del componente acuoso suficiente para hacer 100% será mezclada, con los demás componentes listados arriba para de esta manera llevar las composiciones a volumen.

4. MOLÉCULAS CARGADAS NEGATIVAMENTE

Cuando se va a suministrar una molécula cargada negativamente, se puede formar complejo con las partículas de las emulsiones catiónicas de aceite en agua. La molécula cargada negativamente forma complejo con las partículas de la emulsión mediante, por ejemplo, interacciones entre la molécula cargada negativamente y el lípido catiónico sobre la superficie de las partículas, así como interacciones hidrófobas/hidrófilas entre la molécula cargada negativamente y la superficie de las partículas. Aunque no se desea ser limitados por ninguna teoría particular, se cree que las moléculas cargadas negativamente interactúan con el lípido catiónico a través de interacciones de carga iónica no covalentes (fuerzas electrostáticas), y la fuerza del complejo así como la cantidad de compuesto cargado negativamente que puede formar complejo con una partícula están relacionadas con la cantidad de lípido catiónico en la partícula. Además, las interacciones hidrófobas/hidrófilas entre la molécula cargada negativamente y la superficie de las partículas pueden jugar también un papel.

Ejemplos de moléculas cargadas negativamente incluyen péptidos, polipéptidos o proteínas cargados negativamente, moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN de una sola o de doble hebra), moléculas pequeñas (por ejemplo, potenciadores inmunes de molécula pequeña (SMIPs), fosfonato, fluorofosfonato, etc.) y similares. La molécula cargada negativamente es una molécula de ARN, tal como un ARN que codifica para un péptido, polipéptido o proteína, incluyendo moléculas de ARN de auto-replicación, o ARN de interferencia pequeño.

40 El complejo se puede formar usando técnicas conocidas en la técnica, ejemplos de las cuales se describen en la presente. Por ejemplo, un complejo de ácido nucleico-partícula puede formarse al mezclar una emulsión catiónica con la molécula de ácido nucleico, por ejemplo mediante arremolinado. La cantidad de la molécula cargada negativamente y lípido catiónico en las emulsiones puede ajustarse u optimizarse para proporcionar la fuerza de unión deseada y capacidad de unión.

45 Por ejemplo, como se describe y ejemplifica aquí, ejemplos de complejos de ARN-partículas se produjeron al variar las relaciones ARN: lípido catiónico (según se mide por la "relación N/P"). El término relación N/P se refiere a la cantidad (moles) de átomos de nitrógeno protonables en el lípido catiónico dividida entre la cantidad (moles) de fosfatos en el ARN. Las relaciones N/P que se prefieren son de aproximadamente 1:1 a alrededor de 20:1, de aproximadamente 2:1 a alrededor de 18:1, de aproximadamente 3:1 a 16:1, de aproximadamente 4:1 a alrededor de 14:1, de aproximadamente 6:1 a alrededor de 12:1, aproximadamente 3:1, alrededor de 4:1, aproximadamente 5:1, alrededor de 6:1, aproximadamente 7:1, alrededor de 8:1, aproximadamente 9:1, alrededor de 10:1, aproximadamente 11:1, alrededor de 12:1, aproximadamente 13:1, alrededor de 14:1, alrededor de 15:1 o aproximadamente 16:1. Como alternativa, las relaciones N/P que se prefieren son de al menos aproximadamente 3:1, al menos alrededor de 4:1, al menos aproximadamente 5:1, al menos alrededor de 6:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos alrededor de 8:1, al menos aproximadamente 9:1, al menos alrededor de 10:1, al

menos aproximadamente 11:1, al menos alrededor de 12:1, al menos aproximadamente 13:1, al menos alrededor de 14:1, al menos aproximadamente 15:1, o al menos alrededor de 16:1. Una relación N/P que se prefiere más es aproximadamente 4:1 o más.

5 Cada emulsión puede tener su propia relación N/P óptima preferida para producir efectos deseados (por ejemplo, nivel de expresión deseado del ARN que formó complejo), que se pueden determinar experimentalmente (por ejemplo, usando los ensayos descritos en la presente u otras técnicas conocidas en la técnica, tales como medir el nivel de expresión de una proteína que sea codificada por el ARN, o medir el porcentaje de las moléculas de ARN que se liberan del complejo en presencia de heparina). Generalmente, la relación N/P debe estar en un valor tal que al menos aproximadamente 5%, alrededor de 10%, aproximadamente 15%, alrededor de 20%, aproximadamente 25%, alrededor de 30%, aproximadamente 35%, alrededor de 40%, aproximadamente 45%, alrededor de 50%, aproximadamente 55%, alrededor de 60%, aproximadamente 65%, alrededor de 70%, aproximadamente 75%, alrededor de 80%, aproximadamente 85%, alrededor de 90%, o aproximadamente 95% de las moléculas de ARN sean liberadas de los complejos de ARN-partícula cuando los complejos de ARN-partícula sean absorbidos por células. Se prefiere una relación N/P de al menos 4:1.

10 15 Las emulsiones catiónicas de aceite en agua descritas aquí son particularmente adecuadas para formular vacunas a base de ácido nucleico (por ejemplo, vacunas de ADN, vacunas de ARN). La formación de un complejo de ácido nucleico-partícula de emulsión facilita la absorción del ácido nucleico en células hospederas, y protege a la molécula de ácido nucleico de la degradación por nucleasas. Las células transfectadas pueden expresar después el antígeno codificado por la molécula de ácido nucleico, que puede producir una respuesta inmune al antígeno. Al igual que los virus vivos o atenuados, las vacunas a base de ácido nucleico pueden acoplarse efectivamente tanto a las vías MHC-I como MHC-II permitiendo la inducción de respuestas a células T CD8⁺ y CD4⁺, mientras que el antígeno presente en forma soluble, tal como una proteína recombinante, induce generalmente solo respuestas de anticuerpo.

20 25 La secuencia de la molécula de ARN puede ser optimizada en codones o desoptimizada para expresión en un anfitrión deseado, tal como una célula humana.

30 35 La molécula cargada negativamente descrita en la presente es una molécula de ARN. En ciertas modalidades, la molécula de ARN codifica para un antígeno (péptido, polipéptido o proteína) y la emulsión catiónica de aceite en agua es adecuada para usarse como una vacuna a base de ARN. La composición puede contener más de una molécula de ARN que codifique para un antígeno, por ejemplo, dos, tres, cinco o diez moléculas de ARN que formen complejo con las partículas de la emulsión. Es decir, la composición puede contener una o más especies diferentes de moléculas de ARN, cada una codificando para un antígeno diferente. Como alternativa o además, una molécula de ARN también puede codificar para más de un antígeno, por ejemplo, una molécula de ARN bicistrónica o tricistrónica que codifique para diferentes o idénticos antígenos. En consecuencia, la emulsión catiónica de aceite en agua es adecuada para usarse como una vacuna a base de ARN, que sea monovalente o multivalente.

40 45 La secuencia de la molécula de ARN puede ser modificada si se desea, por ejemplo para incrementar la eficacia de expresión o replicación del ARN, o para proporcionar estabilidad de resistencia a degradación adicional. Por ejemplo, la secuencia de ARN puede modificarse con respecto a su uso de codones, por ejemplo, para incrementar la eficacia de traducción y vida media del ARN. Una cola poli A (por ejemplo, de aproximadamente 30 residuos de adenosina o más) puede fijarse al extremo 3' del ARN para incrementar su vida media. El extremo 5' del ARN puede ser tapado con un ribonucleótido modificado con la estructura m7G(5')ppp(5') N (estructura de tapa 0), o un derivado del mismo, que se puede incorporar durante la síntesis de ARN o puede manipularse enzimáticamente después de la transcripción de ARN (por ejemplo, usando Enzima de Bloqueo de Virus de Vaccinia (VCE) que consiste en ARNm trifosfatasa, guanilil-transferasa y guanina-7-metiltransferasa, que cataliza la construcción de estructuras de tapa 0 N7-monometiladas). La estructura de tapa 0 juega un papel importante en mantener la estabilidad y eficiencia de traducción de la molécula de ARN. La tapa 5' de la molécula de ARN puede modificarse más por una 2'-O-metiltransferasa que resulte en la generación de una estructura de tapa 1 (m7Gppp [m2'-O]N), que puede incrementar más la eficiencia de traducción.

50 55 Si se desea, la molécula de ARN puede comprender uno o más nucleótidos modificados. Esto puede ser además de cualquier estructura de tapa 5'. Hay más de 96 modificaciones de nucleótidos de origen natural encontrados en ARN de mamífero. Véase, por ejemplo, Limbach *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 22(12):2183-2196 (1994). La preparación de nucleótidos y nucleótidos modificados y nucleósidos se conocen bien en la técnica, por ejemplo, de las patentes de E.U.A. Números 4373071, 4458066, 4500707, 4668777, 4973679, 5047524, 5132418, 5153319, 5262530, 5700642, y muchos nucleósidos modificados y nucleótidos modificados están disponibles comercialmente.

60 65 Las nucleobases modificadas que pueden ser incorporadas en nucleósidos y nucleótidos modificados y estar presentes en las moléculas de ARN incluyen: m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), sU (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina); m2A (2metiladenosina); Am (2-1-O-metiladenosina); ms2m6A (2-metiltio-N6-metiladenosina); i6A (N6-isopenteniladenosina); ms2i6A (2-metiltio-N6isopenteniladenosina); io6A (N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms2io6A (2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina); t6A (N6-treonilcarbamoiladenosina); ms2t6A (2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina); m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina); hn6A(N6-hroxinorvalilcarbamoil adenosina); ms2hn6A (2-metiltio-N6-hidroxinorvalil carbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-

ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m1I (1-metilinosina); m'lm (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 (N4acetil2TOMetilcitidina); k2C (lisidina); m1G (1-metilguanosina); m2G (N2-metilguanosina); m7G (7-metilguanosina); Gm (2'-O-metilguanosina); m22G (N2,N2-dimetilguanosina); m2Gm (N,2'-O-dimetilguanosina); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosina); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)); yW (wybutosina); o2yW (peroxiwibutosina); OHyW (hidroxiwibutosina); OHyW* (hidroxiwibutosina no modificada); imG (wiosina); mimG (metilguanosina); Q (cueuosina); oQ (epoxicueuosina); galQ (galactosil-cueuosina); manQ (mannosil-cueuosina); preQo (7-ciano-7-desazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-desazaguanosina); G* (arcaeosina); 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 5-oxiacético de uridina); mcmo5U (éster metílico de ácido 5-oxiacético de uridina); chm5U (5-(carboxihidroximetil)uridina); mchm5U (éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)uridina); mcm5U (5-metoxicarbonil metiluridina); mcm5Um (S-metoxicarbonilmetil-2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxicarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); mn5U (5-metilaminometiluridina); mn5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mn5se2U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetil uridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina); cnmm5Um (5-carboximetilaminometil-2-L-ometiluridina); 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); m62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m27G (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-demetylguanosina); imG2 (isoguanosina); ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7-sustituidos de los mismos, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C₁-C₆)-alquiluracilo, 5-metiluracilo, 5-(C₂-C₆)-alqueniluracilo, 5-(C₂-C₆)-alquiniluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(C₁-C₆)-alquicitosina, 5-metilcitosina, 5-(C₂-C₆)-alquenilcitosina, 5-(C₂-C₆)-alquinilcitosin, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 7-desazaguanina, 8-azaguanina, guanina 7-desaza-7-sustituida, 7-desaza-7-(C₂-C₆)alquinilguanina, guanina 7-desaza-8-sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-desazapurina sustituida, purina 7-desaza-7-sustituida, purina 7-desaza-8-sustituida, hidrógeno (residuo abásico), m5C, m5U, m6A, s2U, W, o 2'-O-metil-U. Muchas de estas nucleobases modificadas y sus ribonucleósidos correspondientes están disponibles de proveedores comerciales. Véase, por ejemplo, WO 2011/005799.

Un ARN usado con la invención idealmente incluye solo enlaces de fosfodiéster entre nucleósidos, pero en algunas modalidades puede contener enlaces de fosforamidato, fosforotioato y/o metilfosfonato.

35 En algunas modalidades, la molécula de ARN no incluye nucleótidos modificados, por ejemplo, no incluye nucleobases modificadas, y todos los nucleótidos en la molécula de ARN son ribonucleótidos estándares convencionales A, U, G y C, con la excepción de una tapa 5' opcional que puede incluir, por ejemplo, 7-metilguanosina. En otras modalidades, el ARN puede incluir una tapa 5' que comprenda una 7-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' pueden ser metilados en la posición 2' de la ribosa.

40 A. ARN de auto-replicación

En algunos aspectos, la emulsión catiónica de aceite en agua contiene una molécula de ARN de auto-replicación. En ciertas modalidades, la molécula de ARN de auto-replicación se deriva de o se basa en un alfavírus.

Las moléculas de ARN de auto-replicación se conocen bien en la técnica y pueden producirse usando elementos de replicación derivados de, por ejemplo, alfavírus, y sustituyendo las proteínas virales estructurales con una secuencia 45 de nucleótidos que codifique para una proteína de interés. Una molécula de ARN de auto-replicación es típicamente una molécula de hebra (+) que puede ser traducida directamente después de su suministro a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que luego produce transcritos tanto antisentido como de sentido a partir del ARN suministrado. De esta manera el ARN suministrado lleva a la producción de varias moléculas de ARN hijas. Estas moléculas de ARN hijas, así como transcritos subgenómicos colineales, se pueden 50 traducir a su vez para proporcionar expresión *in situ* de un antígeno codificado, o se pueden transcribir para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que sean traducidos para proporcionar expresión *in situ* del antígeno. Los resultados totales de esta secuencia de transcripciones es una gran amplificación en el número de las moléculas de ARN de replicón introducidas y de esta forma el antígeno codificado 55 se vuelve un gran producto de polipéptido de las células. Las células transfectadas con ARN de auto-replicación brevemente producen un antígeno antes de sufrir la muerte apoptótica. Esta muerte es probablemente resultado de intermedios de ARN de doble hebra (ds) necesarios, los cuales también han mostrado super activar células dendríticas. Así, la inmunogenicidad incrementada del ARN de auto-replicación puede ser el resultado de la producción de ARNds pro-inflamatorio, el cual imita una infección por virus de ARN de células hospederas.

60 Adecuadamente, la maquinaria de la célula se usa por las moléculas de ARN de auto-replicación para generar un incremento exponencial de productos génicos codificados, tales como proteínas o antígenos, que se pueden acumular en las células o ser secretados en las células. La sobreexpresión de proteínas por moléculas de ARN de

auto-replicación toma ventaja de los efectos adyuvantes inmunoestimuladores, incluyendo estimulación de receptores tipo toll (TLR) 3, 7 y 8 y las vías no TLR (por ejemplo, RIG-1, MD-5) por los productos de replicación y amplificación de ARN, y traducción que induce apoptosis de la célula transfeccada.

5 El ARN de auto-replicación contiene generalmente por lo menos uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en replicasas virales, proteasas virales, helicasas virales y otras proteínas virales no estructurales, y también comprenden secuencias de replicación *cis*-activas de extremo 5' y 3', y si se desea, secuencias heterólogas que codifican para secuencias de aminoácido deseadas (por ejemplo, un antígeno de interés). Un promotor subgenómico que dirige la expresión de la secuencia heteróloga puede ser incluido en el ARN de auto-replicación. Si se desea, la secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de interés) puede fusionarse en cuadro a otras regiones de codificación en el ARN de auto-replicación y/o puede estar bajo el control de un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés).

10 En ciertas modalidades, la molécula de ARN de auto-replicación no es encapsulada en una partícula tipo virus. Las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención pueden diseñarse de tal manera que la molécula de ARN de auto-replicación no pueda inducir la producción de partículas virales infecciosas. Esto puede lograrse, por ejemplo, al omitir uno o más genes virales que codifiquen para proteínas estructurales que sean necesarias para la producción de partículas virales en el ARN de auto-replicación. Por ejemplo, cuando la molécula de ARN de auto-replicación. Por ejemplo, cuando la molécula de ARN de auto-replicación se basa en un virus alfa, tal como virus Sindbis (SIN), virus del bosque de Semliki y virus de la encefalitis equina venezolana (VEE, por sus siglas en inglés), se pueden omitir uno o más genes que codifiquen para proteínas estructurales virales, tales como glicoproteínas de cápside y/o envoltura.

15 Si se desea, las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención también pueden diseñarse para inducir producción de partículas virales infecciosas que sean atenuadas o virulentas, o para producir partículas virales que sean capaces de una sola ronda de infección subsecuente.

20 25 Si se desea, las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención también pueden diseñarse para inducir producción de partículas virales infecciosas que sean atenuadas o virulentas, o para producir partículas virales que sean capaces de una sola ronda de infección subsecuente.

Un sistema adecuado para lograr la auto-replicación de esta manera es usar un replicón a base de alfavirus. Los alfavirus comprenden un conjunto de virus de origen artrópodo genética, estructural y serológicamente emparentados de la familia Togaviridae. Veintiséis virus y subtipos de virus conocidos han sido clasificados dentro del género alfavirus, incluyendo, virus Sindbis, virus del bosque de Semliki, virus del río Ross y virus de la encefalitis equina venezolana. De esta forma, el ARN de auto-replicación de la invención puede incorporar una ARN replicasa derivada de virus del bosque de Semliki (SFV, por sus siglas en inglés), virus sindbis (SIN, por sus siglas en inglés), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus del río Ross (RRV, por sus siglas en inglés), virus de la encefalitis equina oriental u otros virus que pertenezcan a la familia de alfavirus.

30 35 Los vectores de expresión de "replicón" a base de alfavirus pueden usarse en la invención. Los vectores de replicón pueden utilizarse en varios formatos, incluyendo ADN, ARN y partículas de replicón recombinantes. Estos virus de replicón han sido derivados de alfavirus que incluyen, por ejemplo, virus Sindbis (Xiong et al. (1989) Science 243:1188-1191; Dubensky et al., (1996) J. Virol. 70:508-519; Hariharan et al. (1998) J. Virol. 72:950-958; Polo et al. (1999) PNAS 96:4598-4603), virus del bosque de Semliki (Liljestrom (1991) Bio/Technology 9:1356-1361; Berglund et al. (1998) Nat. Biotech. 16:562-565), y virus de la encefalitis equina venezolana (Pushko et al. (1997) Virology 239:389-401). Los replicones derivados de alfavirus generalmente son muy similares en características generales (por ejemplo, estructura, replicación), los alfavirus individuales pueden exhibir cierta propiedad particular (por ejemplo, unión a receptor, sensibilidad a interferón y perfil de enfermedad) que sea única. Por lo tanto, los replicones de alfavirus químicos hechos a partir de familias de virus divergentes también pueden ser útiles.

40 45 Los replicones de ARN a base de alfavirus son típicamente moléculas de ARN de hebra positiva que llevan a la traducción de una replicasa (o replicasa-transcriptasa) después de su suministro a una célula. La replicasa es traducida como una poliproteína que auto-corta para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de hebra (-) genómicas del ARN suministrado de hebra (+). Estos transcritos de hebra (-) pueden a su vez ser transcritos para dar copias adicionales del ARN progenitor de hebra (+) y también dar un transcríto subgenómico que codifique para el antígeno. La traducción del transcríto subgenómico lleva entonces a la expresión *in situ* del antígeno por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de virus Sindbis, un virus del bosque de Semliki, un virus de la encefalitis equina oriental, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc.

50 55 Un replicón de ARN comprende de preferencia un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de la fiebre amarilla o alfavirus (por ejemplo, virus Sindbis, virus del bosque de Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana o virus del río Ross), que sea modificado por el reemplazo de uno o más genes de proteínas estructurales con una secuencia de ácido nucleico heterólogo seleccionada que codifique para un producto de interés.

Un replicón que se prefiere codifica para (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN a partir del replicón y (ii) un antígeno. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, por ejemplo, que comprenda una o más proteínas de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. Mientras que los genomas de alfavirus naturales codifican para proteínas de virión estructurales además de la poliproteína de replicasa no estructural, se prefiere que

el replicón no codifique para proteínas estructurales de alfavirus. De esta manera un replicón preferido puede llevar a la producción de copias de ARN genómicas de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contengan ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus tipo silvestre, el replicón preferido no puede perpetuarse a sí mismo en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para perpetuación en virus tipo silvestre están ausentes del replicón preferido y su lugar es tomado por genes que codifican para el antígeno de interés, de tal manera que el transcripto subgenómico codifique para el antígeno en lugar de para las proteínas de virión de alfavirus estructurales.

Un replicón útil con la invención puede tener dos marcos de lectura abiertos. El primer marco de lectura abierto (5') codifica para una replicasa; el segundo marco de lectura abierto (3') codifica para un antígeno. En algunas modalidades el ARN puede tener marcos de lectura abiertos adicionales (hacia el extremo 3'), por ejemplo, para codificar para antígenos adicionales o para codificar para polipéptidos accesorios.

Un replicón que se prefiere tiene una tapa 5' (por ejemplo, una 7-metilguanosina), que comúnmente puede incrementar la traducción *in vivo* del ARN. En algunas modalidades, la secuencia 5' del replicón puede tener que ser seleccionada para asegurar compatibilidad con la replicasa codificada.

15 Un replicón puede tener una cola poli-A 3'. También puede incluir una secuencia de reconocimiento de polimerasa poli-A (por ejemplo, AAUAAA) cerca de su extremo 3'.

Los replicones pueden tener varias longitudes pero típicamente tienen 5,000-25,000 nucleótidos de largo, por ejemplo, 8,000-15,000 nucleótidos, o 9,000-12,000 nucleótidos.

20 El replicón puede prepararse convenientemente mediante transcripción *in vitro* (IVT). IVT puede usar una plantilla (ADNc) creada y propagada en forma de plásmido en bacterias, o creada sintéticamente (por ejemplo mediante síntesis génica y/o procedimientos de manipulación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como las bacteriófago T7, T3 o SP6 ARN polimerasas) se puede usar para transcribir el replicón de una plantilla de ADN. Las reacciones de tapado y adición de poli-A adecuadas pueden usarse según se requiera (aunque la poli-A del replicón normalmente es codificada dentro de la plantilla de ADN).

25 Estas ARN polimerasas tienen severos requisitos para los nucleótidos 5' transcritos y en algunas modalidades estos requisitos deben ser igualados con los requisitos de la replicasa codificada, para asegurar que el ARN transrito por IVT pueda funcionar eficientemente como un substrato para su replicasa auto-codificada. Ejemplos específicos incluyen plásmidos a base de virus Sindbis (pSIN) tales como pSINCP, descrito, por ejemplo, en las patentes de E.U.A. Nos. 5,814,482 y 6,015,686, así como en las publicaciones internacionales Nos. WO 97/38087, WO 99/18226 y WO 02/26209. La construcción de estos replicones, en general, se describe en las patentes de E.U.A. Nos. 5,814,482 y 6,015,686.

30 En otros aspectos, la molécula de ARN de auto-replicación se deriva de o es a base de un virus que no es un alfavirus, de preferencia, un virus de ARN de hebra positiva, y muy preferiblemente un picornavirus, flavivirus, rubivirus, pestivirus, hepatitisvirus, calicivirus o coronavirus. Las secuencias de alfavirus tipo silvestre adecuadas se conocen bien y están disponibles de depósitos de secuencias, tales como la Colección Americana de Tipos de Cultivos, Rockville, MD. Ejemplos representativos de estos alfavirus incluyen Aura (ATCC VR-368), virus Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), virus de Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), virus de la encefalomielitis equina oriental (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), virus de Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), virus de Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), virus del río Ross (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), bosque de Semliki (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonato (ATCC VR-925), Triniti (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), virus de la encefalomielitis equina venezolana (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), virus de la encefalomielitis equina occidental (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926) y Y-62-33 (ATCC VR-375).

40 Las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención son más grandes que otros tipos de ARN (por ejemplo, ARNm) que se han preparado usando nucleótidos modificados. Típicamente, las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención contienen al menos aproximadamente 4 kb. Por ejemplo, el ARN de auto-replicación puede contener al menos aproximadamente 5 kb, al menos alrededor de 6 kb, al menos aproximadamente 7 kb, al menos alrededor de 8 kb, al menos aproximadamente 9 kb, al menos alrededor de 10 kb, al menos aproximadamente 11 kb, al menos alrededor de 12 kb, o más de 12 kb. En ciertos ejemplos, el ARN de auto-replicación tiene alrededor de 4 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 8 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 6 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 7 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 8 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 9 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 10 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 11 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 5 kb a aproximadamente 11 kb, alrededor de 5 kb a aproximadamente 10 kb, alrededor de 5 kb a aproximadamente 9 kb, alrededor de 5 kb a aproximadamente 8 kb, alrededor de 5 kb a aproximadamente 7 kb, alrededor de 5 kb a aproximadamente 6 kb, alrededor de 6 kb a aproximadamente 12 kb, alrededor de 6 kb a aproximadamente 7 kb, alrededor de 7 kb a aproximadamente 11 kb, alrededor de 7 kb a aproximadamente 10 kb, alrededor de 7 kb a aproximadamente 9 kb, alrededor de 7 kb a aproximadamente 8 kb, alrededor de 8 kb a aproximadamente 11 kb, alrededor de 8 kb a aproximadamente 10 kb,

alrededor de 8 kb a aproximadamente 9 kb, alrededor de 11 kb, a aproximadamente 9 kb a alrededor de 10 kb, o aproximadamente 10 kb a alrededor de 11 kb.

Las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención pueden comprender uno o más tipos de nucleótidos modificados (por ejemplo, pseudouridina, N6-metiladenosina, 5-metilcitrudina, 5-metiluridina).

5 La molécula de ARN de auto-replicación puede codificar para un solo antígeno de polipéptido heterólogo o, opcionalmente, para dos o más antígenos de polipéptidos heterólogos enlazados juntos de tal manera que cada una de las secuencias conserve su identidad (por ejemplo, enlazados en serie) cuando se expresen como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos heterólogos generados a partir del ARN de auto-replicación pueden ser luego producidos como un polipéptido de fusión o manipulados de tal manera que se traduzcan en secuencias de polipéptidos o péptidos separadas.

10 El ARN de auto-replicación de la invención puede codificar para uno o más antígenos polipéptidos que contengan una gama de epítopos. De preferencia epítopos capaces de provocar ya sea una respuesta a células T auxiliares o una respuesta a células T citotóxicas, o ambas.

15 Las moléculas de ARN de auto-replicación descritas en la presente pueden ser diseñadas para expresar varias secuencias de nucleótidos, de dos o más marcos de lectura abiertos, de esta manera permitiendo la co-expresión de proteínas, tales como dos o más antígenos junto con citocinas u otros inmunomoduladores, que pueden incrementar la generación de una respuesta inmune. Esta molécula de ARN de auto-replicación podría ser particularmente útil, por ejemplo, en la producción de varios productos génicos (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo, por ejemplo, como una vacuna bivalente o multivalente.

20 Las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención pueden prepararse usando cualquier procedimiento adecuado. Se conocen en la técnica varios procedimientos adecuados para producir moléculas de ARN que contienen nucleótidos modificados. Por ejemplo, una molécula de ARN de auto-replicación que contenga nucleótidos modificados se puede preparar al transcribir (por ejemplo, transcripción *in vitro*), un ADN que codifique para la molécula de ARN de auto-replicación usando una ARN polimerasa dependiente de ADN adecuada, tal como ARN polimerasa de fago T7, ARN polimerasa de fago SP6, ARN polimerasa de fago T3 y similares, o mutantes de estas polimerasas que permitan incorporación eficiente de nucleótidos modificados en moléculas de ARN. La reacción de transcripción contendrá nucleótidos y nucleótidos modificados, y otros componentes que soporten la actividad de la polimerasa seleccionada, tal como un regulador de pH adecuado, y sales adecuadas. La incorporación de análogos de nucleótidos en un ARN de auto-replicación puede diseñarse, por ejemplo, para alterar la estabilidad de estas moléculas de ARN, para incrementar la resistencia contra RNAsas, para establecer replicación después de su introducción en células hospederas adecuadas ("infectividad" del ARN), y/o para inducir o reducir respuestas inmunes innatas y adaptivas.

25 Los procedimientos sintéticos adecuados pueden usarse solos, o en combinación con uno o más de otros procedimientos (por ejemplo, tecnología de ADN o ARN recombinante), para producir una molécula de ARN de auto-replicación de la invención. Los procedimientos adecuados para la síntesis de novo se conocen bien en la técnica y pueden adoptarse para aplicaciones particulares. Ejemplos de procedimientos incluyen, por ejemplo, síntesis química usando grupos protectores adecuados tales como CEM (Masuda *et al.*, (2007) *Nucleic Acids Symposium Series* 51:3-4), el procedimiento de β-cianoethylfosforamida (Beaucage S L *et al.* (1986) *Tetrahedron Lett* 22:1859); procedimiento de H-fosfonato de nucleósidos (Garegg P *et al.* (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehler B C *et al.* (1986) *Nucl Acid Res* 14:5399-407; Garegg P *et al.* (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney B L *et al.* (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22). Estas químicas pueden llevarse a cabo o adaptarse para usarse con sintetizadores de ácido nucleico automáticos que estén disponibles comercialmente. Los procedimientos sintéticos adecuados y adicionales se describen en Uhlmann *et al.* (1990) *Chem Rev* 90:544-84 y Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1: 165. También se puede llevar a cabo una síntesis de ácido nucleico usando procedimientos recombinantes que se conocen bien y son convencionales en la técnica, incluyendo la clonación, procesamiento y/o expresión de polinucleótidos y productos génicos codificados por estos polinucleótidos. La reclasificación de ADN mediante fragmentación aleatoria y re-ensamble de PCR de fragmentos génicos y polinucleótidos sintéticos son ejemplos de técnicas conocidas que pueden usarse para diseñar y manipular secuencias de polinucleótidos. Se puede usar mutagénesis dirigida a sitio para alterar ácidos nucleicos y las proteínas codificadas, por ejemplo, para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar preferencia de codones, producir variantes de empalme, introducir mutaciones y similares. Los procedimientos adecuados para transcripción, traducción y expresión de secuencias de ácido nucleico se conocen y son convencionales en la técnica. (Véase generalmente, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 2, Ed. Ausubel, *et al.*, Greene Publish, Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13, 1988; Glover, DNA Cloning, vol. II, IRL Press, Wash, D. C., Ch. 3, 1986; Bitter, *et al.*, in Methods in Enzymology 153:516-544 (1987); The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Eds. Strathern *et al.*, Cold Spring Harbor Press, vols. I y II, 1982; y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989).

