

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 382**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011** **E 11736500 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015** **EP 2590626**

54 Título: **Liposomas con lípidos que tienen un valor de pKa ventajoso para el suministro de ARN**

30 Prioridad:

06.07.2010 US 361830 P

31.08.2010 US 378837 P

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

25.01.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GEALL, ANDREW

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 557 382 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 con lípidos que tienen un valor de pKa ventajoso para el suministro de ARN

Campo técnico

La presente invención se ubica en el campo del suministro no viral de ARN para inmunización.

5 Técnica antecedente

El suministro de ácidos nucleicos para inmunizar animales ha sido una meta durante varios años. Se han ensayado diversos enfoques, incluyendo el uso de ADN o ARN, de vehículos de suministro virales o no virales (o incluso ningún vehículo de suministro, en una vacuna “desnuda”), de vectores de replicación o no de replicación, o de vectores virales o no virales.

10 El documento WO 2010/015098 y el miembro de su familia US 2011/200667 desvelan liposomas catiónicos a base de Lipofectamine® para transfectar líneas celulares COS-7 y J774 con ARN de virus del bosque Semliki recombinante que codifica una proteína superóxido dismutasa de Cu/Zn de *Brucella abortus*, pero no desvelan la composición de los liposomas para suministro *in vivo* de ARN.

15 Mockey y col. (Cancer Gene Therapy, vol. 14, no. 9, 2007) desvela liposomas de HDHE/colesterol que encierran ARNm de MART1. Kita y col. (Chembiochem, vol. 9, no. 15, 2008) desvela liposomas de POPC/colesterol/DSPE-PEG que encapsulan ARN que codifica la subunidad beta de Qbeta replicasa y beta-galactosidasa. Ningún documento desvela un liposoma que tenga un lípido con un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8.

El documento WO 2005/120152 desvela partículas que comprenden ciertos lípidos catiónicos y que encapsulan ARNip o ADN plasmídico, pero no desvela liposomas que encapsulan ARN que codifica un inmunógeno.

20 Sigue existiendo una necesidad de vacunas de ácidos nucleicos adicionales y mejoradas.

Divulgación de la invención

De acuerdo con la invención, ARN que codifica un inmunógeno es suministrado en un liposoma para fines de inmunización. El liposoma incluye lípidos que tienen un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8. Idealmente, el lípido con un pKa en este intervalo tiene una amina terciaria; dichos lípidos se comportan de forma diferente de lípidos tales como DOTAP o DC-Chol, que tienen un grupo amina cuaternaria. A pH fisiológico, aminas con un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8 tienen una carga superficial neutra o reducida, mientras que un lípido tal como DOTAP es fuertemente catiónico. Los inventores han descubierto que los liposomas formados a partir de lípidos con amina cuaternaria (por ejemplo, DOTAP) son menos adecuados para el suministro de ARN que codifica un inmunógeno que los liposomas formados a partir de lípidos con amina terciaria (por ejemplo, DLinDMA).

30 Por lo tanto, la invención proporciona un liposoma para suministro *in vivo* de ARN a una célula de vertebrado, teniendo el liposoma una bicapa lipídica que encapsula un núcleo acuoso, en el que: (i) la bicapa lipídica comprende un lípido que tiene un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8 cuando se mide tal como se describe más adelante en la sección “medición del pKa”, y que tiene preferentemente una amina terciaria; y (ii) el núcleo acuoso incluye un ARN que codifica un inmunógeno. Estos liposomas son adecuados para suministro *in vivo* del ARN a una célula de vertebrado y, de este modo, son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para inmunizar sujetos contra diversas enfermedades.

El liposoma

La invención utiliza liposomas en los que está encapsulado ARN que codifica un inmunógeno. De este modo, el ARN está (como en un virus natural) separado de cualquier medio externo por la bicapa lipídica del liposoma, y se ha descubierto que la encapsulación de esta manera protege al ARN de digestión por ribonucleasa. Los liposomas pueden incluir algo de ARN externo (por ejemplo en su superficie), pero al menos la mitad del ARN (e idealmente todo) está encapsulado en el núcleo del liposoma. La encapsulación dentro de liposomas es distinta de, por ejemplo, los complejos lípido/ARN desvelados en la referencia 1.

45 Diversos lípidos anfífilos pueden formar bicapas en un entorno acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza hidrófila aniónico, catiónico o zwitteriónico. Los liposomas de la invención comprenden un lípido que tienen un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8, y los lípidos preferidos con un pKa en este intervalo tienen una amina terciaria. Por ejemplo, estos pueden comprender 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA; pKa 5,8) y/o 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Otro lípido adecuado que tiene una amina terciaria es 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA). Véase la figura 3 y la ref. 2. Algunos de los lípidos de aminoácido de la referencia 3 también pueden usarse, al igual que ciertos de los aminolípidos de la referencia 4. Lípidos útiles adicionales con aminas terciarias en sus grupos de cabeza se desvelan en la referencia 5.

Los liposomas de la invención pueden estar formados a partir de un único lípido o a partir de una mezcla de lípidos, siempre que al menos uno de los lípidos tenga un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8 (y, preferentemente, una amina terciaria). Dentro de este intervalo de pKa, los lípidos preferidos tienen un pKa de 5,5 a 6,7 por ejemplo entre 5,6 y 6,8, entre 5,6 y 6,3, entre 5,6 y 6,0, entre 5,5 y 6,2, o entre 5,7 y 5,9. El pKa es el pH al cual el 50 % de los lípidos están cargados, que está a medio camino entre el punto en el que los lípidos están completamente cargados y el punto en el que los lípidos están completamente sin carga. Puede medirse de diversas maneras, pero se mide preferentemente usando el procedimiento desvelado más adelante en la sección titulada "medición del pKa". El pKa típicamente debe medirse para el lípido en solitario en lugar de para el lípido en el contexto de una mezcla que también incluye otros lípidos (por ejemplo no como se realiza en la referencia 6, que se centra en el pKa de un SNALP en lugar del de los lípidos individuales).

Cuando un liposoma de la invención está formado a partir de una mezcla de lípidos, se prefiere que la proporción de aquellos lípidos que tienen un pKa dentro del intervalo deseado deba estar entre el 20-80 % de la cantidad total de lípidos, por ejemplo entre el 30-70 %, o entre el 40-60 %. Por ejemplo, más adelante se muestran liposomas útiles en los que el 40 % o el 60 % del lípido total es un lípido con un pKa en el intervalo deseado. Los restantes pueden estar compuestos por, por ejemplo, colesterol (por ejemplo 35-50 % de colesterol) y/o DMG (opcionalmente PEGilado) y/o DSPC. Dichas mezclas se usan más adelante. Estos valores de % son porcentajes molares.

Un liposoma puede incluir un lípido anfífilo cuya parte hidrófila está PEGilada (es decir, modificada mediante unión covalente de un polietilenglicol). Esta modificación puede incrementar la estabilidad e impedir la adsorción no específica de los liposomas. Por ejemplo, los lípidos pueden conjugarse a PEG usando técnicas tales como las desveladas en la referencia 6 y 7. El PEG proporciona a los liposomas un revestimiento que puede otorgar características farmacocinéticas favorables. La combinación de encapsulación eficiente de un ARN (particularmente un ARN autorreplicante), un lípido catiónico que tiene un pKa en el intervalo de 5,0-6,8, y una superficie PEGilada, permite el suministro eficiente a múltiples tipos celulares (incluyendo células tanto inmunitarias como no inmunitarias), desencadenando de este modo una respuesta inmunitaria más fuerte y mejor que cuando se usan aminas cuaternarias sin PEGilación. Pueden usarse diversas longitudes de PEG, por ejemplo entre 0,5-8 kDa.

Los lípidos usados con la invención pueden estar saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido insaturado para preparar liposomas. La figura 3 muestra tres lípidos insaturados útiles. Si un lípido insaturado tiene dos colas, ambas colas pueden estar insaturadas, o éste puede tener una cola saturada y una cola insaturada.

En los ejemplos se usa una mezcla de DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol. Un liposoma tal como se define en las reivindicaciones y que comprende DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol que encapsula ARN, tal como un ARN autorreplicante, que codifica un inmunógeno, está dentro del alcance de la invención.

Las partículas liposomales se dividen habitualmente en tres grupos: vesículas multilaminares (VML); vesículas monolaminares pequeñas (VMP); y vesículas monolaminares grandes (VMG). Las VML tienen múltiples bicapas en cada vesícula, que forman varios compartimentos acuosos independientes. Las VMP y las VMG tienen una única bicapa que encapsula un núcleo acuoso; las VMP típicamente tienen un diámetro ≤ 50 nm, y las VMG tienen un diámetro > 50 nm. Las partículas liposomales de la invención son idealmente VMG con un diámetro en el intervalo de 50-220 nm. Para una composición que comprende una población de VMG con diferentes diámetros: (i) al menos el 80 % en número deben tener diámetros en el intervalo de 20-220 nm, (ii) el diámetro promedio (Z_{pro} , por intensidad) de la población está idealmente en el intervalo de 40-200 nm, y/o (iii) los diámetros deben tener un índice de polidispersidad $< 0,2$. Se espera que los complejos de liposoma/ARN de la referencia 1 tengan un diámetro en el intervalo de 600-800 nm y que tengan una elevada polidispersidad. El liposoma puede ser sustancialmente esférico.

En la técnica se conocen técnicas para preparar liposomas adecuados, por ejemplo véase las referencias 8 a 10. Un procedimiento útil se describe en la referencia 11 e implica mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos, (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) tampón, seguido por mezcla, equilibrado, dilución y purificación. Los liposomas preferidos de la invención pueden obtenerse mediante este procedimiento de mezcla.

Procedimiento de mezcla

Los liposomas de la invención puede prepararse mediante un procedimiento que comprende las etapas de: (a) mezclar ARN con un lípido a un pH que está por debajo del pKa del lípido pero está por encima de 4,5; a continuación (b) incrementar el pH para que esté por encima del pKa del lípido.

Por lo tanto, un lípido catiónico se carga positivamente durante la formación del liposoma en la etapa (a), pero el cambio de pH a partir de ese momento significa que la mayoría (o todos) de los grupos cargados positivamente se vuelven neutros. Evitando un pH por debajo de 4,5 durante la etapa (a) la estabilidad del ARN encapsulado mejora.

El pH en la etapa (a) está por encima de 4,5, y está idealmente por encima de 4,8. Usar un pH en el intervalo de 5,0 a 6,0, o en el intervalo de 5,0 a 5,5, puede proporcionar liposomas adecuados.

El pH incrementado en la etapa (b) está por encima del pKa del lípido. El pH se incrementa idealmente a un pH menor de 9, y preferentemente menor de 8. Dependiendo del pKa del lípido, el pH en la etapa (b) puede incrementarse, por lo tanto, para estar dentro del intervalo de 6 a 8 por ejemplo a pH $6,5 \pm 0,3$. El incremento de pH de la etapa (b) puede

conseguirse transfiriendo los liposomas a un tampón adecuado, por ejemplo, a solución salina tamponada con fosfato. El incremento de pH de la etapa (b) se realiza idealmente después de que la formación del liposoma ha tenido lugar.

El ARN usado en la etapa (a) puede estar en solución acuosa, para mezcla con una solución orgánica del lípido (por ejemplo una solución etanólica, como en la ref. 11). La mezcla puede diluirse a continuación para formar liposomas, después de lo cual, el pH puede incrementarse en la etapa (b).

El ARN

La invención es útil para suministro *in vivo* de ARN que codifica un inmunógeno. El ARN es traducido por células no inmunitarias en el punto de suministro, causando la expresión del inmunógeno, y también hace que las células inmunitarias secreten interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias que proporcionan un efecto adyuvante local. Las células no inmunitarias también pueden secretar interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias en respuesta al ARN.

