

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 282**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2011** **E 23179901 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024** **EP 4226941**

54 Título: **Liposomas pegilados para el suministro de ARN que codifica un inmunógeno**

30 Prioridad:

31.08.2010 US 37882610 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.02.2025

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.00%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

GEALL, ANDREW y
VERMA, AYUSH

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 995 282 T3

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

DESCRIPCIÓN

Liposomas pegilados para el suministro de ARN que codifica un inmunógeno

5 **Campo técnico**

Esta invención pertenece al campo del suministro no vírico de ARN para la inmunización, a través de composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas dentro de los cuales se encapsula el ARN que codifica un inmunógeno de interés.

10

Técnica anterior

El suministro de ácidos nucleicos para inmunizar animales ha sido un objetivo desde hace varios años. Se han probado varios enfoques, incluyendo el uso de ADN o ARN, de vehículos de suministro víricos o no víricos (o incluso ningún vehículo de suministro, en una vacuna "desnuda"), de vectores replicantes o no replicantes, o de vectores víricos o no víricos.

15

Mockey *et al.*, 2007, Cancer Gene Therapy 2007 14(9):802-814 da a conocer la administración de ARNm que codifica un antígeno tumoral. El documento WO2009/086558 describe composiciones y métodos para la administración de agentes terapéuticos a células. El documento WO2008/103276 describe composiciones y métodos destinados a potenciar la actividad de moléculas biológicamente activas junto con uno o más vehículos de administración y una o más moléculas portadoras. El documento WO2009/111088 describe composiciones y métodos destinados a la administración de un agente terapéutico al bazo.

20

25 Sigue existiendo la necesidad de más y mejores vacunas de ácido nucleico y, en particular, para formas mejoradas de suministrar vacunas de ácido nucleico.

Divulgación de la invención

Según la invención, la inmunización con ácidos nucleicos se logra mediante el suministro de ARN encapsulado dentro de un liposoma. El ARN codifica un inmunógeno de interés. El liposoma incluye un lípido PEGilado, es decir, el lípido se modifica mediante la unión covalente de un polietilenglicol. El PEG proporciona a los liposomas una capa que puede conferir características farmacocinéticas favorables, por ejemplo, puede aumentar la estabilidad y evitar la adsorción no específica de los liposomas. Los inventores han descubierto que la longitud del PEG puede afectar a la expresión *in vivo* de ARN encapsulado, por lo que la invención utiliza liposomas que comprenden PEG que tiene una masa molecular promedio de entre 1 kDa y 3 kDa. El PEG con un peso molecular más bajo (por ejemplo, 500 o 750 Da) no forma liposomas estables.

35

Por lo tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un liposoma dentro del cual se encapsula el ARN que codifica un inmunógeno de interés, en donde el liposoma comprende al menos un lípido que incluye un resto de polietilenglicol, de manera que el polietilenglicol está presente en el exterior del liposoma, en donde la masa molecular promedio del polietilenglicol es entre 1 kDa y 3 kDa, en donde la composición farmacéutica incluye un tampón Tris. Los liposomas son adecuados para el suministro *in vivo* del ARN a una célula de vertebrado y, por lo tanto, son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para la inmunización de sujetos contra diversas enfermedades.

40

45

El liposoma

La invención utiliza liposomas dentro de los cuales se encapsula ARN que codifica un inmunógeno. De este modo, el ARN está (como en un virus natural) separado de cualquier medio externo. Se ha descubierto que la encapsulación dentro del liposoma protege al ARN de la digestión con RNasas. Los liposomas pueden incluir algo de ARN externo (por ejemplo, en su superficie), pero al menos la mitad del ARN (e idealmente su totalidad) está encapsulado en el núcleo del liposoma. La encapsulación dentro de los liposomas es distinta de, por ejemplo, los complejos lípido/ARN divulgados en la referencia 1, donde el ARN se mezcla con liposomas previamente formados.

50

55

Varios lípidos anfífilos pueden formar bicapas en un entorno acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza hidrófilo, aniónico, catiónico o dipolar. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos se remonta a la década de 1960, y los lípidos que forman liposomas catiónicos se han estudiado desde la década de 1990. Algunos fosfolípidos son aniónicos mientras que otros son dipolares y otros son catiónicos. Las clases de fosfolípidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas y fosfatidilglicerolos, y algunos fosfolípidos útiles se enumeran en la tabla 1. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero sin limitación, dioleoil trimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-dilineniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los

60

lípidos dipolares incluyen, pero sin limitación, lípidos de acilo dipolares y lípidos de éter dipolares. Ejemplos de lípidos dipolares útiles son DPPC, DOPC, DSPC, dodecilsfosfolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) y 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE). Los lípidos pueden ser saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido insaturado para preparar liposomas. Si un lípido insaturado tiene dos colas, ambas colas pueden estar insaturadas, o puede tener una cola saturada y una cola insaturada. Un lípido puede incluir un grupo esteroide en una cola, por ejemplo, como en RV05.

De este modo, en una realización, la composición farmacéutica comprende un liposoma que tiene una bicapa lipídica que encapsula un núcleo acuoso, en donde: (i) la bicapa lipídica comprende al menos un lípido que incluye un resto de polietilenglicol, de manera que el polietilenglicol está presente en el exterior del liposoma, en donde la masa molecular promedio del polietilenglicol es entre 1 kDa y 3 kDa; y (ii) el núcleo acuoso incluye un ARN que codifica un inmunógeno.

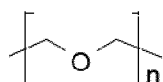
Los liposomas de la invención se pueden formar a partir de un solo lípido o a partir de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos (ii) una mezcla de lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos dipolares (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos dipolares (vi) una mezcla de lípidos dipolares y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos dipolares. De manera análoga, una mezcla puede comprender lípidos tanto saturados como insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (dipolar, saturado), DlinDMA (catiónico, insaturado) y/o DMG (aniónico, saturado). Cuando se utiliza una mezcla de lípidos, no todos los lípidos componentes de la mezcla tienen que ser anfífilos, por ejemplo, uno o más lípidos anfífilos se pueden mezclar con colesterol.

Cuando un liposoma de uso en la invención se forma a partir de una mezcla de lípidos, se prefiere que la proporción de esos lípidos que están PEGilados como se describe en el presente documento sea inferior al 10 % de la cantidad total de lípidos, por ejemplo, entre 0,5-5 %, entre 1-4 %, o aproximadamente 2 %. Por ejemplo, se muestran a continuación liposomas útiles en los que el 2 % del contenido total de lípidos es un PEG-DMG. El resto puede estar hecho de, por ejemplo, colesterol (por ejemplo, 35-50 % de colesterol) y/o lípidos catiónicos (por ejemplo, 30-70 %) y/o DSPC (por ejemplo, 5-15 %). Dichas mezclas se utilizan a continuación. Estos valores porcentuales son porcentajes molares.

Por lo tanto, se puede formar un liposoma a partir de un lípido catiónico (por ejemplo, DlinDMA, RV05), un lípido dipolar (por ejemplo, DSPC, DPyPE), un colesterol y un lípido PEGilado. En los ejemplos de referencia se utiliza una mezcla de DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol, así como varias mezclas adicionales.

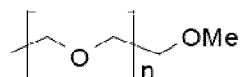
Al menos un lípido dentro del liposoma incluye un resto de polietilenglicol. Los liposomas que incluyen estos lípidos PEGilados tendrán PEG orientado para que esté presente al menos en el exterior del liposoma (pero algo de PEG también puede estar expuesto al interior del liposoma, es decir, al núcleo acuoso). Esta orientación se puede lograr uniendo el PEG a una parte adecuada del lípido. Por ejemplo, en un lípido anfífilo, el PEG estaría unido a la cabeza hidrófila, ya que es esta cabeza la que se orienta hacia el exterior acuoso de la bicapa lipídica. La PEGilación de esta manera se puede lograr mediante la unión covalente de un PEG a un lípido, por ejemplo, utilizando técnicas como las divulgadas en las referencias 2 y 3.

Así, los lípidos PEGilados comprenderán la estructura de PEG:

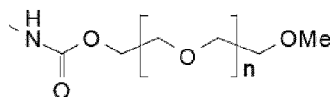


donde n proporciona un peso molecular para el PEG de entre 1 kDa y 3 kDa, por ejemplo, entre 23 y 68, o aproximadamente 45 para una PEGilación de 2 kDa (por ejemplo, véase la figura 16).

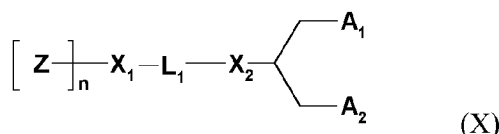
El resto de PEG puede terminar con un grupo -O-metilo, por lo que un lípido PEGilado puede comprender:



Incluyendo la unión a un nitrógeno en el grupo de cabeza de un lípido, por lo tanto, un lípido PEGilado útil con la invención puede comprender:



Un lípido PEGilado adecuado para su uso con la invención es PEG-DMG, como se usa en los ejemplos. Las figuras 17A a 17E muestran otros lípidos PEGilados útiles. También se puede utilizar colesterol PEGilado. Se pueden utilizar otros lípidos PEGilados, por ejemplo, lípidos de Fórmula (X):



en donde:

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

Z está polimerizado por n subunidades;

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

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

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

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

Un liposoma de uso en la invención normalmente incluirá una gran cantidad de restos de PEG, que pueden ser iguales o diferentes. La masa molecular promedio del PEG en un liposoma de uso en la invención está entre 1 kDa y 3 kDa, por ejemplo, entre 1,5-2,5 kDa, entre 1,7-2,3 kDa, entre 1,8-2,2 kDa, entre 1,9-2,1 kDa o 2 kDa. Por lo tanto, el PEG puede ser un PEG que se conoce comúnmente como "PEG 2000" o "PEG 2k", aunque también se puede utilizar "PEG 1000" más corto y "PEG 3000" más largo.

El PEG generalmente comprenderá cadenas poliméricas lineales pero, en algunas realizaciones, el PEG puede comprender cadenas poliméricas ramificadas.

También es posible que una sola molécula lipídica incluya más de un grupo PEG, por ejemplo, unidos a diferentes átomos de carbono en un grupo de cabeza de un lípido (por ejemplo, véase la figura 18). En estas circunstancias, la referencia a la masa molecular de PEG en un liposoma es la masa molecular por molécula de lípido en lugar de por sustituyente de PEG. De este modo, en un liposoma en el que el único lípido PEGilado tiene la estructura que se muestra en la figura 18, donde el peso molecular encuadrado es 2 kDa y se compone de dos cadenas de 1 kDa cada una, la masa molecular promedio del PEG es 2 kDa, no 1 kDa.

En algunas realizaciones, el PEG puede ser un PEG sustituido, por ejemplo, en el que uno o más átomos de carbono en el polímero está sustituido por uno o más grupos alquilo, alcoxi, acilo o arilo.

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

Los liposomas suelen dividirse en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV, por sus siglas en inglés), vesículas unilamelares pequeñas (SUV, por sus siglas en inglés) y vesículas unilamelares grandes (LUV, por sus siglas en inglés). Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, formando varios compartimentos acuosos separados. Las SUV y LUV tienen una sola bicapa que encapsula un núcleo acuoso; las SUV suelen tener un diámetro ≤ 50 nm y las LUV tienen un diámetro > 50 nm. Los liposomas de uso en la invención son idealmente LUV con un diámetro en el intervalo de 60-180 nm, y preferentemente en el intervalo de 80-160 nm.

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

Las técnicas para preparar liposomas adecuados son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, véanse las referencias 4 a 6. Un método útil se describe en la referencia 7 e implica mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) tampón, seguido de mezclado, equilibrado, dilución y purificación. Los liposomas preferidos de uso en la invención se pueden obtener mediante este proceso de mezclado.

Para obtener liposomas o LNP con el uno o más diámetros deseados, la mezcla puede realizarse mediante un proceso en el que se combinan dos corrientes de alimentación de solución acuosa de ARN en una única zona de mezclado con una corriente de una solución etanólica de lípidos, todo ello al mismo caudal, por ejemplo, en un canal microfluídico.

El ARN

Los liposomas de uso en la invención incluyen una molécula de ARN que (a diferencia del ARNip, como en la referencia 2) codifica un inmunógeno. Después de la administración de las partículas *in vivo*, el ARN se libera de las partículas y se traduce dentro de una célula para proporcionar el inmunógeno. *in situ*.

El ARN es de cadena +, por lo que las células pueden traducirlo sin necesidad de ninguna etapa de replicación intermedia, tal como transcripción inversa. También puede unirse a los receptores TLR7 expresados por las células inmunitarias, iniciando así un efecto adyuvante.

Los ARN de cadena + preferidos se autorreplican. Una molécula de ARN autorreplicante (replicón) puede, cuando se suministra a una célula de vertebrado incluso sin proteínas, dar lugar a la producción de múltiples ARN descendientes por transcripción de sí misma (a través de una copia antisentido que genera de sí misma). Una molécula de ARN autorreplicante es, por lo tanto, normalmente una molécula de cadena + que puede traducirse directamente después de suministrarse a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que a continuación produce transcritos tanto antisentido como en sentido a partir del ARN suministrado. Por lo tanto, el ARN suministrado da lugar a la producción de múltiples ARN descendientes. Estos ARN descendientes, así como los transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse ellos mismos para proporcionar la expresión *in situ* de un inmunógeno codificado, o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que se traducen para proporcionar la expresión *in situ* del inmunógeno. El resultado global de esta secuencia de transcripciones es una enorme amplificación en el número de ARN replicones introducidos, y por tanto, el inmunógeno codificado se convierte en un producto polipeptídico principal de las células.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación es utilizar un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones de cadena + se traducen después del suministro a una célula para dar una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias genómicas de cadena - del ARN suministrado de cadena +. Estos transcritos de cadena - pueden en sí transcribirse para proporcionar copias adicionales del ARN precursor de cadena + y también para proporcionar un transcrito subgenómico que codifica el inmunógeno. La traducción del transcrito subgenómico da lugar de este modo a la expresión *in situ* del inmunógeno por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de un virus Sindbis, un virus del bosque de Semliki, un virus de la encefalitis equina oriental, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc. Se pueden usar secuencias de virus mutantes o naturales, por ejemplo, el mutante atenuado TC83 del VEEV se ha usado en replicones[8].

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

Mientras que los genomas de los alfavirus naturales codifican proteínas estructurales de los viriones, además de la poliproteína replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN autorreplicante de uso en la invención no codifique proteínas estructurales de alfavirus. Por lo tanto, un ARN autorreplicante preferido puede dar lugar a la producción de copias de ARN genómico 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 natural, la molécula de ARN autorreplicante no puede autoperpetuarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de los alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus naturales están ausentes en los ARN autorreplicantes de la presente invención, y su lugar lo ocupan el uno o más genes que codifican el inmunógeno de interés, de manera que el transcrito subgenómico codifica el inmunógeno en lugar de las proteínas estructurales de los viriones de alfavirus.

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

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

Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden tener diversas longitudes, pero normalmente son de 5000-25000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 8000-15000 nucleótidos o 9000-12000 nucleótidos. Por tanto, el ARN es más largo que el observado en el suministro de ARNip.

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

El nucleótido en 5' de una molécula de ARN útil con la invención puede tener un grupo trifosfato en 5'. En un ARN protegido terminalmente con caperuza este puede unirse con una 7-metilguanosina a través de un enlace de 5' a 5'. Un trifosfato en 5' puede potenciar la unión de RIG-I y, por tanto, promover efectos adyuvantes.

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

Una molécula de ARN útil con la invención será normalmente monocatenaria. En general, los ARN monocatenarios pueden iniciar un efecto adyuvante al unirse a TLR7, TLR8, a helicasas de ARN y/o a PKR. El ARN suministrado en forma bicatenaria (ARNbc) puede unirse a TLR3, y este receptor también puede activarse por el ARNbc que se forma durante la replicación de un ARN monocatenario o dentro de la estructura secundaria de un ARN monocatenario.

Una molécula de ARN útil con la invención se puede preparar convenientemente mediante transcripción *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés). La IVT puede usar una plantilla (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias, o creado sintéticamente (por ejemplo, mediante síntesis génica y/o métodos de modificación por ingeniería por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, se puede usar una ARN polimerasa dependiente de ADN (tales como las ARN polimerasas de los bacteriófagos T7, T3 o SP6) para transcribir el ARN a partir de una plantilla de ADN. Se pueden usar reacciones adecuadas de protección terminal con caperuza y adición de poli-A según sea necesario (aunque la poli-A del replicón está habitualmente codificada en la plantilla de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener unos requisitos rigurosos para el uno o más nucleótidos en 5' transcritos, y en algunas realizaciones, estos requisitos deben coincidir con los requisitos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito en la IVT pueda funcionar eficazmente como sustrato para su replicasa autocodificada.

Como se analiza en la referencia 9, un ARN autorreplicante puede incluir (además de cualquier estructura de caperuza en 5') uno o más nucleótidos que tengan una nucleobase modificada. Por tanto, el ARN puede comprender m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina), m2A (2-metiladenosina), Am (2'-O-metiladenosina), ms2m6A (2-metil2'-O-metiladenosina), i6A (N6-isopenteniladenosina), ms2i6A (2-metil2'-O-metiladenosina), io6A (N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina), ms2io6A (2-metil2'-O-metiladenosina), g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina), t6A (N6-treonilcarbamoiladenosina), ms2t6A (2-metil2'-O-metiladenosina), m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina), hn6A (N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina), ms2hn6A (2-metil2'-O-metiladenosina), Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)), I (inosina), m11 (1-metilinosina), m'Im (1,2'-O-dimetilinosina), m3C (3-metilcitidina), Cm (2T-O-metilcitidina), s2C (2-tiocitidina), ac4C (N4-acetilcitidina), f5C (5-fonilcitidina), m5Cm (5,2'-O-dimetilcitidina), ac4Cm (N4acetil2T-O-metilcitidina), k2C (lisidina), m1G (1-metilguanosina), m2G (N2-metilguanosina), m7G (7-metilguanosina), Gm (2'-O-metilguanosina), m22G (N2,N2-dimetilguanosina), m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanosina), m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosina), Gr(p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)), yW (wibutosina), o2yW (peroxiwibutosina), OHyW (hidroxiwibutosina), OHyW* (hidroxiwibutosina submodificada), imG (wiosina), mimG (metilguanosina), Q (queuosina), oQ (epoxiqueuosina), galQ (galtactosilqueuosina), manQ (manosil-

queuosina); preQo (7-ciano-7-desazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-desazaguanosina); G* (arqueosina); D (dihidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp3U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho5U (5-hidroxiuridina); mo5U (5-metoxiuridina); cmo5U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo5U (éster metílico del ácido uridina 5-oxiacético); chm5U (5-(carboxihidroximetil)uridina); mchm5U (éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)uridina); mcm5U (5-metoxycarbonilmetiluridina); mcm5Um (S-metoxycarbonilmetil-2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); nmm5U (5-metilaminometiluridina); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetiluridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina); cnmm5Um (5-carboximetilaminometil-2-L-O-metiluridina); cmnm5s2U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m62A (N6,N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitidina); m4Cm (N4,2-O-dimetilcitidina); hm5C (5-hidroximetilcitidina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carboximetiluridina); m6Am (N6, T-O-dimetiladenosina); m62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosina); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosina); m3Um (3,2T-O-dimetiluridina); m5D (5-metildihidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m'Am (1,2-O-dimetiladenosina) irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina)); imG-14 (4-desmetil guanosina); imG2 (isoguanosina); o ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxoadenina, derivados 7-sustituidos de los mismos, dihidouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C1-C6)-alquiluracilo, 5-metiluracilo, 5-(C2-C6)-alqueniluracilo, 5-(C2-C6)-alquiluracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(C1-C6)-alquilcitosina, 5-metilcitosina, 5-(C2-C6)-alquenilcitosina, 5-(C2-C6)-alquilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 7-desazaguanina, 8-azaguanina, 7-deaza-guanina 7-sustituida, 7-desaza-7-(C2-C6)alquilguanina, 7-deaza-guanina 8-sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, deazapurina 7-sustituida, 7-deaza-purina 7-sustituida, 7-desaza-purina 8-sustituida, o un nucleótido abásico. Por ejemplo, un ARN autorreplicante puede incluir una o más nucleobases de pirimidina modificadas, tales como restos de pseudouridina y/o 5-metilcitosina. En algunas realizaciones, sin embargo, el ARN no incluye nucleobases modificadas, y puede incluir nucleótidos no modificados, es decir, todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos estándar A, C, G y U (excepto cualquier estructura de caperuza en 5', que puede incluir una 7'-metilguanosina). En otras realizaciones, el ARN puede incluir una caperuza en 5' que comprende una 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos en 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

Idealmente, un ARN usado con la invención incluye solamente enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, pero en algunas realizaciones puede contener enlaces fosforamidoato, fosforotioato y/o metilfosfonato.