30 La presencia y/o cantidad de uno o más nucleótidos modificados en una molécula de ARN de auto-replicación puede determinarse usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, un ARN de auto-replicación puede ser digerido a monofosfatos (por ejemplo, usando nucleasa P1) y desfosforilado (por ejemplo, usando una fosfatasa

adeuada tal como CIAP), y los nucleótidos resultantes a analizarse mediante HPLC de fase inversa (por ejemplo, usando una columna YMC Pack ODS-AQ (5 micras, 4,6 X 250 mm) y eluyendo usando un gradiente, 30% de B (0-5 min) a 100% de B (5-13 min) y a 100% de B (13-40 min, caudal (0,7 ml/min), detección UV (longitud de onda: 260 nm), temperatura de columna (30°C). Regulador de pH A (20 mM de ácido acético – acetato de amonio pH 3,5), regulador de pH B (20 mM de ácido acético – acetato de amonio, pH 3,5/metanol [90/10])).

Opcionalmente, las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención pueden incluir uno o más nucleótidos modificados de tal manera que la molécula de ARN de auto-replicación tenga menos actividad inmunomoduladora después de su introducción o entrada en una célula hospedera (por ejemplo, una célula humana) en comparación con la molécula de ARN de auto-replicación correspondiente que no contiene nucleótidos modificados.

- 5 10 Si se desea, las moléculas de ARN de auto-replicación pueden ser tamizadas o analizadas para confirmar sus propiedades terapéuticas y profilácticas usando varios procedimientos de prueba *in vitro* o *in vivo* que se conozcan por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, vacunas que comprendan la molécula de ARN de auto-replicación pueden ser probadas para verificar su efecto en la inducción de proliferación o función efectora del tipo de interés de linfocito particular, por ejemplo, células B, células T, líneas de células T y clones de células T. Por ejemplo, células de bazo de ratones inmunizados pueden ser aisladas y la capacidad de los linfocitos T citotóxicos para lisar células objetivo autólogas que contengan una molécula de ARN de auto-replicación que codifique para un antígeno de polipéptido. Además, la diferenciación de células auxiliares T puede analizarse al medir la proliferación o producción de citocinas TH1 (IL-2 e IFN- γ) y TH2 (IL-4 e IL-5) por ELISA o directamente en células T CD4+ mediante tinción de citocinas citoplásmicas y citometría de flujo.
- 15 20 Las moléculas de ARN de auto-replicación que codifican para un antígeno de polipéptido también pueden probarse para su capacidad para inducir respuestas inmunes humorales, según e evidencia, por ejemplo, por la inducción de la producción por células B de anticuerpos específicos para un antígeno de interés. Estos ensayos pueden llevarse a cabo usando, por ejemplo, linfocitos B periféricos de individuos inmunizados. Estos procedimientos de ensayo se conocen por los expertos en la técnica. Otros ensayos que pueden usarse para caracterizar las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención pueden incluir detectar la expresión del antígeno codificado por las células objetivo. Por ejemplo, se puede usar FACS para detectar la expresión de antígenos en la superficie de la célula o intracelularmente. Otra ventaja de la selección por FACS es que se puede clasificar diferentes niveles de expresión; algunas veces puede ser deseable la expresión inferior. Otro procedimiento adecuado para identificar células que expresen un antígeno particular incluye el paneo usando anticuerpos monoclonales en una placa o captura usando esferas magnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales.
- 25 30

B. Antígenos

En ciertas modalidades, la molécula cargada negativamente descrita en la presente es una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN) que codifica para un antígeno. Los antígenos adecuados incluyen, pero no están limitados a, un antígeno bacteriano, un antígeno viral, un antígeno fúngico, un antígeno protozoario, un antígeno vegetal, un antígeno de cáncer o una combinación de los mismos.

- 35 Los antígenos adecuados incluyen proteínas y péptidos de un patógeno tal como virus, bacterias, hongos, protozoarios, plantas o de un tumor. Los antígenos e inmunógenos virales que pueden ser codificados por la molécula de ARN de auto-replicación incluyen, pero no están limitados a, proteínas y péptidos de Ortomixovirus, tales como influenza A, B y C; virus *Paramixoviridae*, tales como Neumovirus (RSV), Paramixovirus (PIV), Metaneumovirus y Morbillivirus (por ejemplo, sarampión); Neumovirus, tales como virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés), virus sincitial respiratorio bovino, virus de neumonía de ratones y virus de la rinotraqueitis del pavo; paramixovirus, tales como virus de la parainfluenza tipos 1-4 (PIV), virus de paperas, virus de Sendai, virus Simiano 5, virus de la parainfluenza bovina, nipavirus, henipavirus y virus de la enfermedad de Newcastle; poxivirus, incluyendo un ortopoxvirus tal como *Variola vera* (incluyendo pero no limitado a, *Variola major* y *Variola minor*); metaneumovirus, tales como metaneumovirus humano (hMPV, por sus siglas en inglés) y metaneumovirus aviar (aMPV, por sus siglas en inglés); morbillivirus, tales como sarampión; piconavivirus, tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, parecovirus, cardiovirus y aftovirus; enterovirus, tales como poliovirus tipos 1, 2 o 3, virus Coxsackie A tipos 1 a 22 y 24, virus de Coxsackie B tipos 1 a 6, ecovirus (ECHO) tipos de virus 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 y enterovirus 68 a 71, bunyavirus, incluyendo un ortobunyavirus tal como virus de la encefalitis de California; un flebovirus, tal como virus de la fiebre del Valle de Rift; un nairovirus, tal como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; heparnavirus, tales como virus de la hepatitis A (HAV, por sus siglas en inglés); togavirus (rubéola), tales como rubivirus, un alfavirus, o un arterivirus; flavivirus, tales como virus de la encefalitis originada por garrapatas (TBE, por sus siglas en inglés), virus del dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis Japonesa, virus del Bosque de Kyasanur, virus de la encefalitis del Nilo Occidental, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis de primavera-verano Ruso, virus de la encefalitis de Powassan; pestivirus, tales como diarrea viral de bovino (BVDV, por sus siglas en inglés), fiebre porcina clásica (CSFV, por sus siglas en inglés) o enfermedad de Border (BDV); hepadnavirus, tales como virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C; rabbiovirus, tales como lisavirus (virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV), *caliciviridae*, tales como virus de Norwalk y virus tipo Norwalk, tales como virus de Hawái y virus de la Montaña Nevada; coronavírus, tales como SARS, coronavírus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviaria (IBV, por sus siglas en inglés), virus de la hepatitis del ratón (MHV, por sus siglas en inglés) y virus de la gastroenteritis transmisible por SIDA (TGEV, por sus siglas en inglés);

- retrovirus tales como un oncovirus, un lentivirus o un spumavirus; reovirus, como un ortoreovirus, un rotavirus, un orbivirus o un coltivirus; parvovirus, tales como parvovirus B19; virus de la hepatitis delta (HDV, por sus siglas en inglés); virus de la hepatitis E (HEV, por sus siglas en inglés); virus de la hepatitis G (HGV); virus del herpes humano, tales como, por ejemplo, virus del herpes simple (HSV, por sus siglas en inglés), virus de la varicela zoster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés), citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés), virus del herpes humano 6 (HHV6, por sus siglas en inglés), virus del herpes humano 7 (HHV7, por sus siglas en inglés) y virus del herpes humano 8 (HHV8, por sus siglas en inglés); papovavirus, tales como virus de papiloma y virus de polioma, adenovirus y arenavirus.
- En algunas modalidades, el antígeno provoca una respuesta inmune contra un virus que infecta peces, tal como: virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV, por sus siglas en inglés), virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV, por sus siglas en inglés), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, por sus siglas en inglés), virus del pez gato de canal (CCV, por sus siglas en inglés), virus de la enfermedad de linfocistitis piscícola (FLDV, por sus siglas en inglés), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV, por sus siglas en inglés), virus del herpes koi, virus tipo picorna de salmón (también conocido como virus tipo picorna del salmón del atlántico), virus del salmón sin litoral (LSV, por sus siglas en inglés), rotavirus de salmón del atlántico (ASR, por sus siglas en inglés), virus de la enfermedad de la fresa de la trucha (TSD, por sus siglas en inglés), virus de tumor del salmón coho (CSTV, por sus siglas en inglés) o virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV, por sus siglas en inglés).
- En algunas modalidades, el antígeno provoca una respuesta inmune contra un parásito del género *Plasmodium*, tal como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. De esta manera la invención se puede usar para inmunizar contra la malaria. En algunas modalidades el antígeno provoca una respuesta inmune contra un parásito de la familia de los caligídeos, particularmente aquellos de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus*, por ejemplo, piojos de mar, tales como *Lepeophtherirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.
- Los antígenos e inmunógenos bacterianos que pueden ser codificados por la molécula de ARN de auto-replicación incluyen, pero no están limitados a, proteínas y péptidos de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia* sp. (por ejemplo, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia cepacia*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* (botulismo), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* sp. (por ejemplo, *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. pinnipediae*), *Francisella* sp. (por ejemplo, *F. novicida*, *F. philomiragia* y *F. tularensis*), *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* (sífilis), *Haemophilus ducreyi*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* (tal como *E. coli* enterotoxigénico (ETEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enteropatogénico (EPEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC; tal como *E. coli* uropatógeno (UPEC, por sus siglas en inglés) y/o *E. coli* asociado con meningitis/sepsis (MNEC, por sus siglas en inglés)) y/o *E. coli* enterohemorrágico (EHEC, por sus siglas en inglés), *Bacillus anthracis* (ántrax), *Yersinia pestis* (plaga), *Mycobacterium tuberculosis*, *Rickettsia*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), *Borrelia burgdorferi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Klebsiella*, *Mycoplasma pneumoniae*, etc.
- Los antígenos e inmunógenos fúngicos que pueden ser codificados por la molécula de ARN de auto-replicación incluyen, pero no están limitados a proteínas y péptidos de dermatofitos, incluyendo: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouini*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum nanum*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum* y/o *Trichophyton faviforme*; o de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitaniae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporidia*, *Encephalitozoon* spp., *Septata intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi*; los menos comunes son *Brachyola* spp., *Microsporidium* spp., *Nosema* spp., *Pleistophora* spp., *Trachipleistophora* spp., *Vittaforma* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiosperum*, *Sporothrix schenkii*, *Trichosporon beigelii*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffei*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp., *Mortierella* spp., *Cunninghamella* spp., *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Helminthosporium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Monolinia* spp., *Rhizoctonia* spp., *Paecilomyces* spp., *Pithomyces* spp. y *Cladosporium* spp.
- Los antígenos e inmunógenos protozoarios que se pueden codificar por la molécula de ARN de auto-replicación incluyen, pero no están limitados a, proteínas y péptidos de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*

parvum, Cyclospora cayatanensis y Toxoplasma.

Los antígenos e inmunógenos vegetales que pueden ser codificados por la molécula de ARN de auto-replicación incluyen, pero no están limitados a, proteínas y péptidos de *Ricinus communis*.

- 5 Los antígenos adecuados incluyen proteínas y péptidos de un virus tal como, por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus del herpes simple (HSV), citomegalovirus (CMV), virus de la influenza (gripe), virus sincitial respiratoria (RSV), parvovirus, norovirus, virus del papiloma humano (HPV), rinovirus, virus de la fiebre amarilla, virus de la rabia, virus de la fiebre del dengue, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, virus de varicela zoster, enterovirus (por ejemplo, enterovirus 71), virus del ébola y virus de la diarrea bovina. De preferencia, la sustancia antigénica se selecciona del grupo que consiste en glicoproteína de HSV gD, glicoproteína de VIH gp120, glicoproteína de VIH gp 40, gag p55 de VIH y polipéptidos de las regiones pol y tat. En otras modalidades preferidas de la invención, el antígeno es una proteína o péptido derivado de una bacteria tal como, por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenza*, *Vibrio cholerae* (cólera), *C. diphtheriae* (difteria), *C. tetani* (tétanos), *Neisseria meningitidis*, *B. pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, y similares.
- 10 15 Los antígenos de VIH que pueden ser codificados por las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención se describen en la solicitud de E.U.A. No. de serie 490,858, presentada el 9 de Marzo de 1990, y en la solicitud Europea publicada No. 181150 (Mayo 14 de 1986), así como en las solicitudes de E.U.A. Nos. de serie 60/168,471; 09/475,515; 09/475,504; y 09/610,313.
- 20 Los antígenos de citomegalovirus que pueden ser codificados por las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención se describen en la patente de E.U.A. No. 4,689,225, solicitud de E.U.A. No. de serie 367,363, presentada el 16 de Junio de 1989 y publicación de PCT WO 89/07143, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.
- 25 Los antígenos de la hepatitis C que pueden ser codificados por las moléculas de ARN de auto-replicación de la invención se describen en PCT/US88/04125, solicitud europea publicada No. 318216 (Mayo 31 de 1989), solicitud japonesa publicada No. 1-500565 presentada el 18 de noviembre de 1988, solicitud canadiense 583,561 y EPO 388,232. Un conjunto diferente de antígenos de HCV se describe en la solicitud de patente europea 90/302866,0, presentada el 16 de marzo de 1990 y solicitud de E.U.A. No. de serie 456,637, presentada el 21 de diciembre de 1989 y PCT/US90/01348.
- 30 35 En algunas modalidades, el antígeno se deriva de un alérgeno, tal como alérgenos de polen (alérgenos de polen de árboles, hierbas, malezas y césped); alérgenos de insectos o arácnidos (alérgenos inhalantes, de saliva y veneno, por ejemplo, alérgenos de ácaros, alérgenos de cucarachas y mosquitos, alérgenos de veneno de himenópteros); alérgenos de pelaje y caspa animales (de, por ejemplo, perro, gato, caballo, rata, ratón, etc.); y alérgenos de alimentos (por ejemplo, una gliadina). Los alérgenos de polen importantes de los árboles, céspedes y hierbas son los que se originan de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y platánáceos incluyendo, pero no limitados a, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano de sombra (*Platanus*), el orden de Poales incluyendo gramíneas de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *sorgo*, las órdenes de Asterales y Urticales incluyendo hierbas del género Ambrosia, Artemisia y Parietaria. Otros alérgenos de inhalación importantes son aquellos de ácaros del polvo doméstico del género Dermatophagoïdes y Euroglyphus, ácaros de almacenamiento por ejemplo, Lepidoglyphys, Glycyphagus y Tyrophagus, los de cucarachas, mosquitos y pulgas, por ejemplo, Blatella, Periplaneta, Chironomus y Ctenocephalides, y aquellos de mamíferos tales como gatos, perros y caballos, alérgenos de veneno incluyendo aquellos que se originan de insectos picadores o mordedores tales como aquellos del orden taxonómico de los himenópteros incluyendo abejas (*Apidae*), avispas (*Vespidae*) y hormigas (*Formicoidae*).
- 40 45 En ciertas modalidades, un inmunógeno o antígeno tumoral, o inmunógeno o antígeno de cáncer, puede ser codificado por la molécula de ARN de auto-replicación. En ciertas modalidades, los inmunógenos y antígenos tumorales son antígenos tumorales que contienen péptidos, tales como antígeno de tumor de polipéptidos o antígenos tumorales de glicoproteínas.
- 50 Los inmunógenos y antígenos de tumores adecuados para usarse en la presente abarcan una amplia variedad de moléculas, tales como (a) antígenos tumorales que contienen polipéptidos, incluyendo polipéptidos (los cuales pueden variar, por ejemplo, de 8-20 aminoácidos de largo, aunque longitudes fuera de este intervalo también son comunes), lipopolipéptidos y glicoproteínas.
- 55 En ciertas modalidades, los inmunógenos tumorales son, por ejemplo, (a) moléculas de longitud completa asociadas con células cancerosas, (b) homólogos y formas modificadas de las mismas, incluyendo moléculas con porciones suprimidas, añadidas y/o sustituidas, y (c) fragmentos de los mismos. Los inmunógenos humorales incluyen, por ejemplo, antígenos restringidos a clase I reconocidos por linfocitos CD8+ o antígenos restringidos a clase II reconocidos por linfocitos CD4+.
- En ciertas modalidades, los inmunógenos tumorales incluyen, pero no están limitados a, (a) antígenos de cáncer de

testículo tales como NY-ESO-1, SSX2, SCP1 así como los polipéptidos de la familia RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que se pueden usar, por ejemplo, para resolver melanoma, tumores de pulmón, cabeza y cuello, NSCLC, senos, gastrointestinales y de vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con varios tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, pulmonar, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado con, por ejemplo, melanoma, cáncer pancreático y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, melanoma), caspasa-8 (asociado con, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina (asociada con, por ejemplo, melanoma), TCR (asociado con, por ejemplo, linfoma no Hodgkin de células T), BCR-abl (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), triosefósфato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT, (c) antígenos sobre-expresados, por ejemplo, Galectina 4 (asociada con, por ejemplo, cáncer colorrectal), Galectina 9 (asociada con, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociado con, por ejemplo, varias leucemias), anhidrasa carbónica (asociada con, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociada con, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociado con, por ejemplo, melanoma), HER-2/neu (asociado con, por ejemplo, cáncer de seno, colon, pulmón y ovario), alfa-fetoproteína (asociada con, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada con, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica de telomerasa, MUC-1 (asociado con, por ejemplo, cáncer de seno y ovárico), G-250 (asociado con, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, colon) y antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal tal como cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanoma-melanocitos tales como, MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de hormona estimuladora de melanocitos, tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa-1/TRP1 y proteína relacionada con tirosinasa-2/TRP2 (asociada con, por ejemplo, melanoma), (e) antígenos asociados con próstata tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados con por ejemplo, cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados con mieloma y linfomas de células B, por ejemplo).

En ciertas modalidades, los inmunógenos tumorales incluyen, pero no están limitados a, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRI., H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos de virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del virus de papiloma humano (HPV), incluyendo E6 y E7, antígenos de virus de la hepatitis B y C, antígenos de virus linfotrófico de células T humanas, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada con ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, y similares.

C. Solución acuosa para la molécula cargada negativamente

La molécula cargada negativamente (tal como ARN) se proporciona generalmente en forma de una solución acuosa, o una forma que puede ser fácilmente disuelta en una solución acuosa (por ejemplo, liofilizada). La solución acuosa puede ser agua, o una solución acuosa que comprenda una sal (por ejemplo, NaCl), un regulador de pH (por ejemplo, un regulador de pH de citrato), un agente de ajuste de osmolaridad o tonicidad (por ejemplo, un sacárido), un polímero, un tensioactivo o una combinación de los mismos. Si la formulación está diseñada para administración *in vivo*, es preferible que la solución acuosa sea un regulador de pH fisiológicamente aceptable que mantenga un pH que sea compatible con condiciones fisiológicas normales. Asimismo, en ciertos casos, puede ser deseable mantener el pH a un nivel particular para poder asegurar la estabilidad de ciertos componentes de la formulación.

Por ejemplo, puede ser deseable preparar una solución acuosa que sea isotónica y/o isoosmótica. Las soluciones hipertónicas e hipotónicas algunas veces podrían causar complicaciones y efectos secundarios cuando sean inyectadas, tales como hinchañón post-administración o rápida absorción de la composición debido a concentraciones iónicas diferencias entre la composición y fluidos fisiológicos. Para controlar la tonicidad, la emulsión puede comprender una sal fisiológica, tal como una sal sodio. Cloruro de sodio (NaCl), por ejemplo, se puede usar a alrededor de 0,9% (p/v) (solución salina fisiológica). Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, fosfato diácido de potasio, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc. En una modalidad ejemplar, la solución acuosa comprende 10 mM de NaCl y otras sales o agentes de tonificación no iónicos. Como se describe en la presente, los agentes tonificadores no iónicos también se pueden usar para controlar la tonicidad.

La solución acuosa puede ser de pH regulado. Se puede usar en la presente cualquier regulador de pH fisiológicamente aceptable, tales como reguladores de PH de citrato, reguladores de pH de fosfato, reguladores de pH de acetato, regulador de pH de succinato, reguladores de pH Tris, reguladores de pH de bicarbonato, reguladores de pH de carbonato, o similares. El pH de la solución acuosa será de preferencia de entre 6,0-8,0, preferiblemente a alrededor de 6,2 a aproximadamente 6,8. En algunos casos, se puede incluir cierta cantidad de sal en el regulador de pH. En otros casos, la sal en el regulador de pH podría interferir con la formación de complejos de la molécula cargada negativamente a la partícula de la emulsión, por lo tanto se evita.

La solución acuosa también puede comprender componentes adicionales tales como moléculas que cambien la osmolaridad de la solución acuosa o moléculas que estabilicen la molécula cargada negativamente después de la

formación de complejos. Por ejemplo, la osmolaridad puede ajustarse usando un agente tonificador no iónico, los cuales son generalmente carbohidratos pero también pueden ser polímeros. (véase, por ejemplo, Voet y Voet (1990) Biochemistry (John Wiley & Sons, Nueva York). Ejemplos de agentes tonificadores no iónicos adecuados incluyen azúcares (por ejemplo, trehalosa, sacrosa, dextrosa, fructosa, palatinosa reducida, etc.), alcoholes de azúcar (tales como manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, maltitol, glicerol, etc.), y combinaciones de los mismos. Si se desea, se puede usar un polímero no iónico (por ejemplo, un polialquilglicol) tal como polietilenglicol, polipropilenglicol o polibutilenglicol) o tensioactivo no iónico. Estos tipos de agentes, en particular azúcar y alcoholes de azúcar, también son crioprotectores que pueden proteger ARN, y otras moléculas cargadas negativamente, cuando sean lifoilizadas. En modalidades ejemplares, el regulador de pH comprende alrededor de 560 mM a 600 mM de trehalosa, sacrosa, sorbitol o dextrosa.

En algún caso, puede ser preferible preparar una solución acuosa que comprenda la molécula cargada negativamente como una solución hipertónica, y preparar la emulsión catiónica usando agua no adulterada o un regulador de pH hipotónico. Cuando la emulsión y la molécula cargada negativamente se combinan, la mezcla se vuelve isotónica. Por ejemplo, una solución acuosa que comprende ARN puede ser una solución hipertónica 2X, y la emulsión catiónica se puede preparar usando regulador de pH de citrato 10 mM. Cuando la solución de ARN y la emulsión se mezclan a una relación de 1:1 (v/v), la composición se vuelve isotónica. Con base en cantidades relativas deseadas de la emulsión a la solución acuosa que comprende la molécula cargada negativamente (por ejemplo, mezcla 1:1 (v/v), mezcla 2:1 (v/v), mezcla 1:2 (v/v), etc.), se puede determinar fácilmente la tonicidad de la solución acuosa que se requiera para poder lograr una mezcla isotónica.

De manera similar, las composiciones que tienen una osmolaridad fisiológica pueden ser deseables para administración *in vivo*. La osmolaridad fisiológica es de alrededor de 255 mOsm/kg de agua a aproximadamente 315 mOsm/kg de agua. Algunas veces puede ser preferible preparar una solución acuosa que comprenda la molécula cargada negativamente como una solución hiperosmolar, y preparar la emulsión catiónica usando agua no adulterada o un regulador de pH hipoosmolar. Cuando la emulsión y la molécula cargada negativamente se combinan, se logra una osmolaridad fisiológica. Con base en las cantidades relativas deseadas de la emulsión a la solución acuosa que comprende la molécula cargada negativamente (por ejemplo, mezcla 1:1 (v/v), mezcla 2:1 (v/v), mezcla 1:2 (v/v), etc.), se puede determinar fácilmente la osmolaridad de la solución acuosa que se requiera para poder lograr una mezcla iso-osmolar.

En ciertas modalidades, la solución acuosa que comprende la molécula cargada negativamente puede comprender además un polímero o un tensioactivo, o una combinación de los mismos. En una modalidad ejemplar, la emulsión de aceite en agua contiene un poloxámero. En particular, los inventores han observado que añadir Pluronic® F127 a la solución acuosa de ARN antes de la formación de complejos a partículas de emulsión catiónicas llevó a mayor estabilidad y resistencia a RNasa incrementada de la molécula de ARN. La adición de pluronic F127 a solución acuosa de ARN también se encontró que reduce el tamaño de partícula del complejo ARN/CNE. Los polímeros poloxámeros pueden facilitar también una ruptura del complejo/liberación adecuadas de la molécula de ARN, y evitar la agregación de las partículas de la emulsión, y tener un efecto inmunomodulador. Otros polímeros que pueden usarse incluyen, por ejemplo, Pluronic® F68 o PEG300.

Como alternativa o además, la solución acuosa que comprende la molécula cargada negativamente puede comprender alrededor de 0,05% a aproximadamente 20% (p/v) de polímero. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender un polímero (por ejemplo, un poloxámero tal como Pluronic® F127, Pluronic® F68 o PEG300) a alrededor de 0,05% a aproximadamente 10% (p/v), tal como 0,05%, 0,5%, 1% o 5%.

El sistema de regulación de pH puede comprender cualquier combinación de dos o más moléculas descritas arriba (sal, regulador de pH, sacárido, polímero, etc.). En una modalidad preferida, el regulador de pH comprende 560 mM de sacrosa, 20 mM de NaCl y 2 mM de citrato, que se puede mezclar con una emulsión catiónica de aceite en agua descrita en la presente para producir una fase acuosa final que comprenda 280 mM de sacrosa, 10 mM de NaCl y 1 mM de citrato.

5. PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende una molécula cargada negativamente (ARN) que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, que comprende: (i) proporcionar una emulsión catiónica de aceite en agua como la descrita en la presente; (ii) proporcionar una solución acuosa que comprenda la molécula cargada negativamente (tal como ARN); y (iii) combinar la emulsión de aceite en agua de (i) y la solución acuosa de (iii), de tal forma que la molécula cargada negativamente, se compleja con la partícula de la emulsión. Por ejemplo, una emulsión catiónica de aceite en agua puede combinarse con una solución acuosa que comprenda una molécula cargada negativamente (por ejemplo, una solución de ARN acuosa) en cualesquier cantidades relativas deseadas, por ejemplo, aproximadamente 1:1 (v/v), alrededor de 1,5:1 (v/v), aproximadamente 2:1 (v/v), alrededor de 2,5:1 (v/v), aproximadamente 3:1 (v/v), alrededor de 3,5:1 (v/v), aproximadamente 4:1 (v/v), alrededor de 5:1 (v/v), aproximadamente 10:1 (v/v), alrededor de 1:1,5 (v/v), aproximadamente 1:2 (v/v), alrededor de 1:2,5 (v/v), aproximadamente 1:3 (v/v), alrededor de 1:3,5 (v/v), aproximadamente 1:4 (v/v), alrededor de 1:1,5 (v/v) o aproximadamente 1:1,10 (v/v), etc.

La concentración de cada componente de la composición post-complejo (por ejemplo, complejo ARN-emulsión) puede determinarse fácilmente de acuerdo con cantidades relativas de la emulsión de aceite en agua de pre-complejo y la solución acuosa que comprenda la molécula cargada negativamente (por ejemplo una solución de ARN acuosa) que sean usadas. Por ejemplo, cuando la emulsión catiónica de aceite en agua se combine con una

- 5 solución acuosa que comprenda una molécula cargada negativamente (por ejemplo, una solución acuosa de ARN) a una relación 1:1 (v:v), las concentraciones del aceite y lípido catiónico se vuelven ½ de aquella de la emulsión pre-complejo. Por lo tanto, si una emulsión que comprende 4,3% (p/v) de escualeno, 1,4 mg/mL de DOTAP, 0,5% v/v de SPAN85 y 0,5% v/v de Tween 80 (referido aquí como "CNE17") se combina con una solución acuosa de ARN que comprende 560 mM de sucrosa, 20 mM de NaCl, 2 mM de citrato y 1% (p/v) de Pluronic F127 a 1:1 (v:v), la
- 10 composición post-complejo comprende 2,15% (p/v) de escualeno, 0,7 mg/mL de DOTAP, 0,25% v/v de SPAN85, 0,25% v/v de Tween 80, 280 mM de sucrosa, 10 mM de NaCl, 1 mM de citrato y 0,5% (p/v) de Pluronic F127.

Se pueden incluir etapas opcionales y adicionales para promover la formación de partículas, para mejorar la formación de complejos entre las moléculas cargadas negativamente y las partículas catiónicas, para incrementar la estabilidad de la molécula cargada negativamente (por ejemplo, para evitar la degradación de una molécula de ARN), para facilitar la ruptura del complejo/liberación adecuada de las moléculas cargadas negativamente (tales como una molécula de ARN), o para prevenir la agregación de las partículas de emulsión. Por ejemplo, se puede añadir a la solución acuosa un polímero (por ejemplo, Pluronic® F127) o un tensioactivo que comprenda la molécula cargada negativamente (tal como ARN). En una modalidad ejemplar, Pluronic® F127 se añade a la molécula de ARN antes de la formación de complejos a la partícula de emulsión.