El ARN es de cadena +-, y de este modo puede ser traducido por las células no inmunitarias sin necesitar etapa de replicación intermedia alguna, tal como transcripción inversa. También puede unirse a receptores TLR7 expresados por células inmunitarias, iniciando de este modo un efecto adyuvante.

Los ARN de cadena +- preferidos son autorreplicantes. Una molécula de ARN autorreplicante (replicón) puede, cuando se suministra a una célula de vertebrado incluso sin ninguna proteína, causar la producción de múltiples ARN de segunda generación mediante transcripción a partir de sí mismo (mediante una copia antisentido que se genera a partir de sí mismo). Una molécula de ARN autorreplicante es, por lo tanto, típicamente una molécula de cadena +- que puede traducirse directamente después del suministro a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que, a continuación, produce transcritos tanto antisentido como sentido a partir del ARN suministrado. Por lo tanto, el ARN suministrado causa la producción de múltiples ARN de segunda generación. Estos ARN de segunda generación, así como transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse, a su vez, para proporcionar expresión *in situ* de un inmunógeno codificado, o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que son traducidos para proporcionar expresión *in situ* del inmunógeno. Los resultados globales de esta secuencia de transcripciones es una enorme amplificación del número de los ARN replicones y, de este modo, el inmunógeno codificado se convierte en un producto polipeptídico fundamental de las células.

Tal como se muestra más adelante, no se requiere una actividad autorreplicante para que un ARN proporcione un efecto adyuvante, aunque ésta puede mejorar la secreción postransfección de citocinas. La actividad autorreplicante es particularmente útil para conseguir un elevado nivel de expresión del inmunógeno por células no inmunitarias. También puede mejorar la apoptosis de las células no inmunitarias.

Un sistema adecuado para conseguir la autorreplicación es usar un replicón de ARN a base de alfavirus. Estos replicones de cadena +- son traducidos después del suministro a una célula para dar una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa es traducida como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de cadena-- genómicas del ARN suministrado de cadena +-. Estos transcritos de cadena -- pueden, a su vez, transcribirse para dar copias adicionales del ARN parental de cadena +- y también para dar un transcrito subgenómico que codifica el inmunógeno. La traducción del transcrito subgenómico causa, de este modo, 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 Semliki, un virus de encefalitis equina oriental, un virus de encefalitis equina venezolana, etc. Pueden usarse secuencias de virus mutantes o de tipo silvestre, por ejemplo el mutante TC83 atenuado del VEEV se ha usado en replicones [12].

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

Mientras que los genomas de alfavirus naturales codifican proteínas viriónicas estructurales además de la poliproteína replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN autorreplicante de la invención no codifique proteínas estructurales de alfavirus. Por lo tanto, un ARN autorreplicante preferido puede causar la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no la producción de viriones que contienen ARN. La incapacidad de producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN autorreplicante no puede perpetuarse a sí misma en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para perpetuación en virus de tipo silvestre están ausentes de ARN autorreplicantes descritos en el presente documento y su lugar es ocupado por uno o más genes que codifican el inmunógeno de interés. De modo que el transcrito subgenómico codifica el inmunógeno en lugar de las proteínas viriónicas estructurales de alfavirus.

Por lo tanto, una molécula de ARN autorreplicante útil con la invención puede tener dos marcos de lectura abierta. El primer (5') marco de lectura abierta codifica una replicasa; el segundo (3') marco de lectura abierta codifica un inmunógeno. El ARN puede tener marcos de lectura abierta adicionales (por ejemplo corriente abajo) por ejemplo para codificar inmunógenos adicionales (véase más adelante) o para codificar polipéptidos accesorios.

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

Moléculas de ARN autorreplicantes pueden tener diversas longitudes pero tienen típicamente 5000-25000 nucleótidos de largo por ejemplo 8000-15000 nucleótidos, o 9000-12000 nucleótidos. Por lo tanto, el ARN es más largo que el observado en el suministro de ARNip.

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

El nucleótido 5' de una molécula de ARN útil con la invención puede tener un grupo trifosfato 5'. En un ARN con caperuza éste puede estar enlazado a una 7-metilguanosina mediante un puente 5'-a-5'. Un trifosfato 5' puede mejorar la unión a RIG-I y, de este modo, promover efectos adyuvantes.

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

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

- 15

Una molécula de ARN útil con la invención puede prepararse convenientemente mediante transcripción *in vitro* (IVT). La IVT puede usar una plantilla de (ADNc) creada y propagada en forma de plásmido en bacterias, o creada de forma sintética (por ejemplo mediante procedimientos de ingeniería de síntesis génica y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como las ARN polimerasas de bacteriófago T7, T3 o SP6) puede usarse para transcribir el ARN a partir de una plantilla de ADN. Pueden usarse reacciones de formación de caperuzas y adición de poli-A adecuadas, según se requiera (aunque la poliA del replicón está codificada habitualmente dentro de la plantilla de DNA). Estas ARN polimerasas pueden tener requisitos estrictos para el o los nucleótidos 5' transcritos y estos requisitos pueden emparejarse con los requisitos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito mediante IVT pueda funcionar de forma eficiente como sustrato para su replicasa autocodificada.

- 25

Tal como se describe en la referencia 13, el ARN autorreplicante puede incluir (además de cualquier estructura de caperuza 5') uno o más nucleótidos que tienen una base nitrogenada modificada. Por lo tanto, el ARN puede comprender m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiocitidina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina), m2A (2-metiladenosina), Am (2'-O-metiladenosina), ms2m6A (2-metil-2'-O-metiladenosina), i6A (N6-isopenteniladenosina), ms2i6A (2-metil-2'-O-metiladenosina), io6A (N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina), ms2io6A (2-metil-2'-O-metiladenosina), g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina), t6A (N6-treonilcarbamoiladenosina), ms2t6A (2-metil-2'-O-metiladenosina), m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina), hn6A (N6-hidroxiisopentenilcarbamoiladenosina), ms2hn6A (2-metil-2'-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 (N4-acetil-2T-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 (wybutosina), o2yW (peroxiwybutosina), OHyW (hidroxiwybutosina), OHyW* (hidroxiwybutosina submodificada), imG (wyosina), mimG (metilguanosina), Q (queuosina), oQ (epoxiqueuosina), galQ (galtactosil-queuosina), manQ (manosil-queuosina), preQo (7-ciano-7-desazaguanosina), preQi (7-aminometil-7-desazaguanosina), G (archaeosina), D (dihidrouridina), m5Um (5,2'-O-dimetiluridina), s4U (4-tiouridina), m5s2U (5-metil-2-tiouridina), s2Um (2-tio-2'-O-metiluridina), acp3U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina), ho5U (5-hidroxiuridina), mo5U (5-metoxiuridina), cmo5U (ácido uridin-5-oxiacético), mcmo5U (éster metílico del ácido uridin-5-oxiacético), chm5U (5-(carboxihidroxi-metil)uridina), mchm5U (éster metílico de 5-(carboxihidroxi-metil)uridina), mcm5U (5-metoxycarbonilmetiluridina), mcm5Um (S-metoxycarbonilmetil-2-O-metiluridina), mcm5s2U (5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina), nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina), mnm5U (5-metilaminometiluridina), mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina), mnm5se2U (5-metilaminometil-2-selenouridina), ncm5U (5-carbamoilmetiluridina), ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina), cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina), cmnm5Um (5-carboximetil-aminometil-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-dimetil-guanosina), m'Am (1,2-O-dimetiladenosina)iririnetiluridina), tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina), imG-14 (4-dimetilguanosina), imG2 (isoguanosina), o ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7-sustituidos de los mismos, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquil(C1-C6)-uracilo, 5-metiluracilo, 5-alquénil(C2-C6)-uracilo, 5-alquínil(C2-C6)-uracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquil(C1-C6)-citosina, 5-metilcitosina,

- 60

5-alqueniil(C2-C6)-citosina, 5-alquiniil(C2-C6)-citosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 7-desazaguanina, 8-azaguanina, 7-desazaguanina 7-sustituida, 7-desaza-7-alquiniil(C2-C6)-guanina, 7-desazaguanina 8-sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-desazapurina sustituida, 7-desazapurina 7-sustituida, 7-desazapurina 8-sustituida, o un nucleótido abásico. Por ejemplo, un ARN autorreplicante puede incluir una o más base nitrogenadas pirimidínicas modificadas, tales como restos de pseudouridina y/o 5-metilcitosina. En algunos ejemplos, sin embargo, el ARN incluye base nitrogenadas no modificadas, y puede incluir nucleótidos no modificados es decir todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos A, C, G y U convencionales (excepto cualquier estructura de caperuza 5', que puede incluir una 7'-metilguanosina). En otros ejemplos, el ARN puede incluir una caperuza 5' que comprende una 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

Un ARN usado con la invención idealmente incluye solamente enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, pero 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; de la forma más preferente, un liposoma incluye una única especie de ARN es decir todas las moléculas de ARN en el liposoma tienen la misma secuencia y la misma longitud.

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

El inmunógeno

Las moléculas de ARN usadas con la invención codifican un inmunógeno polipeptídico. Después de la administración de los liposomas, el ARN se traduce *in vivo* y el inmunógeno puede desencadenar una respuesta inmunitaria en el receptor. El inmunógeno puede desencadenar una respuesta inmunitaria contra una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, un alérgeno o un antígeno tumoral. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta de anticuerpo (que habitualmente incluye IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. El inmunógeno polipeptídico desencadenará típicamente una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido bacteriano, viral, fúngico o parásito (o alérgeno o tumor) correspondiente, pero el polipéptido puede actuar como mimótopo para desencadenar una respuesta inmunitaria que reconoce un sacárido bacteriano, viral, fúngico o parásito. El inmunógeno será típicamente un polipéptido de superficie por ejemplo una adhesina, una hemaglutinina, una glucoproteína de la envuelta, una glucoproteína de la espiga, etc.

Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden codificar un único inmunógeno polipeptídico o múltiples polipéptidos. Múltiples inmunógenos pueden presentarse como un único inmunógeno polipeptídico (polipéptido de fusión) o como polipéptidos independientes. Si se expresan inmunógenos como polipéptidos independientes, entonces uno o más de estos pueden estar provistos de un IRES o un elemento promotor viral adicional corriente arriba. Como alternativa, múltiples inmunógenos pueden expresarse desde una poliproteína que codifica inmunógenos individuales fusionados a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo proteína 2A del virus de la fiebre aftosa), o como inteínas.

A diferencia de las referencias 1 y 14, el ARN codifica un inmunógeno. Para evitar dudas, la invención no abarca ARN que codifica una luciferasa de luciérnaga o que codifica una proteína de fusión de *E. coli* β -galactosidasa o que codifica una proteína verde fluorescente (GFP). Además, el ARN no es ARN total del timo de ratón.

En algunos ejemplos el inmunógeno desencadena una respuesta inmunitaria contra una de estas bacterias:

Neisseria meningitidis: los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, proteínas de membrana tales como adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro, y proteína de unión al factor H. Una combinación de tres polipéptidos útiles se desvela en la referencia 15.

Streptococcus pneumoniae: los inmunógenos polipeptídicos útiles se desvelan en la referencia 16. Estos incluyen, aunque no se limitan a, la subunidad de pilus RrgB, el precursor de beta-N-acetil-hexosaminidasa (spr0057), spr0096, proteína de estrés general GSP-781 (spr2021, SP2216), serina/treonina quinasa StkP (SP 1732), y adhesina superficial neumocócica PsaA.

Streptococcus pyogenes: los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, los polipéptidos desvelados en las referencias 17 y 18.

Moraxella catarrhalis.

Bordetella pertussis: Los inmunógenos de pertussis útiles incluyen, aunque no se limitan a, toxina o toxoide de pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina y aglutinógenos 2 y 3.

Staphylococcus aureus: Los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, los polipéptidos desvelados en la referencia 19, tales como una hemolisina, esxA, esxB, proteína de unión a ferricromo (sta006) y/o la lipoproteína sta011.