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

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

El inmunógeno

Las moléculas de ARN utilizadas con la invención codifican un inmunógeno polipeptídico. Después de la administración de los liposomas, el ARN se traduce *in vivo* y el inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. El inmunógeno puede provocar una respuesta inmune contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito (o, en algunas realizaciones, contra un alérgeno; y en otras realizaciones, contra un antígeno tumoral). La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta de anticuerpo (que incluye habitualmente IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. El inmunógeno polipeptídico normalmente provocará una respuesta inmunitaria que reconoce el correspondiente polipéptido (o alérgenos o tumores) bacteriano, vírico, fúngico o parasitario, pero en algunas realizaciones, el polipéptido puede actuar como un mimótopo para provocar una respuesta inmunitaria que reconozca un sacárido bacteriano, vírico, fúngico o parasitario. El inmunógeno será normalmente un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glicoproteína de envoltura, una glicoproteína espiga, etc.

La molécula de ARN puede codificar un único inmunógeno polipeptídico o múltiples polipéptidos. Se pueden presentar múltiples inmunógenos como un único inmunógeno polipeptídico (polipéptido de fusión) o como polipéptidos separados. Si los inmunógenos se expresan como polipéptidos separados de un replicón, entonces uno o más de estos puede estar provisto de un IRES cadena arriba o un elemento promotor vírico adicional. Como alternativa, pueden expresarse múltiples inmunógenos a partir de una poliproteína que codifica inmunógenos individuales fusionados con una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo, proteína 2A del virus de la glosopeda) o como inteínas.

A diferencia de las referencias 1 y 10, el ARN codifica un inmunógeno. Para disipar cualquier duda, la invención no abarca el ARN que codifica una luciferasa de luciérnaga o que codifica una proteína de fusión de β -galactosidasa de *E. coli* o que codifica una proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés). Dichos polipéptidos pueden ser

útiles como marcadores, o incluso en un contexto de terapia génica, pero la invención se refiere al suministro de ARN para provocar un sistema de respuesta inmunitaria. Por lo tanto, el inmunógeno tampoco es una proteína propia que se suministra para complementar o sustituir una proteína hospedadora defectuosa (como en terapia génica). Además, el ARN no es ARN total de timo de ratón.

5

En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria contra una de estas bacterias:

10 *Neisseria meningitidis*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, proteínas de membrana tal como adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro y proteína de unión al factor H. En la referencia 11 se divulga una combinación de tres polipéptidos útiles.

15 *Streptococcus pneumoniae*: los inmunógenos polipeptídicos útiles se describen en la referencia 12. Estos incluyen, pero sin limitación, la subunidad RrgB de un pilus, el precursor de β -N-acetil-hexosaminidasa (spr0057), spr0096, proteína de estrés general GSP-781 (spr2021, SP2216), serina/treonina cinasa StkP (SP1732) y adhesina de superficie neumocócica PsaA.

Streptococcus pyogenes: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos divulgados en las referencias 13 y 14.

20 *Moraxella catarrhalis*.

Bordetella pertussis: Los inmunógenos contra la tos ferina útiles incluyen, pero sin limitación, toxina pertussis o toxoide (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina y aglutinógenos 2 y 3.

25 *Staphylococcus aureus*: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos divulgados en la referencia 15, tal como una hemolisina, esxA, esxB, proteína de unión a ferricromo (sta006) y/o la lipoproteína sta011.

Clostridium tetani: el inmunógeno característico es el toxoide tetánico.

30 *Corynebacterium diphtheriae*: el inmunógeno característico es el toxoide diftérico.

Haemophilus influenzae: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos divulgados en las referencias 16 y 17.

35 *Pseudomonas aeruginosa*

Streptococcus agalactiae: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos divulgados en la referencia 13.

40 *Chlamydia trachomatis*: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, tipo OmpH, L7/L12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (por ejemplo, como se divulga en la referencia 18. LcrE [19] y HtrA [20] son dos inmunógenos preferidos.

45 *Chlamydia pneumoniae*: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos divulgados en la referencia 21.

Helicobacter pylori: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, CagA, VacA, NAP y/o ureasa [22].

50 *Escherichia coli*: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, inmunógenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Las cepas ExPEC incluyen cepas *E. coli* uropatógenas (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis/sepsis (MNEC). Los inmunógenos polipeptídicos UPEC útiles se divulgan en las referencias 23 y 24. Los inmunógenos MNEC útiles se divulgan en la referencia 25. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es AcfD [26].

55

Bacillus anthracis

Yersinia pestis: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los divulgados en las referencias 27 y 28.

60 *Staphylococcus epidermis*

Clostridium perfringens o *Clostridium botulinum*

Legionella pneumophila

- Coxiella burnetii*
Brucella, tal como *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. pinnipediae*.
- 5 *Francisella*, tal como *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. tularensis*.
- Neisseria gonorrhoeae*
- 10 *Treponema pallidum*
Haemophilus ducreyi
Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*
- 15 *Staphylococcus saprophyticus*
Yersinia enterocolitica
Mycobacterium tuberculosis
- 20 *Rickettsia*
Listeria monocytogenes
- 25 *Vibrio cholerae*
Salmonella typhi
Borrelia burgdorferi
- 30 *Porphyromonas gingivalis*
Klebsiella
- 35 En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria contra uno de estos virus:
Orthomyxovirus: Los inmunógenos útiles pueden ser de un virus de la gripe A, B o C, tal como la hemaglutinina, neuraminidasa o proteínas de la matriz M2. Cuando el inmunógeno es una hemaglutinina del virus de la gripe A, puede ser de cualquier subtipo, por ejemplo, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.
- 40 *Virus Paramyxoviridae*: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de pneumovirus (por ejemplo, virus respiratorio sincitial, RSV), rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), paramixovirus (por ejemplo, virus paragripal), metapneumovirus y morbilivirus (por ejemplo, virus del sarampión).
- 45 *Poxviridae*: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de ortopoxvirus tales como viruela, incluyendo, pero sin limitación, viruela mayor y viruela menor.
- 50 *Picornavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de picornavirus, tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiovirus y aftovirus. En una realización, el enterovirus es un poliovirus, por ejemplo, un poliovirus de tipo 1, tipo 2 y/o tipo 3. En otra realización, el enterovirus es un enterovirus EV71. En otra realización, el enterovirus es un virus coxsackie A o B.
- 55 *Bunyavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un ortobunyavirus, tal como el virus de la encefalitis de California, un flebovirus, tal como el virus de la fiebre del valle del Rift o un nairovirus, tal como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.
- Heparnavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un heparnavirus, tal como el virus de la hepatitis A (HAV).
- 60 *Filovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un filovirus, tal como el virus del Ébola (incluyendo un ebolavirus de Zaire, Costa de Marfil, Reston o Sudán) o un virus de Marburgo.
- Togavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un togavirus, tal como un rubivirus, un alfavirus o un arterivirus. Esto incluye el virus de la rubéola.

Flavivirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un flavivirus, tal como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), 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 rusa, virus de la encefalitis de Powassan.

5

Pestivirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un pestivirus, tales como diarrea vírica bovina (BVDV), fiebre porcina clásica (CSFV) o enfermedad de la frontera (BDV).

10

Hepadnavirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un hepadnavirus, tal como el virus de la hepatitis B. Una composición puede incluir el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

Otros virus de hepatitis: Una composición puede incluir un inmunógeno de un virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis delta, virus de la hepatitis E o virus de la hepatitis G.

15

Rhabdovirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un rhabdovirus, tal como un lisavirus (por ejemplo, un virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV).

20

Caliciviridae: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de *Caliciviridae*, tal como virus de Norwalk (Norovirus) y virus de tipo Norwalk, tales como virus de Hawaii y virus de Snow Mountain.

Coronavirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un coronavirus de SARS, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis de ratón (MHV) y virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV). El inmunógeno de coronavirus puede ser un polipéptido espicular.

25

Retrovirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un oncovirus, un lentivirus (por ejemplo, HIV-1 o HIV-2) o un espumavirus.

30

Reovirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un ortorreovirus, un rotavirus, un orbivirus o un coltivirus.

Parvovirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de parvovirus B19.

35

Herpesvirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de un herpesvirus humano, tal como, solo a modo de ejemplo, virus del herpes simple (HSV) (por ejemplo, HSV de tipos 1 y 2), virus de la varicela zóster (VZV), virus de Epstein Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HHV6), herpesvirus humano 7 (HHV7) y herpesvirus humano 8 (HHV8).

40

Papovavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de papilomavirus y poliomavirus. El papilomavirus (humano) puede ser del serotipo 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 o 65, por ejemplo, de uno o más de los serotipos 6, 11, 16 y/o 18.

Adenovirus: Los inmunógenos víricos incluyen los obtenidos a partir del adenovirus serotipo 36 (Ad-36).

45

En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria contra un virus que infecta a los peces, tales como: virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus del siluro del canal (CCV), virus de la enfermedad linfocítica de los peces (FLDV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), herpesvirus de la carpa koi, virus de tipo picoma del salmón (también conocido como virus de tipo picoma del salmón atlántico), virus del salmón de interior (LSV), rotavirus del salmón atlántico (ASR), virus de las manchas de fresa de la trucha (TSD), virus tumoral del salmón plateado (CSTV) o virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV).

50

Pueden obtenerse inmunógenos fúngicos de dermatofitos, incluyendo: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *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 lusitanae*, *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 *Brachiola*

60

- sp, *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 apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *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.
- En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria contra un parásito del género *Plasmodium*, tal como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. Por lo tanto, la invención puede usarse para inmunizar contra la malaria. En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria contra un parásito de la familia *Caligidae*, particularmente los de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus*, por ejemplo, piojos de mar tales como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.
- En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria contra: alérgenos del polen (alérgenos de polen de árboles, hierbas, maleza y gramíneas); alérgenos de insectos o arácnidos (alérgenos inhalantes, de saliva y veneno, por ejemplo, alérgenos de ácaros, alérgenos de cucarachas y mosquitos, alérgenos del veneno de himenópteros); alérgenos de pelo y de caspa de animales (de, por ejemplo, perro, gato, caballo, rata, ratón, etc.); y alérgenos alimentarios (por ejemplo, una gliadina). Los alérgenos de polen importantes de árboles, pastos y hierbas son aquellos que se originan de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y *platanaceae* incluyendo, pero sin limitación, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), árbol del plátano de sombra (*Platanus*), el orden de Poales, incluyendo hierbas de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de Asterales y Urticales, incluyendo hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros alérgenos de inhalación importantes son aquellos que proceden de ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaro del almacenamiento, por ejemplo, *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquitos y pulgas, por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, y los de mamíferos, tales como de gato, de perro y de caballo, alérgenos de venenos, incluyendo aquellos que se originan a partir de insectos que pican o muerden como los del orden taxonómico de himenópteros, incluyendo abejas (*Apidae*), avispas (*Vespidae*), y hormigas (*Formicoidae*).
- En algunas realizaciones, el inmunógeno es un antígeno tumoral seleccionado de: (a) antígenos de cáncer de testículo tal como NY-ESO-1, SSX2, SCP1 así como 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 utilizar, por ejemplo, para abordar melanoma, tumores de pulmón, cabeza y cuello, NSCLC, de mama, gastrointestinal y de vejiga); (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con diversos tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado con, por ejemplo, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, melanoma), caspasa-8 (asociada 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 Hodgkiniano de linfocitos T), BCR-abl (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), triosafosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT; (c) antígenos sobreexpresados, 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 de riñón), aldolasa A (asociada con, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociado con, por ejemplo, melanoma), HER-2/neu (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), mamaglobina, alfa-fetoproteína (asociada con, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada con, por ejemplo, cáncer de páncreas y gástrico), proteína catalítica de telomerasa, MUC-1 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama y ovario), 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 melanocitos de melanoma tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína-1/TRP1 relacionada con la tirosinasa y proteína-2/TRP2 relacionada con la tirosinasa (asociada con, por ejemplo, melanoma); (e) antígenos asociados a la 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 linfocitos B, por ejemplo). En determinadas realizaciones, los inmunógenos tumorales incluyen, pero sin limitación, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del virus del papiloma humano (HPV), que incluyen E6 y E7, antígenos del virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de linfocitos T humanos, 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 a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y similares.

Composiciones farmacéuticas

- 5 Los liposomas de uso en la invención son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para inmunizar sujetos contra diversas enfermedades. Estas composiciones normalmente incluirán un transportador farmacéuticamente aceptable además de los liposomas. En la referencia 29 se encuentra disponible un análisis detallado de los transportadores farmacéuticamente aceptables.

Una composición farmacéutica de la invención incluye un tampón Tris.

- 10 Una composición farmacéutica de la invención puede incluir uno o más inmunopotenciadores farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (por ejemplo, Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (por ejemplo, un fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como E6020), un agonista de TLR7 (por ejemplo, imiquimod), un agonista de TLR8 (por ejemplo, resiquimod) y/o un agonista de TLR9 (por ejemplo, IC31). Cualquiera de dichos agonistas tiene idealmente un peso molecular de < 2000 Da. En algunas realizaciones, dicho uno o más
15 agonistas también se encapsulan con el ARN dentro de los liposomas, pero en otras realizaciones no están encapsulados.

Las sales tamponantes se incluirán normalmente en el intervalo de 5-20 mM.

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

Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para aportar tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl es habitual, por ejemplo, aproximadamente 9 mg/ml.

- 25 Las composiciones de la invención pueden incluir quelantes de iones metálicos. Éstos pueden prolongar la estabilidad del ARN al eliminar los iones que pueden acelerar la hidrólisis de los fosfodiésteres. Por lo tanto, una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, *etc.* Dichos quelantes están normalmente presentes entre 10-500 μ M, por ejemplo, 0,1 mM. Una sal de citrato, tal como citrato sódico, también puede actuar como
30 quelante, mientras proporciona también ventajosamente una actividad tamponante.

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

- 35 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefieren las composiciones sin mercurio y se pueden preparar vacunas sin conservantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente estériles.

- 40 Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente no pirógenas, por ejemplo, que contiene <1 EU (por sus siglas en inglés, unidad de endotoxina, una medida patrón) por dosis, y preferentemente <0,1 EU por dosis.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente sin gluten.

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

- 50 Las composiciones se pueden preparar como soluciones o suspensiones inyectables. La composición se puede preparar para administración pulmonar, por ejemplo, mediante un inhalador, usando un aerosol fino. La composición se puede preparar para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como aerosoles o gotas. Los inyectables para administración intramuscular son habituales.

- 55 Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de liposomas, así como de cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física de la persona a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, *etc.*), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico a cargo del tratamiento sobre la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre dentro de un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos habituales. El
60 contenido de liposomas y ARN de las composiciones de la invención se expresará generalmente en términos de cantidad de ARN por dosis. Una dosis preferida tiene $\leq 100 \mu$ g de ARN (por ejemplo, de 10-100 μ g, tal como aproximadamente 10 μ g, 25 μ g, 50 μ g, 75 μ g o 100 μ g), pero la expresión se puede observar a niveles mucho más bajos, por ejemplo, $\leq 1 \mu$ g/dosis, ≤ 100 ng/dosis, ≤ 10 ng/dosis, ≤ 1 ng/dosis, *etc.*

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

5

Los liposomas de uso en la invención no contienen ribosomas.

Usos médicos

- 10 A diferencia de las partículas descritas en la referencia 10, las composiciones farmacéuticas de la invención son para su uso *in vivo* para provocar una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno de interés.

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

15

La invención también proporciona el uso de una composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un vertebrado.

- 20 Al generar una respuesta inmune en los vertebrados por estos usos y métodos, el vertebrado puede protegerse contra diversas enfermedades y/o infecciones, por ejemplo, contra enfermedades bacterianas y/o víricas como se analiza anteriormente. Los liposomas y las composiciones son inmunogénicos y, más preferentemente, son composiciones de vacuna. Las vacunas según la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir infecciones) o terapéuticas (es decir, para tratar infecciones), pero normalmente serán profilácticas.

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

30

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

35

- 40 Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede realizarse por inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intradérmica o en el espacio intersticial de un tejido; a diferencia de la referencia 1, la inyección intraglosal no suele utilizarse con fines de inmunización). Las vías de administración alternativas incluyen rectal, oral (por ejemplo, comprimidos, aerosoles), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración en las mucosas. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente se puede usar una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular característica es de 0,5 ml.

45

- 50 La invención puede utilizarse para inducir la inmunidad sistémica y/o de las mucosas, preferentemente para provocar una inmunidad sistémica y/o de las mucosas potenciada.

50

- La dosificación puede ser mediante un esquema de dosis única o un esquema de múltiples dosis. Se pueden utilizar múltiples dosis en un esquema de inmunización primaria y/o en un esquema de inmunización de refuerzo. En un esquema de múltiples dosis, las distintas dosis pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo, un cebado parenteral y un refuerzo de la mucosa, un cebado de la mucosa y un refuerzo parenteral, *etc.* Las dosis múltiples normalmente se administrarán con al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, *etc.*). En una realización, se pueden administrar dosis múltiples aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del nacimiento, por ejemplo, a la edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se suele utilizar en el Programa Ampliado de Inmunización ("EPI, por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud. En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias aproximadamente con dos meses de diferencia, por ejemplo, aproximadamente con 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguidas de una o más dosis de refuerzo entre 6 meses y 1 año después de la segunda dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12

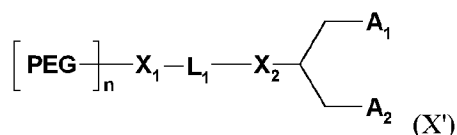
55

60

meses después de la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias aproximadamente con dos meses de diferencia, por ejemplo, aproximadamente con 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguidas de una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses y 1 año después de la tercera dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10, o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

Fórmula (A)

Los compuestos de fórmula (X') contienen un grupo de cabeza de polímero hidrófilo unido a un resto lipídico. Se pueden describir como "lípidos ocultos" y tienen la fórmula:



en donde

PEG es una subunidad de poli(etilenglicol), en donde el PEG puede ser lineal o ramificado;

n es un grado de polimerización promediado en número entre 10 y 200 unidades de PEG, preferentemente alrededor de 45 unidades;

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

X₁ y X₂ son oxígeno;

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

Los lípidos de fórmula (X'), cuando se formulan con lípidos catiónicos para formar liposomas, pueden aumentar el tiempo durante el cual puede existir un liposoma *in vivo* (por ejemplo, en la sangre). Pueden proteger la superficie de una superficie de un liposoma y, por lo tanto, reducir la opsonización por las proteínas de la sangre y la absorción por los macrófagos. Hay detalles adicionales en las referencias 30 y 31.