- 20 El tamaño de las partículas de emulsión puede variarse al cambiar la relación de tensioactivo a aceite (incrementar la relación reduce el tamaño de gotita), presión operativa (incrementar la presión operativa reduce el tamaño de la gotita), temperatura (incrementar la temperatura reduce el tamaño de la gotita) y otros parámetros del procedimiento. El tamaño de partícula real también variará con el tensioactivo, aceite y lípido catiónico particulares usados, y con las condiciones operativas particulares seleccionadas. El tamaño de partícula de emulsión puede verificarse mediante el uso de instrumentos de configuración, tales como el analizador de partículas de submicras comercial (modelo N4MD) fabricado por Coulter Corporation, y los parámetros pueden ser variados usando los lineamientos mostrados arriba hasta que el diámetro promedio de las partículas sea menor que 1 µm, menor que 0,9 µm, menor que 0,8 µm, menor que 0,7 µm, menor que 0,6 µm, menor que 0,5 µm, menor que 0,4 µm, menor que 0,3 µm, menor que 0,2 µm, o menor que 0,1 µm. De preferencia, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 400 nm o menos, o alrededor de 300 nm o menos, aproximadamente 200 nm o menos, alrededor de 180 nm o menos, aproximadamente 150 nm o menos, o alrededor de 140 nm o menos, de aproximadamente 50 nm a 180 nm, de alrededor de 60 nm a 180 nm, de aproximadamente 70 a 180 nm, o de alrededor de 80 nm a 180 nm, de aproximadamente 80 nm a 170 nm, de alrededor de 80 nm a 160 nm, de aproximadamente 80 nm a 150 nm, o de alrededor de 80 nm a 140 nm. En algunos casos, puede ser deseable que el tamaño de partícula medio de las emulsiones catiónicas sea de 200 nm o menos para permitir la filtración estéril. En otros casos, la filtración estéril no se requiere y el tamaño de partícula medio de las emulsiones catiónicas puede ser mayor que 200 nm.
- 25
- 30
- 35

Procedimientos opcionales para preparar la emulsión catiónica de aceite en agua (emulsión de pre-formación de complejos), o el complejo molécula cargada negativamente-emulsión, incluyen, por ejemplo, esterilización, selección de tamaño de partícula (por ejemplo, remoción de partículas grandes), relleno, empaque y etiquetado, etc.

- 40 Por ejemplo, si la emulsión pre-formación de complejos, o el complejo molécula cargada negativamente-emulsión, se formula para administración *in vivo*, puede ser esterilizada, por ejemplo, al filtrar a través de un filtro grado esterilización (por ejemplo, a través de un filtro de 0,22 micras). Otras técnicas de esterilización incluyen un procedimiento térmico, o un procedimiento de esterilización por radiación, o al uso de luz pulsada para producir una composición estéril.
- 45 La emulsión catiónica de aceite en agua descrita en la presente se puede usar para fabricar vacunas. Emulsiones catiónicas de aceite en agua estériles y/o grado clínico pueden prepararse usando procedimientos similares a los descritos para MF59. Véase, por ejemplo, Ott et al., *Methods in Molecular Medicine*, 2000, volumen 42, 211-228, en *VACCINE ADJUVANTS* (O'Hagan ed.), Human Press. Por ejemplo, en forma similar al procedimiento de fabricación de MF59, la fase de aceite y la fase acuosa de la emulsión pueden combinarse y procesarse en un homogeneizador en línea para producir una emulsión gruesa. La emulsión gruesa puede ser luego alimentada en un microfluidizador, en donde puede procesarse más para obtener una emulsión en submicras estable. La emulsión gruesa puede ser pasada a través de la cámara del microfluidizador repetidamente hasta que se obtenga el tamaño de partícula deseada. La emulsión completa puede ser luego filtrada (por ejemplo, a través de un filtro de 0,22 µm bajo nitrógeno) para eliminar partículas grandes, produciendo un grupo de emulsión que puede ser relleno en recipientes adecuados (por ejemplo, botellas de vidrio). Para antígenos de vacuna que hayan demostrado estabilidad a largo plazo en presencia de emulsión de aceite en agua para auto almacenamiento, el antígeno y emulsión pueden combinarse y filtrarse estériles (por ejemplo, a través de una membrana de filtro de 0,22 µm). La vacuna en un solo vial combinada puede llenarse en recipientes de una sola dosis. Para antígenos de vacuna en donde la estabilidad a largo plazo no haya sido demostrada, la emulsión puede ser suministrada como un frasco separado. En tales casos, el grueso de la emulsión puede filtrarse y esterilizarse (por ejemplo, a través de una membrana de filtración de 0,22 µm), rellenarse y envasarse en frascos finales de una sola dosis.
- 50
- 55
- 60

El control de calidad puede llevarse a cabo opcionalmente en una pequeña muestra del grueso de la emulsión o vacuna mezclada, y el grueso o la vacuna mezclada se envasarán en dosis solo si la muestra pasa la prueba de control de calidad.

6. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ADMINISTRACIÓN

- 5 Las composiciones que se describen en el presente documento pueden usarse en una composición farmacéutica que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, como la descrita en la presente, y puede comprender además uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En modalidades preferidas, la composición farmacéutica es una composición inmunogénica, la cual se puede usar como una vacuna.
- 10 Como alternativa, las composiciones descritas en la presente pueden usarse para suministrar una molécula cargada negativamente a células. Por ejemplo, moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) pueden ser suministradas a células para una variedad de propósitos, tales como para inducir la producción de un producto genético deseado (por ejemplo, proteína), para regular la expresión de un gen, para terapia génica y similares. Las composiciones descritas en la presente también se pueden usar para suministrar una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) a células para propósitos terapéuticos, tales como para tratar una enfermedad tales como cánceres o enfermedades proliferativas, enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, infecciones, alergias, para inducir una respuesta inmune y similares. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico pueden ser suministradas a células para inhibir la expresión de un gen objetivo. Estas moléculas de ácido nucleico incluyen por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, moléculas de ARN de doble hebra, tales como moléculas de ARN de interferencia pequeñas y similares. Las moléculas de ARN de doble hebra, tales como moléculas de ARN de interferencia pequeñas, pueden desencadenar la interferencia de ARN, la cual silencia específicamente el gen objetivo correspondiente (supresión génica). Los oligonucleótidos antisentido son hebras individuales de ADN o ARN y son complementarias a una secuencia seleccionada. Generalmente, el ARN anti-sentido puede evitar la traducción de la proteína de ciertas hebras del ARN mensajero al unirse a ellas. Se puede usar ADN antisentido para seleccionar un ARN específico y complementario (de codificación o no codificación). Por lo tanto, las emulsiones catiónicas descritas en la presente son útiles para suministrar oligonucleótidos antisentido o moléculas de ARN de doble hebra para tratamiento de, por ejemplo, cáncer al inhibir la producción de un objetivo de oncología.

30 Las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente pueden administrarse individualmente o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. El procedimiento de administración incluye, pero no está limitado a, administración oral, administración rectal, administración parenteral, administración subcutánea, administración intravenosa, administración intravítreo, administración intramuscular, administración por inhalación e intranasal, administración tópica, administración oftálmica o administración ótica.

35 Una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones descritas en la presente variará dependiendo de, entre otras cosas, la enfermedad indicada, la severidad de la enfermedad, la edad y salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto administrado, el modo de administración y el tratamiento deseado.

40 En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adicionales pueden incluir, pero no están limitados a, antibióticos o agentes antibacterianos, agentes antieméticos, agentes antimicóticos, agentes antiinflamatorios, agentes antivirales, agentes inmunomoduladores, citocinas, antidepresivos, hormonas, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumor, agentes antimítoticos, inhibidores de topoisomerasa, agentes citostáticos, agentes anti-invasión, agentes antiangiogénicos, inhibidores de factor de crecimiento, inhibidores de función de replicación viral, inhibidores de enzimas virales, agentes anticáncer, α-interferones, β-interferones, ribavirina, hormonas y otros moduladores de receptores tipo toll, inmunoglobulinas (Igs) y anticuerpos que modulan la función de Ig (tales como anti-IgE (omalizumab)).

45 En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas provistas en la presente se usan en el tratamiento de enfermedades infecciosas que incluyen, pero no están limitadas a, enfermedades causadas por los patógenos descritos en la presente, incluyendo enfermedades virales tales como verrugas genitales, verrugas comunes, verrugas plantares, rabia, virus sincitial respiratorio (RSV), hepatitis B, hepatitis C, virus del dengue, fiebre amarilla, virus del herpes simple (a manera de ejemplo únicamente, HSV-1, HSV-II, CMV o VZV), *molluscum contagiosum*, 50 *vaccinia*, *viruela*, *lentivirus*, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis (virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis A), *citomegalovirus* (CMV), virus de la varicela zoster (VZV, por sus siglas en inglés), *rinovirus*, *enterovirus* (por ejemplo, EV71), *adenovirus*, *coronavirus* (por ejemplo, SARS), virus de la influenza, parainfluenza, paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, *papovavirus*, *hepadnavirus*, *flavivirus*, *retrovirus*, *arenavirus* (a manera de ejemplo únicamente, LCM, virus de Junin, virus 55 de Machupo, virus de Guanarito y fiebre de Lassa) y *filovirus* (a manera de ejemplo únicamente, virus del ébola o virus de marburg).

En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas provistas en la presente se usan en el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y protozoarias incluyendo, pero no limitadas a, paludismo, tuberculosis y *micobacterium avium*, lepra; *pneumocystis carni*, criptosporidiosis, histoplasmosis, toxoplasmosis, infección por

trípanosomas, leishmaniasis, infecciones causadas por bacterias de los géneros *Escherichi*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* y *Chlamydia*, e infecciones micóticas tales como candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis y meningitis criptocócica.

5 En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas provistas en la presente se usan en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos respiratorios, trastornos dermatológicos, enfermedades y/o trastornos oculares, enfermedades y/o trastornos genitourinarios incluyendo, rechazo de aloinjertos, autoinmune y alérgico, cáncer o piel dañada o envejecida tal como cicatrización o arrugas.

10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición como se desvela en el presente documento para su uso en un procedimiento para generar o potenciar una respuesta inmune en un sujeto que lo requiera, tal como un mamífero, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición como la descrita en la presente. La respuesta inmune es de preferencia protectora e incluye preferiblemente anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. El procedimiento se puede usar para inducir una respuesta inmune primaria y/o para potenciar una respuesta inmune.

15 En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente pueden usarse como un medicamento, por ejemplo, para usarse en elevar o incrementar una respuesta inmune en un sujeto que lo requiera, tal como un mamífero.

En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente pueden usarse en la elaboración de un medicamento para generar o potenciar una respuesta inmune en un sujeto que lo requiera, tal como un mamífero.

20 Una composición o una vacuna desveladas en el presente documento puede usarse en un dispositivo de suministro prellenado con una composición o una vacuna descrita aquí.

25 El mamífero es de preferencia un humano, pero puede ser, una vaca, un cerdo, un pollo, un gato o un perro, ya que los patógenos cubiertos en la presente pueden ser problemáticos a través de una amplia variedad de especies. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es de preferencia un niño (por ejemplo, un bebé o lactante), o adolescente o un adulto; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es de preferencia un adolescente o un adulto. Una vacuna diseñada para niños también puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

30 Una manera de verificar la eficacia del tratamiento terapéutico incluye monitorear la infección por patógenos después de la administración de las composiciones o vacunas descritas en la presente. Una manera de revisar la eficacia del tratamiento profiláctico incluye monitorear respuestas inmunes, sistémicamente (tal como monitorear el nivel de la producción de IgG1 e IgG2a) y/o mucosamente (tal como monitorear el nivel de producción de IgA), contra el antígeno. Típicamente, respuestas de anticuerpos séricos específicas de antígeno se determinan post-inmunización pero pre-ataque mientras que las respuestas de anticuerpos mucosales específicas de antígenos se determinan post-inmunización y post-ataque.

35 Otra manera de evaluar la inmunogenicidad de las composiciones o vacunas descritas en la presente cuando la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el ARN) codifica para un antígeno de proteína es expresar el antígeno de proteína de manera recombinante para tamizar sueros o secreciones mucosas de pacientes mediante immunoblot y/o microdisposiciones. Una reacción positiva entre la proteína y la muestra del paciente indica que el paciente ha desarrollado una respuesta inmune a la proteína en cuestión. Este procedimiento también se puede usar para identificar antígenos inmunodominantes y/o epítopos dentro de antígenos de proteínas.

40 La eficacia de las composiciones también se puede determinar *in vivo* al atacar modelos animales adecuados del patógeno de la infección de interés.

45 La dosis puede ser un programa de una sola dosis o un programa de varias dosis. Se pueden usar varias dosis en un programa de inmunización primario y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de dosis múltiples las diferentes dosis pueden darse por la misma o diferentes rutas, por ejemplo, un cebo parenteral y refuerzo mucosal, un cebo mucosal y refuerzo parenteral, etc. Varias dosis serán típicamente administradas con una semana de separación (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, alrededor de 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, alrededor de 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, alrededor de 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, alrededor de 16 semanas, etc.).

50 Las composiciones descritas aquí que incluyen uno o más antígenos o se usan en conjunto con uno o más antígenos pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. De esta manera un sujeto humano puede tener menos de 1 año 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 sujetos preferidos para recibir las composiciones son los ancianos (por ejemplo, >50 años de edad, >60 años de edad y de preferencia > 65 años), los jóvenes (por ejemplo, < 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de salud, personal de servicios armados y militares, mujeres embarazadas, aquellos crónicamente enfermos o pacientes inmunodeficientes. Las composiciones no son adecuadas únicamente para estos grupos, sin embargo, y se pueden usar más generalmente en una población.

Las composiciones descritas en la presente que incluyen uno o más antígenos o se usan en conjunto con uno o más antígenos pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional del cuidado de salud al centro de vacunación). Otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna para sarampión, una vacuna para paperas, una vacuna para

5 MMR, una vacuna para varicela, una vacuna para MMRV, una vacuna para difteria, una vacuna para tétanos, una vacuna para los ferina, una vacuna para DTP, una vacuna para *H. influenzae* tipo b conjugada, una vacuna para virus del polio inactivado, una vacuna para el virus de la hepatitis B, una vacuna para conjugar un meningocócico (tal como una vacuna tetravalente A C W135 Y), una vacuna para virus sincitial respiratorio, etc.

10 En ciertas modalidades, las composiciones provistas en la presente incluyen o incluyen opcionalmente uno o más agentes inmunorreguladores tales como adyuvantes. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no están limitados a, un adyuvante TH1, y/o un adyuvante TH2, descritos más abajo. En ciertas modalidades, los adyuvantes usados en las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente incluyen, pero no están limitados a:

1. Composiciones que contienen minerales;
2. Emulsiones de aceite;
3. Formulaciones de saponina;
4. Virosomas y partículas tipo virus;
5. Derivados bacterianos o microbianos;
6. Bioadhesivos y mucoadhesivos;
7. Liposomas;
8. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno;
9. Polifosfaceno (PCPP);
10. Péptidos de muramilo;
11. Compuestos de imidazoquinolona;
12. Compuestos de tiosemicarbazona;
13. Compuestos de triptantrina;
14. Inmunomoduladores humanos;
15. Lipopéptidos;
16. Benzenoaftriridinas;
17. Micropartículas;
18. Polinucleótidos inmunoestimuladores (tales como ARN o ADN; por ejemplo, oligonucleótidos que contengan CpG).

EJEMPLIFICACIÓN

La invención habiéndose descrito ahora generalmente, será más fácilmente entendida por referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se incluyen simplemente para efectos de ilustración de ciertos aspectos y modalidades de la 35 presente invención, y no se intenta que limiten la invención.

EJEMPLO 1: DESARROLLO DE EMULSIONES CATIÓNICAS DE ACEITE EN AGUA

Se desarrollaron tres tipos de nanoemulsiones catiónicas (CNE, por sus siglas en inglés) para el suministro de ARN de auto replicación. Las emulsiones tipo I son emulsiones tipo "MF59". Estas emulsiones se hicieron a partir de los mismos componentes que MF59 con excepción de que se añaden lípidos catiónicos. Las emulsiones tipo 2 son emulsiones que reemplazan al SPAN 85 y Tween 80 en MF59 con fosfolípidos. Las emulsiones tipo 3 son emulsiones híbridas que son estabilizadas ya sea por lípidos u otros tensioactivos y pueden tener polímeros o tensioactivos adicionales en la fase acuosa de la emulsión.

40 Se usaron tres tipos diferentes de lípidos en la preparación de las emulsiones tipo 1: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (sal clorhidrato) (DOTAP), clorhidrato de 3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoyl]colesterol (DC colesterol) y dimetildioctadecilamonio (sal Bromuro) (DDA). Se usó DOTAP en la preparación de emulsiones tipo 2 y tipo 3.

45 El término relación N/P se refiere a la cantidad de nitrógeno en el lípido catiónico en relación con la cantidad de fosfatos en el ARN. El nitrógeno es el elemento de soporte de carga dentro de los lípidos catiónicos probados. El fosfato se puede encontrar en el esqueleto del ARN. Una relación de carga N/P de 10/1 indica que hay diez nitrógenos cargados positivamente a partir del lípido catiónico presente por cada fosfato cargado negativamente en el ARN.

50 *CNEs tipo 1:*

55 La relación de Tween 80, Span 85, escualeno y regulador de pH de citrato no cambió para esta clase de emulsiones. Estas emulsiones se prepararon a las mismas concentraciones que MF59. La cantidad total de lípido catiónico dada por dosis permanece constante no obstante de la concentración de lípidos. Por ejemplo, una dosis de 10 µg de ARN suministrada en una emulsión con 0,8 mg/ml de emulsión DOTAP a una relación N/P de 10/1 requeriría de una dilución 2x. En consecuencia la cantidad de escualeno suministrada sería la mitad de lo que normalmente se administra durante la inmunización con MF59. Como alternativa, una dosis de 10 µg de ARN suministrada en una

emulsión con 1,6 mg/ml de DOTAP a una relación N/P de 10/1 requeriría de una dilución 4x.

En este ejemplo, se prepararon 17 formulaciones diferentes de emulsiones tipo 1. Los intervalos de lípidos catiónicos que fueron capaces de hacerse en emulsiones se listan a continuación:

Tabla 1

DOTAP	0,8 mg/ml hasta 1,6 mg/ml
Colesterol DC	0,62 mg/ml hasta 2,46 mg/ml
DDA	0,73 mg/ml hasta 1,64 mg/ml

- 5 Las formulaciones con concentraciones de DOTAP de 0,8 mg/ml hasta 1,6 mg/ml todas produjeron emulsiones estables. Las formulaciones con concentraciones de DC colesterol de 0,62 mg/ml hasta 2,46 mg/ml todas produjeron emulsiones estables. Las formulaciones con concentraciones de DDA de 0,73 mg/ml hasta 1,64 mg/ml todas produjeron emulsiones estables.

CNEs tipo 2:

- 10 El porcentaje de escualeno varió con los CNEs tipo 2. Otra diferencia de MF59 es que estas emulsiones se hicieron en agua y no en regulador de pH de citrato. Estas emulsiones se hicieron con 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) y fosfatidilcolina (PC de huevo) como estabilizadores lípidos. Las emulsiones se hicieron usando DOPE y PC de huevo ya sea con DOTAP, colesterol CD o DDA a las concentraciones optimizadas a partir de los estudios de la emulsión tipo 1.
- 15 Se hizo una serie separada de emulsiones usando solo DOTAP como el estabilizador. Estas emulsiones contenían varias cantidades de escualeno (de 0,43% p/p hasta la concentración de MF59 de 4,3% p/p).

CNEs tipo 3:

- 20 La adición de Pluronic® F127 (poloxámero) al ARN antes de la formación de complejos con una emulsión de DOTAP/PC de huevo llevó a una mayor estabilidad para RNasa en comparación con una muestra que no tuvo el poloxámero añadido a ésta. Esto indica el papel de este polímero en permitir una mejor formación de complejos de ARN con la gotita de aceite.

La adición de una pequeña cantidad de Tween 80 (0,08% p/p) durante la etapa de emulsificación de las emulsiones únicamente con DOTAP llevó a un tamaño de gotita más pequeño.

Procedimientos para preparar emulsiones catiónicas:

- 25 Escualeno, trioleato de sorbitan (Span 85), monooleato de polioxi-etilen sorbitan (Tween 80) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, E.U.A.). Dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), clorhidrato de 3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoi]colesterol (DC-colesterol HCl), se compraron de Avanti Lipids. L-α-lisofosfatidilcolina (huevo, pollo) y 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) se compraron de Lipoid (Ludwigshafen, Alemania).
- 30 Se prepararon nanoemulsiones catiónicas (CNEs) similares a MF59 cargado como se describió previamente con modificaciones menores (Ott, Singh et al. 2002). Brevemente, componentes solubles en aceite (es decir, escualeno, Span 85, lípidos catiónicos, tensioactivos lípidos) se combinaron en un vaso de precipitados, los componentes lípidos se disolvieron en cloroformo (CHCl_3) o diclorometano (DCM). La solución lípida resultante se añadió directamente al aceite más span 85. Para un subconjunto de emulsiones (CNE01, 02, 17) el solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 2 horas en una campana de humo antes de combinar la fase acuosa y homogeneizar la muestra. Para las emulsiones restantes (CNE 12, 13, 27, 32, 35), la fase de aceite se combinó con la fase acuosa y se homogeneizó inmediatamente durante 2 minutos usando un homogeneizador IKA T25 a 24K RPM para proporcionar una solución de abastecimiento homogénea. CNE05 Se preparó al preparar una solución de abastecimiento de liposomas. Los liposomas se prepararon al evaporar la solución de 10 mg/ml de DOTAP cloroformo usando un evaporador giratorio (Buchi modelo número R200) a 300 miliTorr, de presión durante 30 minutos a una temperatura de 50°C. La evaporación del cloroformo residual se aseguró al poner las muestras durante la noche en un liofilizador Labconco. La película de lípidos se hidrató y se dispersó al añadir 1,0 mL de agua destilada desionizada y filtrada y puesta a 50°C para asegurar suspensión completa del lípido. Los liposomas resultantes se añadieron directamente al escualeno y se emulsionaron inmediatamente durante 2 minutos usando un homogeneizador IKA T25 a 24K RPM. Las emulsiones se dejaron después asentar a temperatura ambiente en una placa de agitación durante 2-3 horas después de una homogeneización primaria en una campana de humo. Las emulsiones primarias se pasaron tres a cinco veces a través de un homogeneizador microfluidezer M110S con una bobina de enfriamiento con baño de hielo a una presión de homogeneización de aproximadamente 15k-20k PSI (1,054-1,406 kg/cm²) (Microfluidics, Newton, MA). Las muestras de lotes de 20 ml se retiraron de la unidad y se

ES 2 649 896 T3

almacenaron a 4°C. La tabla 2 describe los componentes de las emulsiones.

Tabla 2

CNE	Lípido catiónico (+)	mg/ml + lípido	Tensioactivo	Escualeno	Regulador de pH/agua
CNE01	DOTAP (en CHCl3)	0,8	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato 6,5
CNE02	DOTAP (en CHCl3)	1,6	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato 6,5
CNE05	DOTAP (en CHCl3)	1,2	0,08% de Tween 80	0,5%	Agua tratada con DEPC
CNE12	DC colesterol (en DCM)	2,46	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato 6,5
CNE13	DDA (en DCM)	1,45	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato 6,5
CNE17	DOTAP (en DCM)	1,40	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato 6,5
CNE27	DOTAP (en DCM) + 30 mg de DOPE	1,40	-	4,3%	dH ₂ O libre de Rnasa
CNE32	DOTAP (en DCM) + 30,9 mg de PC de huevo	1,40	-	4,3%	dH ₂ O libre de Rnasa
CNE35	DOTAP (en DCM) + 32,16 mg de DPyPE	1,40	-	4,3%	dH ₂ O libre de Rnasa

Un procedimiento de adición de los lípidos en la fase de aceite de las emulsiones fue añadir diclorometano (DCM o cloruro de metileno) en la fase de aceite. Una vez añadido, el DCM podría ser dejado evaporar completamente. Después de la evaporación, la emulsión se pasó entonces a través del Microfluidizer. Como alternativa, en casos en los que la solubilidad del lípido sea un problema la emulsión primaria podría hacerse con el DCM aún en la fase orgánica. En ese caso, el DCM se dejaría evaporar directamente de la emulsión antes de la homogeneización secundaria.

Un procedimiento alternativo para emulsiones que contenían lípidos como estabilizadores fue hacer una película de lípidos y redhidratar la película, de tal manera que los lípidos formaran liposomas. Los liposomas se añadieron después a la fase de aceite y se procesaron como se procesó el MF59 estándar.

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DE COMPLEJOS DE ARN-PARTÍCULAS

1. Materiales y Procedimientos

Síntesis de ARN

ADN Plasmídico que codificaba para un replicón de alfavirus (ARN de auto-replicación) se usó como una plantilla para la síntesis de ARN *in vitro*. Cada replicón contiene los elementos genéticos requeridos para la replicación de ARN pero carece de secuencias que codifican para productos génicos que son necesarias para el ensamblaje de partículas. Los genes estructurales del genoma de alfavirus fueron reemplazados por secuencias que codificaban para una proteína heteróloga (cuya expresión es conducida por el promotor genómico de alfavirus). Después del suministro de los replicones a células eucarióticas, el ARN de hebra positiva se tradujo para producir cuatro proteínas no estructurales, las cuales juntas replicaron el ARN genómico y transcribieron moléculas de ARN subgenómicas abundantes que codificaban para la proteína heteróloga. Debido a la falta de expresión de las proteínas estructurales de alfavirus, los replicones fueron incapaces de generar partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago T9 se ubica hacia el extremo 5' del ADNc de alfavirus para facilitar la síntesis del ARN de replicón *in vitro*, y la ribozima de virus delta de la hepatitis (HDV) ubicada inmediatamente hacia el extremo 3' de la cola poli(A) genera el extremo 3' correcto a través de su actividad de auto-corte. Las secuencias de los cuatro plásmidos usados en los ejemplos se muestran en las figuras 7A-7B.

Después de la linearización del ADN plasmídico hacia el extremo 3' de la ribozima de HDV con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron transcritos de escorrentía *in vitro* usando bacteriófago T7 o SP6 y ARN polimerasa dependiente de ADN derivado de bacteriófago T7 o SP6. Las transcripciones se llevaron a cabo durante 2 horas a 37°C en presencia de 7,5 mM (de ARN polimerasa T7) o 5 mM (ARN polimerasa de SP6) concentración final de cada uno de los trifosfatos de nucleósido (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones provistas del fabricante (Ambion, Austin, TX). Después de la transcripción, el ADN de plantilla se digirió con TURBO DNase (Ambion, Austin, TX). El ADN de replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. ARN no tapado se tapó después de la transcripción con Enzima de Tapado de Vaccinia (VCE) usando el sistema de tapado ScriptCap m⁷G (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) como se detalla en el manual de usuario. El ARN tapado después de la transcripción se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. Como alternativa, los replicones pueden ser tapados al complementar las reacciones de transcripción con 6 mM (para ARN polimerasa T7) o 4 mM (para ARN polimerasa SP6) de m⁷G(5')ppp(5')G, un análogo de estructura de tapa no reversible (New England Biolabs, Beverly, MA) y reduciendo la concentración de trifosfato de guanosina a 1,5 mM (para ARN polimerasa T7) o 1 mM (para ARN polimerasa SP6). Los transcritos pueden ser luego purificados mediante digestión con TURBO DNase (Ambion, Austin, TX) seguida por precipitación con LiCl y un lavado en 75% de etanol.

La concentración de las muestras de ARN se determinó al medir la densidad óptica a 260 nm. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó por electroforesis en gel de agarosa de desnaturación para verificar la presencia de la construcción de longitud completa.

Formación de complejos de ARN

El número de nitrógenos en solución se calculó a partir de la concentración de lípidos catiónicos, DOTAP por ejemplo tiene un nitrógeno que puede protonarse por molécula. La concentración de ARN se usó para calcular la cantidad de fosfato en solución usando un estimado de 3 mmoles de fosfato por microgramo de ARN. Al variar la cantidad de ARN: lípido, se puede modificar la relación N/P. El ARN se complejó a las CNEs en un intervalo de relaciones nitrógeno/fosfato (N/P). El cálculo de la relación N/P se hizo al calcular el número de moles de nitrógenos protonables en la emulsión por mililitro. Para calcular el número de fosfatos, una constante de 3 nmoles de fosfato por microgramo de ARN fue usada. Una vez que se determinaron los valores, la relación adecuada de la emulsión se añadió al ARN. Usando estos valores, el ARN fue diluido a la concentración adecuada y añadido directamente a un volumen igual de emulsión mientras se arremolinaba ligeramente. La solución se dejó asentar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Una vez formado el complejo la solución resultante se eluyó a la concentración adecuada y se usó dentro de 1 hora.

Electroforesis en gel

Se llevó a cabo electroforesis en gel de desnaturación para evaluar la unión de ARN con las formulaciones catiónicas y estabilidad en presencia de RNasa A. El gel se fundió como sigue: 2 g de agarosa (Bio-Rad, Hércules, CA) se añadieron a 180 ml de agua y se calentaron en un microondas hasta disolverse y luego se enfrió a 60°C. Se añadieron después a la solución de agarosa 20 ml de regulador de pH de gel de desnaturación 10x (Ambion, Austin, TX). El gel se vertió y se dejó reposar durante al menos 45 minutos a temperatura ambiente. El gel se puso después en un tanque de gel, y se añadió 1x de regulador de pH de corrida MOPS (Ambion, Austin, TX) para cubrir el gel pocos milímetros.

Ensayo de protección contra RNasa

La digestión con RNasa se logró mediante incubación con 6,4 mAU de RNasa A por microgramo de ARN (Ambion, Hércules, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La RNasa se inactivó con proteinasa K (Novagen, Darmstadt, Alemania) al incubar la muestra a 55°C durante 10 minutos. En las muestras de inactivación post-RNasa se rompió el complejo con una mezcla 1:1 de muestra a 25:24:1, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Las muestras se invirtieron varias veces para mezclar y luego se pusieron en una centrífuga durante 15 minutos a 12k RPM. La fase acuosa se retiró de la fase orgánica y se usó para analizar el ARN. Antes de la carga (460 ng por pocillo) todas las muestras se incubaron con tinte de carga de formaldehido, se desnaturizaron durante 10 minutos a 65°C y se enfriaron a la temperatura ambiente. Marcadores Ambion Millennium se usaron para aproximar el peso molecular de la construcción de ARN. El gel se corrió a 130 V. El gel se tiñó usando 0,1% de oro SYBR de acuerdo con los lineamientos del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) en agua al mecer a temperatura ambiente durante 1 hora. Las imágenes del gel se tomaron en un sistema de formación de imágenes Bio-Rad Chemidoc XRS (Hércules, CA). Todos los estudios usaron ARN de timo de ratón de Clonetech (Mountain View, CA).

Ensayo de unión a heparina

ARN se acomplejó como se describió arriba. El complejo ARN/CNE se incubó con varias concentraciones de sulfato de heparina (Alfa Aesar, Ward Hill MA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las soluciones resultantes se centrifugaron durante 15-20 minutos. Los tubos centrífugos se perforaron con una jeringa de tuberculina y se retiró el subnaciente. La solución se ensayó después para concentración de ARN usando el kit de Ensayo Quant-it Ribogreen ARN (Invitrogen, Carlsbad CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron en un lector de placa fluorescente Biotek Synergy 4 (Winooski, VT). Los valores de ARN libre se calcularon usando una

curva estándar.