Clostridium tetani: el inmunógeno típico es el toxoide del tétanos.

Corwynebacterium diphtheria: el inmunógeno típico es el toxoide de difteria.

Haenaophilus influenzae: Los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, los polipéptidos desvelados en las referencias 20 y 21.

5 *Pseudomonas aeruginosa*

Streptococcus agalactiae: los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, los polipéptidos desvelados en la referencia 17.

10 *Chlamydia trachomatis*: Los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, similar a OmpH, L7/L12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (por ejemplo tal como se desvela en la referencia 22. LcrE [23] y HtrA [24] son dos inmunógenos preferidos.

Chlamydia pneumonia: Los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, los polipéptidos desvelados en la referencia 25.

Helicobacter pylori: Los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, CagA, VacA, NAP y/o ureasa [26].

15 *Escherichia coli*: Los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, inmunógenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágico (EHEC). Las cepas de ExPEC incluyen *E. coli* uropatógeno (UPEC) y *E. coli* asociado a meningitis/sepsis (MNEC). Los inmunógenos polipeptídicos de UPEC útiles se desvelan en las referencias 27 y 28. Los inmunógenos de MNEC útiles se desvelan en la referencia 29. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es AcfD [30].

20 *Bacillus anthracis*

Yersinia pestis: Los inmunógenos útiles incluyen, aunque no se limitan a, los desvelados en las referencias 31 y 32.

Staphylococcus epidermis

Clostridium perfringens o *Clostridium botulinums*

Legionella pneumophila

25 *Coxiella burnetii*

Brucella, tal como *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. pinnipediae*.

Francisella, tal como *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. tularensis*.

Neisseria gonorrhoea *Treponema pallidum* *Haemophilus ducreyi*

Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*

30 *Staphylococcus saprophyticus*

Yersinia enterocolitica

Mycobacterium tuberculosis

Rickettsia

Listeria monocytogenes *Vibrio cholera* *Salmonella typhi* *Borrelia burgdorferi* *Porphyromonas gingivalis* *Klebsiella*

35 En algunos ejemplos, el inmunógeno desencadena una respuesta inmunitaria contra uno de estos virus:

Orthomixovirus: Los inmunógenos útiles pueden ser de un virus de la gripe A, B o C, tales como hemaglutinina, neuraminidasa o proteínas M2 de la matriz. Donde 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 paramixoviridae*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de Pneumovirus (por ejemplo virus respiratorio sincitial, VRS), Rubulavirus (por ejemplo virus de las paperas), Paramixovirus (por ejemplo virus de paragripe), Metapneumovirus y Morbilivirus (por ejemplo sarampión).

Poxviridae: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de *Orthopoxvirus* tales como *Variola vera*, incluyendo aunque sin limitarse a, *Variola major* y *Variola minor*.

Picornavirus: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados 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.

5 *Bunyavirus*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados 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 virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un Heparnavirus, tal como el virus de la hepatitis A (VHA).

10 *Filovirus*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un filovirus, tal como un virus del Ébola (incluyendo un virus del ébola de Zaire, Costa de marfil, Reston o Sudán) o un virus Marburg.

Togavirus: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un Togavirus, tal como un Rubivirus, un Alfavirus, o un Arterivirus. Esto incluye el virus de la rubeola.

15 *Flavivirus*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un Flavivirus, tales como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), el virus del Dengue (tipos 1,2, 3 o 4), el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus del bosque de Kyasanur, el virus de la encefalitis del Nilo occidental, el virus de la encefalitis de St. Louis, el virus de la encefalitis primaveral-veraniega de Rusia, el virus de la encefalitis de Powassan.

20 *Pestivirus*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un Pestivirus, tales como diarrea vírica bovina (DVB), fiebre porcina clásica (FPC) o enfermedad fronteriza (EF).

Hepadnavirus: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un Hepadnavirus, tales como el virus de la Hepatitis B. Una composición puede incluir el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

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

Rabdovirus: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un Rabdovirus, tales como un virus de Lisa (por ejemplo un virus de la rabia) y Vesiculovirus (VSV).

30 *Caliciviridae*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de Caliciviridae, tales como virus de Norwalk (Norovirus), y virus similares al de Norwalk, tales como virus de Hawái y virus de la montaña nevada.

Coronavirus: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un coronavirus SARS, bronquitis infecciosa aviar (BIA), virus de hepatitis de ratón (VHR), y virus de gastroenteritis transmisible porcina (VGTP). El inmunógeno de coronavirus puede ser un polipéptido de la espiga.

35 *Retrovirus*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un Oncovirus, un Lentivirus (por ejemplo VIH-1 o VIH-2) o un espumavirus.

Reovirus: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un Ortorreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus o un Coltivirus.

Parvovirus: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de Parvovirus B19.

40 *Herpesvirus*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de un herpesvirus humano, tales como, a modo de ejemplo solamente, virus del herpes simple (VHS) (por ejemplo VHS tipos 1 y 2), virus de la varicela-zoster (VVZ), virus Epstein-Barr (VEB), Citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HVV6), herpesvirus humano 7 (HVV7) herpesvirus humano 8 (HVV8).

45 *Papovavirus*: Los inmunógenos virales incluyen, aunque no se limitan a, los derivados de virus del papiloma y virus del polioma. El virus del papiloma (humano) puede ser de 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 serotipos 6, 11, 16 y/o 18.

Adenovirus: Los inmunógenos virales incluyen los derivados del serotipo de adenovirus 36 (Ad-36).

50 En algunas realizaciones, el inmunógeno desencadena una respuesta inmunitaria contra un virus que infecta a los peces, tal como: el virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS), virus de la enfermedad pancreática del salmón (VEPS), virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), virus del bagre del canal (VBC), virus de la linfocistis del pescado (VLP), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), herpesvirus koi, virus similares al picornavirus del salmón (también conocidos como virus similares al picornavirus del salmón atlántico), virus de salmón encerrado

(VSE), rotavirus del salmón atlántico (RSA), virus de la enfermedad de la fresa de la trucha (EFT), virus del tumor de salmón coho (VTSC), o virus de septicemia hemorrágica vírica (VSHV).

Los inmunógenos fúngicos pueden derivarse 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 schoenleini*, *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* spp, *Microsporidium* spp., *Nosema* spp., *Pleistophora* spp., *Trachipleistophora* spp., *Vittaforma* spp, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Saccharomyces 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, *Cunninghamiella* spp, *Saksenaia* 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 algunos ejemplos el inmunógeno desencadena una respuesta inmunitaria contra un parásito del género *Plasmodium*, tal como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. Por lo tanto, la divulgación puede usarse para inmunizar contra la malaria. En algunos ejemplos el inmunógeno desencadena una respuesta inmunitaria contra un parásito de la familia *Caligidae*, particularmente aquellos de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus* por ejemplo piojos marinos tales como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.

En algunos ejemplos el inmunógeno desencadena una respuesta inmunitaria contra: alérgenos del polen (alérgenos del polen de árboles, de hierbas, maleza y pastos); alérgenos de insectos o arácnidos (alérgenos inhalantes, de saliva y veneno, por ejemplo alérgenos de ácaros, alérgenos de cucarachas y mosquitos pequeños, alérgenos de veneno de himenópteros); alérgenos de pelo y caspa de animales (de, por ejemplo, perro, gato, caballo, rata, ratón, etc.); y alérgenos de alimentos (por ejemplo una gliadina). Importantes alérgenos del polen de árboles, pastos y hierbas son aquellos que se originan de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y platanaceae incluyendo, aunque sin limitarse a, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), el orden de las Poales incluyendo pastos 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 importantes alérgenos por inhalación son aquellos de ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacén por ejemplo *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquitos pequeños y pulgas por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, y los de mamíferos tales como gato, perro y caballo, alérgenos de veneno incluyendo aquellos que se originan de insectos con aguijón o picadores tales como los del orden taxonómico Hymenoptera incluyendo abejas (*Apidae*), avispa (*Vespidae*) y hormigas (*Formicoidae*).

En algunos ejemplos el inmunógeno es un antígeno tumoral seleccionando entre: (a) antígenos de cáncer de testículos tales 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 pueden usarse, por ejemplo, para abordar tumores de melanoma, pulmón, cabeza y cuello, CPNM, mama, gastrointestinal y 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 pancreático 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 Hodgkins 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, diversas leucemias), anhidrasa carbónica (asociada con, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociada con, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociado con, por ejemplo, melanoma), HER-2/neu (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, de colon, de pulmón y de ovario), mamaglobina, alfa-fetoproteína (asociado con, por ejemplo hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada con, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica de la telomerasa, MUC-1 (asociada con, por ejemplo, cáncer de mama y de ovario), G-250 (asociado con, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, de colon), y antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal tales como cáncer colorrectal); (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de

- melanoma-melanocito tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína 1 relacionada con tirosinasa/TRP1 y proteína 2 relacionada con tirosinasa/TRP2 (asociadas 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 ciertas realizaciones, los inmunógenos tumorales incluyen, aunque no se limitan a, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus Epstein Barr, EBNA, antígenos del virus del papiloma humano (HPV), incluyendo E6 y E7, antígenos del virus de la hepatitis B y C, antígenos de virus linfotrópicos 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

- Los liposomas de la invención son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para inmunizar sujetos contra diversas enfermedades. Estas composiciones incluirán típicamente un vehículo farmacéuticamente aceptable además de los liposomas. Una exhaustiva descripción de vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 33.

- Una composición farmacéutica de la invención puede incluir uno o más inmunopotenciadores de molécula pequeña. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (por ejemplo Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (por ejemplo un fosfato de aminoalquilglucosaminida, 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). Cualquier agonista de este tipo idealmente tiene un peso molecular de < 2000 Da. Cuando un ARN está encapsulado, dicho agonista o agonistas también pueden estar encapsulados con el ARN, o pueden estar no encapsulados. Cuando un ARN está adsorbido a una partícula, dichos agonistas también pueden estar adsorbidos con el ARN, o pueden estar no adsorbidos.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir los liposomas en agua (por ejemplo agua para inyección) o en un tampón, por ejemplo, un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón de histidina, o un tampón citrato. Las sales tamponantes típicamente estarán incluidas en el intervalo de 5-20 mM.

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 descritas en el presente documento pueden incluir sales de sodio (por ejemplo cloruro sódico) para dar tonicidad. Una concentración de 1062 mg/ml de NaCl es típica, por ejemplo de aproximadamente 9 mg/ml.

- Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir quelantes de iones metálicos. Estos pueden prolongar la estabilidad del ARN retirando iones que pueden acelerar la hidrólisis del fosfodiéster. Por lo tanto, una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, etc. Dichos quelantes están típicamente presentes a entre 10-500 μ M por ejemplo 0,1 mM. Una sal de citrato, tal como citrato sódico, también puede actuar como quelante, mientras que ventajosamente también proporciona actividad tamponante.

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

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

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente estériles.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente no pirógenas, conteniendo por ejemplo < 1 UE (unidades de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferentemente < 0,1 UE por dosis.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente libres de gluten.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse 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.

- Las composiciones pueden prepararse como inyectables, como soluciones o suspensiones. La composición puede prepararse para administración pulmonar por ejemplo mediante un inhalador, usando una pulverización fina. La composición puede prepararse para administración nasal, auricular u ocular por ejemplo como pulverización o gotas. Los inyectables para administración intramuscular son típicos.

Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de liposomas, así como cualesquiera otros componentes, según sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, en una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y el estado físico del individuo a tratar, la 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 de la situación médica por parte del médico encargado del tratamiento, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. El contenido de liposoma y ARN de las composiciones descritas en el presente documento se expresará generalmente en términos de la cantidad de ARN por dosis. Una dosis preferida tiene $\leq 100 \mu\text{g}$ de ARN (por ejemplo de 10-100 μg , tales como aproximadamente 10 μg , 25 μg , 50 μg , 75 μg o 100 μg), pero puede observarse expresión a niveles mucho más bajos por ejemplo $\leq 1 \mu\text{g/dosis}$, $\leq 100 \text{ ng/dosis}$, $\leq 10 \text{ ng/dosis}$, $\leq 1 \text{ ng/dosis}$, etc.

La divulgación 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 puede usarse para administrar la composición a un sujeto vertebrado.

Los liposomas de la invención no incluyen ribosomas.

Procedimientos de tratamiento y usos médicos

En contraste con las partículas desveladas en la referencia 14, los liposomas y las composiciones farmacéuticas de la invención son para uso *in vivo* para desencadenar una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno de interés.

La invención proporciona un liposoma o una composición farmacéutica de la invención para su uso en un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria en un vertebrado que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un liposoma o una composición farmacéutica de la invención. La respuesta inmunitaria es protectora y preferentemente implica inmunidad mediada por anticuerpos y/o células. El procedimiento puede generar una respuesta de refuerzo.

Generando una respuesta inmunitaria en el vertebrado mediante estos usos y procedimientos, el vertebrado puede protegerse contra diversas enfermedades y/o infecciones por ejemplo contra enfermedades bacterianas y/o víricas tal como se ha descrito anteriormente. Los liposomas y las composiciones son inmunógenos, y son, más preferentemente, composiciones de vacuna. Las vacunas descritas en el presente documento pueden ser profilácticas (es decir para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas.

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

Las vacunas preparadas de acuerdo con la presente divulgación pueden usarse para tratar tanto niños como 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 las personas mayores (por ejemplo ≥ 50 años, ≥ 60 años, y preferentemente ≥ 65 años), los jóvenes (por ejemplo ≤ 5 años), pacientes hospitalizados, profesionales sanitarios, fuerzas armadas y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos o pacientes inmunodeficientes. Las vacunas no son adecuadas solamente para estos grupos, sin embargo, y pueden usarse de forma más general en una población.

Las composiciones descritas en el presente documento se administrarán generalmente a un paciente. La administración directa puede conseguirse mediante inyección parenteral (por ejemplo por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intradérmica o al espacio intersticial de un tejido; a diferencia de la referencia 1, la inyección intralingual no se usa típicamente con la presente invención). Las vías de administración alternativas incluyen administración rectal, oral (por ejemplo comprimido, pulverización), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, auricular, pulmonar u otra mucosal. Las administraciones intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo una aguja hipodérmica) pero, como alternativa, puede usarse inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es 0,5 ml.

La invención puede usarse para desencadenar inmunidad sistémica y/o mucosal, preferentemente para desencadenar una inmunidad sistémica y/o mucosal mejorada.

La dosificación puede ser mediante un calendario de dosis única o un calendario de dosis múltiples. Pueden usarse dosis múltiples en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. En un calendario de dosis múltiples, las diversas dosis pueden administrarse mediante la misma o diferentes vías, por ejemplo, una principal parenteral y un refuerzo mucosal, una principal mucosal y un refuerzo parenteral, etc. Múltiples dosis se administrarán típicamente al menos cada semana (por ejemplo cada 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, múltiples dosis pueden administrarse aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas

después del nacimiento, por ejemplo a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se usa a menudo en el programa expandido de inmunización ("EPI") de la organización mundial de la salud. En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias aproximadamente cada dos meses, por ejemplo aproximadamente cada 7, 8 o 9 semanas, seguida por una o más dosis de refuerzo aproximadamente de 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, por ejemplo aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias aproximadamente cada dos meses, por ejemplo aproximadamente cada 7, 8 o 9 semanas, seguidas por una o más dosis de refuerzo aproximadamente de 6 meses a 1 año después de la tercera dosis primaria, por ejemplo aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

10 **General**

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro del alcance de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, las referencias 34-40, etc.

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

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

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo una composición que es "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Donde sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

20 Las referencias a carga, a cationes, a aniones, a zwitteriones, etc., se toman a pH 7.

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

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

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

35 La familia del receptor similar a RIG-I ("RLR") incluye diversas ARN helicasas que desempeñan papeles clave en el sistema inmunitario innato [41]. RLR-1 (también conocido como RIG-I o gen inducible por ácido retinoico I) tiene dos dominios de reclutamiento de caspasa cerca de su extremo N. El nombre aprobado por el HGNC para el gen que codifica la RLR-1 helicasa es "DDX58" (para polipéptido de secuencia DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 58) y la ID del HGNC única es HGNC:19102. La secuencia RefSeq para el gen RLR-1 humano es GI:77732514. RLR-2 (también conocido como MDA5 o gen asociado a la diferenciación de melanoma 5) también tiene dos dominios de reclutamiento de caspasa cerca de su extremo N. El nombre aprobado por el HGNC para el gen que codifica la RLR-2 helicasa es "IFIH1" (para dominio 1 de interferón inducido con helicasa C) y la ID del HGNC única 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 caspasa. El nombre aprobado por el HGNC para el gen que codifica la RLR-3 helicasa es "DHX58" (para polipéptido de secuencia DEXH (Asp-Glu-X-His) 58) y la ID del HGNC única es HGNC:29517. La secuencia RefSeq para el gen RLR-3 humano es GI:149408121.

45 PKR es una proteína quinasa dependiente de ARN bicatenario. Desempeña un papel clave en el sistema inmunitario innato. "EIF2AK2" (para alfa quinasa 1 del factor de inicio de la traducción eucariota 2) es el nombre aprobado por el HGNC para el gen que codifica esta enzima, y su ID del HGNC única es HGNC:9437. La secuencia RefSeq para el gen PKR humano es GI:208431825.

Breve descripción de los dibujos

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

La figura 2 es una microfotografía electrónica de liposomas.

La figura 3 muestra las estructuras de DLinDMA, DLenDMA y DODMA.

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 ribonucleasa y a continuación sometido a extracción con fenol/cloroformo.

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

La figura 6 muestra la expresión de proteínas los días 1,3 y 6 después del suministro de cuatro dosis diferentes de ARN encapsulado en liposomas.

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

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

La figura 9 muestra títulos de anticuerpo neutralizante en animales que reciben VRP o 0,1g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.

15 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 complejo lipoplex (triángulo invertido).

La figura 11 muestra títulos de IgG específica de 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 un virión (VRP, 10⁶ unidades infecciosas o UI).

20 La figura 12 muestra títulos de IgG específica de 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 un virión (VRP, 10⁶ UI). También se muestran los títulos en ratones no sometidos a experimentación previa. Las líneas continuas muestran medias geométricas.

25 La figura 13 muestra la producción de citocina intracelular después de la reestimulación con péptidos sintéticos que representan los epítomos fundamentales en la proteína F, 4 semanas después de una segunda dosis. El eje y muestra el % de citocina+ de CD8+CD4-.

30 La figura 14 muestra títulos de IgG específica de F (media del log₁₀ de los títulos ± desviación típica) durante 63 días (figura 14A) y 210 días (figura 14B) después de la inmunización de terneros. Las tres líneas se distinguen fácilmente el día 63 y son, de abajo hacia arriba: control PBS negativo; ARN suministrado en liposomas; y el producto "Triangle 4".

La figura 15 muestra la expresión de SEAP (intensidad relativa) el día 6 frente al pKa de lípidos usados en los liposomas. Los círculos muestran niveles para liposomas con DSPC, y los cuadrados para liposomas sin DSPC; algunas veces un cuadrado y un círculo se solapan, dejando solamente visible el cuadrado para un pKa dado.

35 La figura 16 muestra la expresión de títulos anti-F (con respecto a RV01, 100 %) dos semanas después de una primera dosis de replicón que codifica proteína F. Los títulos se representan gráficamente frente al pKa de la misma manera que en la figura 15. La estrella muestra RV02, que usaba un lípido catiónico que tiene un pKa más elevado que los otros lípidos. Los triángulos muestran datos para liposomas que carecen de DSPC; los círculos son para liposomas que incluían DSPC.

40 La figura 17 muestra títulos de IgG totales después del suministro de replicón en liposomas usando, de izquierda a derecha, RV01, RV16, RV17, RV18 o RV19. Las barras muestran medias. La barra superior en cada caso es 2sd2 (es decir 2 semanas después de la segunda dosis), mientras que la barra inferior es 2sd1.

La figura 18 muestra títulos de IgG en 13 grupos de ratones. Cada círculo es un ratón individual, y las líneas continuas muestran medias geométricas. La línea horizontal discontinua es el límite de detección del ensayo. Los 13 grupos son, de izquierda a derecha, A a M tal como se describe a continuación.

45 La figura 19 muestra (A) IL-6 y (B) IFNα (pg/ml) liberados por pDC. Hay 4 pares de barras, de izquierda a derecha: control; inmunizado con ARN+DOTAP; inmunizado con ARN+lipopectamina; e inmunizado con ARN en liposomas. En cada par la barra negra es ratón de tipo silvestre, la gris es mutante *rsqI*.

Modos para llevar a cabo la invención

Replicones de ARN

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

ADN plasmídico que codifica 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 requeridos para la replicación de ARN pero carecen de aquellos que codifican los productos génicos necesarios para el ensamblaje de partículas; las proteínas estructurales son sustituidas, en su lugar, por una proteína de interés (un informador, tal como SEAP o GFP, o un inmunógeno, tal como la proteína F de VRS de longitud completa) y, de este modo, los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago (T7 o SP6) corriente arriba del ADNc de alfavirus facilita la síntesis del ARN de replicón *in vitro* y una ribozima de virus de la hepatitis delta (VHD) inmediatamente corriente abajo de la cola de poli(A) genera el correcto extremo 3' a través de su actividad de autoescisión.

Después de la linealización del ADN plasmídico corriente debajo de la ribozima de VHD con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron transcritos de prueba de transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa dependiente de ADN derivada del bacteriófago T7 o SP6. Las transcripciones se realizaron durante 2 horas a 37 °C en presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa de T7) o 5 mM (ARN polimerasa de SP6) de cada uno de los nucleósido trifosfatos (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion). Después de la transcripción, el ADN plantilla se digirió con desoxirribonucleasa TURBO (Ambion). El ARN de replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. Al ARN sin caperuza se le añadió una caperuza de forma post-transcripcional con enzima de formación de caperuza de Vaccinia (VCE) usando el sistema ScriptCap m7G Capping System (Epicentre Biotechnologies) tal como se perfila en el manual del usuario; a los replicones a los que se les añade una caperuza de esta manera se les da el prefijo "v" por ejemplo vA317 es el replicón A317 al que se le añade una caperuza por VCE. El ARN al que se le añade una caperuza de forma postranscripcional se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. 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 desnaturizante.

Encapsulación liposomal

El ARN se encapsuló en liposomas preparados mediante el procedimiento de las referencias 11 y 42. Los liposomas estaban compuestos por el 10 % de DSPC (zwitteriónico), el 40 % de DLinDMA (catiónico), el 48 % de colesterol y el 2 % de DMG conjugado a PEG (2 kDa de PEG). Estas proporciones se refieren al % en moles en el liposoma total.

Se sintetizó DLinDMA (1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) usando el procedimiento de la referencia 6. DSPC (1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfolina) se adquirió de Genzyme. El colesterol se obtuvo de Sigma-Aldrich. El DMG conjugado a PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol), sal de amonio), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, sal de cloruro) y DC-chol (clorhidrato de 3β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol) eran de Avanti Polar Lipids.

En resumen, los lípidos se disolvieron en etanol (2 ml), un replicón de ARN se disolvió en tampón (2 ml, citrato sódico 100 mM, pH 6) y estos se mezclaron con 2 ml de tampón, seguido por 1 hora de equilibrado. La mezcla se diluyó con 6 ml de tampón y a continuación se filtró. El producto resultante contenía liposomas, con ~95 % de eficiencia de encapsulación.