Los lípidos PEGilados adecuados para su uso con la invención incluyen conjugados de polietilenglicol-diacilglicerol o polietilenglicol-diacilglicamida (PEG-DAG) que incluyen aquellos que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida que tiene una longitud de cadena alquilo que comprende independientemente de aproximadamente C4 a aproximadamente C40 átomos de carbono saturados o insaturados. El grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos. El lípido PEGilado se puede seleccionar de PEG-dilaurilglicerol, PEG-dimiristilglicerol (número de catálogo GM-020 de NOF), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-disterilglicerol, PEG-dilaurilglicamida, PEG-dimiristilglicamida, PEG-dipalmitoilglicamida y PEG-disterilglicamida, PEG-colesterol (1-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-metil-poli(etilenglicol), PEG-DMB (éter de 3,4-ditetradecoxilbencil-[omega]-metil-poli(etilenglicol)), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)-2000] (n.º de catálogo 880150P de Avanti Polar Lipids). Otros lípidos PEGilados útiles son S001, S002, S003, S004, S005, S006, S007, S008, S009, S010, S011 y CS-020SA (NOF); S010 y S011 se divulgan en la ref. 32 con las etiquetas IVa y IVc, respectivamente. En la referencia 32, para preparar IVa y IVc se utiliza una síntesis diferente de la indicada en el presente documento.

Términos y definiciones químicos

Halo

Los términos "halógeno" (o "halo") incluyen flúor, cloro, bromo y yodo.

Alquilo, alquileo, alqueno, alquino, cicloalquilo etc.

Los términos "alquilo", "alquileo", "alqueno" y "alquino" se utilizan en el presente documento para referirse a formas acíclicas tanto de cadena lineal como ramificada. Los análogos cíclicos de los mismos se denominan cicloalquilo, etc.

El término "alquilo" incluye grupos de hidrocarbilo monovalentes, lineales o ramificados, saturados y acíclicos. En una realización, el alquilo es alquilo C₁₋₁₀, en otra realización alquilo C₁₋₆, en otra realización alquilo C₁₋₄, tal como grupos

metilo, etilo, n-propilo, i-propilo o t-butilo.

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

5 El término "alcoxi" significa alquil-O-.

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

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

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

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

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

30 El término "alquenileo" incluye grupos de hidrocarbilo divalentes, lineales o ramificados, insaturados y acíclicos que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, sin triples enlaces carbono-carbono. En una realización, el alquenileo es alquenileo C₂₋₁₀, en otra realización alquenileo C₂₋₆, en otra realización alquenileo C₂₋₄.

35 El término "alquinileo" incluye grupos de hidrocarbilo divalentes, lineales o ramificados, insaturados y acíclicos que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y, en una realización, sin dobles enlaces carbono-carbono. En una realización, el alquinileo es alquinileo C₂₋₁₀, en otra realización alquinileo C₂₋₆, en otra realización alquinileo C₂₋₄.

Heteroalquilo, etc.

40 El término "heteroalquilo" incluye grupos alquilo en los que se sustituyen hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, cada uno independientemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si (y preferentemente O, S(O)_q o N), siempre que permanezca al menos uno de los átomos de carbono del alquilo. El grupo heteroalquilo puede estar unido a C o heterounido, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si.

50 El término "heterocicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo en los que se sustituyen hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que permanezca al menos uno de los átomos de carbono del cicloalquilo. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen oxiranilo, tiananilo, aziridinilo, oxetanilo, tiananilo, azetidino, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, 1,4-oxatiano, morfolinilo, 1,4-ditanilo, piperazinilo, 1,4-azatiano, oxepanilo, tiepanilo, azepanilo, 1,4-dioxepanilo, 1,4-oxatiepanilo, 1,4-oxaazepanilo, 1,4-ditiepanilo, 1,4-tieazepanilo y 1,4-diazepanilo. El grupo heterocicloalquilo puede estar unido a C o a N, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de un átomo de nitrógeno.

60 El término "heteroalquenilo" incluye grupos alquenilo en los que se sustituyen hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que permanezca al menos uno de los átomos de carbono del alquenilo. El grupo heteroalquenilo puede estar unido a C o heterounido, es decir, puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_q o N.

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

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

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

El término "heterocicloalquileno" incluye grupos alquileno en los que se sustituyen hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que permanezca al menos uno de los átomos de carbono del alquileno.

El término "heteroalquenileno" incluye grupos alquenileno en los que se sustituyen hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que permanezca al menos uno de los átomos de carbono del alquenileno.

El término "heteroalquinileno" incluye grupos alquinileno en los que se sustituyen hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, siempre que permanezca al menos uno de los átomos de carbono del alquinileno.

Arilo

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

Otros ejemplos de grupos arilo son los derivados monovalentes del acantrileno, acenaftileno, acefenaftileno, antraceno, azuleno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleyadeno, pireno, pirantreno y rubiceno.

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

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

Heteroarilo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El término "heteroarilalquilo" significa alquilo sustituido con un grupo heteroarilo.

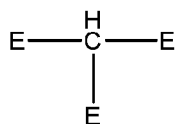
El término "heteroarileno" incluye grupos de hidrocarbilo divalentes heteroaromáticos y cíclicos que contienen adicionalmente uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de O, S, N y NRⁿ, donde Rⁿ se define a continuación (y en una realización es H o alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆)).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

Los términos "arilo", "aromático", "heteroarilo" y "heteroaromático" también incluyen grupos que están parcialmente reducidos. De este modo, por ejemplo, "heteroarilo" incluye especies fusionadas en las que uno de los anillos se ha reducido a un anillo saturado (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-ilo).

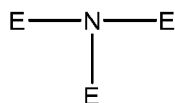
General

A menos que se indique explícitamente lo contrario, donde las combinaciones de grupos se denominan en el presente documento como un resto, por ejemplo, arilalquilo, el último grupo mencionado contiene el átomo mediante el cual el resto se une al resto de la molécula.

Cuando se hace referencia a un átomo de carbono de un grupo alquilo u otro grupo que se reemplaza por O, S(O)_n, N o P(O)_n, lo que se pretende es que:

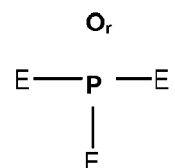


se sustituya por



5

o



10

(en donde E no puede ser H);

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

15

≡CH se sustituye por ≡N o ≡P(O)_r; o

-CH₂- se sustituye por -O-, -S(O)_q-, -NR^N- o -P(O)_rR^N-, donde R^N es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, heterocicloalquilo C₃₋₆, alqueno C₂₋₆, heteroalqueno C₂₋₆, cicloalqueno C₃₋₆, heterocicloalqueno C₃₋₆, fenilo o heteroarilo que contienen 5 o 6 miembros de anillo. R^N es preferentemente H, alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₃₋₆.

20

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

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

25

Cuando se hace referencia a un átomo de carbono que se sustituye por Si, lo que se pretende es que el átomo de carbono se intercambie por un átomo de silicio pero que, por lo demás, los enlaces sigan siendo los mismos. De este modo, por ejemplo, -CH₂- se sustituye por -SiH₂-; -CH= se sustituye por -SiH=; y =C-H se sustituye por =Si-H.

A modo de aclaración, en relación con los grupos que contienen heteroátomos mencionados anteriormente (tales como heteroalquilo, etc.), donde se proporciona un número de átomos de carbono, por ejemplo heteroalquilo C₃₋₆, lo que se pretende es un grupo basado en alquilo C₃₋₆ en el que uno o más de los 3-6 átomos de carbono de la cadena se sustituyan por O, S(O)_q o N. En consecuencia, un grupo heteroalquilo C₃₋₆, por ejemplo, contendría menos de 3-6 átomos de carbono en la cadena. Como otro ejemplo, un grupo piridilo se clasificaría como grupo heteroarilo C₆ a pesar de que contiene 5 átomos de carbono.

30

Sustitución

Se pueden sustituir o no grupos de los compuestos de uso en la invención (por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alqueno, cicloalqueno, alquino, alqueno, alqueno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, heteroalqueno, heterocicloalqueno, heteroalquino, heteroalqueno, heteroalqueno arilo, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, grupos heteroarilalquilo o heteroarilheteroalquilo etc.), en una realización sin sustituir. Normalmente, la sustitución implica el reemplazo teórico de un átomo de hidrógeno con un grupo sustituyente, o dos átomos de hidrógeno en el caso de sustitución por =O.

40

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

45

En una realización, el uno o más sustituyentes son independientemente Sub¹ o Sub² (en una realización Sub²) en donde:

50

Sub¹ es independientemente un halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, -NO₂, -CN, -N⁺(R^s)₂O⁻, -CO₂H, -CO₂R^s, -SO₃H,

-SOR^s, -SO₂R^s, -SO₃R^s, -OC(=O)OR^s, -C(=O)H, -C(=O)R^s, -OC(=O)R^s, =O, -NR^s₂, -C(=O)NH₂, -C(=O)NR^s₂, -N(R^s)C(=O)OR^s, -N(R^s)C(=O)NR^s₂, -OC(=O)NR^s₂, -N(R^s)C(=O)R^s, -C(=S)NR^s₂, -NR^sC(=S)R^s, -SO₂NR^s₂, -NR^sSO₂R^s, -N(R^s)C(=S)NR^s₂, -N(R^s)SO₂NR^s₂, -R^s o -Z^sR^s, en donde;

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

R^s es independientemente H o alquilo C₁₋₆, heteroalquilo C₁₋₆, -(Alk^a)_f-cicloalquilo C₃₋₆, -(Alk^a)_f-heterocicloalquilo C₃₋₆, alqueno C₂₋₆, heteroalqueno C₂₋₆, -(Alk^a)_f-cicloalqueno C₃₋₆, -(Alk^a)_f-heterocicloalqueno C₃₋₆, alquino C₂₋₆, heteroalquino C₂₋₆, -(Alk^a)_f-arilo C₆₋₁₄, -(Alk^a)_f-arilo C₆₋₁₄o -(Alk^a)_f-heteroarilo (donde el heteroarilo contiene 5-13 miembros de anillo), donde

f es 0 o 1;

Alk^a es alquileo C₁₋₆o heteroalquileo C₁₋₆; y

15 R^s está opcionalmente sustituido (en una realización sin sustituir) por 1 a 3 sustituyentes Sub²;

Sub² es independientemente un halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, -NO₂, -CN, -N+(alquilo C₁₋₆)₂O⁻, -CO₂H, -CO₂alquilo C₁₋₆, -SO₃H, -SO₃alquilo C₁₋₆, -SO₂alquilo C₁₋₆, -SO₃alquilo C₁₋₆, -OC(=O)Oalquilo C₁₋₆, -C(=O)H, -C(=O)alquilo C₁₋₆, -OC(=O)alquilo C₁₋₆, =O, -N(alquilo C₁₋₆)₂, -C(=O)NH₂, -C(=O)N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)C(=O)O(alquilo C₁₋₆), -N(alquilo C₁₋₆)C(=O)N(alquilo C₁₋₆)₂, -OC(=O)N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)C(=O)alquilo C₁₋₆, -C(=S)N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)C(=S)(alquilo C₁₋₆), -SO₂N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)SO₂alquilo C₁₋₆, -N(alquilo C₁₋₆)C(=S)N(alquilo C₁₋₆)₂, N(alquilo C₁₋₆) SO₂N(alquilo C₁₋₆)₂, -alquilo C₁₋₆, -heteroalquilo C₁₋₆, -cicloalquilo C₃₋₆, -heterocicloalquilo C₃₋₆, -alqueno C₂₋₆, -heteroalqueno C₂₋₆, -cicloalqueno C₃₋₆, -heterocicloalqueno C₃₋₆, -alquino C₂₋₆, -heteroalquino C₂₋₆, -arilo C₆₋₁₄, -heteroarilo C₅₋₁₃, -Z^l-alquilo C₁₋₆, -Z^l-cicloalquilo C₃₋₆, -Z^l-alqueno C₂₋₆, -Z^l-cicloalqueno C₃₋₆, o -Z^l-alquino C₂₋₆; y Z^l es independientemente O, S, NH o N(alquilo C₁₋₆).

30 Mientras R^s en Sub¹ puede estar opcionalmente sustituido por 1 a 3 sustituyentes Sub², Sub² no está sustituido. Sin embargo, en una realización, R^s no está sustituido.

En una realización, R^s es H o alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido por 1 a 3 sustituyentes Sub².

35 En una realización, Sub² es independientemente un halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, -NO₂, -CN, -N+(alquilo C₁₋₆)₂O⁻, -CO₂H, -SO₃H, -SO₃alquilo C₁₋₆, -SO₂alquilo C₁₋₆, -C(=O)H, -C(=O)alquilo C₁₋₆, =O, -N(alquilo C₁₋₆)₂, -C(=O)NH₂, -alquilo C₁₋₆, -cicloalquilo C₃₋₆, -heterocicloalquilo C₃₋₆, -Z^l-alquilo C₁₋₆o -Z^l-cicloalquilo C₃₋₆. En una realización, donde el grupo sustituido es acíclico (por ejemplo, alquilo, heteroalquilo, alqueno *etc.*), Sub¹ no es -R^s y sub² no es -alquilo C₁₋₆, -heteroalquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -heteroalqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆o -heteroalquino C₂₋₆.

40 Cuando un grupo que no sea Sub² tiene al menos 2 posiciones que pueden estar sustituidas, el grupo puede estar sustituido por ambos extremos de una cadena de alquileo, alqueno, alquino, heteroalquileo, heteroalqueno o heteroalquino (en una realización que contiene de 1 a 6 átomos, en una realización adicional de 3 a 6 átomos, y en una realización adicional de 3 o 4 átomos) para formar un resto cíclico. Esa cadena está opcionalmente sustituida por 1 a 3 sustituyentes Sub². En una realización, esa cadena no está sustituida. De este modo, las expresiones "cicloalquilo", "cicloalqueno", "cicloalquino", "heterocicloalquilo", "heterocicloalqueno" "heterocicloalquino", "arilo" y "heteroarilo" opcionalmente sustituido incluyen especies fusionadas. Por ejemplo, "cicloalquilo opcionalmente sustituido" incluye una especie en la que se fusionan dos anillos de cicloalquilo, y "heteroarilo opcionalmente sustituido" incluye una especie en la que un anillo de heterocicloalquilo se fusiona con el anillo aromático (por ejemplo, 5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-ilo).

55 Cuando un grupo que no sea Sub² tiene un átomo que puede estar sustituido dos veces, ese átomo puede estar sustituido por ambos extremos de una cadena de alquileo, alqueno, alquino, heteroalquileo, heteroalqueno o heteroalquino (en una realización que contiene de 2 a 8 átomos, en una realización adicional de 3 a 6 átomos, y en una realización adicional de 4 o 5 átomos) para formar un resto cíclico. Esa cadena está opcionalmente sustituida por 1 a 3 sustituyentes Sub². En una realización, esa cadena no está sustituida. De este modo, las expresiones "cicloalquilo", "cicloalqueno", "cicloalquino", "heterocicloalquilo", "heterocicloalqueno" "heterocicloalquino", "arilo" y "heteroarilo" opcionalmente sustituido incluyen especies espiró.

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

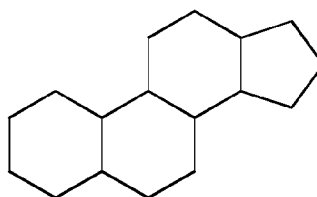
Términos modificadores

Cuando una lista va precedida de un modificador, lo que se pretende es dar a entender que el modificador se aplica a cada uno de los elementos de la lista. Por ejemplo, la oración "grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀, heterocicloalqueno C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido" significa que cada uno de los cuatro elementos de la lista, en concreto, el grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀, el grupo heterocicloalqueno C₃₋₂₀, el grupo heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ y el grupo heteroarilo C₆₋₂₀, puede estar opcionalmente sustituido.

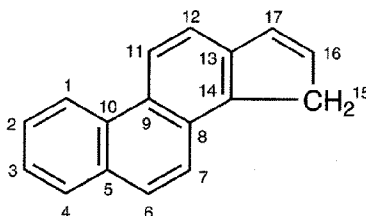
Cuando un grupo se caracteriza por un primer modificador y después, o a continuación, el mismo grupo se caracteriza por un modificador posterior, lo que significa es que el grupo se caracteriza por ambos modificadores simultáneamente. Por ejemplo, si un grupo se describe como un grupo "heterocicloalquinilo C₃₋₂₀" (el primer modificador) y luego el mismo grupo se describe como un "grupo C₅₋₁₆" (el modificador posterior), lo que significa es un grupo heterocicloalquinilo C₅₋₁₆.

Esteroides

Como se utiliza en el presente documento, el término "esteroide" se refiere a cualquier grupo que comprenda la siguiente estructura (estructura que se denomina en el presente documento "esqueleto de esteroide").



Simplemente con fines ilustrativos, el esqueleto de esteroide se ha dibujado anteriormente como saturado por completo. El término esteroide, sin embargo, también pretende cubrir casos en los que hay insaturación en el esqueleto de esteroide. Por ejemplo, el término esteroide abarca un grupo que comprende el esqueleto básico completamente insaturado (mancude), 15H-ciclopenta[a]fenantreno:

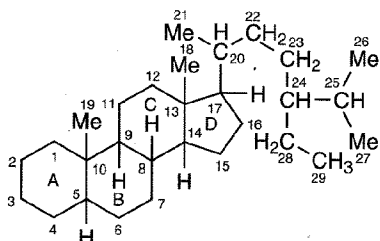


El término esteroide también abarca un grupo que comprende un esqueleto de esteroide parcialmente insaturado.

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

El término esteroide también abarca los casos en los que uno o más de los átomos de carbono en el esqueleto de esteroide marcado con estructura se reemplaza por un heteroátomo. En una realización de este tipo, se sustituyen hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, cada uno independientemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si (y preferentemente O, S(O)_q o N). En una realización, sin embargo, el término "esteroide" comprende especies en las que el "esqueleto básico de esteroide" no contiene heteroátomos.

Un sistema de anillos de esteroides se numera según la convención establecida a continuación.



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

Insaturación

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

General

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

La expresión "que comprende" abarca tanto "que incluye" como "que consiste en", por ejemplo, una composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico X es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La expresión "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la expresión "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Las referencias a carga, a cationes, a aniones, a iones dipolares, *etc.*, se toman a pH 7.

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

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

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

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

PKR es una proteína cinasa dependiente de ARN bicatenario. Desempeña un papel clave en el sistema inmunitario

innato. "EIF2AK2" (para el factor de iniciación de la traducción eucariota 2-alfa quinasa 2) es el nombre HGNC aprobado para el gen que codifica esta enzima, y su ID de HGNC exclusivo es HGNC:9437. La secuencia RefSeq para el gen PKR humano es GI:208431825.