Ensayo de tamaño de partícula

El tamaño de partícula de la emulsión se midió usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, RU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los tamaños de partícula se reportan como el promedio Z (Z Ave) con el índice de polidispersión (pdi). Todas las muestras se diluyeron en agua antes de las mediciones. Además, el tamaño de partícula de la emulsión se midió usando un configurador de partícula Horiba LA-930 (Horiba Scientific, E.U.A.). Las muestras se diluyeron en agua antes de las mediciones. El potencial zeta se midió usando Zetasizer Nano ZS usando muestras diluidas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo de fosfatasa alcalina secretada (SEAP)

- 10 Para evaluar la cinética y cantidad de producción de antígeno, se administró un replicón de ARN que codificaba para SEAP con y sin formulación a ratones intramuscularmente. Grupos de 3 o 5 ratones Balb/C hembra de 8-10 semanas de edad y que pesaban aproximadamente 20 gramos se inmunizaron con CNEs que formaron complejo con ARN de replicón que codificaba para SEAP a las relaciones N/P indicadas. ARN Desnudo se formuló en PBS 1X libre de RNasa. Una dosis de 100 μ L se administró a cada ratón (50 μ L por sitio) en el músculo cuádriceps. Se tomaron muestras de sangre 1, 3 y 6 días después de la inyección. El suero se separó de la sangre inmediatamente después de la recolección, y se almacenó a -30°C hasta usar.

20 Un ensayo SEAP quimioluminiscente y Phospha-Light System (Applied Biosystems, Bedford, MA) se usó para analizar el suero. Sueros de ratón se diluyeron 1:4 en regulador de pH de dilución 1X Phospha-Light. Las muestras se pusieron en un baño de agua sellado con papel aluminio sellador y se inactivaron con calor durante 30 minutos a 65°C. Despues de enfriar en hielo durante 3 minutos y de equilibrar a la temperatura ambiente, se añadieron 50 μ L de regulador de pH de ensayo Phospha-Light a los pocillos y las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se añadieron 50 μ L de regulador de pH de reacción que contenía 1:20 de substrato CSPD® (substrato de fosfato alcalino quimioluminiscente), y la luminiscencia se midió después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió en un luminómetro Berthold Centro LB 960 (Oak Ridge, TN) con una integración de 1 segundo por pocillo. La actividad de SEAP en cada muestra se midió por duplicado y la media de estas dos mediciones es mostrada.

Electroporación

- 30 La electroporación es un procedimiento muy efectivo para el suministro de vacunas de ADN plasmídico y esta técnica se usó para suministrar ARN de auto-replicación. Los ratones fueron anestesiados bajo isofluorano, ambas patas traseras se rasuraron estrechamente para exponer el área de la extremidad que iba a ser tratada. Se injectó una dosis de 30 μ L de vacuna al músculo cuádriceps de la pata trasera usando una jeringa de insulina de ½ cc. El músculo se electroporó usando el sistema de suministro de ADN Elgen® (Inovio, San Diego). Los parámetros del instrumento son los siguientes: 60V, 2 pulsos cada uno a 60 ms. Otra dosis fue similarmente suministrada a la segunda extremidad, seguida por electroporación.

- 35 *Partículas de replicón viral (VRP, por sus siglas en inglés)*

40 Para comparar vacunas de ARN con enfoques vectorizados ARN tradicionales para lograr expresión *in vivo* de genes o antígenos reporteros, utilizamos partículas de replicón viral (VRPs) producidas en células BHK mediante los procedimientos descritos por Perri et al. En este sistema, los replicones de antígeno (o gen reportero) consistían en replicones químéricos de alfavirus (VCR) derivados del genoma de virus de la encefalitis equina Venezolana (VEEV, por sus siglas en inglés) manipulados para contener las secuencias terminales 3' (3'UTR) de virus Sindbis y una señal de empaque de virus Sindbis (PS) (véase figura 2 de Perri S., et al., J Virol 77: 10394-10403 (2003)). Estos replicones fueron empacados en VRPs al co-electroporarlos en células de riñón de hámster bebé (BHK) junto con moléculas de ARN auxiliares defectuosas que codificaban para la cápside de virus de Sindbis y genes de glicoproteína (véase figura 2 de Perri et al.). Los VRPs fueron luego cosechados y titulados mediante procedimientos estándares e inoculados en animales en fluido de cultivo u otros reguladores de pH isotónicos.

2. Análisis de tamaño de partícula de las emulsiones de aceite en agua

50 Después de la fabricación las emulsiones se analizaron para tamaño de partícula y potencial zeta. Las tablas 3 y 4 resumen el tamaño de partícula de datos y los datos de potencial zeta obtenidos antes y después de la formación de complejos a una relación N/P de 4:1 y 10:1. El tamaño de partícula de las emulsiones estuvo debajo de 160 nm para todas las formulaciones probadas cuando se midió en el configurador de partículas Nano ZS. Despues de la formación de complejos algunos de los tamaños de partícula sí se incrementaron de manera significativa particularmente a la relación N/P de 4:1. Esto es probablemente debido a la agregación y puenteo del ARN entre varias gotitas de emulsión. Los datos de Horriba coincidieron generalmente bien con las mediciones NanoZS excepto por pocos casos (CNE02 y CNE32) en donde parece haber una población de partículas más grande que no es capaz de ser analizada en el NanoZS. Todas las CNEs con excepción de CNE02 y CNE32 tuvieron un tamaño de menos de 190 nm cuando se midieron en el configurador de partículas Horiba. La baja variabilidad en tamaño indica un robusto procedimiento de procesamiento no obstante la cantidad o tipo de lípido catiónico añadida. Es

particularmente deseable que el tamaño de partícula medio esté debajo de 200 nm en tamaño para permitir filtración estéril. Todas las muestras probadas pasan este criterio.

Tabla 3: Datos de tamaño de partícula

Formulación	Medición Horiba		Medición nano ZS	
	No forma complejo	No forma complejo	4:1 N/P	10:1 N/P
CNE01	187,8	159,6	156,7	141,9
CNE02	535	121,9	-	-
CNE05	-	110,1	143,6	132,3
CNE12	127,1	124	366,6	153
CNE13	128,5	117,4	273,3	163,4
CNE17	129,4	134,8	-	164
CNE27	137,2	134,6	223,5	139,2
CNE32	279,8	114,8	185,4	134,7
CNE35	-	134,7	161,1	142,7

El potencial zeta fue ligeramente más variable que los datos de tamaño de partícula (tabla 4). Esto concuerda con nuestras expectativas toda vez que un número de las diferencias en estas formulaciones es el cambio en la concentración de lípidos catiónicos. Por ejemplo CNE01, CNE02 y CNE17 contienen cada una 0,8, 1,6 y 1,2 mg/ml de DOTAP respectivamente. El potencial zeta para estos lotes concordó con las expectativas con CNE01 que tenía el potencial zeta más bajo de 15,9 mV antes de la formación de complejos, seguido por CNE17 con un potencial zeta antes de formación de complejos de 33,4 mV, y finalmente CNE02 con un potencial zeta de 43 mV. El potencial zeta después de la formación de complejos generalmente no cambia mucho a partir del potencial zeta antes de la formación de complejos posiblemente debido al exceso de carga en las emulsiones.

Tabla 4: Potencial zeta

Formulación	No forma complejo (mV)	4:1 N/P (mV)	10:1 N/P (mV)
CNE01	15,9	41,4	36,6
CNE02	43	-	-
CNE05	74,2	44,9	15,2
CNE12	24,5	18,2	24,8
CNE13	26,3	33,2	33,4
CNE17	33,4	33,9	30,7
CNE27	63,2	25,1	26,8
CNE32	66,9	39,2	27,6
CNE35	78	23,9	43,6

3. Ensayo de estabilidad de RNasa

Para evaluar la capacidad de las emulsiones para proteger contra la degradación por RNasa se desarrolló un ensayo *in vitro* para tamizar formulaciones. La figura 1 muestra los resultados del ensayo de protección con RNasa de CNE01 y CNE17 a una relación N/P de 10:1 y 4:1. CNE01 Protegió al ARN mejor a una relación de 10:1 en comparación con la relación de 4:1. CNE17 Mostró buena protección a 10:1. La figura 2 muestra que CNE17 también fue capaz de proteger al ARN a una relación N/P de 4:1. CNE12 y 13 También protegieron el ARN (en forma similar a CNE17) ambas relaciones de carga (figura 2). La figura 3 muestra resultados similares a los de la figura 1 con CNE01 no protegiendo muy bien a una relación N/P de 4:1. CNE02 sí protegió contra RNasas muy bien a ambas relaciones N/P probadas (figuras 3 y 4). CNE04 no protegió el ARN contra la digestión por RNasa, pero CNE05 fue capaz de proteger al ARN a ambas relaciones de carga probadas (figura 5). CNE27 Mostró muy poca protección contra RNasa, mientras que CNE32 mostró ligeramente más protección, pero completamente menor que las formulaciones mencionadas previamente. CNE 35 (figura 6) fue capaz de proteger ligeramente al ARN contra la degradación de RNasa. Las 5 formulaciones totales fueron capaces de evitar la degradación del ARN *in vitro*.

4. Tamiz de SEAP *in vivo*

El replicón A306, el cual expresa fosfatasa alcalina secretada (SEAP, por sus siglas en inglés), se usó para

- determinar el nivel de expresión de proteína *in vivo* después de la administración de vectores de alfavírus. Ratones BALB/c, 5 animales por grupo, fueron administrados con vacunas intramusculares bilaterales (50 µL por extremidad) los días 0 con VRPs que expresaban SEAP (5×10^5 UI), ARN de auto-replicación desnudo (A306, 1 µg), ARN de auto-replicación suministrado usando electroforación (A306 + EP, 1 y 0,1 µg, respectivamente) y ARN de auto-replicación formulado con CNE17, CNE05 y CNE35 a una relación N/P de 10:1 producido como se describió previamente (1 µg o 0,1 µg de A306). Los niveles de SEAP en suero (unidades de luz relativas, RLU) los días 1, 3 y 6 después de vacunación intramuscular el día 0 se muestran en la tabla 5. Los datos se representan como títulos medios aritméticos de 5 ratones individuales por grupo.

Tabla 5

Grupo	Dosis (µg)	DIA1	DIA3	DIA6
VRP	5×10^5 UI	161,428	46,594	35,998
A306	1	2,992	35,000	228,614
CNE17	1	4,615	54,108	570,484
CNE17	0,1	2,509	14,772	157,386
A306+EP	1	2,047	18,208	173,176
A306+EP	0,1	1,745	8,249	56,927
CNE05	1	1,831	1,748	5,171
CNE35	1	1,712	1,811	11,005

- La tabla 5 muestra que los niveles de SEAP en suero se incrementaron cuando el ARN se formuló en CNE17 en relación con el control de ARN desnudo a una dosis similar. La expresión de SEAP se incrementó cuando el ARN se formuló en la CNE en relación con el control de VRP, pero la cinética de expresión fue muy diferente. El suministro con electroporación se tradujo en expresión de SEAP incrementada en relación con el control de ARN desnudo, pero estos niveles fueron más bajos en comparación con el nivel de expresión de SEAP cuando el ARN se formuló con CNE17. CNE05 y CNE35 Redujeron el nivel de expresión de proteína.

5. Efecto de las relaciones N/P en la expresión de SEAP (CNE17)

- El replicón A306, el cual expresa fosfatasa alcalina secretada (SEAP), se usó para determinar el nivel de expresión de proteína *in vivo* después de la administración de vectores de alfavírus. Ratones BALB/c, 5 animales por grupo, fueron administrados con vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µL por pata) los días 0 con ARN de auto-replicación desnudo (A306, 1 µg), ARN de auto-replicación formulado con CNE17, producido como se describió previamente (A306, 1 µg) a las siguientes relaciones N/P 6:1, 7:1, 8:1, 10:1, 12:1, 13:1, 14:1, 16:1.

- Los niveles de SEAP en suero (unidades de luz relativas, RLU, por sus siglas en inglés) los días 1, 3 y 6 después de vacunación intramuscular el día 0 se muestran en la tabla 6. Los datos se representan como títulos promedio aritméticos de 5 ratones individuales por grupo. Una correlación de la unión a sulfato de heparina comparada con la expresión de SEAP en el día 6 se delinea en la tabla 7. Los porcentajes de ARN liberado del complejo a 6x, 8x y 10x de sulfato de heparina, respectivamente, son indicados.

Tabla 6: Niveles de SEAP en suero (CNE17)

Grupo	Dosis de A306 (µg)	DIA1	DIA3	DIA6
A306	1	1,235	3,271	5,215
CNE17 6:1	1	6,189	17,960	131,321
CNE17 7:1	1	2,836	40,736	266,217
CNE17 8:1	1	5,737	26,823	316,274
CNE17 10:1	1	8,018	31,988	333,184
CNE17 12:1	1	7,775	23,412	295,218
CNE17 13:1	1	9,217	24,236	247,262
CNE17 14:1	1	7,317	26,072	279,585
CNE17 16:1	1	15,014	17,141	144,582

Tabla 7: Unión a heparina y expresión de SEAP el día 6 (CNE17)

Relación N/P	Sulfato de heparina 6x	Sulfato de heparina 8x	Sulfato de heparina 10x	Expresión de SEAP el día 6	Desviación estándar
4	5,4	4,9	4,6	-	-
6	7,7	16,6	32,1	131321	49229
7	15,2	27,1	42,8	266217	190144
8	20,7	39,8	50,8	316274	138669
10	53,9	72,7	79,3	333184	168456
12	45,4	71,7	88,8	295218	153891
13	-	-	-	247262	85926
14	13,1	84,1	81,5	279585	261205
16	1	47,5	84,9	144583	105973
18	0	21,1	78	-	-

Las tablas 6 y 7 muestran que los niveles de SEAP en suero se incrementaron cuando el ARN se formuló a una relación N/P de 10:1 en relación con el control de ARN desnudo a una dosis similar. Las otras relaciones N/P probadas expresaron cantidades menores de expresión de proteína en comparación con la relación N/P de 10:1, pero todas mostraron una respuesta más alta que el ARN desnudo. Debe resaltarse que los valores SEAP promedio del ARN desnudo fluctuaron considerablemente, lo cual se exemplifica en las tablas 5 y 6, con la expresión de aproximadamente 35,000 en un experimento, y 5,000 en otro. El nivel de expresión de proteína el día 6 se correlacionó bien con la liberación de heparina.

6. Efecto de las relaciones N/P en la expresión de SEAP (CNE13)

- 10 El replicón A306, que expresa fosfatasa alcalina secretada (SEAP), se usó para determinar el nivel de expresión de proteína *in vivo* después de la administración de vectores de alfavirus. Ratones BALB/c, 5 animales por grupo, fueron administrados con vacunas intramusculares bilaterales (50 µg por pata) los días 0 con ARN de auto-replicación desnudo (A306, 1 µg), ARN de auto-replicación formulado con CNE13, producido como se describió previamente (1 µg de A306) a las siguientes relaciones N/P 6:1, 8:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1.
- 15 Los niveles de SEAP en suero (unidades de luz relativas, RLU) los días 1, 3 y 6 después de vacunación intramuscular el día 0 se muestran en la tabla 8. Los datos se representan como títulos promedio aritméticos de 5 ratones individuales por grupo. Una correlación de la unión a sulfato de heparina en comparación con la expresión de SEAP el día 6 se detalla en la tabla 9. Los porcentajes de ARN liberado del complejo a 6x, 8x y 10x de sulfato de heparina, respectivamente, son indicados.

20

Tabla 8: Niveles de SEAP en suero (CNE13)

Grupo	Dosis de A306 (µg)	DIA1	DIA3	DIA6
A306	1	1,507	42,405	138,978
CNE13 18:1	1	5,425	169,971	1,104,679
CNE13 16:1	1	3,584	68,118	586,874
CNE13 14:1	1	5,199	56,314	745,815
CNE13 12:1	1	3,609	212,772	1,462,864
CNE13 10:1	1	5,538	200,506	1,103,004
CNE13 8:1	1	6,038	95,870	872,715
CNE13 6:1	1	4,116	23,000	291,485

Tabla 9: Unión a heparina y expresión de SEAP el día 6 (CNE13)

Relación N/P	Sulfato de heparina 6x	Sulfato de heparina 8x	Sulfato de heparina 10x	Expresión de SEAP el día 6	Desviación estándar
4	6,94	7,81	8,6	-	-
6	10,9	13,02	14,48	291485	313966
8	19,33	24,44	29,01	872715	530829

(continuación)

Relación N/P	Sulfato de heparina 6x	Sulfato de heparina 8x	Sulfato de heparina 10x	Expresión de SEAP el día 6	Desviación estándar
10	27,64	33,57	39,1	1103004	1095207
12	22,85	40,28	45,95	1462864	1413440
14	19,3	35,91	40,97	745815	415278
16	6,23	34,86	42,45	586875	471111
18	0,71	28,32	40,47	1104680	715503
20	0,32	13,77	42,64	-	-

Las tablas 8 y 9 muestran que los niveles de SEAP en suero se incrementaron cuando el ARN se formuló a todas las relaciones N/P probadas en relación con el control de ARN desnudo a una dosis similar. La expresión de proteína el día 6 se correlacionó bien con la liberación de heparina.

5 7. Efecto de las relaciones N/P en la expresión de SEAP (CNE01)

El replicón A306, el cual expresa fosfatasa alcalina secretada (SEAP), se usó para determinar el nivel de expresión de proteína *in vivo* después de la administración de vectores de alfavirus. Se dieron vacunas intramusculares bilaterales (50 µL por pata) a ratones BALB/c, 5 animales por grupo, el día 0 con ARN de auto-replicación desnudo (A306, 1 µg), ARN de auto-replicación formulado con CNE01, producido como se describió previamente (1 µg de A306) a las siguientes relaciones N/P 4:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1.

Los niveles de SEAP en suero (unidades de luz relativas, RLU) los días 1, 3 y 6 después de la vacunación intramuscular el día 0 se muestran en la tabla 10. Los datos se representan como unidades de luz relativas (RLUs) de la media aritmética de 5 ratones individuales por grupo. Una correlación de la unión a sulfato de heparina en comparación con la expresión de SEAP el día 6 se detalla en la tabla 11. Los porcentajes de ARN liberado del complejo a 6x, 8x y 10x de sulfato de heparina, respectivamente, son indicados.

Tabla 10: Niveles de SEAP en suero (CNE01)

Grupo	Dosis de A306 (µg)	DIA1	DIA3	DIA6
A306	1	9,102	6,567	17,994
CNE01 4:1	1	4,326	8,064	104,097
CNE01 10:1	1	5,865	14,058	237,271
CNE01 12:1	1	19,365	14,096	117,644
CNE01 14:1	1	4,841	11,531	148,937
CNE01 16:1	1	9,061	20,639	182,854
CNE01 18:1	1	13,822	45,073	285,868

Tabla 11: Unión a heparina y expresión de SEAP el día 6 de CNE01

Relación N/P	Sulfato de heparina 6x	Sulfato de heparina 8x	Sulfato de heparina 10x	Expresión de SEAP el día 6	Desviación estándar
4	59,76	66,5	69,18	104098	64504
6	70,66	73,36	72,05	-	-
8	69,96	71,36	69,14	-	-
10	66,89	66,63	63,06	237271	50946
12	58,91	55,05	51,42	117645	64871
14	55,57	45,65	38,91	148938	28513
16	52,89	39	32,36	182854	36627
18	42,42	35,21	27,74	285868	83251
19	30,04	40,73	27,63	-	-

Las tablas 10 y 11 muestran que los niveles de SEAP en suero se incrementaron cuando el ARN se formuló a todas las relaciones N/P probadas en relación con el control de ARN desnudo a una dosis similar.

EJEMPLO 3: EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS USANDO DIFERENTES ACEITES

Se hicieron una serie de emulsiones usando diferentes aceites pero dentro de la formulación de base de CNE17, es decir, 5% de aceite, 0,5% de Tween 80, 0,5% de span 85 y 1,4 mg/ml de DOTAP.

- 5 La siguiente tabla 12 delinea los cambios en aceites para cada uno de los grupos. Las clasificaciones de los aceites también se listan en la tabla 12.

Las emulsiones se probaron a una relación N/P de 10:1 y se formó un complejo como se describió previamente. A ratones BALB/c, 5 animales por grupo se les dieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µL por pata) el día 0 con VRPs que expresaban SEAP (5×10^5 UI), ARN de auto-replicación desnudo (A306, 1 µg), ARN de auto-replicación suministrado usando electroporación (A306 + EP, 1 y 0,1 µg) y ARN de auto-replicación formulado con CNE36, CNE37, CNE38 y CNE41 producido como se describió previamente (1 µg de A306). Los niveles de SEAP en suero (unidades de luz relativas, RLU) los días 1, 3 y 6 después de vacunación intramuscular el día 0 se muestran en la tabla 13. Los datos se representan como RLU de media aritmética de 5 ratones individuales por grupo.

15

Tabla 12

Emulsión	Tipo de aceite	Fuente y composición
CNE17	Escualeno	Aceite de hígado de tiburón, triterpeno
CNE36	Aceite de soja	Aceite no derivado de animal, triglicéridos formados de ácidos alfa-linolénico, linoleico, oleico, esteárico y palmítico
CNE37	Aceite de hígado de Bacalao	Aceite de hígado de pescado, altos niveles de ácidos grasos omega-3 (ácido eicosapentaenoico, ácido decosahexaenoico), vitamina A y vitamina D.
CNE38	Aceite de girasol	Aceite no derivado de animal, principalmente triglicéridos de ácido linoleico (~50%), cantidades mucho menores de ácido oleico, esteárico y palmítico
CNE41	Aceite de oliva	Aceite no derivado de animal, triglicéridos de ácidos grasos oleico, palmítico y otros

Tabla 13

Grupo	Dosis (µg)	DIA1	DIA3	DIA6
A306 + EP	1	1,403	49,969	179,916
CNE36	1	1,506	3,288	83,268
CNE37	1	1,387	1,127	1,594
CNE38	1	1,791	2,228	47,705
CNE41	1	1,369	2,113	60,039
VRP	5×10^5 UI	105,829	38,546	56,155
A306	1	1,212	6,007	95,380
A306 + MF59	1	1,219	1,656	11,667

Como se muestra en la tabla 13, CNE17 muestra el nivel más alto de expresión a lo largo de los estudios. Todas las demás emulsiones fueron inferiores a una dosis de 1 µg de ARN desnudo. CNE36 se tradujo en la expresión más alta de los nuevos aceites, seguida por CNE41 y CNE38. Una dosis de 1 µg de ARN añadida directamente a MF59 mutó la respuesta.

20

EJEMPLO 4: CNE17 MEJORÓ LA INMUNOGENICIDAD DE ANTÍGENO RSV-F EN UN MODELO DE RATÓN

1. Procedimientos

Estudios de inmunogenicidad en murinos

El replicón A317 que expresa la glicoproteína de fusión superficial de RSV (RSV-F, por sus siglas en inglés) se usó para este estudio. A ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad y que pesaban aproximadamente 20 g, 10 animales por grupo, se les dieron vacunaciones intramusculares bilaterales. Todos los animales se inyectaron en el cuádriceps en las dos patas traseras cada uno teniendo un volumen equivalente (50 µL por pata) los días 0 y 21 con VRPs que expresaban RSV-F (1×10^6 de UI), ARN de auto-replicación desnudo (A317, 1 µg), ARN de auto-replicación suministrado usando electroporación (10 µg A317+EP), o ARN de auto-replicación formulado en CNE17

(0,1 µg o 1 µg de A317). Se tomó suero para el análisis de anticuerpos los días 14 (2wp1), 35 (2wp2) y 49 (4wp2). Cuando se requirió la medición de las respuestas a células T, se cosecharon los bazos de 5 ratones por grupo el día 35 o 49 para el análisis de células T.

Ensayos de función de células T de ratón: ensayos de inmunofluorescencia de citocinas intracelulares

- 5 Dos a cinco bazos de ratones BALB/c vacunados idénticamente fueron agrupados y las suspensiones de células individuales se prepararon para cultivo. Dos cultivos estimulados con antígeno y dos cultivos no estimulados fueron establecidos para cada fondo de esplenocitos. Los cultivos estimulados con antígeno contenían 1×10^6 esplenocitos, péptido RSV F 85-93 (1×10^{-6} M), péptido RSV F 249-258 (1×10^{-6} M), péptido RSV F 51-66 (1×10^{-6} M), anti-CD28 mAb (1 mcg/mL) y Brefeldin A (1:1000). Los cultivos no estimulados no contenían péptidos RSV F, y de otra manera fueron idénticos a los cultivos estimulados. Después de cultivar durante 6 horas a 37°C, los cultivos se procesaron para inmunofluorescencia. Las células se lavaron y luego se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 marcados fluorescentemente (mAb). Las células se lavaron de nuevo y luego se fijaron con Citofix/citoperm durante 20 minutos. Las células fijadas se lavaron después con regulador de pH Perm-wash y luego se tiñeron con mAbs marcados fluorescentemente específicos para IFN-g, TNF-a, IL-2 e IL-5. Las células teñidas fueron lavadas y luego analizadas en un citómetro de flujo LSR II. Software FlowJo se usó para analizar los datos adquiridos. Los subconjuntos de células T CD4+8- y CD8+4- fueron analizadas por separado. Para cada subconjunto en una muestra dada se determinó el porcentaje de células positivas a citocinas. El % de células T específicas de antígeno RSV F se calculó como la diferencia entre el % de células positivas para citocina en los cultivos estimulados con antígeno y el % de células positivas para citocina en los cultivos no estimulados. Los límites de confianza de 95% para el % de células específicas de antígeno se determinaron usando procedimientos estándares (Statistical Methods, 7^a edición, G. W. Snedecor y W. G. Cochran).
- 10
- 15
- 20

Ensayos de función de células T de ratón: Ensayo de citocinas secretadas

- 25 Los cultivos para el ensayo de citocinas secretadas fueron similares a aquellos para el ensayo de inmunofluorescencia de citocinas intracelulares excepto que se omitió Brefeldin A. Sobrenadantes de cultivo fueron recolectados después de cultivo nocturno a 37°C, y se analizaron para múltiples citocinas usando kits de citocinas Th1/Th2 de ratón de Meso Scale Discovery. La cantidad de cada citocina por cultivo se determinó a partir de curvas estándares producidas usando citocinas recombinantes purificadas suministradas por el fabricante.

2. Inmunogenicidad mejorada por CNE17 del antígeno RSV-F en un modelo de ratón

- 30 Títulos de IgG en suero específicos para F los días 14, 35 y 49 se muestran en las tablas 14, 15 y 16. Los títulos de neutralización en suero de RSV el día 35 y 49 se muestran en la tabla 17 y las respuestas a células T en el día 49 se muestran en las tablas 18 y 19.

Tabla 14: Título de IgG en suero específicos de F en ratones el día 14

	1 µg de A317	0,1 µg de CNE17	1 µg de CNE17	10 µg de A317 + EP	1E6UI de VRP
	529	2429	3373	5	6041
	1530	2060	4417	88	4912
	2734	2012	1927	964	12923
	2503	1887	3597	7235	7075
	5539	3174	5731	2558	6829
	1033	3904	2852	5105	4885
	5110	1481	3739	9806	3680
	1106	2345	4904	2787	9813
	1493	3084	3824	2576	8631
	3456	2497	3004	1858	6314
GMT	1980	2398	3590	1180	6685

El suero se recolectó para análisis de anticuerpo los días 14 (2wp1). Los datos se representan como animales individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 15: Títulos de IgG en suero específicos de F de ratones el día 35

	1 µg de A317	0,1 µg de vCNE17	1 µg de CNE17	10 µg de A317 + EP	1E6UI de VRP
	958	48079	8473	14612	813045
	12518	17589	58556	22805	365485
	4839	8522	12053	32156	961601

ES 2 649 896 T3

(continuación)

	1 µg de A317	0,1 µg de vCNE17	1 µg de CNE17	10 µg de A317 + EP	1E6UI de VRP
	18451	30801	51514	31053	297526
	9805	13372	26348	18105	207652
	19154	5137	80686	23918	1580066
	4490	47173	21014	9091	900889
	14674	78232	61076	21006	822285
	15223	24135	25499	9835	587121
GMT	8532	20767	29111	19117	579033

El suero se recolectó para análisis de anticuerpo los días 35 (2wp2). Los datos se representan como animales individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 16: Títulos de IgG en suero específicos de F de ratones el día 49

	1 µg de A317	0,1 µg de CNE17	1 µg de CNE17	10 µg de A317 + EP	1E6UI de VRP
	958	48079	8473	14612	813045
	12518	17589	58556	22805	365485
	4839	8522	12053	32156	961601
	10128	10985	20395	24090	349215
	18451	30801	51514	31053	297526
	9805	13372	26348	18105	207652
	19154	5137	80686	23918	1580066
	4490	47173	21014	9091	900889
	14674	78232	61076	21006	822285
	15223	24135	25499	9835	587121
GMT	8532	20767	29111	19117	579033

El suero se recolectó para análisis de anticuerpo los días 49 (4wp2). Los datos se representan como animales individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 17: Títulos de neutralización en suero de RSV

	A317, 1 µg		CNE17, 0,1 µg		CNE17, 1 µg		VRP 1E6UI	
	2wp2	4wp2	2wp2	4wp2	2wp2	4wp2	2wp2	4wp2
	NA	<40	NA	<40	NA	<40	265	161
	NA	<40	NA	<40	NA	70	73	64
	NA	<40	NA	<40	NA	<40	77	126
	NA	<40	NA	<40	NA	76	140	151
	NA	<40	NA	42	NA	57	290	194
	NA	<40	NA	52	NA	<40	134	123
	NA	<40	NA	<40	NA	<40	466	1033
	NA	<40	NA	173	NA	<40	127	174
	NA	<40	NA	<40	NA	<40	75	122
	NA	<40	NA	<40	NA	<40	77	76
GMT	NA	<40	NA	29	NA	34	139	155

Se tomó suero para análisis los días 35 (2wp2) y 49 (4wp2). Los datos se representan como títulos de neutralización con una reducción de placa de 60% de ratones individuales y el título medio geométrico de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <40 (límite de detección) se le asignaba un título de 20. NA = no ensayado.