Por ejemplo, en un procedimiento particular, se prepararon soluciones madre de lípidos frescas en etanol. 37 mg de DLinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG se pesaron 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. A continuación, se añadieron 755 μ l de la solución madre a 1,245 ml de etanol para preparar una solución madre de lípidos de trabajo de 2 ml. Esta cantidad de lípidos se usó para formar liposomas con 250 μ g de ARN. Una solución de trabajo de 2 ml de ARN también se preparó a partir de una solución madre de ~1 μ g/ μ l en tampón citrato 100 mM (pH 6). Tres viales de vidrio de 20 ml (con barras agitadoras) se aclararon con solución RNase Away (Molecular BioProducts) y se lavaron con abundante agua de MilliQ antes de usarlos para descontaminar los viales de ribonucleasa. Uno de los viales se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípido y ARN (tal como se describe más adelante). Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en jeringas con cierre Luer de 3 cm³. 2 ml de tampón citrato (pH 6) se cargaron en otra jeringa de 3 cm³. Las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador T mixer (PEEK™ unión ID de 500 μ m, Idex Health Science) usando tubos de FEP (etileno-propileno fluorado; todos los tubos de FEP usados tenían un diámetro interno de 2 mm y un diámetro externo de 3 mm). La salida del T mixer también era un tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón citrato se conectó a un tramo independiente de tubo de FEP. Todas las jeringas se impulsaron a continuación a un caudal de 7 ml/minuto usando

una bomba de jeringa. Las salidas del tubo se situaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). La barra agitadora se extrajo y se dejó equilibrar el etanol/solución acuosa a temperatura ambiente durante 1 h. 4 ml de la mezcla se cargaron en una jeringa de 5 cm³, que se conectó a un tramo de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cm³ conectada a una longitud igual de tubo de FEP, se cargó una cantidad igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se impulsaron a 7 ml/minuto de caudal usando la bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, se hizo pasar a la mezcla recogida de la segunda etapa de mezcla (liposomas) a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que se une a y retira moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation). Antes de usar esta membrana para los liposomas, 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6) se hicieron pasar con éxito a su través. Los liposomas se calentaron durante 10 minutos a 37 °C antes de pasar a través de la membrana. A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de 1X PBS usando filtración por flujo tangencial antes de recuperar el producto final. El sistema de TFF y membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs (Rancho Dominguez) y se usaron de acuerdo con las directrices del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de polisulfona con un límite de tamaño de poro de 100 kD y 8 cm² de área superficial. Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con 1X PBS.

La figura 2 muestra una microfotografía electrónica ejemplar de liposomas preparados mediante estos procedimientos. Estos liposomas contienen ARN encapsulado que codifica antígeno F de VRS de longitud completa. La dispersión de luz dinámica de un lote mostraba un diámetro promedio de 141 nm (por intensidad) o 78 nm (por número).

El porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN se determinaron mediante el kit Quant-iT RiboGreen RNA reagent kit (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El estándar de ARN ribosómico proporcionado en el kit se usó para generar una curva patrón. Los liposomas se diluyeron 10 veces o 100 veces en 1X tampón TE (del kit) antes de la adición del colorante. Por separado, se diluyeron liposomas 10 veces o 100 veces en 1X tampón TE que contenía el 0,5 % de Triton X antes de la adición del colorante (para romper los liposomas y, por lo tanto, para determinar el ARN total). Seguidamente se añadió una cantidad igual de colorante a cada solución y a continuación ~180 µl de cada solución después de la adición del colorante se cargaron por duplicado en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. La fluorescencia (Ex 485 nm, Em 528 nm) se leyó en un lector de microplacas. Todas las formulaciones de liposomas se dosificaron *in vivo* basándose en la cantidad encapsulada de ARN.

La encapsulación en liposomas demostró proteger el ARN de la digestión con ribonucleasa. Los experimentos usaban 3,8 mAU de ribonucleasa A por microgramo de ARN, incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. La ribonucleasa se inactivó con Proteinasa K a 55 °C durante 10 minutos. A continuación se añadió una mezcla 1:1 v/v de muestra a 25:24:1 v/v/v, de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para extraer el ARN de los lípidos en la fase acuosa. Las muestras se mezclaron agitando en vórtice durante unos pocos segundos y a continuación se colocaron en una centrifuga durante 15 minutos a 12000 rpm. La fase acuosa (que contenía el ARN) se retiró y se usó 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, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65 °C y se enfriaron a temperatura ambiente. Se usaron marcadores Ambion Millennium para aproximar el peso molecular de la construcción de ARN. El gel se hizo correr a 90 V. el gel se tiñó usando SYBR oro al 0,1 % de acuerdo con las directrices del fabricante en agua agitando a temperatura ambiente durante 1 hora. La figura 1 muestra que la ribonucleasa 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 son tratados con ribonucleasa (carril 4). Después de que los liposomas tratados con ribonucleasa se someten a extracción con fenol, se observa el ARN sin digerir (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* permanecía 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, una enzima informadora (SEAP; fosfatasa alcalina secretada) estaba codificada en el replicón, en lugar de un inmunógeno. Los niveles de expresión se midieron en sueros diluidos a 1:4 en 1X tampón de dilución Phospha-Light usando un sustrato de fosfatasa alcalina quimioluminiscente. A ratones BALB/c de 8-10 semanas (5/grupo) se les inyectó por vía intramuscular el día 0, 50 µl por pata de una dosis de ARN de 0,1 µg o 1 µg. El mismo vector también se administró sin los liposomas (en 1X PBS libre de ribonucleasa) a 1 µg. Los replicones empaquetados en virión también se pusieron a prueba. Los replicones empaquetados en virión usados en el presente documento (denominados "VRP") se obtuvieron mediante los procedimientos de la referencia 43, donde el replicón de alfavirus se deriva del VEEV mutante o una quimera derivada del genoma de VEEV manipulado para contener el UTR 3' de virus Sindbis y una señal de empaquetamiento (PS) de virus Sindbis, empaquetados coelectroporándolos en células BHK con ARN auxiliares defectuosos que codifican genes de la cápsida y de glucoproteínas del virus Sindbis.

Tal como se muestra en la figura 5, la encapsulación aumentaba los niveles de SEAP en aproximadamente ½ log a la dosis de 1 µg, y el día 6 la expresión a partir de una dosis encapsulada de 0,1 µg concordaba con niveles observados con la dosis no encapsulada de 1 µg. El día 3, los niveles de expresión superaban los conseguidos con VRP (cuadrados). Los expresados de este modo se incrementaban cuando el ARN se formulaba en los liposomas con respecto a al control de ARN desnudo, incluso a una dosis 10 veces más baja. La expresión también era más elevada

con respecto al control de VRP, pero las cinéticas de expresión eran muy diferentes (véase la figura 5). El suministro del ARN con electroporación dio como resultado una expresión incrementada con respecto al control de ARN desnudo, pero estos niveles eran más bajos que con liposomas.

5 Para evaluar si el efecto observado en los grupos con liposoma se debía simplemente a los componentes del liposoma, 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 dio los niveles de expresión más bajos, mostrando que la encapsulación es esencial para una potente expresión.

10 Estudios *in vivo* usando suministro liposomal confirmaron estos descubrimientos. Los ratones recibieron diversas combinaciones de (i) replicón de ARN autorreplicante que codifica proteína F de VRS de longitud completa (ii) replicón de ARN que codifica GFP autorreplicante (iii) replicón de ARN que codifica GFP con una inactivación ("knockout") en nsP4 que elimina la autorreplicación (iv) proteína F de VRS de longitud completa. 13 grupos en total recibieron:

A	-	-
B	0,1 µg de (i), desnudo	-
C	0,1 µg de (i), encapsulado en liposoma	-
D	0,1 µg de (i), con liposomas independientes	-
E	0,1 µg de (i), desnudo	10 µg de (ii), desnudo
F	0,1 µg de (i), desnudo	10 µg de (iii), desnudo
G	0,1 µg de (i), encapsulado en liposoma	10 µg de (ii), desnudo
H	0,1 µg de (i), encapsulado en liposoma	10 µg de (iii), desnudo
I	0,1 µg de (i), encapsulado en liposoma	1 µg de (ii), encapsulado en liposoma
J	0,1 µg de (i), encapsulado en liposoma	1 µg de (iii), encapsulado en liposoma
K	5 µg de proteína F	-
L	5 µg de proteína F	1 µg de (ii), encapsulado en liposoma
M	5 µg de proteína F	1 µg de (iii), encapsulado en liposoma

15 Los resultados en la figura 18 muestran que las respuestas de IgG específica de F requerían encapsulación en el liposoma en lugar de simplemente cosuministro (compárense los grupos C y D). Una comparación de los grupos K, L y M muestra que el ARN proporcionaba un efecto adyuvante contra la proteína cosuministrada, y este efecto se observó con ARN tanto replicante como no replicante.

20 Experimentos con SEAP adicionales mostraban una clara respuesta a la dosis *in vivo*, con expresión observada después del suministro de tan solo 1 ng de ARN (figura 6). Experimentos adicionales que comparaban la expresión a partir de replicones encapsulados y desnudos indicaban que 0,01 µg de ARN encapsulado eran equivalentes a 1 µg de ARN desnudo. A una dosis de 0,5 µg de ARN, el material encapsulado dio una expresión 12 veces más elevada el día 6; a una dosis de 0,1 µg, los niveles eran 24 veces más elevados el día 6.

25 En lugar de buscar niveles promedio en el grupo, también se estudiaron animales individuales. Mientras que varios animales no respondían a los replicones desnudos, la encapsulación eliminaba los animales que no respondían. Experimentos adicionales sustituyeron DLinDMA por DOTAP. Aunque los liposomas con DOTAP dieron mejor expresión que el replicón desnudo, eran inferiores a los liposomas con DLinDMA (una diferencia de 2 a 3 veces el día 1). Mientras que DOTAP tenía una amina cuaternaria, y de este modo tenía una carga positiva en el punto de suministro, DLinDMA tenía una amina terciaria.

30 Para evaluar la inmunogenicidad *in vivo*, se construyó un replicón para expresar proteína F de longitud completa de virus respiratorio sincitial (VRS). Éste se suministró desnudo (1 µg), encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg), o empaquetado en viriones (10⁶ UI; "VRP") los días 0 y 21. La figura 7 muestra títulos de IgG anti-F 2 semanas después de la segunda dosis, y los liposomas mejoran claramente la inmunogenicidad. La figura 8 muestra los títulos 2 semanas después, punto en el cual no había ninguna diferencia estadística entre el ARN encapsulado a 0,1 µg, el ARN encapsulado a 1 µg, o el grupo de VRP. Los títulos de neutralización (medidos como reducción de placas del 60 %, "PRNT60") no eran significativamente diferentes en estos tres grupos 2 semanas después de la segunda dosis (figura 9). La figura 12 muestra títulos tanto de IgG como de PRNT 4 semanas después de la segunda dosis.

La figura 13 confirma que el ARN desencadena una respuesta de linfocitos T CD8 robusta.

Experimentos adicionales compararon títulos de IgG específica de F en ratones que recibieron VRP, 0,1 µg de ARN encapsulado en liposomas, o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas. Las relaciones de títulos (VRP:liposoma) a diversos tiempos después de la segunda dosis eran las siguientes:

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

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

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

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

Se realizó un estudio adicional en ratas algodonerías (*Sigmodon hispidus*) en lugar de ratones. A una dosis de 1 µg la encapsulación en liposomas incrementaba los títulos de IgG específica de F en 8,3 veces en comparación con ARN desnudo e incrementaba los títulos de PRNT en 9,5 veces. La magnitud de la respuesta de anticuerpo era equivalente a la inducida por 5×10^6 UI de VRP. Los ARN tanto desnudo como encapsulado en liposomas eran capaces de proteger a las ratas algodonerías de la exposición al VRS (1×10^5 unidades formadoras de placas), reduciendo la carga viral en el pulmón en al menos 3,5 log. La encapsulación incrementaba la reducción en aproximadamente 2 veces.