5 Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 muestra un gel con ARN teñido. Los carriles muestran (1) marcadores (2) replicón desnudo (3) replicón después del tratamiento con RNasa (4) replicón encapsulado en liposoma (5) liposoma después del tratamiento con RNasa (6) liposoma tratado con RNasa, sometido después a extracción con fenol/cloroformo.
- La figura 2 es una micrografía electrónica de liposomas.
- La figura 3 muestra la expresión de proteínas (como unidades de luz relativas, RLU, por sus siglas en inglés) en los días 1, 3 y 6 después del suministro de ARN en liposomas con PEG de diferentes longitudes: 1k Da (triángulos); 2k Da (círculos); 3k Da (cuadrados).
- La figura 4 muestra un gel con ARN teñido. Los carriles muestran (1) marcadores (2) replicón desnudo (3) replicón encapsulado en liposoma (4) liposoma tratado con RNasa, y sometido después a extracción con fenol/cloroformo.
- La figura 5 muestra la expresión de proteínas en los días 1, 3 y 6 después del suministro de ARN como un replicón empaquetado en un virión (cuadrados), como ARN desnudo (rombos) o en liposomas (+ = 0,1 µg, x = 1 µg).
- La figura 6 muestra la expresión de proteínas en los días 1, 3 y 6 después de la administración de cuatro dosis diferentes de ARN encapsulado en liposomas.
- La figura 7 muestra títulos de IgG anti-F en animales que reciben replicones empaquetados en viriones (VRP o VSRP, por sus siglas en inglés), 1 µg de ARN desnudo y 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.
- La figura 8 muestra los títulos de IgG anti-F en animales que reciben VRP, 1 µg de ARN desnudo y 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.
- La figura 9 muestra títulos de anticuerpos neutralizantes en animales que recibieron VRP o 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.
- La figura 10 muestra los niveles de expresión después del suministro de un replicón como ARN desnudo (círculos), ARN encapsulado en liposomas (triángulo y cuadrado), o como un lipoplex (triángulo invertido).
- La figura 11 muestra títulos de IgG específica para F (2 semanas después de la segunda dosis) después del suministro de un replicón como ARN desnudo (0,01-1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,01-10 µg) o empaquetado como virión (VRP, 10⁶ unidades infecciosas o IU, por sus siglas en inglés).
- La figura 12 muestra títulos de IgG específica para F (círculos) y títulos de PRNT (cuadrados) después del suministro de un replicón como ARN desnudo (1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg) o empaquetado como virión (VRP, 10⁶ IU). También se muestran los títulos en ratones sin tratamiento previo. Las líneas continuas muestran medias geométricas.
- La figura 13 muestra la producción de citocinas intracelulares después de la reestimulación con péptidos sintéticos que representan los epitopos principales en la proteína F, 4 semanas después de una segunda dosis. El eje y muestra el % de citocinas+ de CD8+CD4-.
- La figura 14 muestra la estructura de lípido "RV05".
- La figura 15 muestra los títulos de IgG específica para F (log₁₀ de la media de los títulos ± desviación estándar) durante 210 días después de la inmunización de los terneros. Las tres líneas se distinguen fácilmente en el día 63 y son, de abajo a arriba: control negativo con PBS; ARN suministrado en liposomas; y el producto "Triángulo 4".
- La figura 16 muestra estructuras de tres lípidos DMG conjugados con PEG (1-3 kDa).
- Las figuras 17A a 17E muestran estructuras de varios lípidos conjugados con PEG, donde R es PEG de una longitud deseada.
- La figura 18 muestra la estructura de un lípido conjugado con PEG "dividido" útil. El recuadro muestra el PM total de PEG en el lípido (que, en el ejemplo específico a continuación, era 2000).

Ejemplos de referencia

Replicones de ARN

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

10 El ADN plasmídico que codifica los replicones de alfavirus (denominados: pT7-mVEEV-FL.RSVF o A317; pT7-mVEEV-SEAP o A306; pSP6-VCR-GFP o A50) sirvió como plantilla para la síntesis de ARN *in vitro*. Los replicones contienen los elementos genéticos del alfavirus necesarios para la replicación del ARN, pero carecen de los productos génicos codificantes necesarios para el ensamblaje de partículas; en cambio, las proteínas estructurales se reemplazan por una proteína de interés (ya sea un indicador, como SEAP o GFP, o un inmunógeno, como la proteína RSV F de longitud completa), por lo que los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un
15 promotor de bacteriófago (T7 o SP6) cadena arriba del ADNc de alfavirus facilita la síntesis del ARN del replicón *in vitro* y una ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) inmediatamente cadena abajo de la cola de poli(A) genera el extremo 3' correcto a través de su actividad de autoescisión.

20 Después de la linealización del ADN plasmídico cadena abajo de la ribozima de HDV con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron transcritos run-off *in vitro* utilizando ARN polimerasa dependiente de ADN procedente de los bacteriófagos T7 o SP6. Las transcripciones se realizaron durante 2 horas a 37 °C en presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa T7) o 5 mM (ARN polimerasa SP6) de cada uno de los nucleósidos trifosfato (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion). Después de la transcripción, el
25 ADN molde se digirió con TURBO DNasa (Ambion). El ARN del replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua sin nucleasas. El ARN sin proteger terminalmente con caperuza se protegió con caperuza después de la transcripción con la enzima de protección terminal con caperuza de vaccinia (VCE) utilizando el sistema de protección terminal con caperuza ScriptCap m7G (Epicentre Biotechnologies) como se describe en el manual del usuario; los replicones protegidos terminalmente con caperuza de esta manera reciben el prefijo "v", por ejemplo, vA317 es el replicón A317 protegido terminalmente con caperuza por VCE. El ARN protegido terminalmente con caperuza después
30 de la transcripción se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua sin nucleasas. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo la DO_{260nm} . La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante.

Encapsulación liposómica

35 El ARN se encapsuló en liposomas elaborados esencialmente mediante el método de las referencias 7 y 41. Los liposomas se prepararon con DSPC (dipolar) al 10 %, DlinDMA (catiónico) al 40 %, colesterol al 48 % y DMG conjugado con PEG al 2 %. Estas proporciones se refieren al % de moles en el total del liposoma.

40 Se sintetizó DlinDMA (1,2-dilinoil-3-aminopropano) utilizando el procedimiento de la referencia 2. Se adquirió DSPC (1,2-diastearoil-sn-glicero-3-fosfolina) de Genzyme. El colesterol se obtuvo de Sigma-Aldrich. El DMG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(poli)etilenglicol], sal de amonio) conjugado con PEG, DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, sal de cloruro) y el DC-col (clorhidrato de 3β -[N-(N',N'-dimetilamino)etano]-carbamoil]colesterol) se adquirieron de Avanti Polar Lipids.

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

En un método de encapsulación particular, se prepararon soluciones madre de lípidos en etanol recientes. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de DMG conjugado con PEG y se disolvieron
55 en 7,55 ml de etanol. Se utilizaron cinco PEG conjugados diferentes: PEG-500, PEG-750, PEG-1000, PEG-2000 o PEG-3000. La solución madre de lípidos recién preparada se agitó suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 226,7 µl de la solución madre a 1,773 ml de etanol para preparar una solución madre de trabajo de lípidos de 2 ml. También se preparó una solución de trabajo de 2 ml de ARN a partir de una solución madre de ~1 µg/µl en tampón de citrato 100 mM (pH 6). Se enjuagaron tres
60 viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con solución RNase Away y se lavaron con abundante agua MilliQ antes de su uso para descontaminar los viales de RNasa. Uno de los viales se utilizó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípidos y ARN (como se describe posteriormente). Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en jeringas luer-lok de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contenían el ARN y los lípidos se

conectaron a un mezclador T (unión PEEK™ de 500 µm de diámetro interno) utilizando tubos de FEP (etileno-propileno fluorado; teniendo todos los tubos de FEP utilizados un diámetro interno de 2 mm y un diámetro externo de 3 mm; obtenido de IDEX Health Science). La salida del mezclador T también era un tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón de citrato se conectó a una pieza del tubo separada. A continuación, todas las jeringas se accionaron a un caudal de 7 ml/min utilizando una bomba de jeringa. Las salidas de los tubos se colocaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). Se retiró la barra de agitación y se permitió que la solución acuosa/etanol se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se cargó la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se colocó en un trozo de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cc con la misma longitud de tubo de FEP, se cargó un volumen igual de tampón de citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 7 ml/min usando una bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron frente a 10-15 volúmenes de PBS 1X utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) antes de recuperar el producto final. El sistema de TFF y las membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs y se utilizaron según las pautas del fabricante. Se utilizaron membranas de filtración de fibra hueca con un valor de corte de tamaño de poro de 100 kD y un área superficial de 20 cm². Para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con PBS 1X.

El porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN se determinaron mediante el kit de reactivos Quant-iT RiboGreen RNA (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El patrón de ARN ribosómico suministrado en el kit se utilizó para generar una curva patrón. Los liposomas se diluyeron 10x o 100x en tampón TE 1X (del kit) antes de la adición del colorante. Por separado, los liposomas se diluyeron 10x o 100x en un tampón TE 1X que contenía Triton X al 0,5 % antes de añadir el colorante (para romper los liposomas y así poder analizar el ARN total). A continuación, se añadió una cantidad igual de colorante a cada solución y después se cargaron por duplicado ~180 µl de cada solución tras la adición del colorante en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. La fluorescencia (Ex 485 nm, Em 528 nm) se leyó en un lector de microplacas. Todas las formulaciones liposómicas se administraron *in vivo* basándose en la cantidad de ARN encapsulado.

Para obtener liposomas más pequeños, el método de jeringa/tubo se reemplazó por un método en el que las soluciones de lípidos y ARN se mezclan en canales en un chip microfluídico. Se prepararon soluciones madre de lípidos en etanol recientes. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre de lípidos recién preparada se agitó suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 226,7 µl de la solución madre a 1,773 ml de etanol para preparar una solución madre de trabajo de lípidos de 2 ml. También se preparó una solución de trabajo de 4 ml de ARN partir de una solución madre de ~1 µg/µl en tampón de citrato 100 mM (pH 6). Se enjuagaron cuatro viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con solución RNase Away y se lavaron con abundante agua MilliQ antes de su uso para descontaminar los viales de RNasa. Dos de los viales se utilizaron para la solución de trabajo de ARN (2 ml en cada vial) y los otros para recoger las mezclas de lípidos y ARN. Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en jeringas luer-lok de 3 cc. Las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un chip de unión Mitos Droplet (un dispositivo microfluídico de vidrio obtenido de Syrris, Parte n.º 3000158) con tubo de PTFE de 7,62X10⁻⁴ m (0,03 pulgadas) de DI x 1,6X10⁻³ m (1/16 de pulgada) de, (Syrris) utilizando un conector de borde de 4 vías. Se impulsaron dos corrientes de ARN y una corriente de lípidos mediante bombas de jeringa y la mezcla de etanol y la fase acuosa se realizó en la unión X (100 µm x 105 µm) del chip. El caudal de las tres corrientes se mantuvo a 1,5 ml/min, por lo tanto, la relación entre el caudal acuoso total y el etanólico fue de 2:1. La salida del tubo se colocó para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). Se retiró la barra de agitación y se permitió que la solución acuosa/etanol se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la mezcla se cargó en una jeringa de 5 cc que se ajustó a una pieza de tubo de PTFE de 7,62X10⁻⁴ m (0,03 pulgadas) de DI x 1,6X10⁻³ m (1/16 de pulgada) de y en otra jeringa de 5 cc con la misma longitud de tubo de PTFE, se cargó un volumen igual de tampón de citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 3ml/min usando una bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron frente a 10-15 volúmenes de PBS 1X utilizando el sistema TFF antes de recuperar el producto final. Se utilizaron membranas de filtración de fibra hueca con un valor de corte de tamaño de poro de 100 kDa y un área superficial de 20cm². Para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con PBS 1X. Mientras que los liposomas preparados con el método de jeringa/tubo con 75 µg de ARN tenían un diámetro Z promedio (Zav) de 148 nm y un índice de polidispersidad (pdl) de 0,122, la mezcla del chip proporcionó liposomas con un Zav de 97 nm y un pdl de 0,086. La proporción de ARN encapsulado disminuyó ligeramente del 90 % al 87 %.

Se demostró que la encapsulación en liposomas protege al ARN de la digestión por RNasas. Los experimentos utilizaron 3,8 mAU de RNasa A por microgramo de ARN, incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. La RNasa se inactivó con proteinasa K a 55 °C durante 10 minutos. Una mezcla de muestra de 1:1 v/v a 25:24:1 v/v/v, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico se añadió a continuación para extraer el ARN de los lípidos a la fase acuosa. Las muestras se mezclaron mediante agitación vorticial durante unos segundos y después se colocaron en una centrífuga durante 15 minutos a 12k RPM. Se eliminó la fase acuosa (que contenía el ARN) y se utilizó para analizar el ARN.

Antes de la carga (400 ng de ARN por pocillo), todas las muestras se incubaron con colorante de carga de formaldehído, desnaturalizado durante 10 minutos a 65 °C y enfriado a temperatura ambiente. Se usaron marcadores de Ambion Millennium para estimar de manera aproximada el peso molecular de la construcción de ARN. El gel se ejecutó a 90 V. El gel se tiñó usando 0,1 % de oro SYBR según las pautas del fabricante en agua agitando a temperatura ambiente durante 1 hora. La figura 1 muestra que la RNasa digiere completamente el ARN en ausencia de encapsulación (carril 3). El ARN es indetectable después de la encapsulación (carril 4) y no se observa ningún cambio si estos liposomas se tratan con RNasa (carril 4). Después de someter los liposomas tratados con RNasa a extracción con fenol, se observa ARN no digerido (carril 6). Incluso después de 1 semana a 4 °C, el ARN podía observarse sin ninguna fragmentación (figura 4, flecha). La expresión de proteínas *in vivo* se mantuvo sin cambios después de 6 semanas a 4 °C y un ciclo de congelación-descongelación. Por lo tanto, el ARN encapsulado en liposomas es estable.

Para evaluar la expresión *in vivo* del ARN se codificó una enzima indicadora (SEAP; por sus siglas en inglés, fosfatasa alcalina secretada) en el replicón, en lugar de un inmunógeno. Los niveles de expresión se midieron en sueros diluidos 1:4 en tampón de dilución PhosphaLight 1X utilizando un sustrato de fosfato alcalino quimioluminiscente. A ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad (5/grupo) se les inyectaron por vía intramuscular el día 0, 50 µl por pata con una dosis de ARN de 0,1 µg o 1 µg. El mismo vector también se administró sin los liposomas (en PBS 1X sin RNasa) a 1 µg. También se probaron replicones empaquetados en viriones. Los replicones empaquetados en viriones utilizados en el presente documento (denominados "VRP") se obtuvieron mediante los métodos de la referencia 42, donde el replicón de alfavirus se obtiene de VEEV mutante o una quimera procedente del genoma de VEEV modificado por ingeniería para contener la 3' UTR del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento (PS, por sus siglas en inglés) del virus Sindbis, empaquetados por electroporación conjunta en células BHK con ARN auxiliares defectuosos que codifican los genes de la cápside y las glicoproteínas del virus Sindbis.

Como se muestra en la figura 5, la encapsulación aumentó los niveles de SEAP en aproximadamente 1/2 log con la dosis de 1 µg, y en el día 6 la expresión a partir de una dosis encapsulada de 0,1 µg coincidió con los niveles observados con la dosis no encapsulada de 1 µg. Para el día 3, los niveles de expresión excedieron los logrados con los VRP (recuadros). Por lo tanto, el ARN expresado aumentó cuando se formuló en los liposomas con respecto al control de ARN desnudo, incluso a una dosis 10 veces menor. La expresión también fue mayor con respecto al control de VRP, pero las cinéticas de expresión fueron muy diferentes (véase la figura 5). El suministro del ARN con electroporación dio como resultado una mayor expresión con respecto al control de ARN desnudo, pero estos niveles fueron más bajos que con los liposomas.

Para evaluar si el efecto observado en los grupos de liposomas se debía simplemente a los componentes de los liposomas o estaba relacionado con la encapsulación, el replicón se administró en forma encapsulada (con dos protocolos de purificación diferentes, 0,1 µg de ARN), o mezclado con los liposomas después de su formación (un "lipoplex" no encapsulado, 0,1 µg de ARN) o como ARN desnudo (1 µg). La figura 10 muestra que el lipoplex proporcionó los niveles más bajos de expresión, demostrando que la encapsulación es esencial para una expresión potente.

Otros experimentos con SEAP mostraron una clara respuesta a la dosis *in vivo*, con una expresión observada después del suministro de tan solo 1 ng de ARN (figura 6). Otros experimentos que compararon la expresión de replicones encapsulados y desnudos indicaron que 0,01 µg de ARN encapsulado equivalía a 1 µg de ARN desnudo. A una dosis de 0,5 µg de ARN, el material encapsulado proporcionó una expresión 12 veces mayor en el día 6; a una dosis de 0,1 µg, los niveles eran 24 veces mayores en el día 6.

En lugar de observar los niveles promedio en el grupo, también se estudiaron animales individuales. Mientras que varios animales no respondieron a los replicones desnudos, la encapsulación eliminó a los que no respondían.

Otros experimentos reemplazaron DlinDMA con DOTAP. Aunque los liposomas de DOTAP proporcionaron una mejor expresión que el replicón desnudo, eran inferiores a los liposomas DlinDMA (diferencia de 2 a 3 veces el día 1).

Para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* se construyó un replicón para expresar la proteína F de longitud completa del virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés). Este se suministró desnudo (1 µg), encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg) o empaquetado en viriones (10⁶ IU; "VRP") en los días 0 y 21. La figura 7 muestra los títulos de IgG anti-F 2 semanas después de la segunda dosis, y los liposomas potencian claramente la inmunogenicidad. La figura 8 muestra títulos 2 semanas después, momento en el que no hubo diferencia estadística entre el ARN encapsulado a 0,1 µg, el ARN encapsulado a 1 µg o el grupo de VRP. Los títulos de neutralización (medidos como un 60 % de reducción en placa, "PRNT60") no fueron significativamente diferentes en estos tres grupos 2 semanas después de la segunda dosis (figura 9). La figura 12 muestra los títulos de IgG y PRNT 4 semanas después de la segunda dosis.

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

Otros experimentos compararon los títulos de IgG específica para F en ratones que recibieron VRP, 0,1 µg de ARN

encapsulado en liposomas o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas. Las razones de los títulos (VRP: liposoma) en varios momentos después de la segunda dosis fueron los siguientes:

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

- 5 Por tanto, el ARN encapsulado en liposomas induce esencialmente la misma magnitud de respuesta inmunitaria que la observada con el suministro de viriones.

Otros experimentos mostraron respuestas de IgG específica para F superiores con una dosis de 10 µg, respuestas equivalentes para dosis de 1 µg y 0,1 µg, y una respuesta menor con dosis de 0,01 µg. La figura 11 muestra los títulos de IgG en ratones que recibieron el replicón en forma desnuda a 3 dosis diferentes, en liposomas a 4 dosis diferentes, o como VRP (10⁶ IU). La respuesta observada con 1 µg de ARN encapsulado en liposomas fue estadísticamente insignificante (ANOVA) en comparación con VRP, pero la mayor respuesta observada con 10 µg de ARN encapsulado en liposomas fue estadísticamente significativa (p<0,05) en comparación con ambos grupos.

- 15 Otro estudio confirmó que 0,1 µg de ARN encapsulado en liposomas dieron respuestas de IgG anti-F mucho más altas (15 días después de la segunda dosis) que 0,1 µg de ADN suministrado, e incluso fue más inmunogénico que 20 µg de ADN plasmídico que codifica el antígeno F, suministrado por electroporación (sistema de suministro de ADN Elgen™, Inovio).