Tabla 18: Frecuencias de células T esplénicas CD4+ específicas para RSV F el día 49 (4wp2)

Respuestas de linfocitos T esplénicos 4wp2	CD4+CD8-: Reestimulación del péptido F51-66			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 UI	0,07 ± 0,06	0,04 ± 0,05	0,00 ± 0,02	0,10 ± 0,04
1 µg de A317	0,00 ± 0,05	0,05 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
CNE17, 1 µg	0,00 ± 0,05	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,05 ± 0,02
CNE17, 0,1 µg	0,00 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,02
10 µg de A317 + EP	0,02 ± 0,06	0,04 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,03
ninguno	0,04 ± 0,06	0,00 ± 0,05	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,01

Se muestran la frecuencia positiva de citocinas neta (específica de antígenos) (%) ± intervalo medio de 95% de confianza. Las frecuencias netas mostradas en negritas indican respuestas estimuladas que fueron estadísticamente significativas >0.

Tabla 19: Frecuencias de células T esplénicas CD8+ específicas para RSV F el día 49 (4wp2)

Respuestas de linfocitos T esplénicos 4wp2	CD8+CD4-: Reestimulación de los péptidos F85-93, F249-258			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 UI	3,48 ± 0,29	1,21 ± 0,18	-0,03 ± 0,05	3,31 ± 0,28
1 µg de A317	0,74 ± 0,15	0,46 ± 0,11	-0,03 ± 0,04	0,70 ± 0,14
CNE17, 1 µg	1,25 ± 0,17	0,60 ± 0,12	0,01 ± 0,03	1,15 ± 0,16
CNE17, 0,1 µg	0,89 ± 0,15	0,49 ± 0,11	-0,03 ± 0,04	0,83 ± 0,14
10 µg de A317 + EP	0,85 ± 0,15	0,53 ± 0,11	0,01 ± 0,04	0,72 ± 0,15
ninguno	0,01 ± 0,07	0,00 ± 0,05	-0,02 ± 0,05	0,02 ± 0,06

Se muestran la frecuencia positiva de citocinas neta (específica de antígenos) (%) ± intervalo medio de 95% de confianza. Las frecuencias netas mostradas en negritas indican respuestas estimuladas que fueron estadísticamente significativas >0.

Como se muestra en las tablas 14-19, la formulación de CNE17 incrementó la inmunogenicidad, según se determina por los títulos de IgG específica de F incrementados (incremento de 5 veces de 4wp2), títulos de neutralización y respuestas a células T CD4 y CD8, en relación con el control de ADN desnudo. La electroporación del ARN incrementó la inmunogenicidad en relación con el control de ARN desnudo, pero fue más baja que el suministro de CNE17. En forma importante, las respuestas inmunes provocadas en grupos CNE17 fluctuaron mucho menos en comparación con aquellas del ARN desnudo. Por ejemplo, las muestras del día 14 a partir del grupo de ARN de auto-replicación desnudo de 1 µg dieron títulos de anticuerpo de entre 529 y 5110, mientras que las muestras de ARN formuladas con CNE17 a una dosis de 1 µg dieron títulos de anticuerpo de entre 1927 y 5731. Además, todos los animales en el grupo de CNE17 respondieron con una respuesta robusta y fueron reforzados muy bien. En contraste, algunos animales en el grupo de ARN desnudo no reforzaron significativamente.

EJEMPLO 5: INMUNOGENICIDAD DE LOS COMPLEJOS ARN-PARTÍCULA EN UN MODELO DE RATA

1. Procedimientos

15 Vacuna de subunidad de trímero de RSV-F

El trímero RSV F es una proteína recombinante que comprende el ectodominio de RSV F con una supresión de la región de péptido de fusión que impide la asociación con otros trímeros. La construcción resultante forma un trímero homogéneo, según se observa por cromatografía de exclusión de tamaño, y tiene un fenotipo esperado consistente con una conformación F postfusión observada mediante microscopía electrónica. La proteína fue expresada en células de insecto y purificada en virtud de un marcador HIS en fusión con el extremo C de la construcción seguido por cromatografía de exclusión de tamaño usando técnicas convencionales. La muestra de proteínas resultante exhibe más de 95% de pureza. Para la evaluación *in vivo* de la vacuna de la subunidad F, 100 µg/mL de proteína trímera se adsorbieron en 2 mg/mL de alumbre usando 10 mM de regulador de pH de histidina, pH 6,3 y la isotonicidad se ajustó con cloruro de sodio a 150 mM. La proteína de la subunidad F fue adsorbida en alumbre durante la noche con agitación suave a 2-8°C.

Vacunación y ataque de ratas algodón

Ratas algodón hembra (*Sigmodon hispidus*) fueron obtenidas de Harlan Laboratories. Todos los estudios fueron

aprobados y llevados a cabo de acuerdo con el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Novartis. Los grupos de animales fueron inmunizados intramuscularmente (i.m., 100 µl) con las vacunas indicadas los días 0 y 21. Las muestras de suero se tomaron 3 semanas después de la primera inmunización y 2 semanas después de la segunda inmunización. Los animales de control inmunizados o no vacunados fueron atacados intranasalmente (i.n.) con 5 1×10^5 PFU de RSV 4 semanas después de la inmunización final. La toma de sangre y ataque con RSV se llevaron a cabo bajo anestesia con isoflurano al 3% usando un vaporizador de precisión.

ELISA específica de RSV F

Muestras de suero individuales se ensayaron para la presencia de IgG específica de RSV F mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Placas de ELISA (MaxiSorp de 96 pocillos, Nunc) fueron recubiertas durante la noche a 4°C con 1 µg/ml de RSV F purificado (no cortadas con delp23-furdell-trunc) en PBS. Después de lavar (PBS con 0,1% de Tween-20), las placas fueron bloqueadas con regulador de pH de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1,5 horas a 37°C. Las placas fueron después lavadas, se añadieron diluciones en serie de suero en diluyente de ensayo (PBS con 0,1% de Tween 20 y 5% de suero de cabra) de ratas algodón experimentales o de control, y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. 10 Despues de lavar, las placas se incubaron con IgG anti-rata algodón de pollo conjugado a peroxidasa (HRP, por sus siglas en inglés) (Immunology Consultants Laboratory, Inc., diluido 1:5,000 en diluyente de ensayo) durante 1 hora a 37°C. Finalmente, las placas fueron lavadas y 100 µl de solución de substrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) se añadieron a cada pocillo. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de H₃PO₄ 1M, y la absorbancia se leyó a 450 nm usando un lector de placa. Para cada muestra de suero, una gráfica 15 de la densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) contra logaritmo de la dilución en suero recíproca se generó mediante regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos fueron definidos como la dilución en suero recíproca a una OD de aproximadamente 0,5 (normalizada a un estándar, sueros agrupados de ratas algodón infectadas con RSV con un título definido de 1:2,500, que se incluyó en cada placa).

20

Ensayo de microneutralización

25 Las muestras de suero se probaron para la presencia de anticuerpos neutralizantes por una prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT, por sus siglas en inglés). Diluciones en serie dos veces de suero HI (en PBS con 5% de HI-FBS) se añadieron a un volumen igual de RSV Long previamente titulado para dar aproximadamente 115 PFU/25 µl. Mezclas de suero/virus fueron incubadas durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂, para permitir que se presentara la neutralización del virus, y luego 25 µl de esta mezcla (que contenía 30 aproximadamente 115 PFU) se inoculó en pocillos duplicados de células Hep-2 en placas de 96 pocillos. Después de 2 horas a 37°C y 5% de CO₂, las células fueron cubiertas con 0,75% de metilcelulosa/EMEM 5% de HI-FBS y se incubaron durante 42 horas. El número de partículas de virus infecciosas se determinó mediante detección de la formación de sincitios por inmunotinción seguida por recuento automático. El título de neutralización se define como el recíproco de la dilución en suero que produce al menos una reducción del 60% en número de sincitios por pocillo, 35 en relación con los controles (sin suero).

Carga viral

La carga viral en el pulmón se determinó mediante ensayo de placa. Específicamente, los pulmones se cosecharon 40 5 días después de la infección con RSV y un lóbulo derecho fue puesto en 2,5 ml de Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con 25% de sucrosa y se rompió con un homogeneizador de tejidos. Sobrenadantes libres de células de estas muestras se almacenaron a -80°C. para ensayar virus infecciosos, diluciones de homogenado de pulmón clarificado (en PBS con 5% de suero bovino fetal inactivado con calor, HI-FBS) se inocularon en monocapas de células Hep-2 confluentes en un volumen de 200 µl/pocillo de una placa de 12 pocillos. Despues de 2 horas con mecimiento suave periódico (37°C, 5% de CO₂), el inóculo se retiró, y las células se cubrieron con 1,5 ml de 1,25% de agarosa SeaPlaque (Lonza) en Medio Esencial Mínimo Eagle (EMEM, Lonza) complementado con 5% de HI-FBS, glutamina y antibióticos. Despues de 3-4 días de incubación, las células fueron cubiertas de nuevo con 1 ml de agarosa al 1,25% en EMEM (Sigma) que contenía 0,1% de rojo neutro (Sigma). Las placas se cuentan un día después con la ayuda de una caja de luz.

Patología pulmonar de rata algodón

Cinco días después del ataque con RSV los pulmones fueron cosechados y 4 lóbulos de cada animal fueron 50 recogidos y fijados con 10% de formalina de pH regulado neutro (NBF) mediante instilación intratraqueal suave seguida por fijación por inmersión. Los tejidos se procesaron rutinariamente para preparar secciones teñidas con hematoxilina y eosina para el examen microscópico. Los descubrimientos se evaluaron usando una modificación de criterios previamente publicados [Prince GA, et al., 2001] para los siguientes parámetros: peribronquiolitis, alveolitis, bronquitis, infiltrados celulares perivasculares y neumonitis intersticial. Las lesiones fueron calificadas en una escala 55 semicuantitativa de 4 puntos. Cambio mínimo (+) contenía uno o pocos focos pequeños; cambio leve (++) estuvo compuesto de focos de tamaño pequeño a medio; cambio moderado (+++) contenía focos de tamaño frecuente y/o moderado y cambio marcado (****) mostró focos extensos a confluentes que afectaban a la mayoría/todos los tejidos.

2. Estudio de ataque con RSV de ratas algodón

El replicón A317, que expresa la glicoproteína de fusión de superficie de RSV (RSV-F) se usó para este estudio. Ratones algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, fueron administradas con vacunas intramusculares bilaterales (50 µL por extremidad) los días 0 y 21 con ARN de auto-replicación desnudo (A317, 1 µg o 10 µg), ARN de auto-replicación formulado con CNE17 (A317, 0,1 µg o 1 µg), VRPs (5x10⁶ UI) que expresaban RSV-F, trímero F/subunidad de alumbre (10 µg), o vacuna RSV inactivada con formalina (5200 FI-pfu). El suero se recolectó para el análisis de anticuerpo los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Todos los animales fueron atacados con 1x10⁵ pfu de RSV intranasalmente el día 49 y los pulmones se recolectaron el día 54 (5dpc) para determinación de la carga viral y patología pulmonar.

- Los títulos de IgG en suero específicos de F los días 14 y 35 se muestran en la tabla 20; títulos de anticuerpo individuales para 8 animales de grupos seleccionados a 2wp2 se muestran en la tabla 21; los títulos de neutralización en suero de RSV los días 14 y 35 se muestran en la tabla 22; los títulos virales pulmonares 5 días después del ataque con RSV se muestran en la tabla 23 y las puntuaciones de alveolitis pulmonar 5 días después del ataque con RSV se muestran en la tabla 24.

Tabla 20: Títulos de IgG en suero específicos de F de ratas algodón (*Sigmodon hispidus*)

Vacuna	Dosis	IgG específica de F	IgG específica de F
		2wp1	2wp2
A317 desnudo	10 µg	198	1599
A317 desnudo	1 µg	78	526
CNE17	1 µg	408	4918
CNE17	0,1 µg	325	2512
VRP	5x10 ⁶ UI	961	5864
Trímero F/alumbre	10 µg	3526	111893
FI-RSV	5200 FI-pfu	17	2074
Ninguno		5	5

8 Animales por grupo, después de vacunas intramusculares los días 0 y 21, Se tomó suero para análisis de anticuerpo los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2), todos los animales fueron atacados con 1x10⁵ pfu de RSV intranasalmente el día 49, Los pulmones se recolectaron el día 54 (5dpc) para determinación de carga viral y patología pulmonar, Los datos se representan como títulos medios geométricos de 8 ratas algodón individuales por grupo, Si un animal individual tiene un título <25 (límite de detección) se le asignaba un título de 5,

Tabla 21: Títulos de anticuerpos individuales a 2wp2

10 µg A317	1 µg A317	0,1 µg CNE17	1 µg CNE17
1778	612	3967	3740
1534	409	2360	3199
3144	1039	1786	3998
1174	116	3097	7173
1719	1086	1075	9005
488	869	2956	6170
1586	742	1496	6406
3200	276	6431	2800
Los títulos de anticuerpos individuales por 8 animales de grupos seleccionados (ARN desnudo y ARN formulado con CNE).			

Tabla 22: Títulos de neutralización en suero de RSV de ratas algodón (*Sigmodon hispidus*)

Vacuna	Dosis	PRNT60	PRNT60
		2wp1	2wp2
A317 desnudo	10 µg	78	240
A317 desnudo	1 µg	58	70

(continuación)

Vacuna	Dosis	PRNT60	PRNT60
		2wp1	2wp2
CNE17	1 µg	91	269
CNE17	0,1 µg	63	145
VRP	5x10 ⁶ UI	149	683
Trímero F/alumbre	10 µg	142	>5120
FI-RSV	5200 FI-pfu	28	38
Ninguno		30	<20

8 Animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se tomó suero para análisis los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Los datos se representan como 60% de títulos de neutralización de reducción de placa. El título medio geométrico de 2 fondos de 4 ratas algodón por grupo. Si un animal individual tenía un título <25 (límite de detección) se le asignaba un título de 5.

Tabla 23: Títulos virales en pulmón 5 días después del ataque con RSV de ratas de algodón (*Sigmodon hispidus*)

Vacuna	Dosis	Pfu/g pulmón 5dpc
A317 desnudo	10 µg	397
A317 desnudo	1 µg	659
CNE17	1 µg	414
CNE17	0,1 µg	572
VRP	5x10 ⁶ UI	359
Trímero F/alumbre	10 µg	190
FI-RSV	5200 FI-pfu	5248

8 Animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se tomó suero para análisis los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Los datos se representan como 60% de títulos de neutralización de reducción de placa. El título medio geométrico de 2 fondos de 4 ratas algodón por grupo. Si un animal individual tenía un título <25 (límite de detección) se le asignaba un título de 5.

Tabla 24: Alveolitis pulmonar 5 días después del ataque con RSV de ratas algodón (*Sigmodon hispidus*)

Vacuna	Dosis	# de ratas algodón con calificación de alveolitis indicada				
		0	1	2	3	4
A317 desnudo	10 µg	8				
A317 desnudo	1 µg	8				
CNE17	1 µg	8				
CNE17	0,1 µg	7	1			
VRP	5x10 ⁶ UI	3	4	1		
Trímero F/alumbre	10 µg	7	1			
FI-RSV	5200 FI-pfu	1	4	3		
Ninguno (atacado)		5	3			

8 Animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Todos los animales fueron atacados con 1x10⁶ pfu de RSV intranasalmente el día 49. Los pulmones se recolectaron el día 54 (5dpc) para determinación de carga viral y patología pulmonar. Las lesiones fueron calificadas en una escala semicuantitativa de 4 puntos. El cambio mínimo (1) contenía uno o pocos focos pequeños; cambio leve (2) estuvo compuesto de focos de tamaño pequeño a mediano; cambio moderado (3) contenía focos frecuentes y/o de tamaño moderado; y cambio marcado (4) mostró focos extensos a confluentes que afectaban la mayoría/todo el tejido.

Este estudio muestra la inmunogenicidad y capacidad protectora de ARN de replicón en el modelo RSV de rata algodón. ARN de replicón no formulado indujo anticuerpos neutralizantes IgG y RSV específicos de F en suero después de una vacunación, y que estas respuestas fueron potenciadas por una segunda vacunación. CNE Fue efectiva en este modelo, reforzando los títulos de IgG específica de F a 1 µg de ARN de replicón aproximadamente 9 veces y títulos de neutralización 4 veces después de la segunda vacunación. Además, CNE17 redujo las considerables variaciones de las respuestas inmunes que se observaron cuando se usó ARN desnudo, no obstante

de las dosis (0,1 o 1 µg), y todos los animales respondieron a vacunación. Todas las vacunas de ARN de replicón proporcionaron protección contra un ataque con RSV nasal, reduciendo la carga viral pulmonar 5 días después del ataque con RSV más de 3 órdenes de magnitud. La magnitud y capacidad protectora de la respuesta inmune generada por 1 µg de ARN de replicón formulado con CNE estuvo dentro de 2 veces la respuesta provocada por 5×10^6 VRPs.

EJEMPLO 6: EL EFECTO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA INMUNOGENICIDAD

Este ejemplo muestra que el tamaño de partícula afecta la inmunogenicidad de las formulaciones de CNE/ARN.

Los protocolos para el ensayo de tamaño de partícula y ensayo SEAP *in vivo* se describen en el ejemplo 2. Los protocolos para los estudios de inmunogenicidad de murino se describen en el ejemplo 3. La figura 8A muestra los resultados (media aritmética) del ensayo SEAP *in vivo*. La figura 8B muestra los títulos de IgG totales de animales individuales en los ratones BALB/c en los puntos de tiempo 2wp1 y 2wp2.

La formación de complejos de ARN con CNE17 incrementó el tamaño de partícula de aproximadamente 220 nm a alrededor de 300 nm (datos no mostrados). Como se muestra en las figuras 8A y 8B, al incrementarse el tamaño de partícula, se redujeron los niveles de expresión de SEAP, y se redujeron también las respuestas inmunes del anfitrión.

EJEMPLO 7: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LÍPIDOS CATIÓNICOS ALTERNATIVOS EN INMUNOGENICIDAD

1. Materiales y procedimientos

Preparación de CNEs

Se hizo una serie de emulsiones usando los siguientes lípidos catiónicos: DLinDMA, DOTMA, DOEPC, DSTAP, DODAC y DODAP. La tabla 25 describe los componentes de las emulsiones.

Las CNEs se prepararon de acuerdo con los protocolos descritos en el ejemplo 1. El complejo ARN/CNE se preparó de acuerdo con los protocolos descritos en el ejemplo 2.

Tabla 25

CNE	Lípido catiónico (+)	mg/ml + lípido	Tensioactivo	Escualeno	Regulador de pH/agua
CMF2 0	DLinDMA	1,25	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa, sin DCM)
CMF2 1	DLinDMA	1,25	0,5% de SPAN85 0,5% de Tween80	4,3%	10mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa, y 50°C de calor y sonicación; solvente evaporado después de la 1 ^a homogeneización)
CMF3 6	DODAP	1,3	0,5% de SPAN85 0,5 de Tween80	4,3%	10mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa, CHCl ₃ ; solvente evaporado antes de homogeneización)
CMF 3 7	DOTMA	1,35	0,5% de SPAN85 0,5% de Tween80	4,3%	10mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa, sin DCM)
CMF3 8	DOEPC	1,7	0,5% de SPAN85 0,5% de Tween 80	4,3%	10mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa, sin DCM)
CMF3 9	DDA	1,65	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa, solvente evaporado después de la 1 ^a homogeneización)

(continuación)

CNE	Lípido catiónico (+)	mg/ml + lípido	Tensioactivo	Escualeno	Regulador de pH/agua
CMF42	DSTAP	1,4	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa, DCM y metanol; solventes evaporados antes a homogeneización)
CMF43	DODAC	1,17	0,5% de SPAN 85 0,5% de Tween 80	4,3%	10mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa, sin DCM)

Estudios de inmunogenicidad de murinos

- 5 Las emulsiones se probaron a relaciones 10:1 N/P, 12:1 N/P o 18:1 N/P (véase tabla 26). Después el replicón de ARN y las emulsiones formaron complejo como se describió previamente en el ejemplo 2. Ratones BALB/c, 5-10 animales por grupo, fueron administrados con vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µL por pata) los días 0 con ARN de auto-replicación desnudo (A317, 1 µg), RSV01 (15) (1 µg de A317 formulado en un liposoma que contenía 40% de DlinDMA, 10% de DSPC, 48% de Chol, 2% de PEG DMG 2000), ARN de auto-replicación (A317, 1 µg) formulado con CNE13, CNE17, CMF37, CMF38 o CMF42.

2. ARN Formulado con CNE incrementó la inmunogenicidad del antígeno RSV-F en un modelo de ratón

- 10 Los títulos de IgG en suero totales (Títulos Medios Geométricos) de los grupos de ratones BALB/c el día 14 y 35 se muestran en la tabla 26 (grupos 1-8). ARN formulado con CMF37 (DOTMA) incrementó bien la respuesta inmune del anfitrión, y los títulos de IgG fueron comparables con aquellos de CNE17 (DOTAP). ARN Formulado con CMF38 (DOEPC) provocó un título de IgG ligeramente más alto que aquél de CNE17, pero el incremento no fue estadísticamente significativo. ARN formulado con DSTAP no incrementó significativamente la respuesta inmune del anfitrión, y los bajos títulos de IgG probablemente se debieron a la baja solubilidad de DSTAP en escualeno. ARN formulado con CNE13 incrementó los títulos de IgG casi 1,5 veces más que aquél de ARN formulado con liposoma (DDA). Los títulos de anticuerpos totales inducidos por ARN formulado con CMF43 (DODAC) fueron inferiores a aquellos de CNE17 (tabla 28, grupos 7 y 8).
- 15

Tabla 26

Grupo #	Descripción		2wp1	2wp2	Relación 2wp2/2wp1
	Emulsión	relación N:P			
1	Lug vA317	-	77	1,710	22,2
2	RV01(15)	-	3,441	59,557	17,3
3	CNE17 DOTAP	10:1	1,474	6,512	4,4
4	CNE13 DDA	18:1	482	8,385	17,4
5	CMF37 DOTMA	10:1	474	6,556	13,8
6	CNE16 DOEPC	12:1	1,145	9,673	8,4
7	CMF42 DSTAP	10:1	22	148	6,7
8	Liposomas de DDA	18:1	898	5,333	5,9
9	CNE17 con 300 mM de trehalosa	10:1	1,807	6,445	3,6
10	CNE17 con 300 mM de sucrosa	10:1	1,042	5,515	5,3
11	CNE17 con 300 mM de sorbitol	10:1	1,209	8,874	7,3
12	CNE17 con 300 mM de dextrosa	10:1	1,247	7,956	6,4

Los grupos 1-8 tuvieron 5 animales/grupo, y los grupos 9-12 tuvieron 10 animales/grupo.

20 **EJEMPLO 8: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LAS COMPOSICIONES REGULADORAS DE PH EN INMUNOGENICIDAD**

En este ejemplo, se prepararon diferentes emulsiones a base de CNE17 pero con diferentes componentes reguladores de pH. La tabla 27 muestra las composiciones de las emulsiones modificadas con regulador de pH.

Tabla 27

Base de emulsión	Regulador de pH/agua
CNE17:4,3% de Escualeno, 0,5% de SPAN 85, 0,5% de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	0 mM de regulador de pH de citrato (en dH ₂ O libre de RNasa, sin DCM)
CNE17:4,3% de Escualeno, 0,5% de SPAN 85, 0,5% de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	1 mM de regulador de pH de citrato (en dH ₂ O libre de RNasa, sin DCM)
CNE17:4,3% de Escualeno, 0,5% de SPAN 85, 0,5% de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	5 mM de regulador de pH de citrato (en dH ₂ O libre de RNasa, sin DCM)
CNE17:4,3% de Escualeno, 0,5% de SPAN 85, 0,5% de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 300 mM de trehalosa
CNE17:4,3% de Escualeno, 0,5% de SPAN 85, 0,5% de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 300 mM de sucrosa
CNE17:4,3% de Escualeno, 0,5% de SPAN 85, 0,5% de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 300 mM de sorbitol
CNE17:4,3% de Escualeno, 0,5% de SPAN 85, 0,5% de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 300 mM de dextrosa

El ensayo de unión *in vitro* mostró que reducir la concentración de pH de citrato causó que el ARN se uniera más estrechamente (datos no mostrados).

- 5 Los resultados de estudios de inmunogenicidad en murinos demostraron que añadir azúcares a CNE17 no impactó significativamente la inmunogenicidad del ARN formulado con CNE17 (tabla 26, grupos 9-12). Ligeros incrementos en los títulos de IgG se observaron con la adición de sorbitol y dextrosa.

La tabla 28 resume los resultados de los estudios de inmunogenicidad en murinos cuando moléculas de ARN formuladas con CNE17 se prepararon usando diferentes sistemas reguladores de pH.

Tabla 28

Grupo #	Descripción			2wp1	2wp2	Relación 2wp2/2wp1
	ARN	Emulsión	relación N:P			
1	1 µg RSV-F*	PBS	-	100	2269	23
2	RV01(15)	PBS	-	8388	105949	13
3	1 µg RSV-F*	CNE17 con 280 mM de sucrosa	10:1	898	9384	10
4	1 µg RSV-F**	CNE17 con 280 mM de sucrosa, 10 mM de NaCl, 1 mM de citrato	10:1	1032	3184	3,1
5		CNE17 con 280 mM de sucrosa, 10 mM de NaCl, 1 mM de citrato, 0,5% (p/v) y Pluronic F127	10:1	79	895	11,3

*Replicón va375, ** replicón vA317, Los replicones fueron transcritos por Ambion en regulador de pH HEPES, luego (i) precipitados con LiCl, (ii) tapados en regulador de pH Tris, y (iii) precipitados con LiCl, Todos los grupos tuvieron 8 animales/grupo,

- 10 Diferentes composiciones reguladoras de pH también afectaron el tamaño de partícula. Como se muestra en la figura 9, la adición de azúcar (sucrosa) redujo el tamaño de partícula del complejo ARN/CEN (figura 9A). La adición de bajas concentraciones de NaCl (a 10 mM) también redujo el tamaño de partícula del complejo ARN/CNE (figura 9A). El regulador de pH de citrato no afectó el tamaño de partícula del complejo de ARN/CNE (figura 9B).

- 15 Los efectos de los polímeros en el tamaño de partícula se muestran en la figura 9C. En particular, la adición de 0,5% de pluronic F127 a regulador de pH de ARN redujo el tamaño de partícula del complejo de ARN/CNE al tamaño de pre-formación de complejos (partículas de CNE sin ARN).

Los títulos de anticuerpos totales y títulos de anticuerpos neutralizantes de CNE17 en sistemas reguladores de pH preferidos, 280 mM de sucrosa, 10 mM de NaCl y 1 mM de citrato; o 280 mM de sucrosa, 10 mM de NaCl, 1 mM de citrato y 0,5% (p/v) de Pluronic F127, se muestran en la tabla 28 (grupos 4 y 5).

20 EJEMPLO 9: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE PEG-LÍPIDOS EN INMUNOGENICIDAD

En este ejemplo, se hizo una serie de emulsiones usando PEG-lípidos. La tabla 29 muestra las composiciones de estas funciones a base de PEG-lípido.

Tabla 29

CNE	Lípido catiónico (+)	mg/ml + lípido	PEG-lípido	Escualeno	Regulador de pH/agua
CMF2 2	DOTAP	1,4	PEG2K C18-1 10 mg/mL	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa)
CMF2 3	DOTAP	1,4	PEG2K C18-1 5 mg/mL	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa)
CMF2 4	DOTAP	1,4	PEG2K C14 9,6 mg/mL	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa)
CMF2 5	DOTAP	1,4	PEG2K C14 19,25 mg/mL	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa)
CMF2 6	DOTAP	1,4	PEG2K C18-1 0,7 mg/mL	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa)
CMF2 7	DOTAP	1,4	PEG2K C18-1 1,4 mg/mL	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa)
CMF2 8	DOTAP	1,4	PEG2K C14 0,7 mg/mL	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa)
CMF2 9	DOTAP	1,4	PEG2K C14 1,4 mg/mL	4,3%	10 mM de regulador de pH de citrato, pH 6,5 (en dH ₂ O libre de RNasa)

Para toda la emulsión, se usó una solución de abastecimiento de 10 mg/mL de DOTAP en DCM, y el solvente se evaporó después de la primera homogeneización. Se llevaron a cabo estudios de inmunogenicidad en murino como se describió arriba en el ejemplo 7.