Un estudio en animales grandes se realizó en ganado vacuno. Las vacas se inmunizaron con 66 µg de replicón que codificaba proteína F de VRS de longitud completa los días 0 y 21, formulado dentro de liposomas. Se usó PBS en solitario como control negativo, y se usó una vacuna autorizada como control positivo ("Triangle 4" de Fort Dodge, que contenía virus inactivado). La figura 14 muestra títulos de IgG específica de F durante un periodo de 63 días comenzando desde la primera inmunización. El replicón de ARN era inmunógeno en las vacas, aunque dio títulos más bajos que la vacuna autorizada. Todas las vacas vacunadas mostraban anticuerpos específicos de F después de la segunda dosis, y los títulos eran muy estables desde el periodo de 2 a 6 semanas después de la segunda dosis (y eran particularmente estables para la vacuna de ARN).

Mecanismo de acción

Células dendríticas derivada de médula ósea (pDC) se obtuvieron de ratones de tipo silvestre o la estirpe mutante "Resq" (*rsq*). La estirpe mutante tiene una mutación puntual en el extremo amino de su receptor TLR7 que abole la señalización de TLR7 sin afectar a la unión a ligandos [44]. Las células se estimularon con ARN en replicón formulado con DOTAP, lipofectamina 2000 o dentro de un liposoma. Tal como se muestra en la figura 19, IL-6 e INFα se indujeron en células WT pero esta respuesta era casi completamente abolida en ratones mutantes. Estos resultados muestran que se requiere TLR7 para el reconocimiento del ARN en células inmunitarias, y que los replicones encapsulados en liposomas pueden hacer que las células inmunitarias secreten niveles elevados tanto de interferones como de citocinas proinflamatorias.

Medición del pKa

El pKa de un lípido tal como se define en las reivindicaciones se mide en agua a temperatura y presión estándar usando la siguiente técnica:

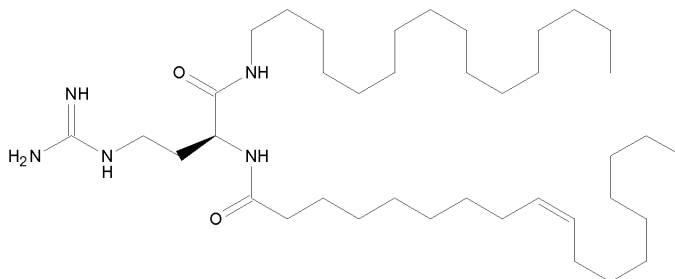
- Una solución 2 mM de lípido en etanol se prepara pesando el lípido y disolviéndolo en etanol. Una solución 0,3 mM de sonda fluorescente ácido toluenonitrosulfónico (TNS) en etanol:metanol 9:1 se prepara preparando el primer lugar una solución 3 mM de TNS en metanol y a continuación diluyendo a 0,3 mM con etanol.
- Se prepara un tampón acuoso que contiene fosfato sódico, citrato sódico, acetato sódico y cloruro sódico, a las concentraciones de 20 mM, 25 mM, 20 mM y 150 mM, respectivamente. El tampón se divide en ocho partes y el pH se ajusta con HCl 12 N o NaOH 6 N a 4,44-4,52, 5,27, 6,15-6,21, 6,57, 7,10-7,20, 7,72-7,80, 8,27-8,33 y 10,47-11,12. Se mezclan 400 µl de solución de lípidos 2 mM y 800 µl de solución de TNS 0,3 mM.

- 5 • 7,5 μ l de mezcla sonda/lípido se añaden a 242,5 μ l de tampón en una placa de 96 pocillos de 1 ml. esto se realiza con los ocho tampones. Después de mezclar, 100 μ l de cada mezcla de sonda/lípido/tampón se transfieren a una placa de 96 pocillos de color negro con fondo transparente de 250 μ l (por ejemplo modelo COSTAR 3904, Corning). Una manera conveniente de realizar esta mezcla es usar el manipulador de líquidos de alto rendimiento Tecan Genesis RSP150 y el software Gemini.
- La fluorescencia de cada mezcla de sonda/lípido/tampón se mide (por ejemplo con un espectrofotómetro SpectraMax M5 y software SoftMax pro 5.2) con 322 nm de excitación, 431 nm de emisión (auto-límite a 420 nm).
- 10 • Después de la medición, el valor de fluorescencia de fondo de un pocillo vacío en la placa de 96 pocillos se resta de cada mezcla de sonda/lípido/tampón. Los valores de intensidad de fluorescencia se normalizan a continuación al valor al pH más bajo. La intensidad de fluorescencia normalizada se representa gráficamente a continuación frente al pH y se proporciona una línea del mejor ajuste.
- Se averigua el punto en la línea de mejor ajuste en el que la intensidad de fluorescencia normalizada es igual a 0,5. El pH correspondiente a intensidad de fluorescencia normalizada igual a 0,5 se averigua y se considera el pKa del lípido.
- 15 Este procedimiento da un pKa de 5,8 para DlinDMA. Los valores de pKa medidos mediante este procedimiento para lípidos catiónicos de la referencia 5 se incluyen a continuación.

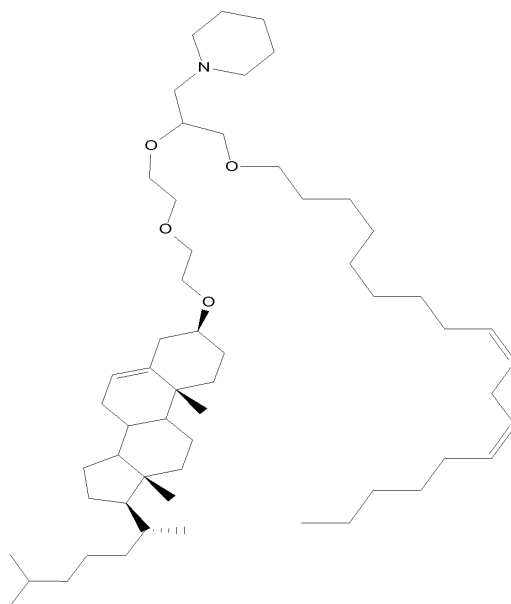
Encapsulación en liposomas usando lípidos catiónicos alternativos

Como alternativa al uso de DlinDMA, se usan los lípidos catiónicos de la referencia 5. Estos lípidos pueden sintetizarse como se desvela en la referencia 5.

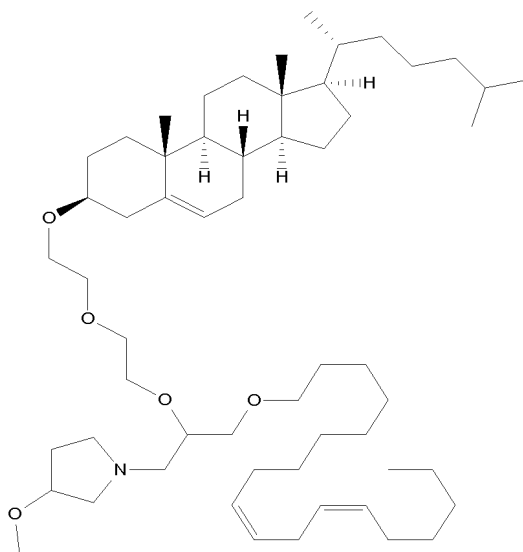
- 20 Los liposomas formados anteriormente usando DlinDMA se denominan en lo sucesivo como la serie "RV01". El DlinDMA se sustituyó por diversos lípidos catiónicos en las series "RV02" a "RV12" tal como se describe a continuación. Se formaron dos tipos diferentes de cada liposoma, usando PEG2000-DMG al 2 % con (01) el 40 % del lípido catiónico, el 10 % de DSPC y el 48 % de colesterol, o (02) el 60 % del lípido catiónico y el 38 % de colesterol. Por lo tanto, una combinación de los liposomas (01) y (02) muestra el efecto del lípido zwitteriónico neutro.
- 25 Los liposomas RV02 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa >9, sin una amina terciaria):



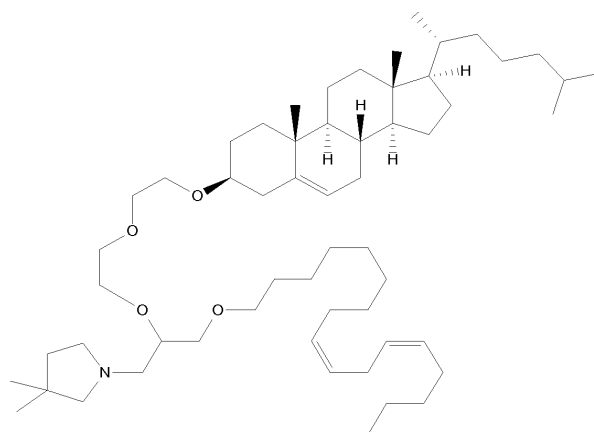
Los liposomas RV03 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 6,4):



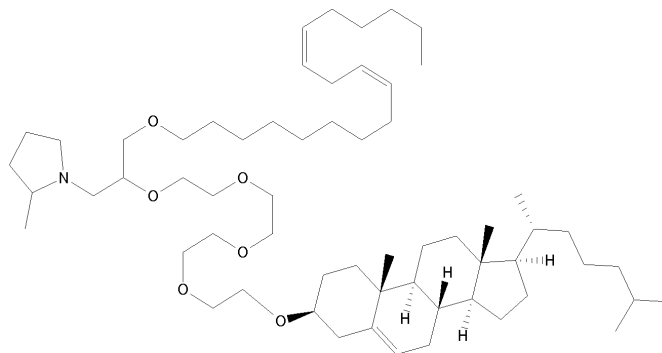
Los liposomas RV04 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 6,62):



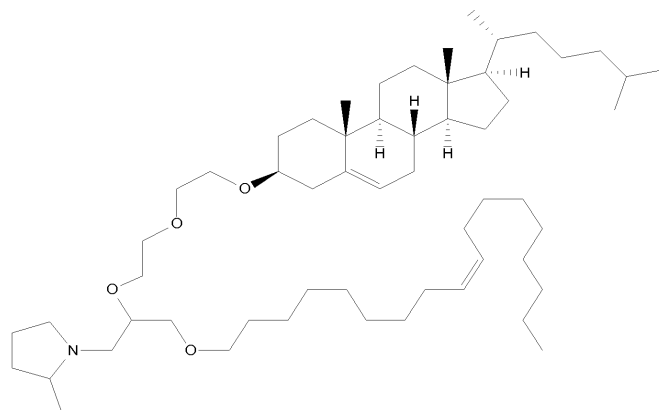
5 Los liposomas RV05 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 5,85):



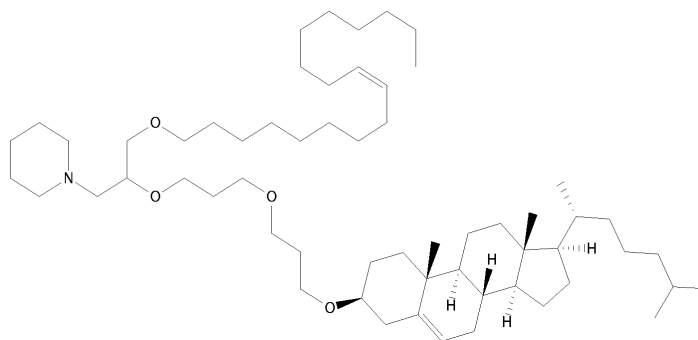
Los liposomas RV06 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 7,27):