20 **Métodos de fabricación de liposomas**

En general, se han utilizado ocho métodos diferentes para preparar liposomas. Estos se denominan en el texto métodos (A) a (H) y difieren principalmente en relación con las etapas de filtración y TFF. Los detalles son de la siguiente manera:

- 25 (A) Se prepararon soluciones madre de lípidos en etanol recientes. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG DMG 2000 y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre de lípidos recién preparada se agitó suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 755 µl de la solución madre a 1,245 ml de etanol para preparar una solución madre de trabajo de lípidos de 2 ml. Esta cantidad de lípidos se utilizó para formar liposomas con 30 250 µg de ARN. También se preparó una solución de trabajo de 2 ml de ARN a partir de una solución madre de ~ 1 µg/µl en tampón de citrato 100 mM (pH 6). Se enjuagaron tres viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con solución RNase Away (Molecular BioProducts, San Diego, CA) y se lavaron con abundante agua MilliQ antes de su uso para descontaminar los viales de RNasa. Uno de los viales se utilizó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípidos y ARN (como se describe posteriormente). Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en jeringas luer-lok de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador T (unión PEEK™ de 500 µm de DI, IDEX Ciencias de la Salud, Oak Harbor, WA) utilizando tubos de FEP (etileno-propileno fluorado; el tubo FEP tiene un diámetro interno de 2 mm x 3 mm de diámetro externo, suministrado por IDEX Health Science). La salida del mezclador T también era un tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón de citrato se conectó a una pieza del tubo FEP separada. A continuación, todas las jeringas se accionaron a un caudal de 7 ml/min utilizando una bomba de jeringa. Las salidas de los tubos se colocaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). Se retiró la barra de agitación y se permitió que la solución acuosa/etanol se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cc, que estaba conectada a una pieza de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cc conectada a una longitud igual de un tubo de FEP, se cargó una cantidad igual de tampón de citrato 45 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 7 ml/min usando la bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, la mezcla recogida de la segunda etapa de mezcla (liposomas) se pasó a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que se une y elimina moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation, Ann Arbor, MI, EE. UU.). Antes de pasar los liposomas, se pasaron sucesivamente 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6) a través de la membrana Mustang. Los liposomas se calentaron durante 10 min a 37 °C antes de hacerlos pasar a través de la membrana. A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron frente a 10-15 volúmenes de PBS 1X usando TFF antes de recuperar el producto final. El sistema de TFF y las membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs y se utilizaron según las pautas del fabricante. Se utilizaron membranas de filtración de fibra hueca de polisulfona (número de pieza P/N: X1AB-100-20P) con un valor de corte de tamaño de poro de 100 kD y un área superficial de 8 cm². Para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con PBS 1X.
- 50 (B) Como el método (A) excepto que, después de la agitación, se añadieron 226,7 µl de la solución madre a 1,773 ml de etanol para preparar una solución madre de lípidos de trabajo de 2 ml, modificando así la relación lípido:ARN.

- (C) Como el método (B) excepto que se omitió la filtración Mustang, de modo que los liposomas pasaron del vial de vidrio de 20 ml a la diálisis de TFF.
- (D) Como el método (C), excepto que para la TFF se utilizaron membranas de fibra hueca de polietersulfona (PES) (número de pieza P-C1-100E-100-01N) con un valor de corte de tamaño de poro de 100 kD y un área superficial de 20 cm².
- (E) Como el método (D) excepto que se usó una membrana Mustang, como en el método (A).
- (F) Como el método (A) excepto que se omitió la filtración Mustang, de modo que los liposomas pasaron del vial de vidrio de 20 ml a la diálisis de TFF.
- (G) Como el método (D), excepto que se preparó una solución de trabajo de 4 ml de ARN a partir de una solución madre de ~ 1 µg/µl en tampón de citrato 100 mM (pH 6). Después se prepararon cuatro viales de vidrio de 20 ml de la misma manera. Dos de ellos se utilizaron para la solución de trabajo de ARN (2 ml en cada vial) y los otros para recoger las mezclas de lípidos y ARN, como en (C). En lugar de usar el mezclador T, las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un chip de unión Mitos Droplet (un dispositivo microfluídico de vidrio obtenido de Syrris, parte n.º 3000158) con tubo de PTFE 7,62X10⁻⁴ m (0,03 pulgadas) de diámetro interno x 1,6X10⁻³ m (1/16 de pulgada) de diámetro externo con un conector de borde de 4 vías (Syrris). Se impulsaron dos corrientes de ARN y una corriente de lípidos mediante bombas de jeringa y la mezcla de etanol y la fase acuosa se realizó en la unión X (100 µm x 105 µm) del chip. El caudal de las tres corrientes se mantuvo a 1,5 ml/min, por lo tanto, la relación entre el caudal acuoso total y el etanólico fue de 2:1. La salida del tubo se colocó para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). Se retiró la barra de agitación y se permitió que la solución acuosa/etanol se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se cargó la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se instaló en otra pieza del tubo de PTFE; en otra jeringa de 5 cc con la misma longitud de tubo de PTFE, se cargó un volumen igual de tampón de citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 3ml/min usando una bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de PBS 1X usando TFF, como en (D).
- (H) Como el método (A), excepto que la solución madre de lípidos de trabajo de 2 ml se preparó mezclando 120,9 µl de la solución madre de lípidos con 1,879 ml de etanol. Además, después de mezclar en el mezclador T, los liposomas del vial de 20 ml se cargaron en el recipiente de diálisis Pierce Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, extrafuerte, 0,5-3 ml de capacidad) y se dializó frente a 400-500 ml de PBS 1X durante la noche a 4 °C en un recipiente de plástico esterilizado en autoclave antes de recuperar el producto final.

Inmunogenicidad de RSV

- Se administró el replicón autorreplicante vA317 que codifica la proteína F de RSV a ratones BALB/c, 4 u 8 animales por grupo, mediante vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con el replicón (1 µg) solo o formulado como liposomas con DlinDMA ("RV01") o DOTAP ("RV13") o el lípido mostrado en la figura 14 ("RV05"). Los liposomas RV01 tenían DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG-DMG al 2 %, pero con diferentes cantidades de ARN. Los liposomas RV05 tenían RV05 al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG-DMG al 2 % o RV05 al 60 %, colesterol al 38 % y PEG-DMG al 2 %. Los liposomas RV13 tenían un DOTAP al 40 %, DOPE al 10 %, colesterol al 48 % y PEG-DMG al 2 %. En todos los casos, el PEG fue PEG-2000 (es decir, PEG de 2 kDa). A efectos de comparación, se suministró ADN plasmídico desnudo (20 µg) que expresaba el mismo antígeno RSV-F mediante electroporación o con liposomas RV01(10) (0,1 µg de ADN). Se usaron cuatro ratones como grupo de control sin tratamiento previo.
- Los liposomas se prepararon por el método (A) o el método (B). Para algunos liposomas realizados por el método (A) se usó una cantidad doble o la mitad de ARN. El diámetro de partícula promedio Z y el índice de polidispersidad fueron:

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

Se recogió suero para análisis de anticuerpos los días 14, 36 y 49. Se recogieron los bazo de los ratones el día 49 para el análisis de linfocitos T.

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

RV	Día 14	Día 36
Plásmido de ADN desnudo	439	6712
ARN A317 desnudo	78	2291

RV01 (10)	3020	26170
RV01 (08)	2326	9720
RV01 (05)	5352	54907
RV01 (09)	4428	51316
RV05 (01)	1356	5346
RV05 (02)	961	6915
ADN de RV01 (10)	5	13
RV13 (02)	644	3616

La proporción de linfocitos T que producen citocinas y específicos para el péptido RSV F51-66 es la siguiente, mostrando solamente cifras que son estadísticamente significativas por encima de cero:

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

Por lo tanto, las formulaciones de liposomas potenciaron significativamente la inmunogenicidad con respecto a los controles de ARN desnudo, según lo determinado por el aumento de los títulos de IgG específica para F y las frecuencias de linfocitos T. El ADN plasmídico formulado con liposomas, o suministrado desnudo utilizando electroporación, fue significativamente menos inmunogénico que el ARN autorreplicante formulado con liposomas.

Se prepararon liposomas RV01 adicionales por el método (H), de nuevo utilizando PEG de 2 kDa conjugado con DMG, y encapsulando 150 μ g de ARN (replicón vA375 que codifica la glicoproteína de fusión superficial de RSV) o encapsulando solamente tampón. Por lo tanto, estos liposomas tenían DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG-DMG al 2 %. Los tamaños y la encapsulación fueron los siguientes:

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

Los liposomas se administraron a ratones BALB/c (10 por grupo) mediante inyección intramuscular bilateral (50 μ l por pata) los días 0 y 21. Las dosis fueron 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 o 1 μ g. Los títulos de IgG sérica específica para F y PRNT60 (GMT) fueron los siguientes, 2 semanas después de la primera o segunda inyección (2wp1 o 2wp2, por sus siglas en inglés):

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

Inmunogenicidad del citomegalovirus

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

Los ratones BALB/c, 10 por grupo, recibieron vacunas intramusculares bilaterales (50 μ l por pata) los días 0, 21 y 42 con VRP que expresaban gH/gL (1×10^6 IU), VRP que expresaban gHsol/gL (1×10^6 IU) y PBS como controles. Dos grupos de prueba recibieron 1 μ g del replicón vA160 o vA322 formulado en liposomas (DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 %, PEG-DMG al 2 %; realizado utilizando el método (D) pero con un tamaño de lote de ARN de

150 µg).

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

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

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

VRP de gH/gL	VRP de gHsol/gL	Liposoma con gH/gL	Liposoma con gHsol/gL
4576	2393	4240	10062

El ARN que expresa una forma soluble o de longitud completa del complejo de CMV gH/gL provocó títulos elevados de anticuerpos neutralizantes, como se analiza en células epiteliales. Los títulos promedio provocados por los ARN encapsulados en liposomas fueron al menos tan elevados como los de los VRP correspondientes.

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

Cinética de expresión

Se utilizó un replicón de ARN autorreplicante ("vA311") que expresa un gen indicador de luciferasa (luc) para estudiar la cinética de la expresión de proteínas después de la inyección. Los ratones BALB/c, 5 animales por grupo, recibieron vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) el día 0 con:

Grupo 1 ADN que expresa luciferasa, suministrado utilizando electroporación (10 µg)

Grupo 2 ARN autorreplicante (1 µg) formulado en liposomas (DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 %, PEG-2000 al 2 % conjugado con DMG)

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

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

Grupo 5 VRP (1 x 10⁶ IU) que expresan luciferasa

Antes de la vacunación, los ratones se depilaron. Los ratones se anestesiaron (2 % de isoflurano en oxígeno), eliminando primero el vello con una maquinilla de afeitar eléctrica y después con Nair químico. A continuación, los datos de bioluminiscencia se adquirieron utilizando un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS 200 (Caliper Life Sciences) los días 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63 y 70. Cinco minutos antes de la obtención de imágenes, a los ratones se les inyectaron por vía intraperitoneal 8 mg/kg de solución de luciferina. Después, los animales se anestesiaron y transfirieron al sistema de obtención de imágenes. Los tiempos de adquisición de imágenes se mantuvieron constantes ya que la señal de bioluminiscencia se midió con una cámara CCD refrigerada.

En términos visuales, se observó que las células que expresaban luciferasa permanecían principalmente en el sitio de la inyección de ARN, y los animales a los que se les tomaron imágenes después de la eliminación de los quads no mostraron señal.

En términos cuantitativos, la expresión de luciferasa se midió como la radiación promedio durante un período de 70 días (p/s/cm²/sr), y los resultados fueron los siguientes para los 5 grupos:

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

El ARN autorreplicante formulado con nanoemulsiones catiónicas mostró bioluminiscencia medible en el día 3, que alcanzó su punto máximo en el día 7 y luego se redujo a niveles de fondo en los días 28 a 35. Cuando se formuló en liposomas, el ARN mostró bioluminiscencia medible en el día 3, que alcanzó su punto máximo en el día 7 y se redujo a niveles de fondo en el día 63. El ARN suministrado mediante VRP mostró una bioluminiscencia potenciada el día 21 en comparación con el ARN formulado, pero la expresión se había reducido a niveles de fondo el día 28. El ADN electroporado mostró el nivel más alto de bioluminiscencia en todos los puntos de tiempo medidos y los niveles de bioluminiscencia no se redujeron a los niveles de fondo en los 70 días del experimento.

10 **Volumen de suministro**

El suministro hidrodinámico emplea la fuerza generada por la inyección rápida de un gran volumen de solución para superar las barreras físicas de las membranas celulares que evitan que los compuestos grandes e impermeables a las membranas entren en las células. Se ha demostrado previamente que este fenómeno es útil para el suministro intracelular de vacunas de ADN.

Un volumen característico de suministro en ratones para inyección intramuscular es de 50 µl en la pata trasera, que es un volumen relativamente alto para un músculo de la pata de un ratón. Por el contrario, una dosis intramuscular en seres humanos de ~0,5 ml es relativamente pequeña. Si la inmunogenicidad en ratones dependiera del volumen, entonces la eficacia de las vacunas de replicones podría deberse, al menos en parte, a fuerzas hidrodinámicas, lo que no sería alentador para el uso de las mismas vacunas en seres humanos y animales más grandes.

El replicón vA317 se suministró a ratones BALB/c, 10 por grupo, mediante vacunas intramusculares bilaterales (5 o 50 por pata) el día 0 y 21:

El grupo 1 recibió un replicón desnudo, 0,2 µg en 50 µl por pata

El grupo 2 recibió un replicón desnudo, 0,2 µg en 5 µl por pata

El grupo 3 recibió un replicón formulado en emulsión (0,2 µg, 50 µl por pata)

El grupo 4 recibió un replicón formulado en emulsión (0,2 µg, 5 µl por pata)

El grupo 5 recibió replicón formulado en liposomas (0,2 µg, 50 µl por pata)

El grupo 6 recibió replicón formulado en liposomas (0,2 µg, 5 µl por pata)

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

El suero se recogió para el análisis de anticuerpos los días 14 y 35. Los GMT de IgG sérica específica para F fueron:

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

Por lo tanto, la inmunogenicidad del replicón formulado no varió según el volumen suministrado, lo que indica que estas vacunas de ARN no dependen del suministro hidrodinámico para su eficacia.

45 **Ratas alodoneras**

Se realizó un estudio en ratas alodoneras (*Sigmodon hispidus*) en lugar de ratones. A una dosis de 1 µg, la encapsulación de liposomas aumentó los títulos de IgG específica para F en 8,3 veces en comparación con el ARN desnudo y aumentó los títulos de PRNT en 9,5 veces. La magnitud de la respuesta de anticuerpos fue equivalente a la inducida por 5×10^6 IU de VRP. Tanto el ARN desnudo como el encapsulado en liposomas pudieron proteger a las ratas alodoneras de la exposición a RSV (1×10^5 unidades formadoras de placa), reduciendo la carga vírica pulmonar en al menos 3,5 unidades logarítmicas. La encapsulación aumentó la reducción en aproximadamente 2 veces.

El trabajo adicional en ratas alodoneras utilizó cuatro replicones diferentes: vA317 expresa RSV-F de longitud completa; vA318 expresa RSV-F truncada (transmembrana y cola citoplásmica eliminada); vA142 expresa RSV-F con su péptido de fusión eliminado; vA140 expresa la RSV-F truncada también sin su péptido. Las ratas alodoneras, 4 a 8 animales por grupo, recibieron vacunas intramusculares (100 µl en una pata) los días 0 y 21 con los cuatro replicones diferentes en dos dosis (1,0 y 0,1 µg) formulados en liposomas elaborados usando DMG conjugado con PEG de 2 kDa mediante el método (D), pero con un tamaño de lote de ARN de 150 µg. Los grupos de control recibieron una vacuna de proteína de subunidad RSV-F (5 µg) con adyuvante de alumbre (8 animales/grupo), VRP que expresaban RSV-F

de longitud completa (1×10^6 IU, 8 animales/grupo), o control sin tratamiento previo (4 animales/grupo). Se recogió suero para análisis de anticuerpos los días 0, 21 y 34.

- 5 Los títulos de IgG específica para F en suero y los títulos de anticuerpos neutralizantes de RSV en suero en los días 21 y 34 fueron:

Grupo	IgG, día 21	IgG, día 34	NT, día 21	NT, día 34
1 µg de vA317	915	2249	115	459
0,1 µg de vA317	343	734	87	95
1 µg de vA318	335	1861	50	277
0,1 µg de vA318	129	926	66	239
1 µg de vA142	778	4819	92	211
0,1 µg de vA142	554	2549	78	141
1 µg de vA140	182	919	96	194
0,1 µg de vA140	61	332	29	72
5 µg de subunidad trómera de F/alumbre	13765	86506	930	4744
1×10^6 IU de VRP-F de longitud completa	1877	19179	104	4528
Sin tratamiento	5	5	10	15

- 10 Los cuatro replicones evaluados en este estudio (vA317, vA318, vA142, vA140) fueron inmunogénicos en ratas algodonerías cuando se suministraron mediante liposomas, aunque los títulos de neutralización en suero fueron al menos diez veces menores que los inducidos por las vacunas proteicas con adyuvante o por los VRP. Las vacunas de liposomas/ARN provocaron IgG específica para F y anticuerpos neutralizantes de RSV en suero después de la primera vacunación, y una segunda vacunación reforzó la respuesta de manera eficaz. Los títulos de IgG específica para F después de la segunda vacunación con 1 µg de replicón fueron de 2 a 3 veces mayores que después de la segunda vacunación con 0,1 µg de replicón. Los cuatro replicones provocaron títulos de anticuerpos comparables, lo que sugiere que RSV-F de longitud completa y troncada, con o sin el péptido de fusión, son igualmente inmunogénicas en ratas algodonerías.

- 20 El trabajo adicional en ratas algodonerías usó nuevamente los replicones vA317, vA318 y vA142. Las ratas algodonerías, 2-8 animales por grupo, recibieron vacunas intramusculares (100 µl en una pata) los días 0 y 21 con los replicones (0,1 o 1 µg) encapsulados en liposomas RV01 (con PEG-2000) elaborados mediante el método (D) pero con un tamaño de lote de ARN de 150 µg. Los grupos de control recibieron la vacuna proteica de subunidad RSV-F (5 µg) con adyuvante de alumbre o VRP que expresaban RSV-F de longitud completa (1×10^6 IU, 8 animales/grupo). Todos estos animales recibieron una tercera vacunación (día 56) con vacuna proteica de subunidad RSV-F (5 µg) con adyuvante de alumbre. Además hubo un control sin tratamiento previo (4 animales/grupo). Asimismo, un grupo adicional recibió vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 56 con 1 µg de ARN vA317 en liposomas pero no recibió una tercera vacunación con la vacuna proteica de la subunidad.