- 5 La tabla 30 muestra los títulos de anticuerpo agrupados en los puntos de tiempo 2wp1 y 4wp2. Para el grupo de CNE13, el promedio de títulos de animales individuales, y los títulos medios geo son mostrados. Como se muestra en la tabla 30, las emulsiones hechas con PEG-lípidos fueron efectivas para inducir una respuesta inmune contra el antígeno RSV-F, pero los títulos de anticuerpos totales estuvieron a un nivel más bajo en comparación con el ARN formulado con CNE17. Además, incrementar la concentración de los PEG-lípidos llevó a una reducción en los títulos de anticuerpos.
- 10

Tabla 30

Grupo	ARN	Formulación	Título agrupado 2wp1	Título agrupado 4wp2
1	1 µg RSV-F*	Ninguno	780	2794
2		CNE17 (relación N/P 10:1)	1,783	12907
3		CMF26 (relación N/P 6:1), (0,7 mg/mL 2K PEG C18-1)	323	4661
4		CMF26 (relación N/P 10:1), (0,7 mg/mL 2K PEG C18-1)	336	6588
5		CMF27 (relación N/P 6:1), (1,4 mg/mL 2K PEG C18-1)	209	2119
6		CMF27 (relación N/P 10:1), (1,4 mg/mL 2K PEG C18-1)	525	3770
7		CMF28 (relación N/P 6:1), (0,7 mg/mL 2K PEG C14)	906	6923

(continuación)

Grupo	ARN	Formulación	Título agrupado 2wp1	Título agrupado 4wp2
8	1 µg RSV-F*	CMF28 (relación N/P 10:1), (0,7 mg/mL 2K PEG C14)	1,280	5532
9		CMF29 (relación N/P 6:1), (1,4 mg/mL 2K PEG C14)	159	1603
10		CMF29 (relación N/P 10:1), (1,4 mg/mL 2K PEG C14)	110	4041
11		CNE13 (relación N/P 18:1)	3,026 (promedio); 2891 (GMT)	25,738 (promedio); 23068 (GMT)

* Replicón vA317, grupos 1-10 tuvieron 5 animales/grupo y el grupo 11 tuvo 10 animales/grupo,

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una molécula de ARN que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, en la que la partícula comprende (a) un núcleo de aceite que está en fase líquida a 25 °C, y (b) un lípido catiónico.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la emulsión comprende adicionalmente un tensioactivo, tal como un tensioactivo no iónico, por ejemplo en la que el agente tensioactivo es trioleato de sorbitano (Span®85), polisorbato 80 (Tween® 80), o una combinación de los mismos, opcionalmente en la que la emulsión catiónica de aceite en agua comprende del 0,01 % al 2,5 % (v/v) de tensioactivo.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición comprende del 0,1 % al 10 % (v/v) de aceite, o en la que la emulsión comprende del 0,2 % al 9 % (v/v) de aceite.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el núcleo de aceite comprende aceite de soja, aceite de girasol, aceite de oliva, escualeno, escualano o una combinación de los mismos.
- 15 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la emulsión catiónica de aceite en agua comprende adicionalmente un polímero o un tensioactivo en la fase acuosa de la emulsión, por ejemplo en la que el polímero es un poloxámero, opcionalmente en la que la emulsión catiónica de aceite en agua comprende del 0,1 % al 10 % (v/v) de polímero.
- 20 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el lípido catiónico se selecciona entre el grupo que consiste en: 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3β-[N-(N',N'-Dimetilaminoetano)carbamoi]Colesterol (DC colesterol), dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-Dimiristoil-3-TrimetilAmonioPropano (DMTAP), dipalmitoil(C_{16:0})trimetil amonio propano (DPTAP), diestearoiltrimetilamonio propano (DSTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP) y 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA).
- 25 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4-6, en la que el lípido catiónico es:
 - (i) 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP) y la emulsión catiónica de aceite en agua comprende de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml de DOTAP;
 - (ii) 3β-[N-(N',N'-Dimetilaminoetano)-carbamoi]Colesterol (DC colesterol) y la emulsión catiónica de aceite en agua comprende de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml de DC Colesterol;
 - (iii) dimetildioctadecilamonio (DDA) y la emulsión catiónica de aceite en agua comprende de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml de DDA;
 - (iv) cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y la composición comprende de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml de DOTMA;
 - (v) 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etylfosfocolina (DOEPC) y la composición comprende de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml de DOEPC; o
 - (vi) cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio (DODAC) y la composición comprende de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml de DODAC.
- 30 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende de 280 mM a 300 mM de sacarosa, manitol, trehalosa, sacarosa, sorbitol o dextrosa.
- 35 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de ARN es una molécula de RNA autoreplicante que codifica un antígeno.
- 40 10. La composición de la reivindicación 9, en la que el ARN autoreplicante es un replicón de ARN derivado de alfavirus.
11. La composición de la reivindicación 1, en la que la partícula comprende adicionalmente un fosfolípido.
- 45 12. La composición de la reivindicación 11, en la que el fosfolípido es 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina de huevo (PC de huevo), 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE) o una combinación de las mismas.
13. Un procedimiento de preparación de una composición que comprende una molécula cargada negativamente que forma complejo con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua, que comprende:
 - (i) proporcionar una emulsión catiónica de aceite en agua, en la que las partículas de emulsión comprenden (a) un núcleo aceite que está en fase líquida a 25 °C, y (b) un lípido catiónico, y opcionalmente (c) un fosfolípido;
 - (ii) proporcionar una solución acuosa que comprende la molécula cargada negativamente, en la que la molécula cargada negativamente es una molécula de ARN, por ejemplo una molécula de ARN autoreplicante; y
 - (iii) combinar la emulsión de aceite-en-agua de (i) y la solución acuosa de (ii) de manera que la molécula cargada negativamente forme complejo con una partícula de la emulsión catiónica de aceite en agua, opcionalmente en la

que la emulsión catiónica de aceite en agua y la solución acuosa se combinan en una proporción de aproximadamente 1:1 (v/v).

14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso como un medicamento.
- 5 15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en un procedimiento de aumento o potenciación de una respuesta inmunitaria.

四
六

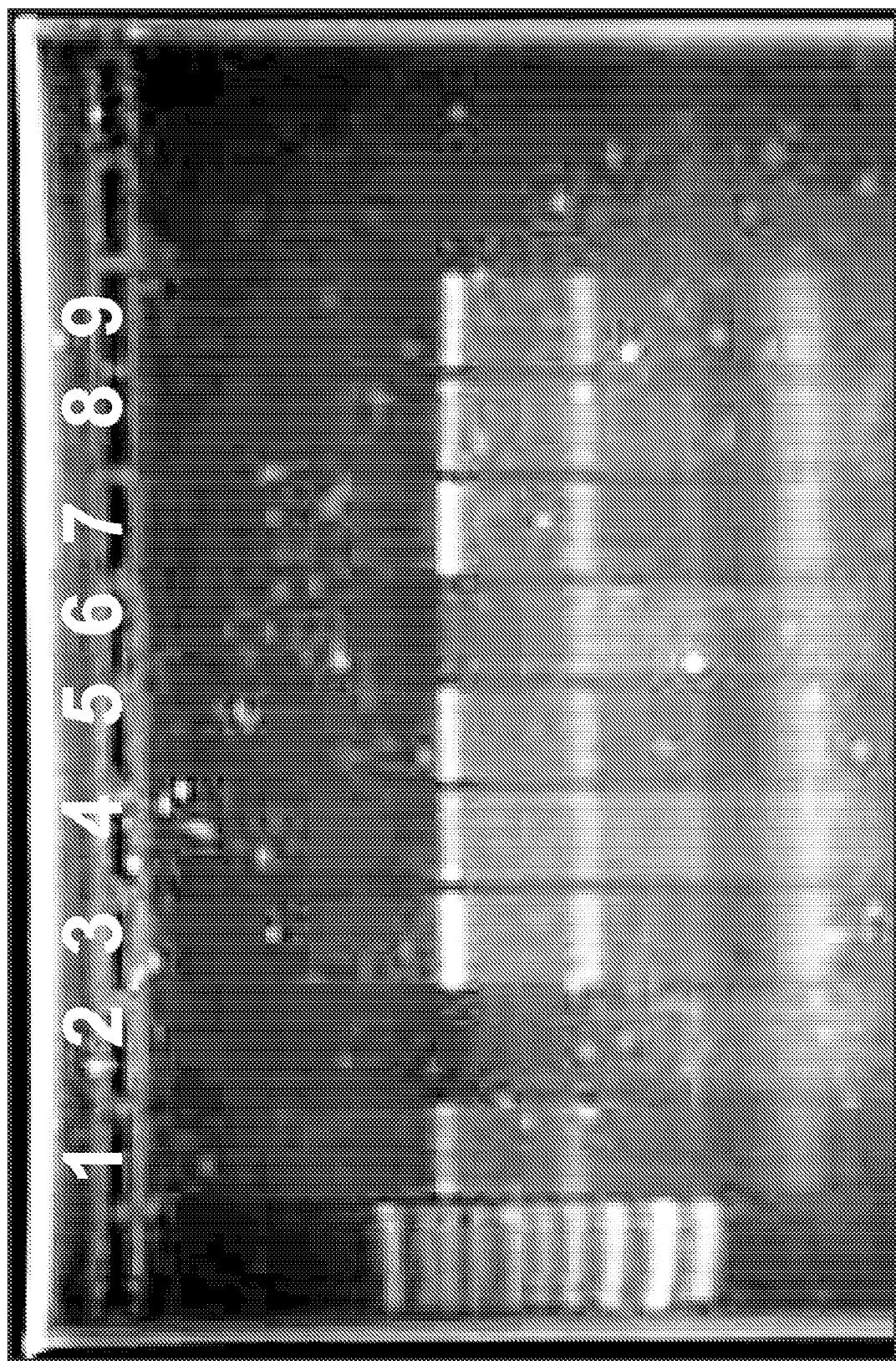


FIG. 2

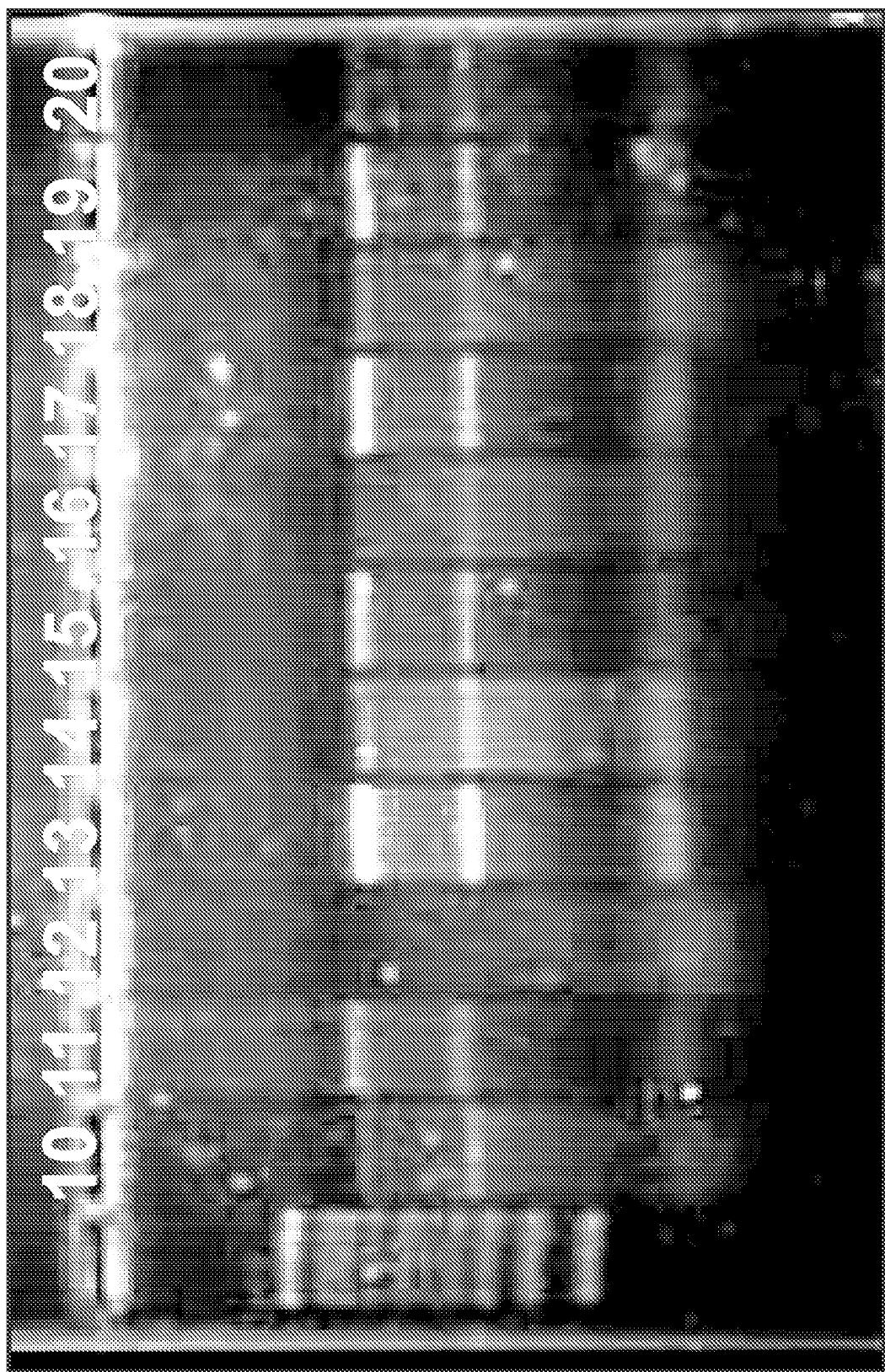


FIG. 3

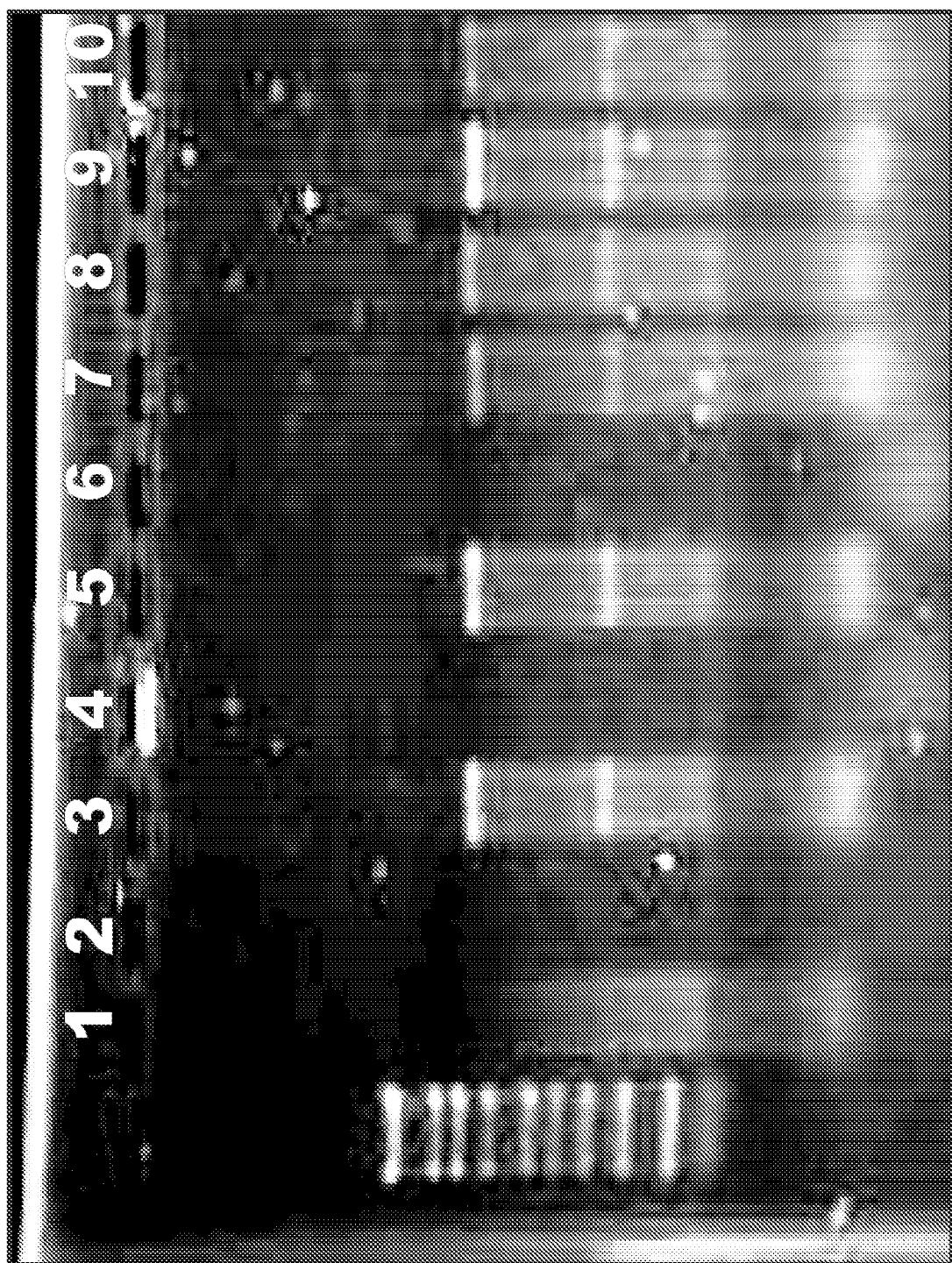
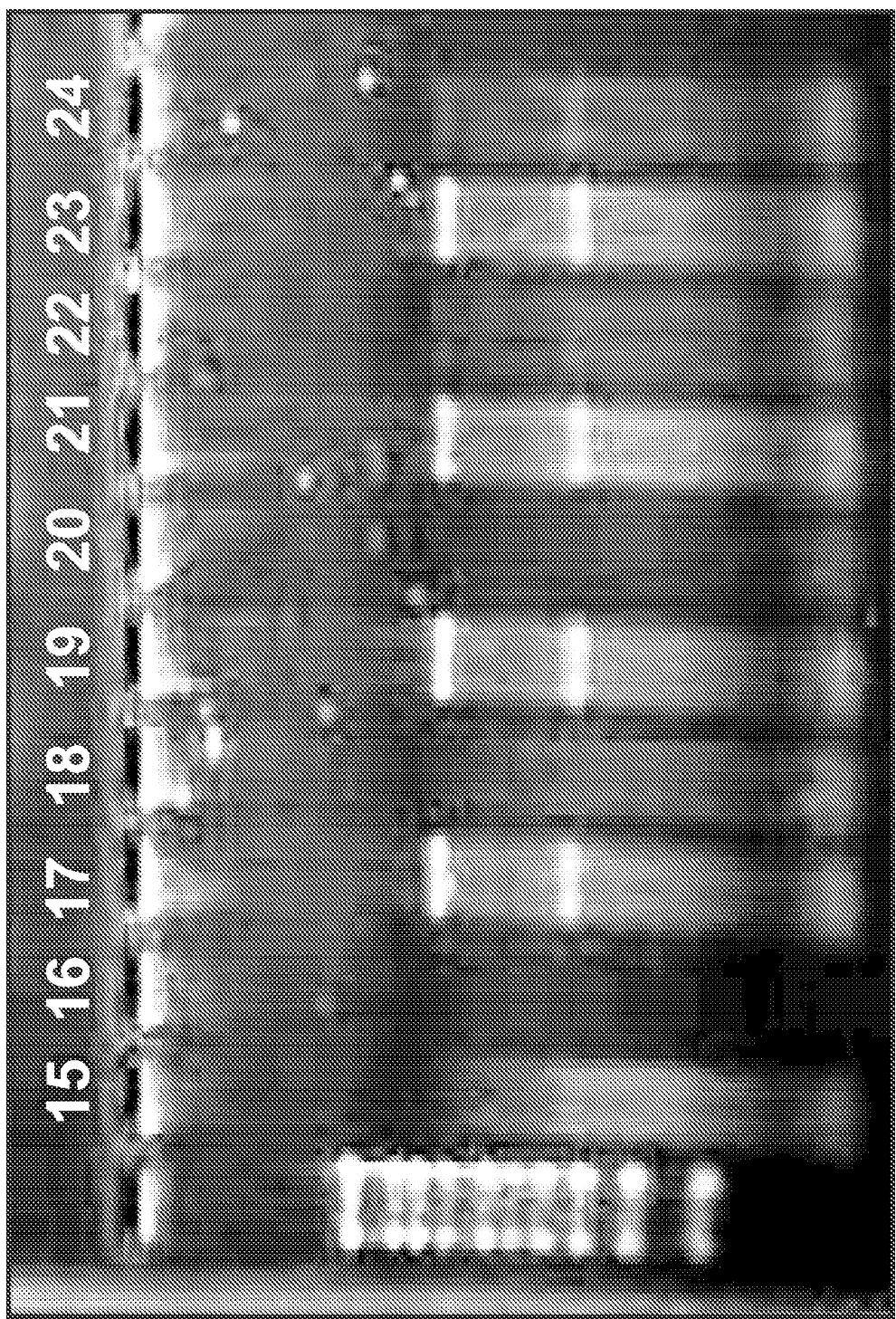


FIG. 4



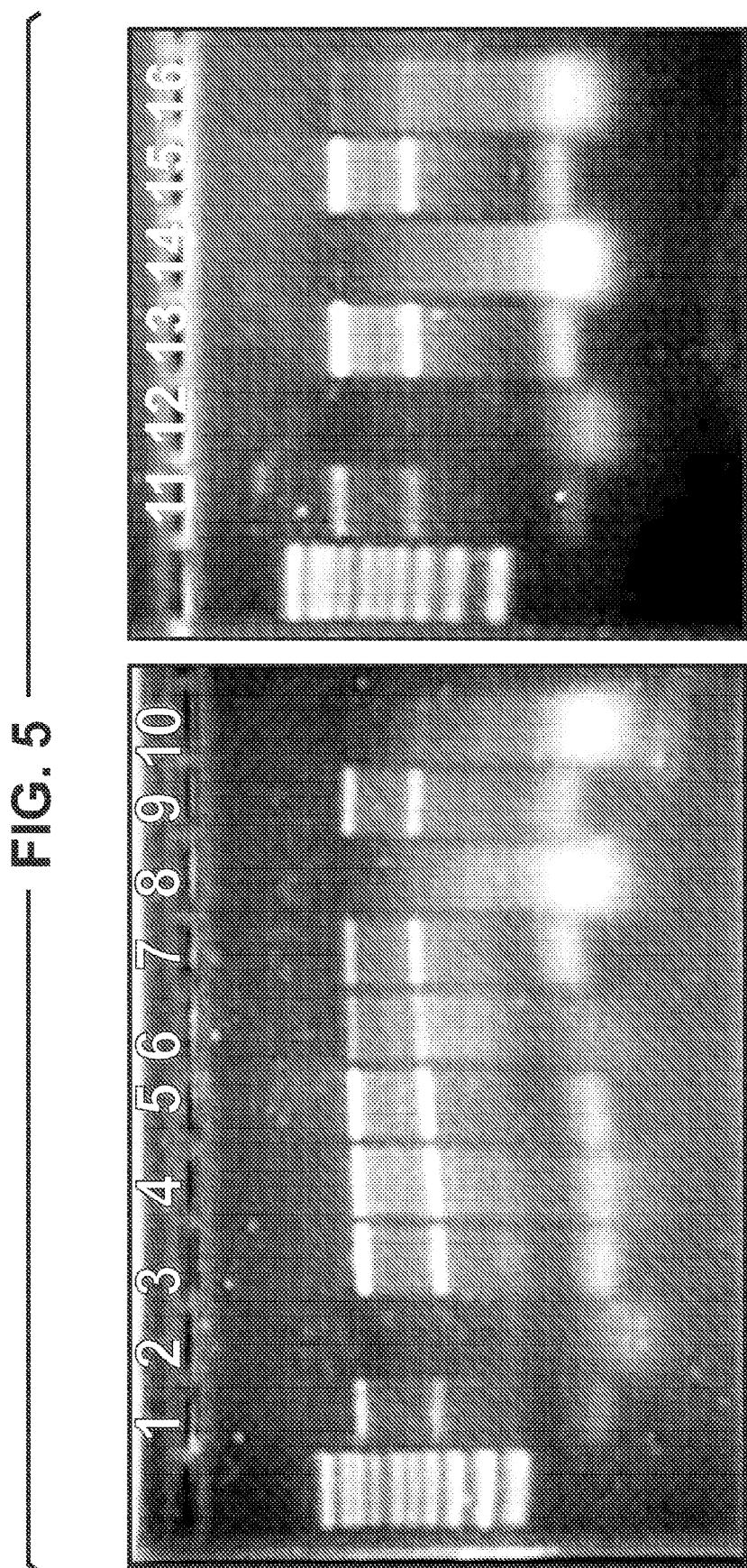


FIG. 6

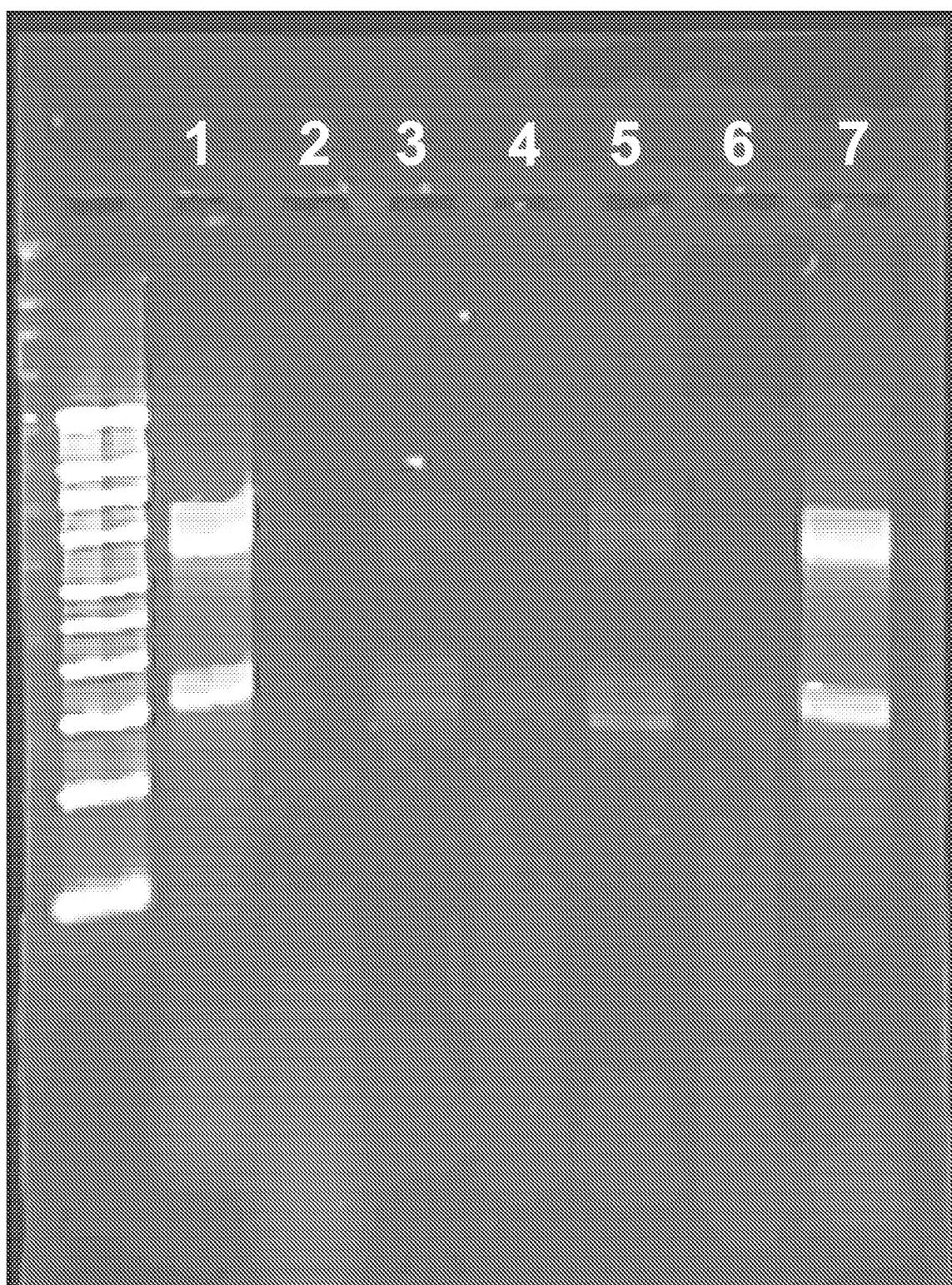


FIG. 7A

ATAGGGGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTGACATC
 GAGGAAGACAGCCCATTCTCAGAGCTTGCAGCGGAGCTCCCGCAGTTGAGGTAGAACGCCAGCA
 CGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGACGGTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAACGG
 AGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAGTGCGCCGCCGCGAGAATGTATTCTAAGCAC
 AAGTATCATTGTATCTGTCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAA
 GCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTGCCCG
 TCATGAGCGACCCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGCGTACGAA
 GGGCAAGTCGCTGTTACCAAGGATGTATACGCCGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCA
 TAAGGGAGTTAGAGTCGCTACTGGATAGGCTTGCACACCACCCCTTTATGTTAAGAACTTGGCTG
 GAGCATAATCCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTAAACGGCTCGTAACATAGGCC
 TGCACTCTGACGTATGGAGCGGTACGTAGAGGGATGTCCTTGTAGAAAAGAAGTATTGAAACC
 ATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACACAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCT
 GGCACCTGCCGCTGTATTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTAGACTATAGTT
 AGTTCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCTGTATGGAAGCCTTCAGGCTA
 TGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGAGAGGG
 TCTCTTTCCCGTGTGACGTATGTGCGCAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACA
 GATGTCAGTGGGACGACGGCAGGGAAACACTGCTGGTGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCACGGCTG
 CACCCAGAGAAACACCAATTACCATGAAAAATTACCTTTGCCGTAGTGGCCAGGGATTGCTAGGT
 GGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAAGACAGTTAGTC
 ATGGGGTGTGTTGGCTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTATAAGGCCCGGATACCCAAAC
 CATCATCAAAGTGAACACGGATTTCACACTCATCGTGTGCCAGGGATAGGCAGTAACACATTGGAGA
 TCGGGCTGAGAACAAAGAATCAGGAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTACCTCTCATTACCGCC
 GAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCG
 CGCAGCTCTACCACCTTGGCAGCTGTGTTAGGAGGCCACTCTGGAAGCCGATGTAGACTTGATGT
 TACAAGAGGCTGGGCCGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAGGTTACCAAGCTACGATGGC
 GAGGACAAGATCGGCTTACGCTGTGCTTCTCCGCAAGGCTGTACTCAAGAGTAAAAATTATCTTG
 CATCCACCCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGTAAACACACTCTGGCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGG
 AACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCAGAGGGACATGCAATTACCGTCCAGGACTTCAAGCTCTG
 AGTGAAGAGTGCACCATGGTACAACGAAACGTGAGTTGCTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCAC
 ACATGGAGGAGGGCTGAACACTGTGAGAAGAATTACAAACTGTCAAGGCCAGCGAGCACGACGGCG
 AATACCTGTACGACATCGACAGGAACAGTGCCTCAAGAAAGAACTAGTCACCTGGCTAGGGCTCACA
 GGCAGCTGGGGATCTCCCTTCCATGAATTGCCCTACGAGAGTGTGAGAACACGACCAGCCGCTCC
 TTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCTAAAGCG
 CAGTCACCAAAAAGATCTAGTGGTGAAGGCCAGAAAGAAAATGTGAGAATTATAAGGGACGTC
 AAGAAAATGAAAGGGCTGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGGCTTGAATGGATGCAAACA
 CCCCGTAGAGACCCCTGTATATTGACGAAGCTTGTGCTGTACGAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAG
 CCATTATAAGACCTAAAAGGCACTGTGCTCTGGGGATCCCAAACAGTGCCTTTTTAACATGATG
 TGCCTGAAAGTGCATTAAACCACGAGATTGACACACAAGTCTCCACAAAAGCATCTCGCCGTG
 CACTAAATCTGTGACTTCGGCGTCTCAACCTGTTACGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGA
 AAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGCAGTACCAACCTAACCGACGAGTCTCATTCTCACT
 TGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTG
 CTCTCAAGGGCTGACCGTAAAGGTGTGATGCCGTTGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACG
 CACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTA
 GCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCGGAAATTCACTGCCACGATAGAGGA
 GTGGCAAGCAGACCATGATGCCATCATGAGGACATCTGGAGAGAACCGGACCCCTACCGACGTCCTCC
 AGAATAAGGCAAACGTGTGGCAAGGCTTGTGCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATG
 ACCACTGAACAATGAAACACTGTGGATTATTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATT
 GAACCAACTATGCGTACGTTCTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTCTGCACCCACTGTG
 CGTTATCCATTAGGAATAACTCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCAACATGTACGGCTGAATAAGGAA
 GTGGTCCCGTCAGCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGA
 CATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGA

FIG. 7A (cont.)

TCCGGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAACGACTGCCATGCTTAGTCCTCCACCATATAATGAAC
 ACCCACAGAGTGACTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACGACTGTCCTGGTGGTCGGGAA
 AAGTTGCCGCCCCAGGCAAAATGGTGACTGGTGTGAGCAGCCGCTGAGGCTACCTCAGAGCTCG
 GCTGGATTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCAAATATGACATAATAATTGTTAATGTGAGGACCCAT
 ATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATTGCCATTAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCT
 TGTCTGCATCTGAATCCCAGGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCAGCGA
 AAGCATATTGGTGCTATAGCGCCAGTTCAAGTTTCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTG
 AAGAGACGGAAGTTCTGTTGTATTCACTGGGTACGATCGCAAGGCCGTACGCACAATCCTTACAAG
 CTTTCATCAACCTGACCAACATTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGGCCGTGCAACCGTACAAG
 TCATGTGGTGCAGGGGATATTGCCACGCCACCGAAGGAGTGAATTAAATGCTGCTAACAGCAAAG
 GACAACCTGGCGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGAAAGCTCGATTACAGCCG
 ATCGAAGTAGGAAAAGCGGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAACATATCATTGCGTAGGACCAA
 CTTCAACAAAGTTGGAGGTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGTTATGAGTCCATCGCTAAGA
 TTGTCACCGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGCATCTTCCGGAAAC
 AAAGATCGACTAACCAATATTGAACCATTTGCTGACAGCTTAGACACCACGTGCAAGATGTAGC
 CATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAACGAGTGG
 AGGAGATATGCATATCCGACGACTCTCAGTGACAGAACCTGATGCAAGGCTGGCATCCG
 AAGAGTCTTGGCTGGAAGGAAGGGTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTCTCATATTGGAGG
 GACCAAGTTCACCAAGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGG
 CCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCGTC
 GAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACCGCTGCCTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGA
 AAGAGTACAGGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTATCCTTCCATTGCCGA
 AGTATAGAATCACTGGTGTGAGAACGATCCAATGCTCCAGCTATATTGTTCTACCGAAAGTGCCT
 GCGTATATTCACTCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGC
 AGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACTGAACAAACCACCACTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTA
 GAACGCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATTAAGTTGCTGTCAGATGGCCCG
 ACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGAGACATTACGGCCCGCCCTGTATCTAGCTCATCCTGGTC
 CATTCCATGCATCCGACTTGTGATGTGGACAGTTATCCATACTTGACACCCGGAGGAGCTAGCG
 TGACCAAGCGGGCAACGTCAAGCGAGACTAACTCTTACTCGAAAGAGTATGGAGTTCTGGCGCGA
 CGGTGCGCTGCGCTCGAACAGTATTCAAGAACCTCCACATCCGCTCCGCCACAAGAACACCGTC
 ACTTGCAACCAAGCAGGGCTGCTCGAGAACCGACTAGTTCCACCCCGCCAGGGCTGAATAGGGTGA
 TCACTAGAGAGGGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCTAGCAGGTCGGCTCGAGAACCG
 CTGGTCTCCAACCCGCCAGCGTAAATAGGTGATTACAAGAGAGGAGTTGAGGCGTTGCTAGCACA
 ACAACAATGACGGTTGATGGGGTGCATACATCTTCTCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAAC
 AAAAATCAGTAAGGAAACGGTCTATCGAAGTGGTTGGAGAGGACGAATTGGAGATTTCGTAT
 GCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAGAATTACTACCGAAGAAATTACAGTTAAATCCACACCTGC
 TAACAGAACGAGATACCGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGC
 AAGGCCTAGGGCATTATTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCC
 TTGTATTCACTAGTGTGAAACCGTGCCTTCAAGCCCCAAGGTGCGAGTGGAAAGCCTGTAACGCCAT
 GTGAAAGAGAACTTCCGACTGTGGCTTCTACTGTATTATTCCAGAGTACCGATGCCATTGGACA
 TGGTTGACGGAGGCTCATGTCGTTAGACACTGCCAGTTTGCCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTCCA
 AAGAAACACTCCTATTGGAAACCCACAATACGATCGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCA
 GAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCGTATTGG
 ATTGGCGGCCCTTAATGTGGATGCTCAAGAAATTGCGTAAATTGAATATTGGAAACGTTT
 AAAGAAAACCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAATTAAAGGACCAA
 AGCTGCTGCTTTTGCGAAGACACATAATTGAATATGTTGCAAGGACATACCAATGGACAGGTTG
 TAATGGACTAAAGAGAGACGTGAAAGTGAACACTCCAGGAACAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTA
 CAGGTGATCCAGGCTGCCGATCGCTAGCAACAGCGTACTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTAG
 GAGATTAATGCCGAGCAGTCCAGGCTGGGATTGTGTTCTGGAAACTGACATCGCGCTGTTGATAAA
 AGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCG

FIG. 7A (cont.)

TTAATGATTCTGGAAAGACTTAGGTGGACGCAGAGCTGTGACGCTGATTGAGGCCGCTTCGGCG
AATTTCATCAATACATTGCCCACTAAAACATAAATTAAATTCCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGT
TCCTCACACTGTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTGAGAGAACGGCTA
ACCGGATCACCAGTGCAGCATTGAGATGACAATATCGTGAAGAGTCAAATCGACAAATT
AATGGCAGACAGGTGCCACCTGGTGAATATGGAAGTCAGATTAGATGCTGTTGGGGAGA
AAGCGCCTATTCTGTGGAGGGTTATTTGTGTGACTCCGTGACCGGACAGCGTGGCTGTGGCA
GACCCCCCTAAAAGGCTGTTAAGCTGGCAACCTCTGGCAGCAGACGATGAAACATGATGACAG
GAGAAGGGCATTGCATGAAAGACTCAACACGCTGAAACCGAGTGGTATTCTTCAGAGCTGTGCAAGG
CAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACITCCATCATAGTTATGGCATGACTACTCTAGCTAGC
AGTGTAAATCATCAGCTACCTGAGAGGGGCCCTATAACCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTAC
GACATAGTCTAGTCGACGCCACOATGCACTGCTGACCGACCTGCAACCGAGTGGCTGACCC
ACCCCCGGTGCCTCTGCTTGGCCAGGGGGCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAAGAGCACCTGCCAC
CCGGGTGAGCAAGGGCTACCTGAGCCGCCCTGGGACCGGGCTGGTACACCCAGCGTGTACCCATCGACG
TGTCAACATCAAAGAAAAGAAGTCCAACGGGACCCGAGGGCAAGGTGAAACTGATCAAGGAGGAACCTG
GAGAAGTACAAGAACGGGGTGCACCGAGCTGCACTGCTGATGCCAGGGCACCCCCCCCACCAAGAACGG
CCCCAGAAGAGAGCTCCCCCGTTATGAACTACACCCCTGAAACAACCCCAAGAAAACCAACCTGACCC
TGACCAAGAAGCGGAAGCGGGGTTCTGGCTTCTGCTGGCTGGGCTGGGAGGGCCATGGCCAGGGGG
GTGGGGCGTGTCCAAGGTCTGCACCTGGAACGGGAGGTGAAACAAGATCAAGTCCGCCCCCTGCTGTCCAG
CAACAAGGGGGCTGCTGCTGACCCAGCTGCTGCCCCATGCTGAAACAGGAGCTGACCC
ACTACATGACAACCAACCTGCTGCCCCATGCTGAAACAGGAGCTGACCCATGAGAACATCGAGACG
GTGATGGAGTTCCACCAAGAACACAACCGGCTGCTGGAAATCACCCGGAGTTCAAGGCTGAAACGGGG
GGTGCACCAACCCCCGGTGAACGACCTACATGCTGACCAACAGGAGCTGCTGTCCTGATCAATGACATG
CCATCACCAACGGGAGAACAAAGCTGATGACCAACACGGTCCAGATCGTGGCCAGCAGAGCTACTCG
ATCATGAGCATCATCAAAGAAGAGGCTGCTGCCCCATGGTACCGTGGTCCAGCTGCCCCCTGTAACGGCTGATG
CACCCCCCTGCTGAAAGCTGACACCAGGCCCCCTGTCACCCACCAACACCAAGAGGGCAGAACATG
CCCTGACCCCCGACCCAGGGGGCTGCTGACTGGGACAAACCCCCGGAGGGTGAAGCTTCTCCCCCAAGGG
GAGACCTGCAAGGTGCAAGGAGAACAGGGGTTCTGGCACACCATGAAACAGGCTGACCCCTGCCCCCTGG
GGTGAACCTGTCACCGTGGACATCTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCAAGACCC
ACGTGAGCAGCTGGTACACCTCCCTGGGGCCATGTCAGCTGCTGCTGACGGCAAGACCAAGTGGAC
CCCAGGAAACAAGAACGGGGGATCATGCAAGACCTGACCCAGGGTGGGACTACGTGACCAAGAACGG
CTTCCGACACCGTGAGGGTGGGCAACACACTGTAAGTGAATAAGGAGGAAGGCAACACCCCTGTAAG
TGAAGGGGGAGGGCATCATGAACTTCTACGACCCCTGGTGTTCCTGGGAGGGAGTTGGACCCAGG
ATCAGGCAAGTCACCGAGAAGATCAACGACAGGCTGGCTTICATCCCCAACAGGGAGGCTGCTGCA
CAATGTAATGCCCCCAAGAGCACCACCAATATCATGATCACCCACAAATCATCATCGTGATCATGGTCA
TCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TCCAGGCAAGGCAACCTGCAACGGGAAAGTCAACAAATATCCCCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CCAGCGCCGATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACCTCGCGGGGATTGGCATGCCGCC
TTAAAAATTTTATTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTGGCATGGCATGGCATCTCCACCTCTCGGGTCCGACCTGG
GCATCCGAAGGAGGAGCGACGTCCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGGCCACGTTAAACCAGCTCCAATT
CGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCTCACTGGCGCTGTTTACAACGTCGTGACTGGAAAAC
CTGGCGTTACCCAACTTAAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCTGGCAGCTGGCTAATAGCGAAGA
GGCCCCGACCGATGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGGCTGAATGGCAATGGGAGGCGCCCTGAGGG
GGCAGTAAAGCGGGGGGGTGTGGTGGTACCGGCAGCGTGGCTACACTGCCAGCGCCCTAGCG
CCCCTCTTCTGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
TCGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTAGTGTGCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAACTGATTAGG
GTGATGGTTACGCTAGTGGGCATGCCCTGATAGACGGTTTCTGGCCCTTGTACGTTGGAGTCCACG
TTCTTAAATAGTGGACTCTGGTCCAAACTGGAACACACTCAACCCCTATCTGGCTTATCTTGT
TTTATAAGGGATTGGCCTTGGCATGGCTATTGGTAAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTAAACG
CGAATTAAACAAATATTAACGTTACAATTAGGTGGCACTTTGGGGAAATGTGCGGGAAACCC
CTATTGTTATTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAATG
CTTCATAAATATTGAAAAAGGAAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTGCGCCCTTATTCCCTTTT
TGGGGCATTTGCCCTGTTTGTACCCAGAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATC

AGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTCGC
 CCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTAT
 TGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCAC
 CAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAG
 AGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTTTT
 GCACAAACATGGGGATCATGTAACCTCGCCTGATCGTTGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
 ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTAGCAATGCCAACACGTTGCCAAACTATTAACGCGAA
 CTACTTACTCTAGCTTCCCAGCAACAATTAAAGACTGGATGGAGGCGATAAGTTGCAGGACCACT
 TCTGGCTCGGCCCTCCGGCTGGTTATTGCTGATAAACTGGAGCCGTAGCTAGTTATCTACACGACGGGG
 AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTACTGATTAAGCATTG
 GTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACCTTAGATTGATTTAAACTCATTTTAATTAAAAA
 GGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTCGTCCAC
 TGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCCGTAACTG
 CTGCTTGCACAAAAACACCGCTACCGAGGGTGGTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTC
 TTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTCTAGTGTAGCGTAG
 TTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGT
 GGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
 CGCAGCGGTGGGTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAA
 CTGAGATAACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGGCCACGCTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTA
 TCCGGTAAGCGGCAGGGTCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGAAACGCTGGTATC
 TTTATAGTCCTGTCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
 CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCCCTTTACGGTTCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGC
 TCACATGTTCTTCCTGCCGTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACGCCCTTGAGTGAGCTG
 ATACCGCTGCCCGACGCCAGGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCA
 ATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCTGGCGATTCAATTAAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGA
 CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTT
 TACACTTATGCTCCGGCTCGTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTACACAGGAAAC
 AGCTATGACCATGATTACGCCAACGCCAACGCAATTAAACCTCACTAAAGGGAACAAAGCTGGGTACCGG
 GCCCACGCGTAATACGACTCACTATAG

FIG. 7A (cont.)

FIG. 7B

ATAGGGGGCGCATGAGAGAAGCCCCAACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGGTGTACATC
 GAGGAAGACAGGCCATTCTCTAGAGCTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTGAGGTAGAAGCCAAGCA
 GGTCACTGATAATGACCAGTCAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTCAAACACTGATCGAAACGG
 AGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAGTGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAA
 GCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAATACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTGCCGCCG
 TCATGAGCGACCCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCCTCACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAA
 GGGCAAGTCGCTGTTACAGGATGTATACGGGTTGACGGACCACAAGTCTCTATACCAAGCCA
 TAAGGGAGTTAGAGTCGCTACTGGATAGGTTGACACCACCCCTTTATGTTAAGAACATTGGCTG
 GAGCATATCCATCATACTTACCAACTGGGCCACGAAACCGTGTAAACGGCTCGTAACATAGGCCA
 TGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTGAAACC
 ATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTGACCATCTACACAGAGAAGAGGACTTACTGAGGAGCT
 GGCACCTGCCGCTGTATTCACTTACGTGGCAAGCAAATTACACATGTGCGTGTGAGACTATAGTT
 AGTTGCGACGGTACGCTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCTGTATGGAAGCCTTCAGGCTA
 TGCTGCTACGATGCACCGGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGCACAGACACATTGAACGGGGAGAGGG
 TCTCTTTCCCGTGTGACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACA
 GATGTCAGTCCGGACGACGCGAAAAACTGCTGGTGGCTCAACCAGCGTATAGTGTCAACGGT
 CACCCAGAGAAACACCAATTACCATGAAAAATTACCTTTGCCAGTGTGGCCAGGCATTGCTAGGT
 GGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGAATAGACAGTTAGTC
 ATGGGGTGTGTTGGCTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTATAAGCCCCGGATACCCAAAC
 CATCATCAAAGTGAACAGCGATTCCACTCATCGTGTGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGA
 TCGGGCTGAGAACAGAACGAAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCGTCACCTCTCATTACCGCC
 GAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGGCAGCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCG
 CGCAGCTTACACCTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCACTCTGGAAAGCCGATGTAGACTTGT
 TACAAGAGGCTGGGCCGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCTACGATG
 GAGGACAAGATGGCTCTACGCTGTGTTCTCCGAGGCTGTACTCAAGAGTAAAAATTATCTTG
 CATCCACCCCTCGCTGAACAAGTCAAGTGTGATAACACACTTGGCCAAAAGGGCTTATGCCGTGG
 AACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGACATGCAATACCGTCCAGGACTTCAAGCTCTG
 AGTGAAAGTGCACCAATTGTTACAACGAACTGAGTTGCTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCAC
 ACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAGAATATTACAAAATGTCAGGCCAGCGAGCACGACGGCG
 AATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGGCTCAAGAAAGAACTAGTCAGTGGCTAGGGCTCACA
 GGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTGCCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGGGCTCC
 TTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGATGGCTGCCAGGATCAGGAAGTCTGGCATCATTAAAGCG
 CAGTCACCAAAAAGATCTAGTGGTGGCGCAAGAAAGAAAATGTCAGAAATTATAAGGACGTC
 AAGAAAATGAAAGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGTCTTGAATGGATGCAAACA
 CCCCGTAGAGAGCCCTGTATATTGACGAAGCTTGTGCTCATGCAAGGTACTCTCAGAGGCTCATAG
 CCATTATAAGACCTAAAAGGAGTGTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGGCTTTTAAACATGATG
 TGCCTGAAAGTGCATTAAACCACGAGATTGACACTACCGGAGTACCAACGTCACACAAGC
 CACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTGTTTACGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGA
 AAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGAGTACCAACGTCACACAAGCAGGACGATCTCATTCTCACT
 TGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGC
 CTCTCAAGGGCTGACCCGTAAGGTTGTTGCTGCCGTTGGTACAAGGTTGAAATGAAAATCCTCTGTACG
 CACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGACGGAGGACCGCATCGTGTGAAAACACTA
 GCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCCTGGAAATTCACTGCCACGATAGAGGA
 GTGGCAAGCAGGACATGATGCCATCATGAGGACACATTGGAGAGACCGGACCCCTACCGACGTCTTCC
 AGAATAAGGAAACGTTGTTGGCAAGGTTAGTGGCTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATG
 ACCACTGAACAAATGGAACACTGTGGATTATTTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATT
 GAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTCTGACCCACTGTC
 CGTTATCCATTAGGAATAACTG

FIG. 7B (cont.)

GATAACTCCCCGTCGCCAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAAGTGGTCCGTAGCTCTCGCAGGTA
 CCCACAAC TG CCGT CCCCAG GTGCC ACTGG AAGAG TCTATGAC ATGA AC ACTGGTAC ACTG GCA ATT
 ATGATCCGCGATAAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCATGCTTAGTCTCCACCATAAT
 GAACACCCCACAGAGTGA CTTCTTCAATT CGTCAGCAAATGAAGGGCAGAACTGTCCCTGGTGGTCGG
 GGAAAAGTGTCCGTCCCAGGC AAAATGGTGACTGGTGTCA GACCCGGCTGAGGCTACCTTCAGAG
 CTCGGCTGGATTAGGCATCCCAGGTATGTGCCAAATATGACATAATATTGTTAATGTGAGGACC
 CCATATAAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTGACCAAGAA
 AGCTTGCTGCATCTGAATCCCGCGAACCTGTGTCA GCGATAGGTATGGTTACGCTGACAGGGCCA
 GCGAAAGCATCATTGGTGTATAGCGCCGAGGTCAAGTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCA
 CTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTGATTCAATTGGTACGATCGCAAGGCCGTACGCACAAATCCTTA
 CAAGCTTCATCAACCTTGACCAACATTATA CAGGTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGACCCCT
 CATATCATGTGGTGCAGGGGATATTGCCACGCCACCGAAGGAGTGA TTAAATGCTGCTAACAGC
 AAAGGACAACCTGGCGAGGGGTGTGGAGCGCTGTATAAGAAATCCCGGAAAGCTCGATTACA
 GCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCAGTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTGACCGTAGGAC
 CAAACTCAACAAAGTTCCGGAGGT TGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGGTTATGAGTCCATCGCT
 AAGATTGTCACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGATCTTTCCGG
 GAACAAAGATCGACTAACCAATCATGACCATTTGCTGACAGCTTAGACACCACTGATGCA GATG
 TAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAC
 GTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTCAGTGACAGAACCTGATGCA GAGGCTGGTGA
 TCCGAAGAGTTCTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACACTTCTCATATTGG
 AAGGGACCAAGTTTACCAAGCGGCCAGGATATAGCAGAAATTAAATGCCATGTGGCCGTTGCAAC
 GAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGAGAAAGCATGAGCAGTTAGGTGCAAATGCC
 CGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTGCTGTGCATCCATGCCATGACTC
 CAGAAAGAGTACAGCCTCACGTCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCTTCCATTG
 CCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAAGAAGATCCAATGCTCCAGCTATTTGTTCTACCGAAAGT
 GCCTGCGTATATTCAAGGAAGTATCTCGGAAACACCACCGTAGACGAGACTCCGGAGCCAT
 CGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGACACCTGAACAACCAACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAG
 ACTAGAACGCCATGCCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCAAAAGTTGCTGTCAAGATGG
 CCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTACGGGCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCT
 GGTCCATTCCATGCATCCGACTTTGATGTGACAGTTATCCATACCTTGACACCCCTGGAGGGAGCT
 AGCGT GACCAGCGGGGCAACGT CAGCCAGA ACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTCTGGC
 GCGACCGGTGCCTGCGCTCGAACAGTATTAGGAACCCCTCACATCCCGCTCGCGCACAAGAAC
 CGTCACCTGCACCCAGCAGGGCTGCTGAGAACCCAGCCTAGTTCCACCCGCCAGGCGTGAATAGG
 GTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGGCTTACCCGTCACGCACTCTAGCAGGTGGTCTCGAGAAC
 CAGCCTGGTCTCCAACCGCCAGCGTAAATAGGGTGA TTACAAGAGAGGAGTTGAGGC GTTCTCGTAG
 CACAACAAATGACGGTTGATGGGGTGACATCATCTTCCCTCGACACCGGTCAAGGGCATT
 CAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTCTATCGAAGTGGTGTGGAGAGGAGCGAATGGAGATT
 GTATGCCCCCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACAC
 CTGCTAACAGAACGAGATACCAAGTCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCATAACAGCTAGACGTATT
 CTGCAAGGCCTAGGGATTATTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGTACCGAACCCCTGCATCCTGT
 TCCTTGTATTCACTAGTGTAACCGTGCTTTCAAGCCCCAAGGTGCGAGTGGAAAGCCTGTAAC
 CCATGTTGAAAGAGAACTTCCGACTGTGGCTCTTACTGTATTATCCAGAGTACGATGCTATT
 GACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTGCCTGCAAAGCTGCGCAGCTT
 TCCAAAGAAACACTCTATTGGAAACCCACAATACGATCGGAGTGCCTCAGCGATCAGAACACGC
 TCCAGAACGTCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCA CGCAAATGAGAGAATTGCCCGTA
 TTGGATTGGCGGCCCTTAATGTGGATGCTCAAGAAATATGCGTGTAAATGAATATTGGGAAAC
 GTTTAAAGAAAACCCATCAGGCTTACTGAAGAAAAGTGGTAAATTACATTACCAAAATTAAAAGGAC
 CAAAAGCTGCTGCTTTTGCGAAGACACATAATTGAATATGTGCAAGGACATACCAATGGACAGG
 TTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAACATACGTAAGAACGGCCAA
 GGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGG
 TTAGGAGATTAAATGCGGTCTGCTTCCGA

FIG. 7B (cont.)

ACATTCTACACTGTTGATATGTCGGCTGAAGACITTGACCGCTATTATAGCCGAGCCTTCCAGCC
 GGGGATGTGTTCTGAAACTGACATCGCGTCTGTTGATAAAAAGTGACGGACGCCATGGCTCTGAC
 CGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACCCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGGGGCTTTCG
 GCGAAATTTCATCAATAACATTTGCCCACTAAACTAAATTAAATTGCGAGCCATGATGAAATCTGGA
 ATGTTCTCACACTGTTGTAACACAGTCATAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTGAGAGAACG
 GCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTGAGAGTACAATATCGTAAAGGAGTCAAATCGGACA
 AATTAAATGGCAGACAGGTGGCCACCTGGTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGC
 GAGAAAGGCCCTTATTCGAGGGTTATTTGTTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGGCGTGT
 GGCAGACCCCCCTAAAAAGGCTGTTAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAAACATGATGATG
 ACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAAGACTCAACACGCTGGAACCGAGTGGTATTCTTCAGAGCTGTG
 AAGGCAGTAGAAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGCCATGACTACTCTAGC
 TAGCAGTGTAAATCATTCAAGCTACCTGAGAGGGGCCCTATAACTCTACGGCTAACCTGAATGGA
 CTACGACATAGTCTAGTCAGGCCACCATGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGACCTACAGCT
 TGGGTGGCCCAAGAAGCTGCAGCCCTGCACAGACAGCCCCCAAGAACCTCATCATTTCTGGCCAT
 GGGATGGGGTGTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCTTAAAGGGCAGAAGAAGGACAAACTGGCC
 TGACATACCCCCTGGCCATGCCACCCCTGCCATATGCTCTCTGCTCCAAGACATAATGACAAAC
 ATGTCGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCACGGCTTACCTGTGCGGGTCAAGGCAACTTCCAGACCA
 GCTTGTAGTGCAGCCGGCCCTTTAACAGTGCACACCCACAGCGGCAACCGAGGTCACTTCGIGAT
 GAATGGGCCAAGAAAGCACCGAACGTCAGTGGAGTGGTAACCACACAGGAGTCCAGCAGCCCTCC
 CAGCCGGCACCTACGGCCACCGGCAACTGGTACTCGSACGCCGACGTGGCTGCCCTCCGCC
 CCCCAGGAGCCCTGGCAGGACATGGTACCCACCTCATCTCAACATGGACATTGACGGTCACTTAC
 TGGAGGGCCAAAGTACATGTTGGATGGAAACCCAGACCCCTCACTAACCCAGATGACTACAGCCAA
 GTGGGACCCAGGCTGGAGGGAGAAATCTGGTGAGGAATGGCAGGGCAAGGCCACGGGIGGGGIVAT
 CTGTCGAACCCACTGAGCTCATCCAGGCTTCCCTGACCCCTCTGACCCATCTCATGGCTCTCT
 TGAGGCTGGAGACATGAAATACGAGATCCACCGAGACTCCACACTGGACCCCTCCCTGATGGAGATGA
 CACAGGCTGCCCTGGCTCTGACGGAGAACCCCGGGCTTCTTCCCTTCTGTCGGAGGGGGTGG
 ATGGACCATGGTCATCATGAAAGCAGGGCTTACCGGCAACTGACTGAGACGATCATGTTGGACGAGCC
 CATTGACAGGGGGGGCCAGCTCACCAACCGAGGAGCACACGCTGACCCCTCGTACTGCCGACCACTCC
 ACCGCTCTCTCCCTGGAGGCTACCCCGCTGCCACGGACCTCCATCTGGCCCTGGCAACCC
 CCGGACAGGAAGCCCTACACGGTCTCTCTATAACGAAACGGTCCAGGCTATGTCCTCAAGGACCC
 CCGGCCCCGATGTTACCGAGAGCCAGAGGGGAGGGGGAGGCTATGCGCAGGAGTCACCAAGTGGCC
 ACCAACACACCCACCCAGGCCAGGAGCTCCCCCTGTTCCCCCCCCCCCCACCCCTGGTHICAC
 CCCGTCAGGAGACAGGCTCATACCCGACGGTCACTGGCCCTTCCCTGGAGCCCTACACCC
 CTGGGACGCTCCCCCCCCCCCCACCGACCCGACCCGACCCGACAGCAATGG
 CCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGGGATGGCATGCCCTTAAATTTTATTTTCTT
 CTTTTCCGAATGGATTTGTTAATATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAGGGTGGCATGCCATCTCCACCTCCTCGGGTCCGACCTGGCATCCAAAGGAGGACGCACGT
 CCACCTGGATGGCTAAGGGAGAGCCACGTTAAACCAGCTCAATTGGCCCTATAGTGAAGTCGTATTA
 CGCGCCTCACTGGCGTCTTACAAACGTCGTGACTGGGAAACCCCTGGCGTACCCAACCTTATC
 GCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCTAATAGCGAAGAGGCCCGACCGATGCCCTTCC
 CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGGGCGCATTAAGCGCGGGGTGT
 GGTGGTACGCGCAGCGTGAACCGCTACACTTGGCAGGCCCTAGCGCCGCTCTTCTGCTTTCTCC
 CTTCCCTTCTGCCACGTTGCCGGCTTCCCCGTCAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTC
 CGATTAGTGTGTTACGGCACCTCGACCCCAAAACTTGATTAGGGTGTGGTACCGTACTGGCC
 ATGCCCTGATAGACGGTTTTGCCCTTGTACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGT
 TCCAAACTGGAACAAACTCAACCCCTATCTGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTGGCATT
 TCGGCCTATTGGTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAATTAAACCGAATTAAACAAATATTAAAC
 GCTTACAATTAGGTGGCACTTTGCCGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTATTCTAAAT
 ACATTCAAATATGATCCGCTCATGAGACA

ATAACCCTGATAAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTGTCG
 CCCTTATTCCCTTTGC GG CATTTCGCCTCCTGTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTA
 AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGAT
 CCTTGAGAGTTTCGCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTAAAGTTCTGCTATGTGGCG
 CGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGAC
 TTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAG
 TGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCCGCCAACCTACTTCTGACAACAGATCGGAGGACCGAAGG
 AGCTAACCGTTTTGCACACATGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGAACCGGAGCTG
 AATGAAGCCATAACCAACGACGAGCGTACACCCACGATGCCCTGAGCAATGCCAACACGTTGCCCAA
 ACTATTAACTGGCGAACTACTACTCTAGCTCCCGAACAAATTAAAGACTGGATGGAGGCGGATA
 AAGTTGCAGGACCACCTCTGGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGCC
 GGTGAGCGTGGGTCTCGCGTATCATGGCAGCACTGGGCCAGATGTAAGCCCTCCGTATCGTAGT
 TATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGTGAGATAGGTGCCT
 CACTGATTAAGCATTGGTAAC TGTCAGACCAAGTTACTCATATAACTTAGATTGATTAAAACCT
 CATTTTAAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAAACG
 TGAGTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTT
 TTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGAAACAAAAAAACCCCGTACAGCGGTGGTTGTTGCCGGAT
 CAAGAGCTACCAACTCTTCTCGAAGGTAACTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGCTCCT
 TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGC
 TAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGA
 TAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTGGAGCG
 AACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTAGCCTATGAGAAAGCGCACGCTCCGAAGGGA
 GAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGG
 GGAAACGCCCTGGTATCTTATAGTCCTGTCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTG
 ATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGAACGCCCTTTACGGTTCTGCC
 TTTGCTGCCCTTTGCTCACATGTTCTTCCCTGCTTATCCCTGATTCTGTTGATAACCGTATTAC
 GCCTTGAGTGAGCTGATAACCGCTCGCCGCAGCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGA
 AGCGGAAGAGGCCCAATACGAAACCGCTCTCCCCGGCGTTGCCGATTCAATTAGCAGCTGGC
 ACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCAT
 TAGGCACCCCCAGGCTTACACTTATGCTTCCCGCTCGTATGTTGTTGGAATTGTGAGCGGATAACA
 ATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAACGCCAAATTAAACCCCTCACTAAAGGAAAC
 AAAAGCTGGTACCGGGCCACGCGTAATACGACTCACTATAG

FIG. 7B (cont.)