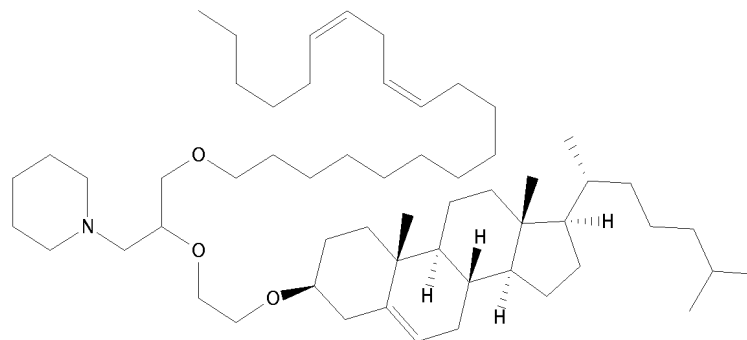
Los liposomas RV07 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 6,8):



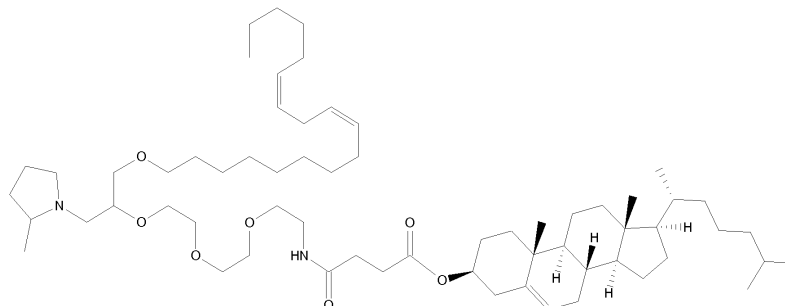
5 Los liposomas RV08 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 5,72):



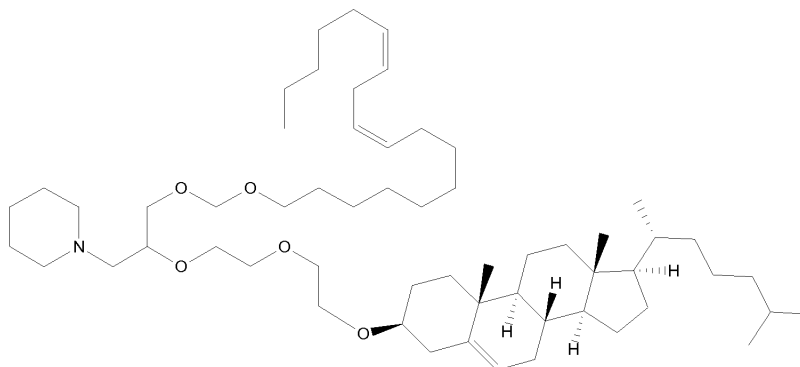
Los liposomas RV09 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 6,07):



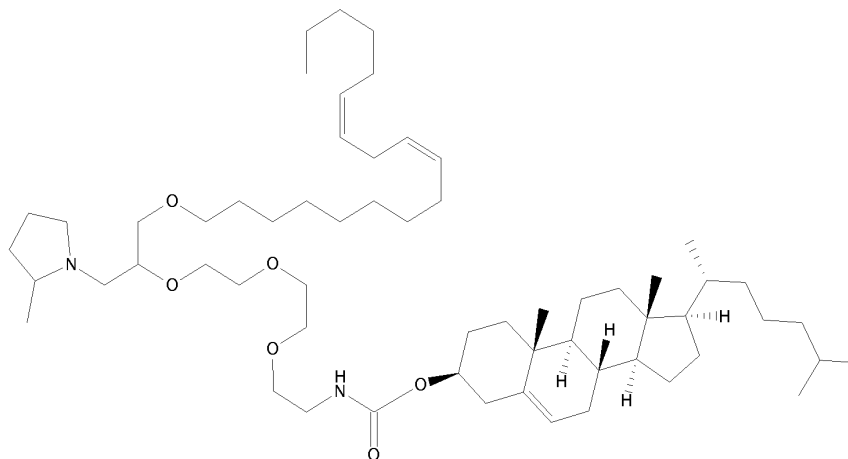
Los liposomas RV10 se prepararon para comparación usando el siguiente lípido catiónico (pKa 7,86):



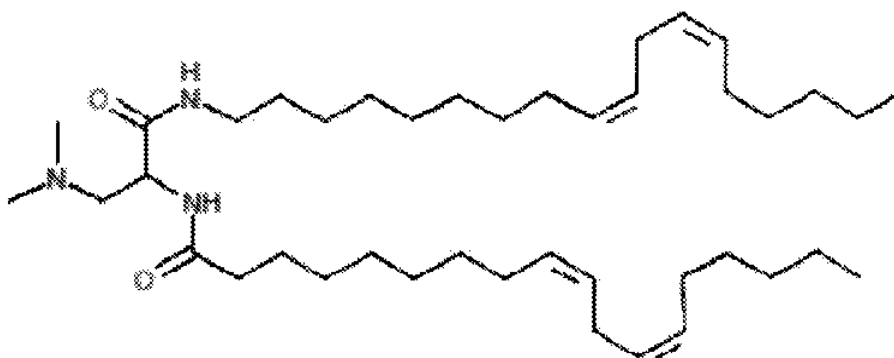
Los liposomas RV11 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 6,41):



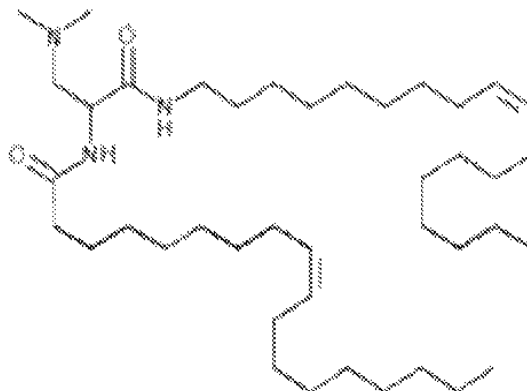
5 Los liposomas RV12 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 7):



Los liposomas RV16 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 6,1) [45]:



Los liposomas RV17 se prepararon usando el siguiente lípido catiónico (pKa 6,1) [45]:



Los liposomas RV18 se prepararon usando DODMA. Los liposomas RV19 se prepararon usando DOTMA y los liposomas RV13 se prepararon con DOTAP, teniendo ambos un grupo de cabeza de amina cuaternaria.

- 5 Estos liposomas se caracterizaron y se ensayaron con el informador SEAP descrito anteriormente. La siguiente tabla muestra el tamaño de los liposomas (Z promedio e índice de polidispersidad), el % de encapsulación de ARN en cada liposoma, junto con la actividad de SEAP detectada los días 1 y 6 después de la inyección. La actividad de SEAP es relativa a liposomas "RV01(02)" compuestos por DlinDMA, colesterol y PEG-DMG:

RV	pKa del lípido	Zpro (pdl)	% de encapsulación	SEAP día 1	SEAP día 6
RV01 (01)	5,8	154,6 (0,131)	95,5	80,9	71,1
RV01 (02)	5,8	162,0 (0,134)	85,3	100	100
RV02 (01)	> 9	133,9 (0,185)	96,5	57	45,7
RV02 (02)	> 9	134,6 (0,082)	97,6	54,2	4,3
RV03 (01)	6,4	158,3 (0,212)	62,0	65,7	44,9
RV03 (02)	6,4	164,2 (0,145)	86	62,2	39,7
RV04 (01)	6,62	131,0 (0,145)	74,0	91	154,8
RV04 (02)	6,62	134,6 (0,117)	81,5	90,4	142,6
RV05 (01)	5,85	164,0 (0,162)	76,0	76,9	329,8
RV05 (02)	5,85	177,8 (0,117)	72,8	67,1	227,9
RV06 (01)	7,27	116,0 (0,180)	79,8	25,5	12,4
RV06 (02)	7,27	136,3 (0,164)	74,9	24,8	23,1
RV07 (01)	6,8	140,6 (0,184)	77	26,5	163,3
RV07 (02)	6,8	138,6 (0,122)	87	29,7	74,8
RV 08 (01)	5,72	176,7 (0,185)	50	76,5	187
RV08 (02)	5,72	199,5(0,191)	46,3	82,4	329,8
RV09 (01)	6,07	165,3 (0,169)	72,2	65,1	453,9
RV09 (02)	6,07	179,5 (0,157)	65	68,5	658,2
RV10 (01)	7,86	129,7 (0,184)	78,4	113,4	47,8
RV10 (02)	7,86	147,6 (0,131)	80,9	78,2	10,4
RV11 (01)	6,41	129,2 (0,186)	71	113,6	242,2
RV11 (02)	6,41	139 (0,198)	75,2	71,8	187,2
RV12 (01)	7	135,7 (0,161)	78,8	65	10
RV12 (02)	7	158,3 (0,287)	69,4	78,8	8,2

- 10 La figura 15 representa gráficamente los niveles de SEAP el día 6 frente al pKa de los lípidos catiónicos. Los mejores resultados se observan cuando el lípido tiene un pKa entre 5,6 y 6,8, e idealmente entre 5,6 y 6,3.

Estos liposomas también se usaron para suministrar un replicón que codifica proteína F de VRS de longitud completa. Los títulos de IgG totales contra proteína F dos semanas después de la primera dosis (2sd1) se representan gráficamente contra pKa en la figura 16. Los mejores resultados se observan donde el pKa es donde el lípido catiónico tiene un pKa entre 5,7-5,9, pero el pKa en solitario no basta para garantizar un título elevado por ejemplo, el lípido debe seguir soportando la formación del liposoma.

Inmunogenicidad frente a VRS

Se llevó a cabo trabajo adicional con un replicón autorreplicante (vA317) que codifica la Proteína F de VRS. A ratones BALB/c, 4 u 8 animales por grupo, se les administraron vacunaciones bilaterales intramusculares (50 μ l por pata) los días 0 y 21 con el replicón (1 μ g) en solitario o formulado como liposomas con los lípidos RV01 o RV05 (véase anteriormente; pKa de 5,8 o 5,85) o con RV13. Los liposomas RV01 tenían el 40 % de DlinDMA, el 10 % de DSPC, el 48 % de colesterol y el 2 % de PEG-DMG, pero con cantidades diferentes de ARN. Los liposomas RV05(01) tenían el 40 % de lípido catiónico, el 48 % de colesterol, el 10 % de DSPC y el 2 % de PEG-DMG; los liposomas RV05(02) tenían el 60 % de lípido catiónico, el 38 % de colesterol y el 2 % de PEG-DMG. Los liposomas RV13 tenían el 40 % de DOTAP, el 10 % de DPE, el 48 % de colesterol y el 2 % de PEG-DMG. Para comparación, ADN plasmídico desnudo (20 μ g) que expresa el mismo antígeno F de VRS se suministró usando electroporación o con liposomas RV01(10) (0,1 μ g de ADN). Se usaron cuatro ratones como grupo de control no sometido a experimentación previa.