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

	Día 21	Día 35	Día 56	Día 70
1 µg de vA318	260	1027	332	14263
0,1 µg de vA318	95	274	144	2017
1 µg de vA142	483	1847	1124	11168
0,1 µg de vA142	314	871	418	11023
1 µg de vA317	841	4032	1452	13852
1×10^6 VRP (F-completa)	2075	3938	1596	14574
5 µg de subunidad trómera de F/alumbre	12685	54526	25846	48864
Sin tratamiento	5	5	5	5

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

	Día 21	Día 35	Día 56	Día 70
1 µg de vA318	58	134	111	6344
0,1 µg de vA318	41	102	63	6647
1 µg de vA142	77	340	202	5427
0,1 µg de vA142	35	65	56	2223

1 µg de vA317	19	290	200	4189
1×10 ⁶ VRP (F-completa)	104	1539	558	2876
5 µg de subunidad trímica de F/alumbre	448	4457	1630	3631
Sin tratamiento	10	10	10	

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

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

- 5 Por lo tanto, se confirma que los replicones son inmunogénicos en ratas algodonerías, provocando IgG específica para F y anticuerpos neutralizantes de RSV en suero después de la primera vacunación. Una segunda vacunación reforzó las respuestas de manera eficaz. Los títulos de IgG específica para F después de la segunda vacunación con 1,0 µg de replicón fueron de 1,5 a 4 veces mayores que después de la segunda vacunación con 0,1 µg de replicón.
- 10 La tercera vacunación (proteína en el día 56) no aumentó los títulos en ratas algodonerías vacunadas previamente con subunidad trímica de F + alumbre, pero proporcionó un gran refuerzo a los títulos en ratas algodonerías previamente vacunadas con replicón. En la mayoría de los casos, los títulos de neutralización del RSV en suero después de dos vacunaciones con replicón seguidas de refuerzo con proteínas fueron iguales o mayores que los títulos inducidos por dos o tres vacunas proteicas secuenciales.
- 15 Este estudio también evaluó la cinética de la respuesta de anticuerpos a 1,0 µg de vA317. Los títulos de IgG sérica específica para F y de neutralización de RSV inducidos por una sola vacunación alcanzaron su punto máximo aproximadamente el día 21 y se mantuvieron al menos hasta el día 56 (50-70 % de caída en el título de IgG específica para F, poco cambio en el título de neutralización de RSV). A estos animales se les administró una segunda vacunación homóloga el día 56 y los títulos de anticuerpos se reforzaron a un nivel al menos igual al alcanzado cuando se administró la segunda vacunación el día 21.
- 20 Otros experimentos implicaron una exposición vírica. El replicón vA368 codifica la glicoproteína de fusión de superficie de natural de longitud completa de RSV con el péptido de fusión eliminado, con la expresión impulsada por el IRES EV71. Las ratas algodonerías, 7 por grupo, recibieron vacunas intramusculares (100 µl por pata) los días 0 y 21 con vA368 en liposomas preparados mediante el método (H), con un tamaño de lote de ARN de 175 µg, o con VRP que tenían el mismo replicón. Los liposomas incluían PEG de 2 kDa, conjugado con DMG. Un grupo de control recibió 5 µg de proteína con adyuvante de alumbre y también se incluyó un grupo de control sin tratamiento previo.
- 25 Todos los grupos recibieron una exposición intranasal (i.n.) con 1×10⁶ PFU de RSV durante cuatro semanas después de la inmunización final. El suero se recogió para el análisis de anticuerpos los días 0, 21 y 35. Los títulos pulmonares víricos se midieron 5 días después de la exposición. Los resultados fueron los siguientes:
- 30

	Liposoma	VRP	Proteína	Sin tratamiento
<i>Títulos de IgG específica para F en suero (GMT)</i>				
Día 21	370	1017	28988	5
Día 35	2636	2002	113843	5
<i>Títulos neutralizantes (GMT)</i>				
Día 21	47	65	336	10
Día 35	308	271	5188	10
<i>Carga vírica pulmonar (pfu por gramo de pulmón)</i>				
Día 54	422	225	124	694110

- 35 Por lo tanto, la vacuna de ARN redujo la carga vírica pulmonar en más de tres unidades logarítmicas, desde aproximadamente 10⁶ PFU/g en ratas algodonerías de control no vacunadas a menos de 10³ PFU/g en ratas algodonerías vacunadas.

Estudio en mamíferos grandes

- 40 Se realizó un estudio con animales grandes en ganado bovino. Se inmunizaron terneros (4-6 semanas de edad, ~60-80 kg, 5 por grupo) con 66 µg de replicón vA317 que codifica la proteína F de RSV de longitud completa en los días 0, 21, 86 y 146. Los replicones se formularon dentro de liposomas elaborados mediante el método (E) pero con un tamaño de lote de ARN de 1,5 mg; tenían DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG-2000 al 2 % conjugado con DMG. Se usó PBS solo como control negativo y se usó una vacuna autorizada como control positivo ("Triángulo 4" de Fort Dodge, que contiene virus muertos). Todos los terneros recibieron 15 µg de proteína F con la
- 45

emulsión MF59 como adyuvante el día 146.

Las vacunas de ARN codifican la proteína F de RSV humano mientras que la vacuna "Triángulo 4" contiene la proteína F de RSV bovino, pero la proteína F de RSV está altamente conservada entre BRSV y HRSV.

5

Los terneros recibieron 2 ml de cada vacuna experimental, administradas por vía intramuscular como 2 x 1 ml en cada lado del cuello. Por el contrario, la vacuna "Triángulo 4" se administró en una dosis única de 2 ml en el cuello.

10

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

15

La figura 15 muestra los títulos de IgG específica para F durante 210 días. Durante los primeros 63 días, el replicón de ARN fue inmunogénico en las vacas a través de liposomas, aunque proporcionó títulos menores que la vacuna autorizada. Todas las vacas vacunadas mostraron anticuerpos específicos para F después de la segunda dosis, y los títulos fueron muy estables durante el período de 2 a 6 semanas después de la segunda dosis (y fueron particularmente estables para las vacunas de ARN). Los títulos hasta el día 202 fueron los siguientes:

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

20

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

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

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

25

Cuando se analiza con el complemento, se detectaron anticuerpos neutralizantes en todas las vacas vacunadas. En este análisis, todos los terneros vacunados tenían buenos títulos de anticuerpos neutralizantes después de la segunda vacunación con ARN. Asimismo, la vacuna de ARN provocó títulos de IgG específica para F en suero que se detectaron en algunos terneros después de la segunda vacunación y en todos los terneros después de la tercera.

30

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

35

La prueba demostrativa preliminar para las vacunas de ARN en animales grandes es particularmente importante en vista de la pérdida de potencia observada previamente con las vacunas basadas en ADN al pasar de modelos de animales pequeños a animales más grandes y seres humanos. Una dosis característica para una vacuna de ADN para vacas sería de 0,5 a 1 mg [43, 44], por lo que es muy alentador que se hayan inducido respuestas inmunitarias con tan solo 66 µg de ARN.

40

Efecto de la longitud de PEG

Como se ha mencionado anteriormente, los liposomas se prepararon utilizando DMG al que se conjugaron cinco PEG diferentes. El peso molecular medio del PEG fue de 500 Da, 750 Da, 1 kDa, 2 kDa o 3 kDa.

45

Los liposomas formados usando los PEG más cortos (500 Da y 750 Da) eran inestables o se agregaban durante la purificación por TFF. PEG-750 proporcionó liposomas con un diámetro Z promedio significativamente mayor (669 nm) y un índice de polidispersidad (0,21), con una encapsulación del 77 %. Los liposomas de PEG-500 se agregaron visiblemente en solución durante el proceso de TFF y se terminó el experimento. Por lo tanto, estos liposomas de PEG cortos eran inestables, pero los PEG más largos formaron liposomas estables.

50

Las diferentes longitudes de PEG (figura 16) tuvieron un pequeño efecto sobre el diámetro de los liposomas y el índice de polidispersidad. El diámetro promedio Z fue de 197 nm (0,119 de pdI) para el PEG de 1 kDa, 142 nm (0,137 de pdI) para el PEG de 2 kDa y 147 nm (0,075 de pdI) para el PEG de 3 kDa. La encapsulación de ARN aumentó gradualmente

a medida que aumentaba la longitud de PEG, del 81,7 % al 85,9 % al 91,5 % (aunque esta relación no siempre se observó en experimentos posteriores).

- 5 Los liposomas se administraron a ratones mediante inyección intramuscular el día 0. Los niveles séricos de SEAP se midieron los días 1, 3 y 6 mediante ensayo quimioluminiscente. Como se muestra en la figura 3, las tres longitudes de PEG fueron eficaces, pero la variación de la longitud del PEG tuvo algún efecto sobre los niveles séricos de SEAP, proporcionando PEG 2000 la máxima expresión.

Diferentes lípidos y longitudes de PEG

- 10 El replicón vA317 se administró en liposomas que tenían una variedad de lípidos diferentes con diferentes longitudes de PEG. Todos los liposomas tenían DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 % y colesterol al 48 %, pero el 2 % restante fue variado, con diferentes lípidos PEGilados (por ejemplo, figuras 17A a 17E) y diferentes longitudes de PEG.

- 15 Las características físicas de los liposomas, elaborados mediante el método (H), fueron:

Nombre	Lípido PEGilado	Longitud de PEG	Zav (nm)	pdl	% encapsulado ⁿ
A	DMG	2000	136,3	0,087	85,35
B	DMG	3000	120,9	0,087	72,06
C	DMG	1000	175,9	0,111	92,52
D	Figura 17A	2000	157,9	0,094	97,44
E	Figura 17D	2000	122,2	0,122	77,84
F	Figura 17E	2000	129,8	0,125	82,57
G	Colesterol	2000	122,9	0,087	87,1
H	Figura 17C	2000	138	0,137	78,48
I	Figura 17B	2000	113,4	0,091	89,12

- 20 Los ratones BALB/c, 8 por grupo, recibieron vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con el replicón, ya fuera desnudo (1 µg) o encapsulado en estos liposomas (0,1 µg). El suero se recogió para el análisis de anticuerpos los días 14 y 35.

Los títulos de IgG sérica específica para F (GMT) fueron los siguientes, 2 semanas después de las dos inyecciones (2wp1):

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

- 25 Los resultados muestran una tendencia, lo que indica que los grupos de cabeza de PEG de mayor peso molecular son más inmunogénicos. A medida que la longitud del PEG conjugado con DMG aumenta de 1000 Da a 3000 Da, los títulos de IgG específica para F 2wp2 aumentan de 7412 a 15659 a 22378.

- 30 El cambio de la región enlazadora de éster a éter no influyó sustancialmente en los títulos. Además, al mismo peso molecular del grupo de cabeza (2000) hubo una tendencia a que al aumentar la longitud de las colas de lípidos disminuían los títulos (H con dialquilo C14 frente a I con dialquilo C18). El reemplazo de una cola lipídica de dialquil PEG con colesterol influyó poco en la inmunogenicidad (A con DMG frente a. G con colesterol).

- 35 Se realizaron experimentos similares con diferentes lípidos en los que los 2 kDa de PEG se dividen en 2 grupos de 1 kDa (figura 18, siendo el PM total en la región encuadrada de 2000). Se volvió a utilizar el replicón vA317, con ratones BALB/c, 8 por grupo, que recibieron vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con 1 µg de ARN desnudo o 0,1 µg de ARN encapsulado en liposomas. Todos los liposomas tenían lípidos catiónicos (DlinDMA) al 40 %, DSPC al 10 % y colesterol al 48 %, pero el 2 % restante fue variado, con diferentes lípidos PEGilados (pero todos con PEG de 2 kDa). Se elaboraron mediante el método (H).
- 40

Las características físicas de los liposomas eran:

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

- 5 Se prepararon liposomas adicionales con RV05. Los liposomas tenían lípidos catiónicos al 40 % (RV05) y DMG PEGilado (PEG de 2 kDa) al 2 %, mientras que el resto de componentes variaba (pero siempre se incluía colesterol). Los liposomas se elaboraron mediante el método (H) pero con pH 5. Las características físicas eran:

Nombre	Otros componentes	Zav (nm)	pdl	% encapsulado ⁿ
F	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	102,2	0,12	76,81
G	DSPC al 10 %, colesterol al 46 %, α GC al 2 %	103,7	0,107	72,58
H	DPyPE al 10 %, colesterol al 48 %	99,6	0,115	78,34
I	PC 18:3 al 10 %, colesterol al 48 %	130	0,14	87,92
J	PC 18:2 al 10 %, colesterol al 48 %	101,1	0,133	76,64
K	PC 18:2 al 30 %, colesterol al 28 %	134,3	0,158	57,76

α GC = α -galactosilceramida

- 10 Los ratones BALB/c, 8 por grupo, recibieron vacunas intramusculares bilaterales (50 μ l por pata) los días 0 y 21 con el replicón, ya fuera desnudo (1 μ g) o encapsulado (0,1 μ g). El suero se recogió para el análisis de anticuerpos los días 14 y 35. Los títulos de IgG sérica específica para F (GMT) fueron los siguientes, 2 semanas después de las dos inyecciones (2wp1):

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

- 15 Dividir los grupos de cabeza de PEG disminuyó, por lo tanto, los títulos *in vivo*. La inclusión de un doble enlace (1 grado de insaturación por cola de alquilo) en las colas lipídicas de PEG aumentó los títulos de IgG, 6 veces el día 14 y 7 veces el día 35. Para un lípido catiónico con colas lipídicas asimétricas (alquilo + colesterol), el cambio del lípido neutro de DSPC (cola de lípido C18 saturada) a PC 18:2 o 18:3 (con 2 y 3 dobles enlaces insaturados por cola) aumentó los títulos de IgG totales. Se observaron resultados comparables con la sustitución de DSPC por DPyPE.

20

Tabla 1: fosfolípidos útiles

DDPC	1,2-Didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfato
DEPC	1,2-Erucoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]

DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG	1,2-Miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPs	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfato
DOPC	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOPS	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPG	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPS	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfato
DSPC	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPS	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenada
HSPC	PC de soja hidrogenada de alta pureza
HSPC	PC de soja hidrogenada
LISOPC MIRÍSTICO	1-Miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LISOPC PALMÍTICO	1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LISOPC ESTEÁRICO	1-Estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
MPPC con 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-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol)...]
PSPC	1-Palmitoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-Estearoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-Estearoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-Estearoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

REFERENCIAS

- 5 [1] Johanning *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res* 23:1495-1501.
- [2] Heyes *et al.* (2005) *J Controlled Release* 107:276-87.
- [3] Documento WO2005/121348.
- 10 [4] *Liposomes: Methods and Protocols*, Volumen 1: *Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols*. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [5] *Liposome Technology*, volúmenes I, II y III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- 15 [6] *Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes)*. (eds. Arshady y Guyot). Citus Books, 2002.

[7] Jeffs *et al.* (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372.

[8] Documento WO2005/113782.

5 [9] Documento WO2011/005799.

[10] El Ouahabi *et al.* (1996) *FEES Letts* 380:108-12.

[11] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103(29): 10834-9.

10 [12] Documento WO2009/016515.

[13] Documento WO02/34771.

[14] Documento WO2005/032582.

15 [15] Documento WO2010/119343.

[16] Documento WO2006/110413.

20 [17] Documento WO2005/111066.

[18] Documento WO2005/002619.

[19] Documento WO2006/138004.

25 [20] Documento WO2009/109860.

[21] Documento WO02/02606.

30 [22] Documento WO03/018054.

[23] Documento WO2006/091517.

[24] Documento WO2008/020330.

35 [25] Documento WO2006/089264.

[26] Documento WO2009/104092.

[27] Documento WO2009/031043.

40 [28] Documento WO2007/049155.

[29] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.

45 [30] Romberg *et al.* (2008) *Pharmaceutical Research* 25:55-71.

[31] Hoekstra *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52

[32] Documento WO2009/086558

50 [33] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)

[34] *Handbook of Experimental Immunology*, Volúmenes. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)

55 [35] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[36] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)

60 [37] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).

[38] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press)

- [39] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- 5 [40] Yoneyama & Fujita (2007) Cytokine & Growth Factor Reviews 18:545-51.
- [41] Maurer *et al.* (2001) Biophysical Journal, 80: 2310-2326.
- [42] Perri *et al.* (2003) J Virol 77:10394-10403.
- 10 [43] Boxus *et al.* (2007) J Virol 81:6879-89.
- [44] Taylor *et al.* (2005) Vaccine 23:1242-50.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un liposoma en el cual se encapsula ARN que codifica un inmunógeno de interés, en donde el liposoma comprende al menos un lípido que incluye un resto de polietilenglicol, de manera que el polietilenglicol está presente en el exterior del liposoma, en donde la masa molecular promedio del polietilenglicol es entre 1 kDa y 3 kDa; en donde la composición farmacéutica incluye un tampón Tris.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el liposoma tiene un diámetro en el intervalo de 80-160 nm.
3. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en donde el liposoma comprende un lípido con un grupo de cabeza catiónico.
- 15 4. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en donde el liposoma comprende un lípido con un grupo de cabeza dipolar.
5. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en donde el ARN es un ARN autorreplicante.
- 20 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde la molécula de ARN autorreplicante codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN a partir de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un inmunógeno.
- 25 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde la molécula de ARN tiene dos marcos de lectura abiertos, el primero de ellos codifica una replicasa de alfavirus y el segundo de ellos codifica el inmunógeno.
8. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en donde la molécula de ARN tiene una longitud de 9000-12000 nucleótidos.
- 30 9. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en donde el inmunógeno puede provocar una respuesta inmune *in vivo* contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.