FIG. 7C

qcagtcacccaaaaaaaatcttagtggtaggcgccaagaaagaactgtgcagaattataag
 ggacgtcaagaaaatgaaaggcgtggacgtcaatgccagaactgtggactcagtgccttga
 atggatgcaaacacccccgttagagaccctgtatattgacgaaqctttgttgcattgcaggt
 actctcaagcgctcatagccattataagacctaagggcagtgcgtctgcgggatccccaa
 acagtgcggtttttaacatgatgtgcctgaaagtgcatttaaccacgagattgcacac
 aagtcttccacaaaagcatctctcgccgtgcactaaatctgtacttcggcgtcaacc
 ttgtttacgacaaaaaaatgagaacgacgaaatccgaaaagagactaagattgtgattgacac
 taccggcagtaccaaaccctaagcaggacgatctcattcacttgcgtttcagagggtgggtga
 agcagttcaaatagattacaaggcaacgaaataatgacggcagctgcctctcaaggcgt
 acccgtaaagggtgttatgcgttcggtacaaggtaatgaaaatctctgtacgcacccac
 ctcagaacatgtgaacgtcctactgaccccacggaggaccqcatcgtgtggaaaacactag
 ccggcgacccatggataaaaacactgactgccaagttaccctgggattttactgccacgata
 qaggagtggcaagcagagcatqatgccatqatqaggcacatottggagagaccqgaccctac
 cgacgtctccagaataaggcaaaccgtgttggccaaggcatttagtgcggcgtgaaga
 ccgctggcatagacatgaccactgaacaatggaacactgtggattatttgaacggacaaa
 gtcactcagcagagatagtattgaaccaactatgcgtgagggttttgactcgatctgga
 ctccggctatttctgcacccactgttcgttatccatttagaataatcactggataact
 cccgctgcctaacatgtacggctgaataaaagaagtggccgtcagctctcgcaggtac
 ccacaactgcctegggcagttgcactgaaagactgttatgacatgaaactgtgacactg
 caattatgatccgcgcataaaccttagtacactgttaaacagaagactgcctcatgccttagtcc
 tccaccataatgaacaccccacagagtgactttctcattcgtcagcaattgaagggcaga
 actgttectgggtggggaaaagttgtccgtcccaggcaaaatggttgactgggttcaga
 ccggcctgaggctacccctcagactcggtggatttaggcattccagggtatgtgc
 atgacataatattgttaatgtgaggacccatataaataccatcactatcagcagtgtgaa
 gaccatgccattaaagcttagcatgttgcaccaagaaagcttgcattgtgaaatcccgg
 aacctgtgtcagcataggttatgttacgttgcacccaggccagcggaaagcatcatgg
 tagcgcggcagttcaagttttccgggtatgcacaaaccgaaatcctcacttgc
 gaggtttatgacttgcacccatcgtaagattgtcaacgataacaattacaacttgc
 actgttgcacccatcgtaatccggatattgcacccggccaccgaaggatgtgatt
 atcaacccatgcaccaacattatacagggttccagactccacgaaagccggatgtgc
 atcatgtggcggggatattgcacccggccaccgaaggatgtgattataatgtgct
 agcaaggacaaccctggcgaggggtgtggggactcgctgtataagaaattccgg
 ccgttacagccatcgaaagttagaaaaagccgactggcataagggtgcagct
 ttcatgcgttaggaccaacttcaacaaagtttcggaggttgcacccatatt
 gaggtttatgacttgcacccatcgtaagattgtcaacgataacaattacaacttgc
 actgttgcacccatcgtaatccggatattgcacccggccaccgaaggatgtgatt
 tgctgacagctttagacaccactgatgcacatgtgcacccatattgc
 gaaatgactctcaaggaagcagttgttagagagaagcagtgaggagatatgc
 catcgacttgcactgtgacagaaccctgtatgcacccatcgtaatccgg
 ctggaggatatacgacccatattgcacccatcgtaatccggatatt
 tttcaccaggcccaaggatatacgacccatattgcacccatcgtaatccgg
 caatcgacccatcgtaatccggatattgcacccatcgtaatccgg
 ccgtcgaagactcgaaacccatccacccatcgtaatccggatatt
 atgactccacaaagactacagccctaaacccatcgtaatccgg
 atcccttcattgcacccatcgtaatccggatattgcacccatcgtaatccgg
 tattgttctcaccgaaagtgcctg

FIG. 7C (cont.)

FIG. 7C (cont.)

cttctgtttcgccagcggccagaacatcacccgaggaatttaccagagcacctgcagcgccg
 tgagcaagggtacacctgaaacgcggaccggctggtaaaaaactaccacgcgtgatcaccatcgag
 ctgtccaaacatcaaagaaaaacaagtgcacccgcacgcacggcaggtaactgatcaagca
 ggaactggacaagaactacaagaacgcgtgaccgagctgcagctgatgcagagcaccccccg
 ccaccaacaaccggccagaagagagactgccccggttcatgaactacaccctgaacaacgccc
 aagaaaaaccaacgtgaccctgagcaagaqgeqqaagcggcggagcgcgcateqccagcqgggt
 ggccgtgtccaagggtgctgcacctggaaaggcgaggtaacaagatcaagtcccccgtgt
 ccaccaacaaggccgtggtgccctgagcaacccgcgtgagcgtgatgcaccagcaagggtgctg
 gatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcccattcgtaacaagcagagctgcagcat
 cagcaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggaaatcaccc
 gggagttcagcgtgaacgcccgtgaccaccccgtagcaccatgctgaccacacagc
 gagctgctgtccctgatcaatgacatgccatcaccaacgaccagaaaaaagctgatgagcaa
 caacgtcagatcgtgcggcagcagactactccatcatgagcatcatcaaaaagaagaggtgc
 tggcctacgtggtgtagctgccccgtacggcgtgatcgacacccctgctggaaagctgcac
 accagccccctgtgcaccaccaacaccaaaagagggcagcaacatctgcccgtacccggaccga
 ccggggctggtaactgcgacaacgcggcagcgtgagcttctcccccagccgagacctgca
 aggtgcagagcaaccgggttttcgcacaccatgaacacgcctgaccctgcggagggtg
 aacctgtgcaacgtggacatcttcaaccccaagtaacgactgcaagatcatgacactccaagac
 cgacgtgagcagctccgtgatcactccctggcgcacatcgtagctgctacggcaagacca
 agtgcaccgcagcaacaagaaccggggcatcatcaagaccctcagcaacggctgcgactac
 gttagcaacaaggcggtgtagccacccgtgagcgtggcaacacactgtactacgtgaaataagca
 ggaaggcaagagccgtacgtgaagggcggccatcatcaacttctacgaccctgggt
 tccccagcgcacgtagttcgcacgcacatcagccaggtaacgagaqatcaaccagagctg
 gccttcatccggaaagtccgacgtagctgctgcacaatgtgaaatgccggcaagagcaccacca
 tatcatgatcaccacaaatcatcatcgtagtgcattgtgatccctgctgtctgattgccgtgg
 gcctgctgctgactgcacggccgcagcaccctgtgaccctgttccaaaggaccagctgtcc
 ggcataacaaatgccttctccaaactgaaagtctagacggcgccacccagggccgca
 tacagcagcaattggcaagctgttttacatagaactcgcggcattggcatgcggccttaaaa
 tttttatttattt
 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaagagcgtttaaacacgtgatctggcc
 tcattggcccttccttactgcggcgtttccagtcgggaaacctgtcgtgcacgcatt
 acatggctatagctgtttccctgtgttattggcgctccgttccgttccgttccgttcc
 tgcgcgtcggtcggtcggtaaagcctgggtgcctaattgagcaaaaggccagcaaaaggcca
 ggaaccgtaaaaaggccgcgttgcgggtttccataggtccgcggccctgacgagcat
 cacaaaaatcgacgcgtcaagtgcagagggtggcggaaacctgcacaggactataaagataccaggc
 gtttccccctggaaagtccttcgtgcgtctccgttccgttccgttccgttccgttccgttcc
 tgcgcgtcggtcggtcggtaaagcctgggtgcctaattgagcaaaaggccagcaaaaggcca
 cactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgcggatgttaggcgtgtacagag
 ttcttgaaagtggtgccctaactacggctacactagaagaacagtattggtatctgcgcct
 gctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctttatccggcaaaacaaaccaccc
 ctggtagccgtgttt
 gaagatcccttgcatt
 gattttggtcatgaatacacacggtg

FIG. 7C (cont.)

cctgactgcgttagcaatttaactgtgataaaactaccgcattaaagcttacatcgatgataagc
 tgtcaaacatgagaatttttagaaaaactccatcgacatcaaatttttatca
 tatcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtatgaaggagaaaactca
 ccgaggcagttccataggatggcaagatcctgtatcggtcgatccgactcgccaac
 atcaatacacaaccttattatcccctgtcaaaaataaggttatcaagtgagaatcaccat
 gagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagcttacatgcattttccagacttgtca
 acaggccagccattacgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaccgttattcattcg
 tgattgcgcctgagcgaacatcgatcgctgtttaaaaggacaattacaaacaggaa
 tcgaatgcaacccggcgcaaggaacactgcccagcgtcaacaatatttcacatcagga
 tattttctaatacctgaaatgtgtttccggatcgactgttgcattttcacatgcac
 atcaggagtacggataaaatgtgtatggcggaaagaggcataaattccgtcagccagttt
 gtctgaccatctcatctgttaacatcattggcaacgcgtacccatgttgcattttcagaaac
 tctggcgcatcggcttccatacaatcgatagattgtgcacccatgttgcatttgcggccattatc
 gcgagcccatttataccatataaatcagcatccatgttgcattttatcgccgcgtcagc
 aagacgttccgttgcataatggctcataacacccctgttactgttgcacccatgcagac
 agtttattgttcatgagcggatcatattgttgcatttttttttttttttttttttttttttttt
 ttccgcgcacattttccgaaaagtgcgcacccatgttgcatttttttttttttttttttttt
 tcgcgtttaattttgttgcataatcagcttgcatttttgcacccatgcggcaaaatc
 ctttataatcaaaagaatagaccgcgatagggttgcatttttttttttttttttttttttt
 cggccattcaggctgcgcactgttggaaaggcggttgcgttgcggccctttcgcttattacg
 ccagctggcgaaaggggatgtgtgcacccatgcggcgatgcatttttttttttttttt
 agtcaacacgcgttaatacgcactcactatagataggccgcgttgcatttttttttttt
 accttacccaaaatgggaaaagttcacgttgcatttttttttttttttttttttttttt
 ttgcagcggagcttccgcagtttgcatttttttttttttttttttttttttttttttt
 taatgccagagcgtttgcatt
 acacgatcccttgcatt
 tgtatctgtccgtatggatgtgtggaaagatccggacagattgttgcatttttttttt
 gaagaaaaactgttgcatt
 ccgtcatgagcgcacccctgcatttttttttttttttttttttttttttttttttttt
 ctatcacaaggcaataaggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 ttatgtttaaggaaacttgcatttttttttttttttttttttttttttttttttttt
 gtgttaacggctgttgcatttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
 gatgtccatt
 ttacgtggcaagcaaaatttacatgtcgtgttgcatttttttttttttttttttt
 cgttaaaagaatagctatcagtcgcgttgcatttttttttttttttttttttttt
 tgcacccgcgagggttgcatttttttttttttttttttttttttttttttttttt
 tttccctgttgcatt
 agatgtcagtgcggacgcgcgggggggggggggggggggggggggggggggggg
 acgggtcgccaccaggagaaaacaccatgcatttttttttttttttttttttttt
 gcattttgttgcatt
 acgagatagacagtttgcatttttttttttttttttttttttttttttttttt
 tttataaggccggataccatcatcaaaatgttgcatttttttttttttttttttt
 ctggccaggataggcgttgcatttttttttttttttttttttttttttttttttt

ttggagatcgggctgagaacaagaatcaggaaaattttagaggagcacaaggagccgtcacc
tctcattaccgccgaggacgtacaagaagctaagtgcgcagccgatgaggctaaggaggtgc
gtgaagccgaggagttgcgcgcagcttaccaccccttggcagctgatgtttagggagccact
ctggaaagccgatgttagactttagttacaagaggctggggccggctcagtggagacacactcg
tggcttataaagggttaccagctacgatggcgaggacaagatcggttacgtgtgtcttt
ctccgcaggctgtactcaagagtgaaaaattatcttgcattccaccctctcgctgaacaagtc
atagtgataaacacactctggccgaaaaggcgttatgccgttgaaccataccatggtaaagt
agtgggtgccagagggacatgcaataccgtccaggacttcaagctctgagtggaaagtgcac
ccatttgttacaacgaacgtgagttcgtaaacaggtacctgcaccatattgccacacatgg
ggagcgctgaacactgtatgaaatattacaaaactgtcaagcccagcqagcacqacggcga
ataccctgtacgacatcgacaggaaacagtgcgtcaagaaagaacttagtcaactggcttagggc
tcacaggcgagctggatcctcccttccatgaattcgccctacgagagtctgagaacacgac
ccagccgcttaccatccaaggatgggttatggcggtccaggatcaggcaagtc
tggcatcattaaaagc

FIG. 7C (cont.)

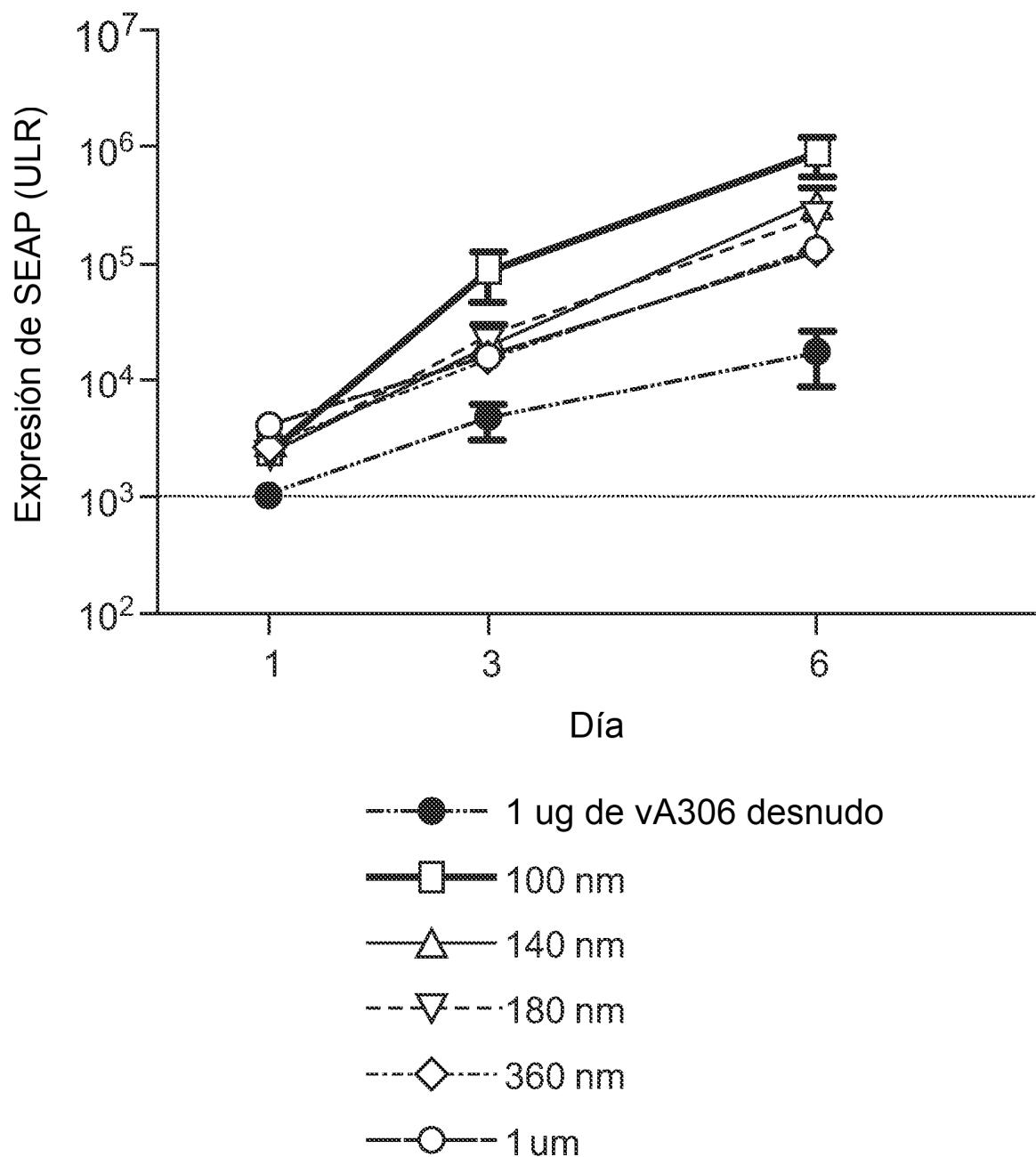
FIG. 8A

FIG. 8B
Títulos de IgG total 2wp1/2wp2

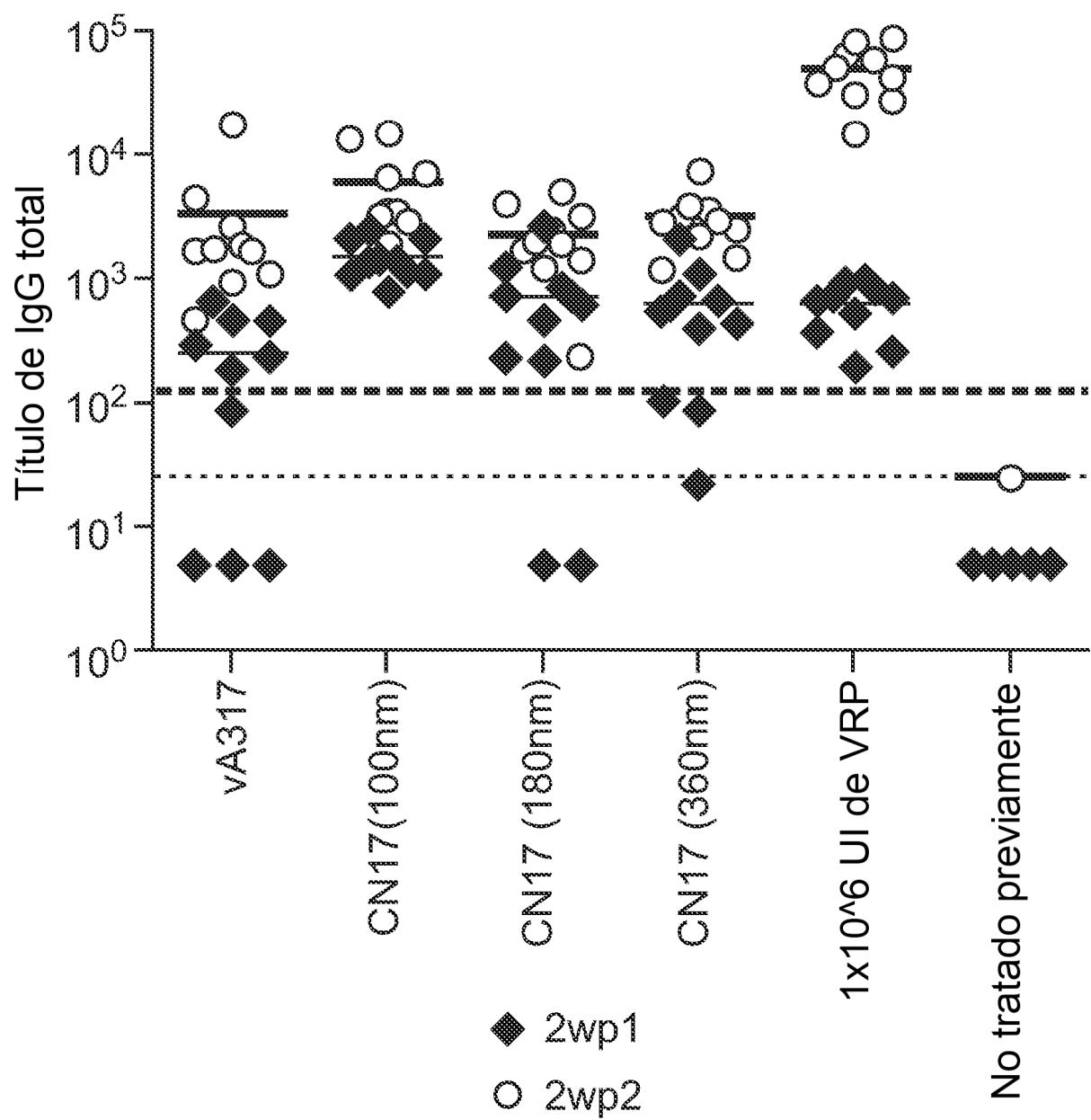


FIG. 9A
Tamaños de partícula por Horiba de CNE 17 a relaciones N/P 10:1

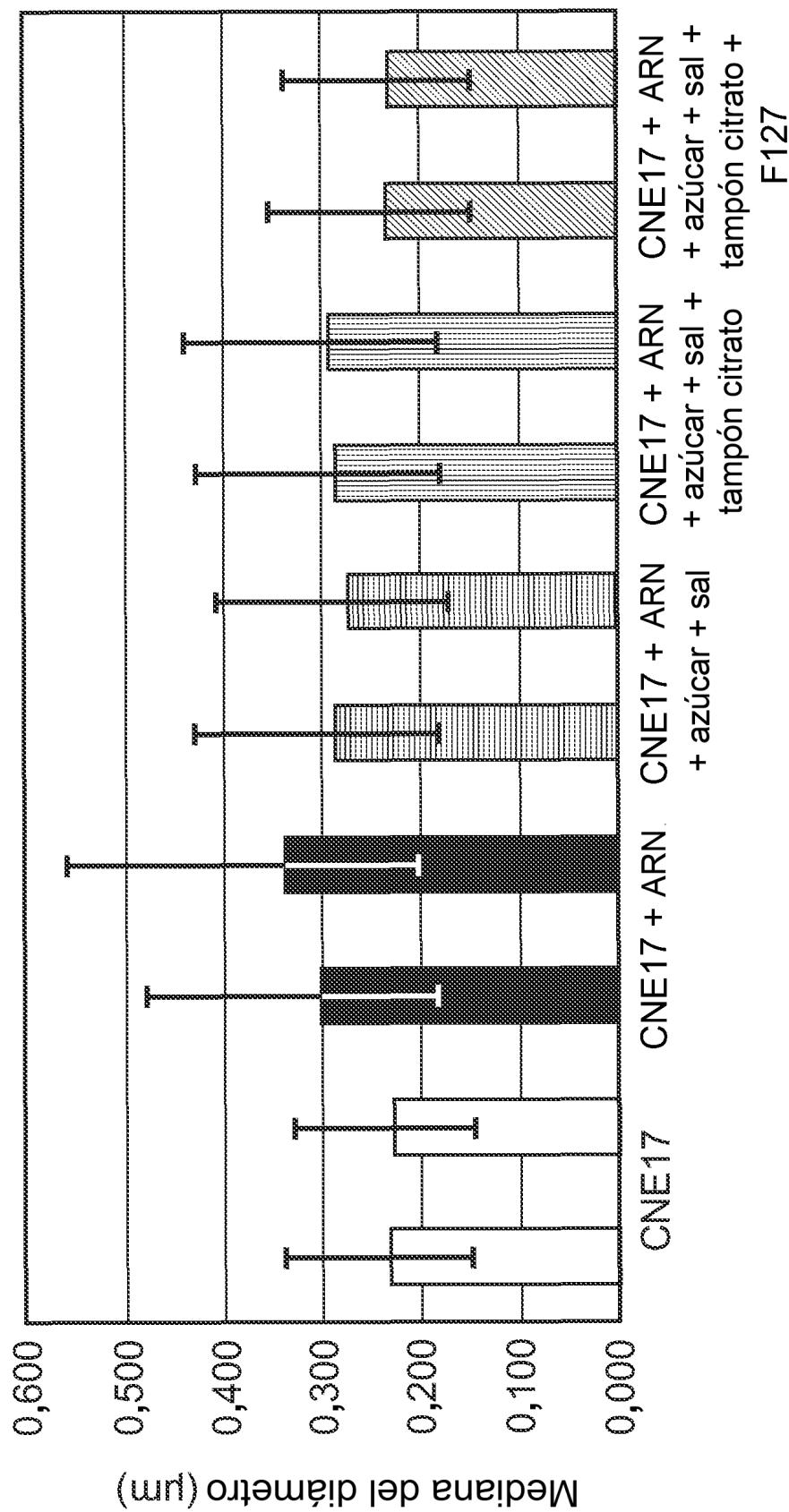


FIG. 9B

Tamaños de partícula por Horiba de CNE 17 con soluciones de tampon de sacarosa y sorbitol con concentraciones variables de tampon citrato

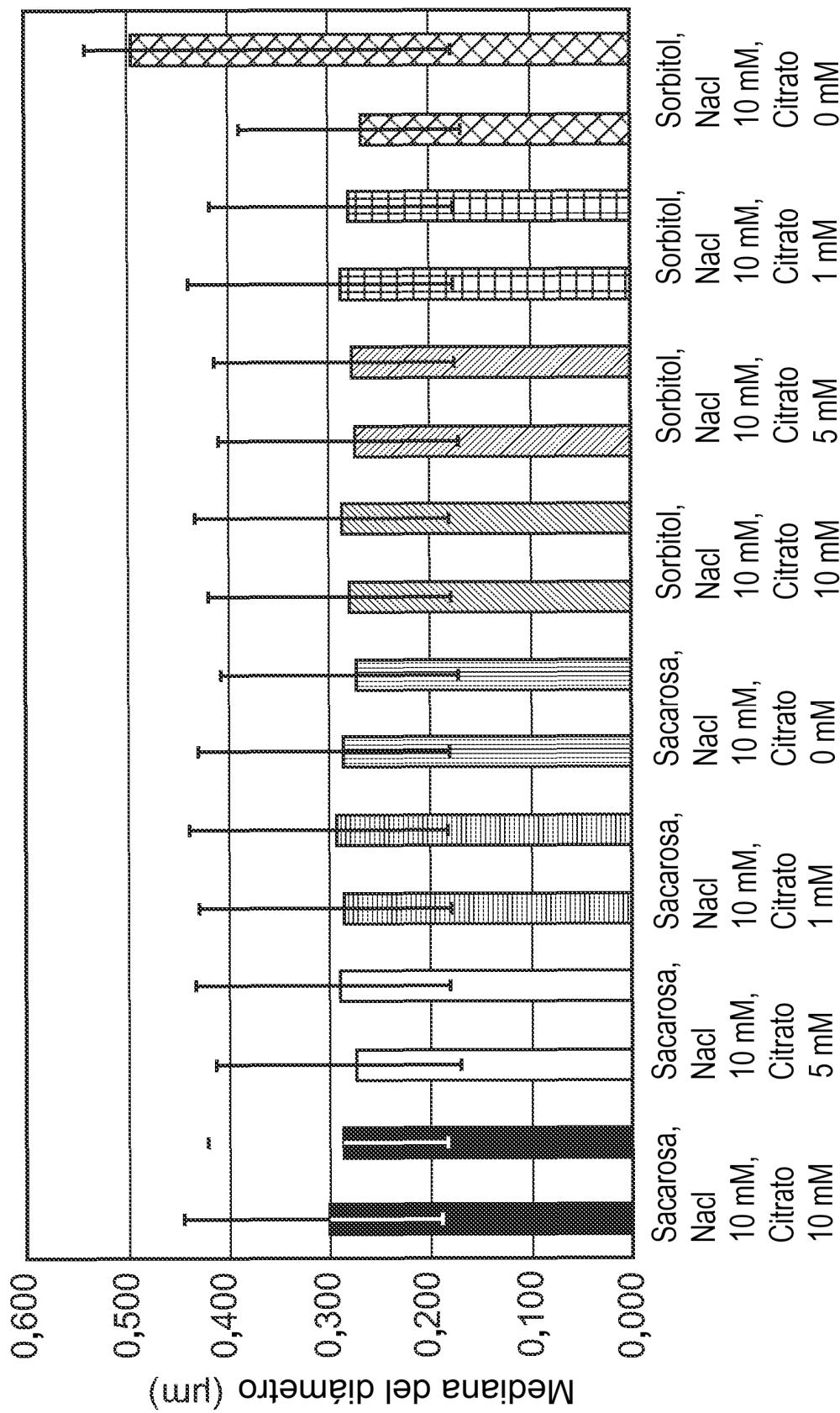


FIG. 9C

Tamaños de partícula por Horiba de CNE 17 con Sacarosa
280 mM, NaCl 10mM, Citrato 1mM y excipientes poliméricos