FIG. 1

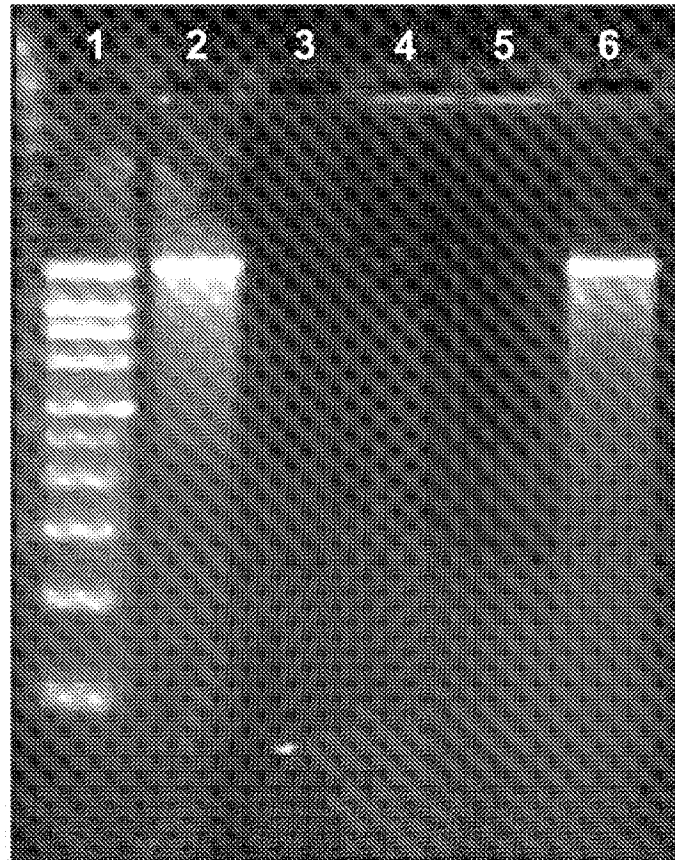


FIG. 2

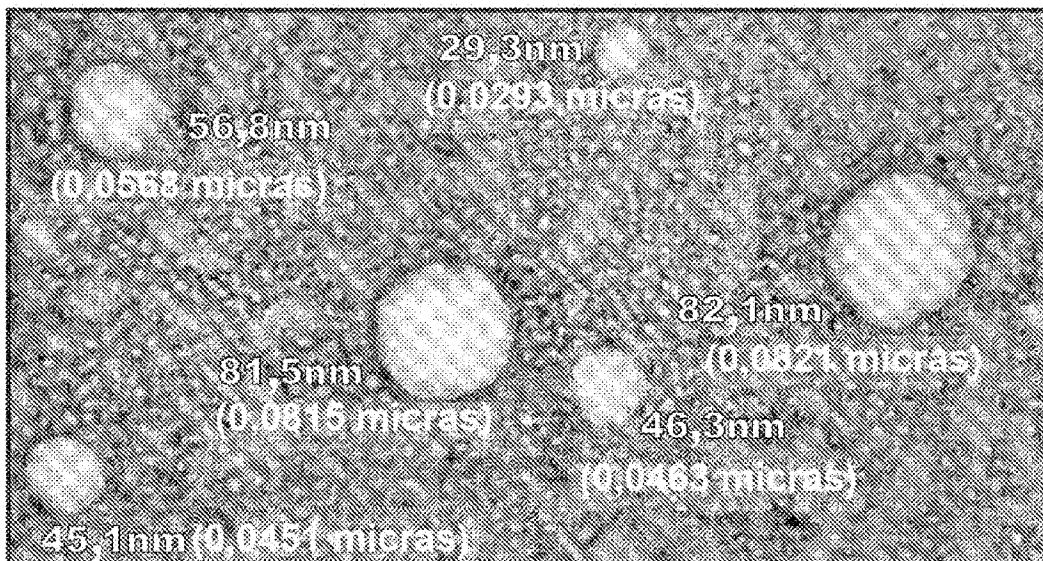


FIG. 3

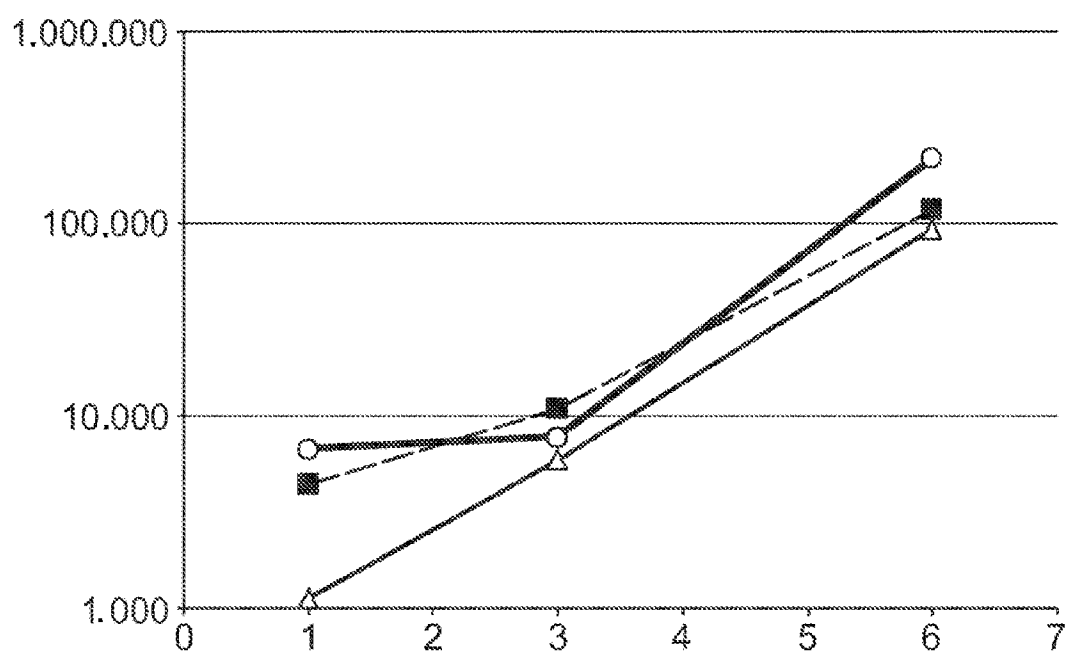


FIG. 4

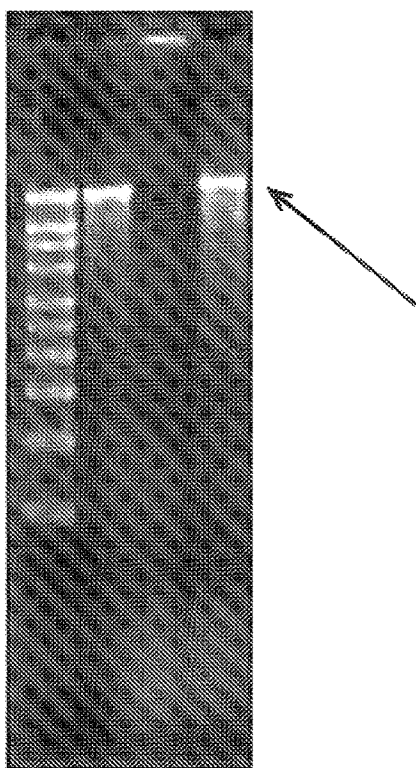


FIG. 5

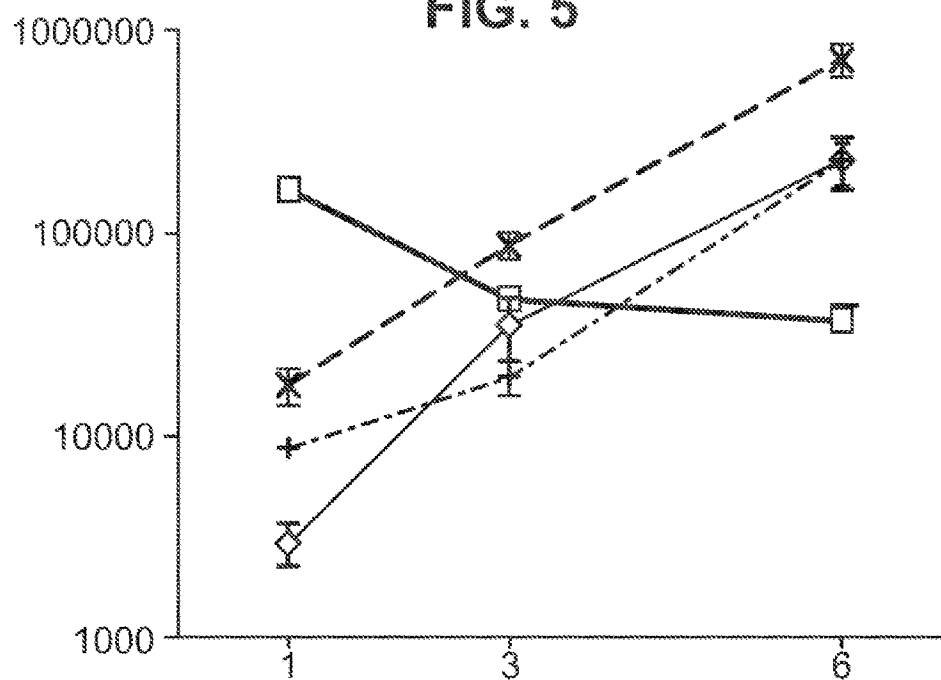


FIG. 6

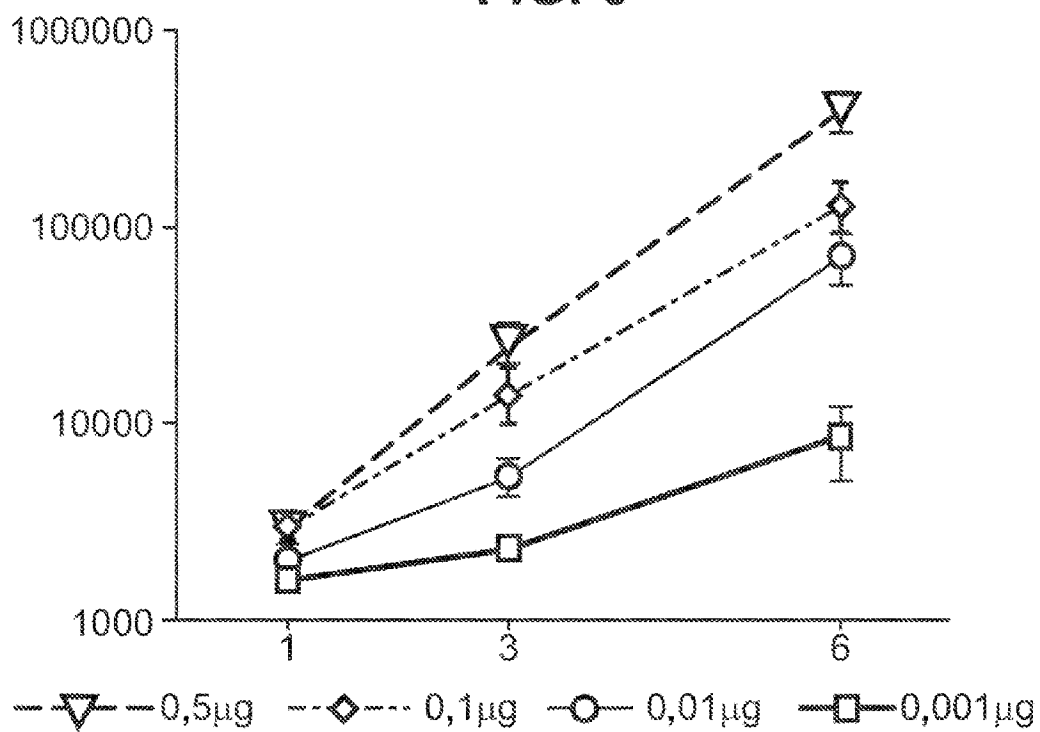


FIG. 7

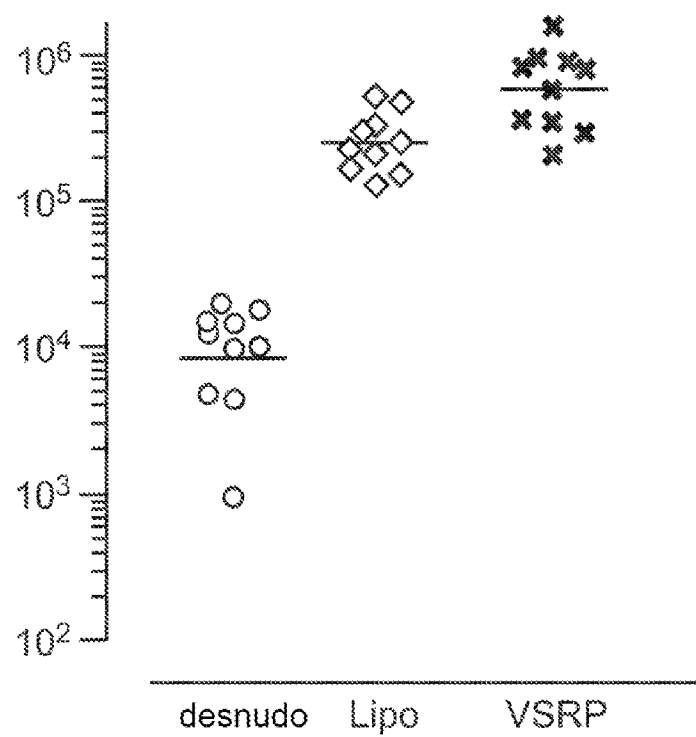


FIG. 8

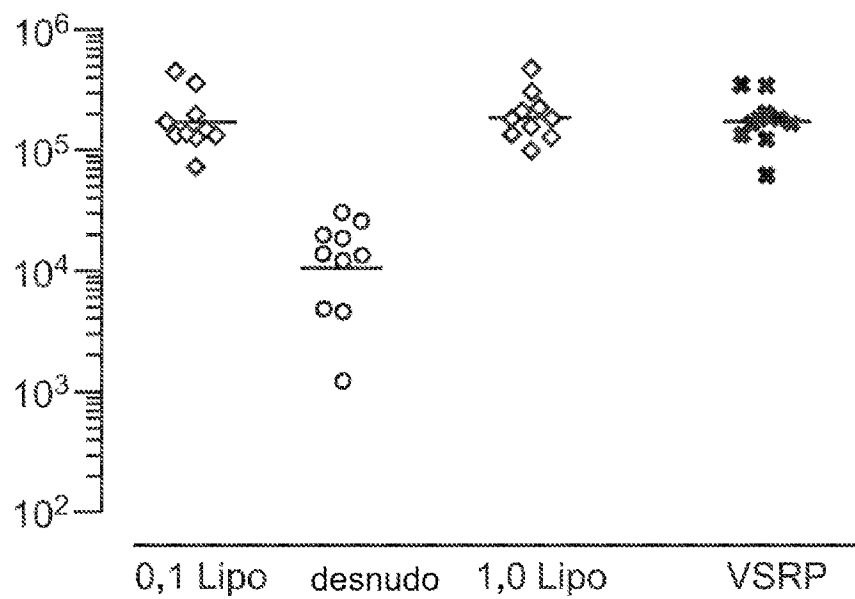


FIG. 9

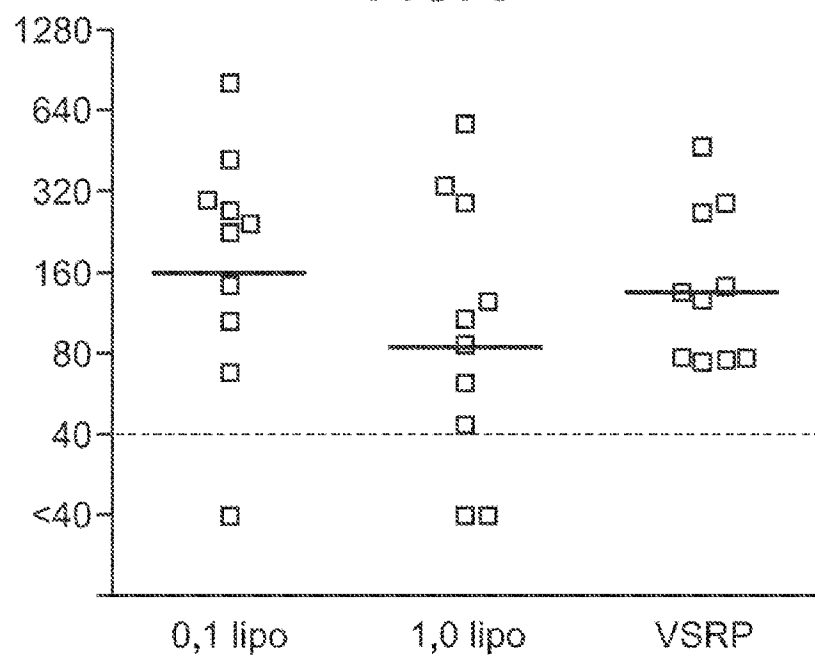


FIG. 10

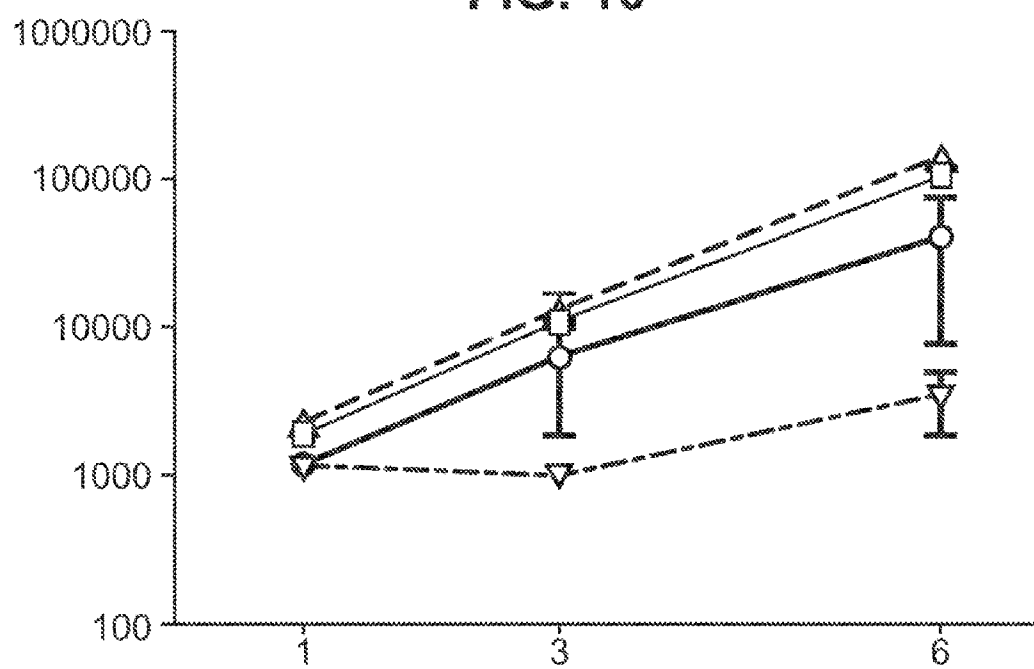


FIG. 11

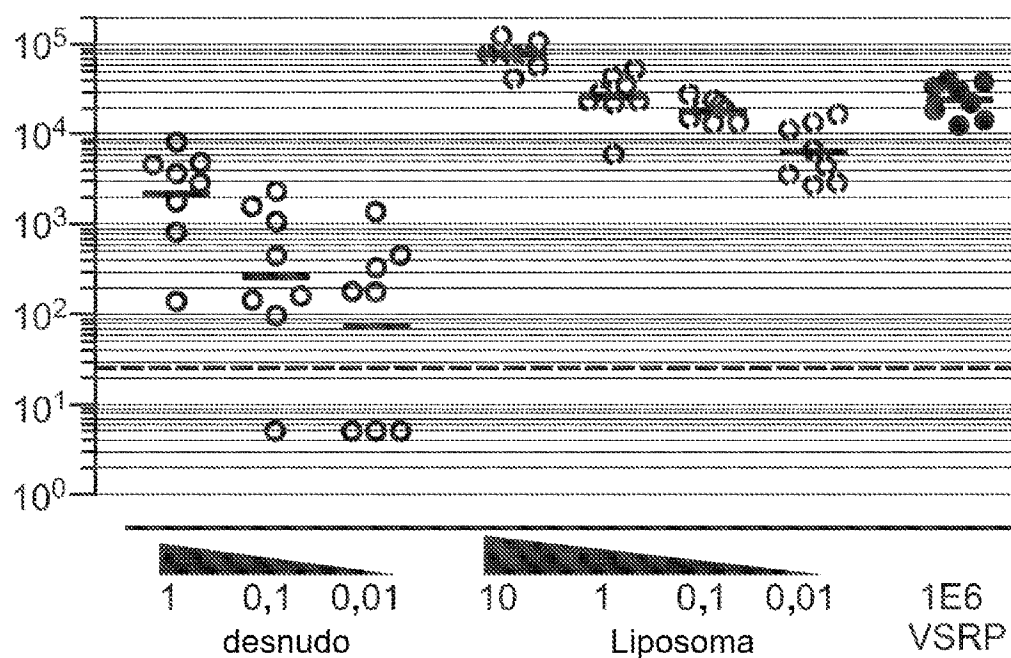


FIG. 12

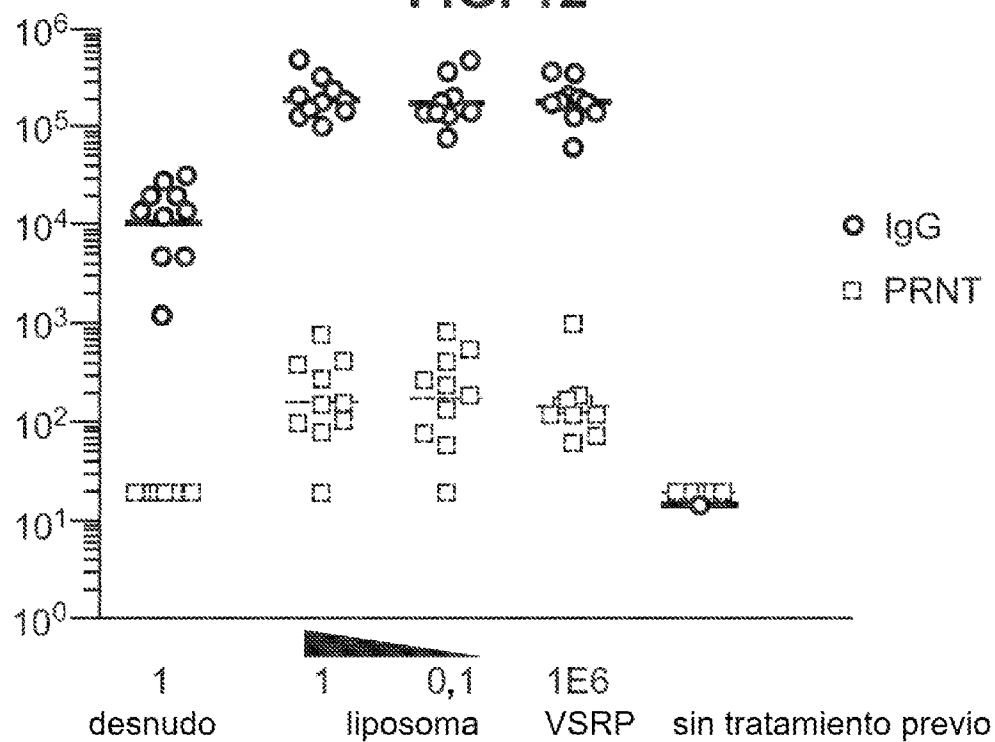


FIG. 13

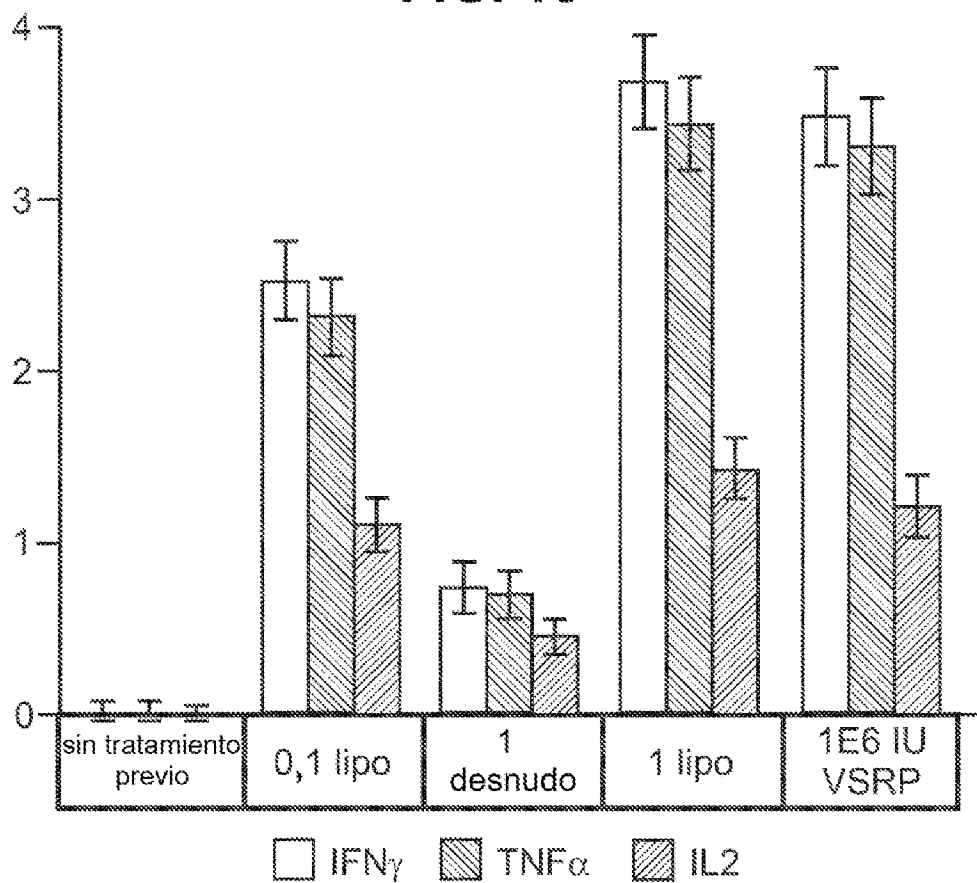
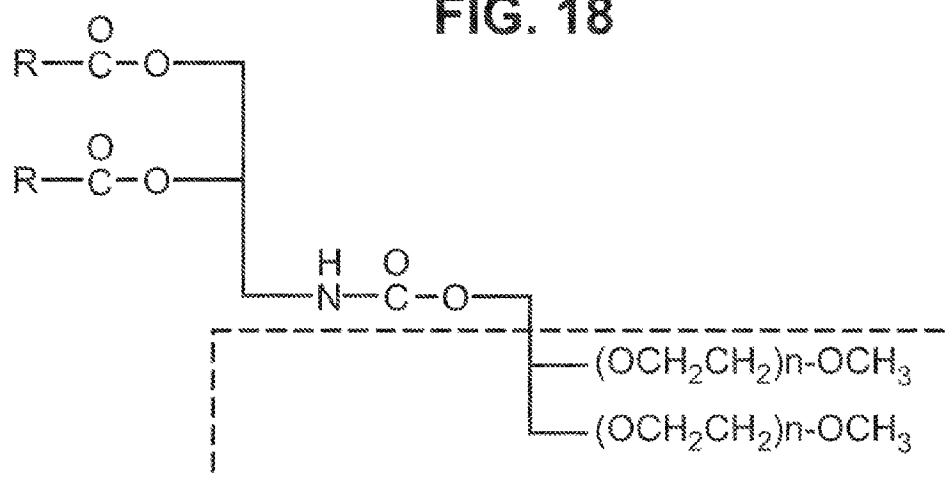


FIG. 18



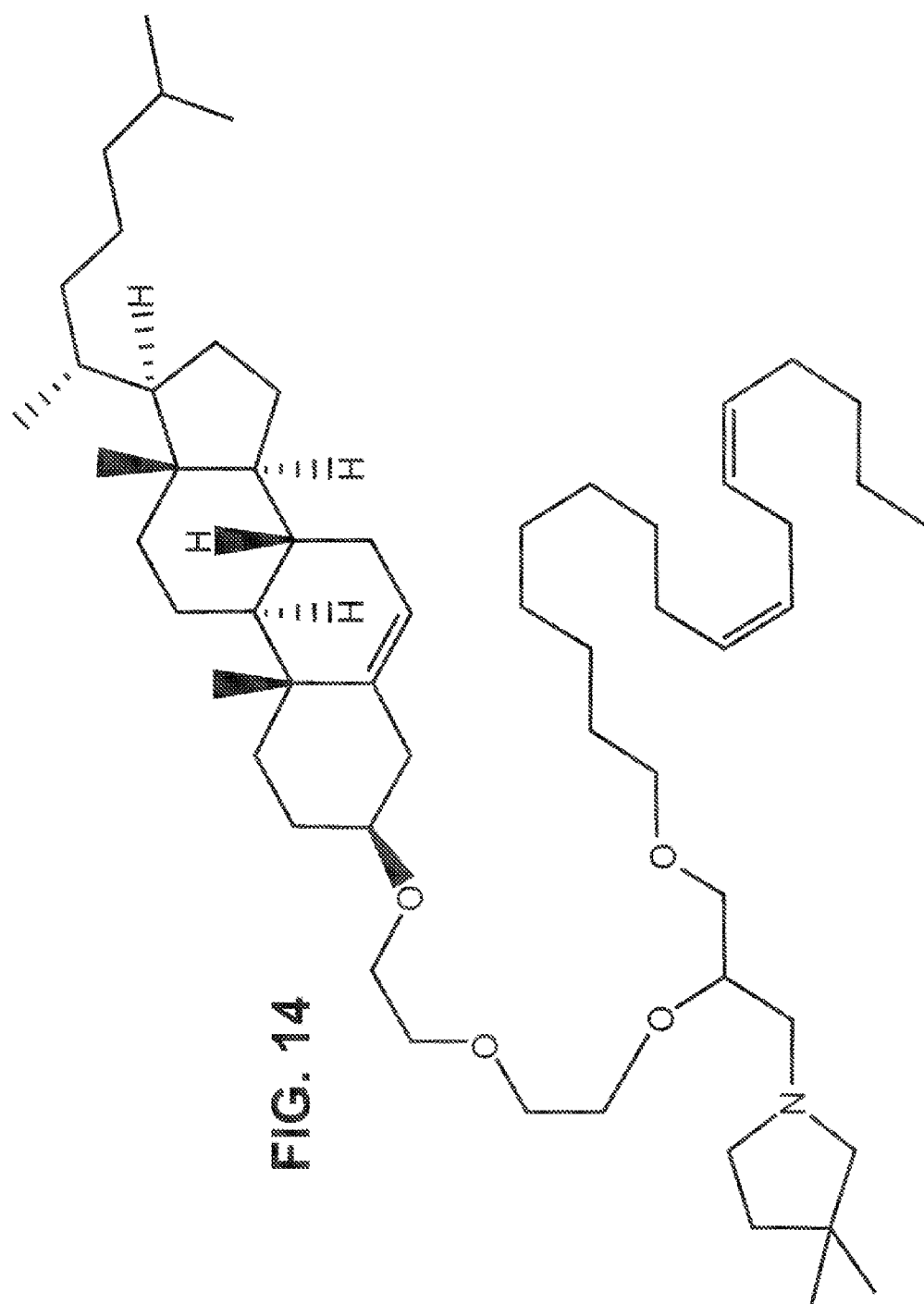
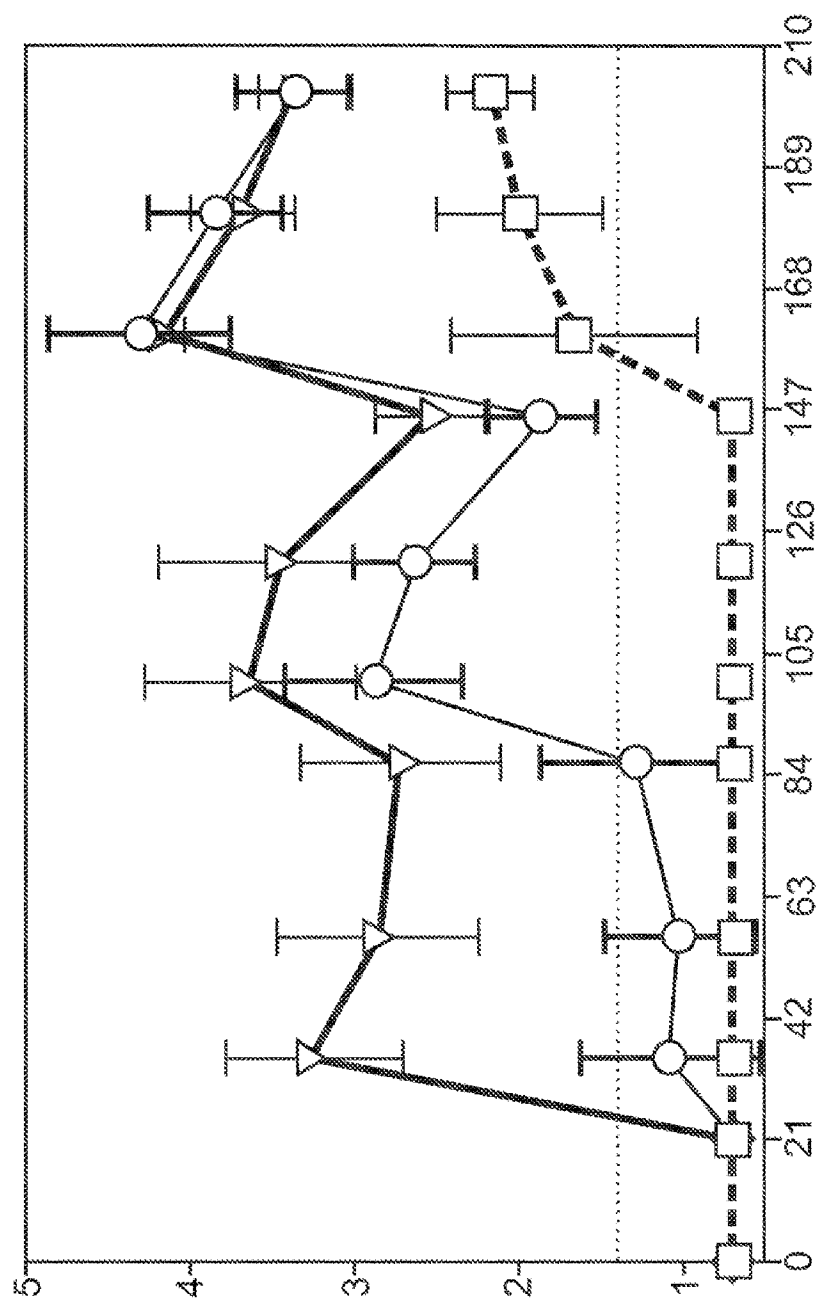


FIG. 15



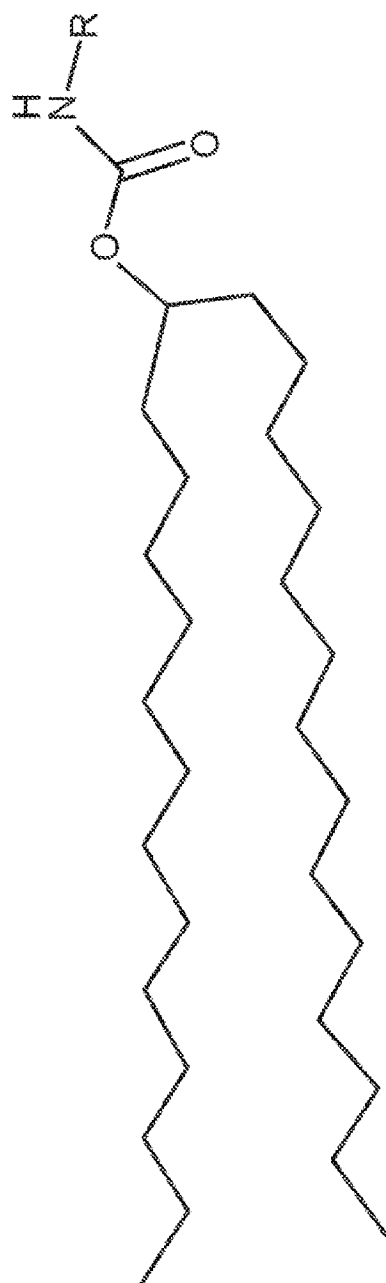


FIG. 17A

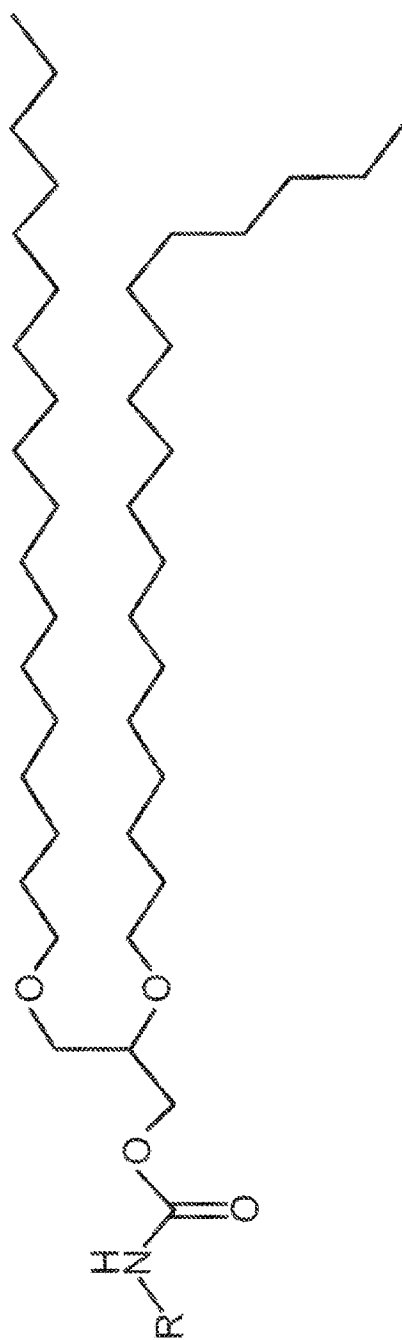


FIG. 17B

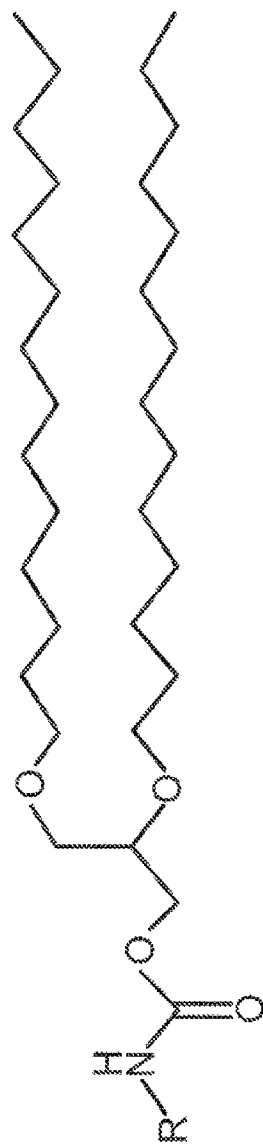


FIG. 17C

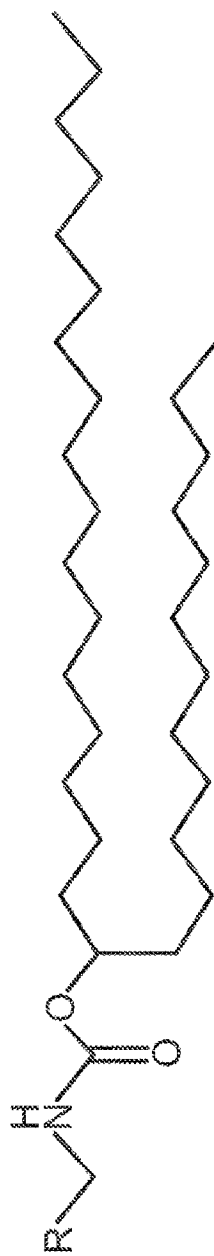


FIG. 17D

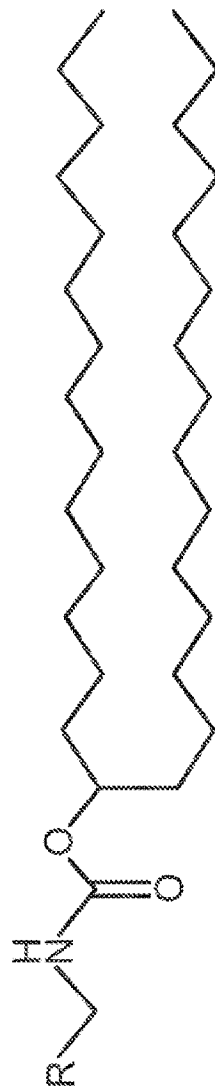


FIG. 17E