Se prepararon liposomas mediante el procedimiento (A) o el procedimiento (B). En el procedimiento (A) se prepararon soluciones madre frescas de lípidos en etanol. 37 mg de lípido catiónico, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG se pesaron 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. A continuación, se añadieron 226,7 μ l de la solución madre a 1,773 ml de etanol para preparar una solución madre de lípidos de trabajo de 2 ml. Esta cantidad de lípidos se usó para formar liposomas con 75 μ g de ARN para dar una relación de nitrógeno con respecto a fosfato de 8:1 (excepto que en RV01 (08) y RV01 (09) esta relación se modificó a 4:1 o 16:1). Una solución de trabajo de ARN de 2 ml (o, para RV01(10), ADN) también se preparó a partir de una solución madre de ~ 1 μ g/ μ l en tampón citrato 100 mM (pH 6). Tres viales de vidrio de 20 ml (con barras agitadoras) se aclararon con solución RNase Away (Molecular BioProducts) y se lavaron con abundante agua de MilliQ antes del uso para descontaminar los viales de ribonucleasas. Uno de los viales se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípido y ARN (tal como se describe más adelante). Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en jeringas de 3 cm³. 2 ml de tampón citrato (pH 6) se cargaron en otra jeringa de 3 cm³. Las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador T mixer (PEEK™ unión ID de 500 μ m, IDEX Health Science) usando tubos de FEP. La salida del T mixer también era un tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón citrato se conectó a un tramo independiente de tubo de FEP. Todas las jeringas se impulsaron a continuación a un caudal de 7 ml/minuto usando una bomba de jeringa. Las salidas del tubo se situaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). La barra agitadora se extrajo y se dejó equilibrar el etanol/solución acuosa a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación la mezcla se cargó en una jeringa de 5 cm³, que se conectó a un tramo de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cm³ conectada a una longitud igual de tubo de FEP, se cargó un volumen igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se impulsaron a 7 ml/minuto de caudal 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 1X PBS usando TFF antes de recuperar el producto final. El sistema de TFF y membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs y se usaron de acuerdo con las directrices del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de polietilensulfona (PES) (número de pieza P-C1-100E-100-01N) con un límite de tamaño de poro de 100 kD y 8 cm² de área superficial. Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con 1X PBS.

El procedimiento de preparación (B) difería de dos maneras del procedimiento (A). En primer lugar, después de la recogida en el vial de vidrio de 20 ml pero antes de la concentración por TFF, la mezcla se hizo pasar a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que se une a y retira moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation, Ann Arbor, MI, EE. UU.). Esta membrana se lavó en primer lugar con 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6) por turnos, y los liposomas se calentaron durante 10 minutos a 37 °C antes de filtrarlos. En segundo lugar, la membrana de filtración de fibra hueca era de Polisulfona (número de pieza P/N: X1AB-100-20P).

El diámetro de partícula promedio Z, el índice de polidispersidad y la eficiencia de encapsulación de los liposomas eran los siguientes:

RV	Zpro (nm)	pdl	% encapsulación	Preparación
RV01 (10)	158,6	0,088	90,7	(A)
RV01 (08)	156,8	0,144	88,6	(A)
RV01 (05)	136,5	0,136	99	(B)
RV01 (09)	153,2	0,067	76,7	(A)

(continuación)

RV	Zpro (nm)	pdl	% encapsulación	Preparación
RV05 (01)	148	0,127	80,6	(A)
RV05 (02)	177,2	0,136	72,4	(A)
RV01 (10)	134,7	0,147	87,8 *	(A)
RV13 (02)	128,3	0,179	97	(A)
* Para esta formulación RV01(10), el ácido nucleico era ADN no ARN				

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

- 5 Los títulos de IgG en suero específica de F (GMT) eran los siguientes:

RV	Día 14	Día 36
ADN plasmídico 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 son positivos para citocinas y específicos para el péptido F51-66 de VRS son las siguientes, mostrando solamente cifras que están de forma estadísticamente significativa por encima de cero:

RV	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
ADN plasmídico 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
RV05 (01)					0,06	0,04		0,19
RV05 (02)	0,05	0,07		0,11	0,64	0,35		0,69
ADN de RV01 (10)				0,03				0,08
RV13 (02)	0,03	0,04		0,06	1,15	0,41		1,18

- 10 De este modo, las formulaciones de liposomas mejoraban significativamente la inmunogenicidad con respecto a los controles de ARN desnudo, según se determinó mediante títulos de IgG específica de F y frecuencias de linfocitos T incrementados. El ADN plasmídico formulado con liposomas, o suministrado desnudo usando electroporación, era significativamente menos inmunógeno que el ARN autorreplicante formulado en liposomas.

- 15 Las vacunas de ARN de RV01 y RV05 eran más inmunógenas que la vacuna de RV13 (DOTAP). Estas formulaciones tenían características físicas comparables y se formularon con el mismo ARN autorreplicante, pero contienen diferentes lípidos catiónicos. RV01 y RV05 tienen, ambos, una amina terciaria en el grupo de cabeza con un pKa de aproximadamente 5,8, y también incluyen colas alquilo insaturadas. RV13 tenían colas alquilo insaturadas pero su grupo de cabeza tiene una amina cuaternaria y es muy fuertemente catiónico. Estos resultados sugieren que lípidos

con aminas terciarias con pKa en el intervalo 5,0 a 7,6 son superiores a lípidos tales como DOTAP, que son fuertemente catiónicos, cuando se usan en un sistema de suministro de liposomas para ARN.

Alternativas adicionales a DLinDMA

- 5 El lípido catiónico en liposomas RV01 (DLinDMA) se sustituyó por RV16, RV17, RV18 o RV19. Los títulos de IgG totales se muestran en la figura 17. Los resultados más bajos se observan con RV19 es decir la amina cuaternaria DOTMA.

Expresión de BHK

- 10 Se incubaron liposomas con diferentes lípidos con células BHK durante una noche y se evaluó su potencia de expresión de proteínas. A partir de una situación inicial con RV05, la expresión de lípidos podía incrementarse 18 veces añadiendo el 10 % de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE) al liposoma, 10 veces añadiendo 10 % el de 18:2 (cis) fosfatidilcolina, y 900x usando en su lugar RV01.

Inmunogenicidad frente a VRS en diferentes estirpes de ratón

- 15 El replicón "vA142" codifica la glucoproteína de fusión de superficie de tipo silvestre de longitud completa (F) de VRS pero con el péptido de fusión eliminado, y el extremo 3' se forma mediante escisión mediada por ribozimas. Se ensayó en tres estirpes de ratón diferentes.

A ratones BALB/c se les administraron vacunaciones bilaterales intramusculares (50 µl por para) los días 0 y 22. Los animales se dividieron en 8 grupos de ensayo (5 animales por grupo) y un control no sometido a experimentación previa (2 animales):

Al grupo 1 se le administró replicón desnudo (1 µg).

- 20 Al grupo 2 se le administró 1 µg de replicón suministrado en liposomas "RV01(37)" con el 40 % de DLinDMA, el 10 % de DSPC, el 48 % de colesterol, el 2 % de DMG conjugado a PEG.

Al grupo 3 se le administró lo mismo que al grupo 2, pero a 0,1 µg de ARN.

Al grupo 4 se le administró 1 µg del replicón en liposomas "RV17(10)" (40 % de RV17 (véase anteriormente), 10 % de DSPC, 49,5 % de colesterol, 0,5 % de PEG-DMG).

- 25 El grupo 5 era 1 µg de replicón en liposomas "RV05(11)" (40 % de lípido RV07, 30 % de PE 18:2 (DLoPE, 28 % de colesterol, 2 % de PEG-DMG).

Al grupo 6 se le administraron 0,1 µg de replicón en liposomas "RV17(10)".

Al grupo 7 se le administraron 5 µg de proteína de subunidad F de VRS con hidróxido de aluminio como adyuvante.

El grupo 8 era un control no sometido a experimentación previa (2 animales)

- 30 Se recogieron sueros para análisis de anticuerpos los días 14, 35 and 49. Los GMT de IgG en suero específica de F eran:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8
14	82	2463	1789	2496	1171	1295	1293	5
35	1538	34181	25605	23579	13718	8887	73809	5

El día 35, los títulos de IgG 1 e IgG2a específicas de F (GMT) eran los siguientes:

IgG	1	2	3	4	5	6	7
IgG1	94	6238	4836	7425	8288	1817	78604
IgG2a	5386	77064	59084	33749	14437	17624	24

- 35 Los títulos de anticuerpo neutralizante en suero contra VRS los días 35 y 49 eran los siguientes (los datos son títulos de neutralización con reducción de placas al 60 % de conjuntos de 2-5 ratones, 1 conjunto por grupo):

Día	1	2	3	4	5	6	7	8
35	<20	143	20	101	32	30	111	<20
49	<20	139	<20	83	41	32	1009	<20

- 5 Los bazos se recogieron el día 49 para el análisis de linfocitos T. Las frecuencias de linfocitos T positivos para citocinas específicos de F netos (CD4+ o CD8+) eran las siguientes, mostrando solamente cifras que estaban de forma estadísticamente significativa por encima de cero (específicos para péptidos de VRS F51-66, F164-178, F309-323 para CD4+, o para péptido F85-93 y F249-258 para CD8+):

Grupo	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
1	0,03	0,06		0,08	0,47	0,29		0,48
2	0,05	0,10		0,08	1,35	0,52		1,11
3	0,03	0,07		0,06	0,64	0,31		0,61
4	0,05	0,09		0,07	1,17	0,65		1,09
5	0,03	0,08		0,07	0,65	0,28		0,58
6	0,05	0,07		0,07	0,74	0,36		0,66
7		0,02			0,04	0,04		
8								

- 10 Ratones C57BL/6 se inmunizaron de la misma manera, pero un 9º grupo recibió VRP (1×10^6 UI) que expresan la glucoproteína de fusión de superficie de tipo silvestre de longitud completa de VRS (eliminación del péptido de fusión).

Se recogieron sueros para análisis de anticuerpos los días 14, 35 & 49. Los títulos de IgG específica de F (GMT) eran:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14	1140	2133	1026	2792	3045	1330	2975	5	1101
35	1721	5532	3184	3882	9525	2409	39251	5	12139

El día 35, los títulos de IgG 1 e IgG2a específicas de F (GMT) eran los siguientes:

IgG	1	2	3	4	5	6	7	8
IgG1	66	247	14	328	468	92	56258	79
IgG2a	2170	7685	5055	6161	1573	2944	35	14229

- 15 Los títulos de anticuerpo neutralizante en suero contra VRS los días 35 y 49 eran los siguientes (los datos son títulos de neutralización con reducción de placas al 60 % de conjuntos de 2-5 ratones, 1 conjunto por grupo):

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
35	<20	27	29	22	36	<20	28	<20	<20
49	<20	44	30	23	36	<20	33	<20	37

- 20 Los bazos se recogieron el día 49 para el análisis de linfocitos T. Las frecuencias de linfocitos T positivos para citocinas específicos de F netos (CD8+) eran las siguientes, mostrando solamente cifras que estaban de forma estadísticamente significativas por encima de cero (específicas para péptidos de VRS F85-93 y F249-258):

Grupo	CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
1	0,42	0,13		0,37
2	1,21	0,37		1,02
3	1,01	0,26		0,77
4	1,26	0,23		0,93
5	2,13	0,70		1,77
6	0,59	0,19		0,49
7	0,10	0,05		
8				
9	2,83	0,72		2,26

Nueve grupos de ratones C3H/HeN se inmunizaron de la misma manera. Los títulos de IgG específica de F (GMT) eran:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14	5	2049	1666	1102	298	984	3519	5	806
35	152	27754	19008	17693	3424	6100	62297	5	17249

5

El día 35, los títulos de IgG 1 e IgG2a específicos de F (GMT) eran los siguientes:

IgG	1	2	3	4	5	6	7	8
IgG1	5	1323	170	211	136	34	83114	189
IgG2a	302	136941	78424	67385	15667	27085	3800	72727

Los títulos de anticuerpo neutralizante en suero contra VRS los días 35 y 49 eran los siguientes:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
35	<20	539	260	65	101	95	443	<20	595
49	<20	456	296	35	82	125	1148	<20	387

- 10 De este modo, tres lípidos diferentes (RV01, RV05, RV17; pKa 5,8, 5,85, 6,1) se ensayaron en tres estirpes de ratón endogámicas diferentes. Para las 3 estirpes RV01 era más eficaz que RV17; para las estirpes BALB/c y C3H, RV05 era menos eficaz que RV01 o RV17, pero era más eficaz en la estirpe B6. En todos los casos, sin embargo, los liposomas eran más eficaces que dos nanoemulsiones catiónicas que se ensayaron en paralelo.

Immunogenicidad frente a CMV

- 15 Los liposomas RV01 con DLinDMA como lípido catiónico se usaron para suministrar replicones de ARN que codifican glucoproteínas de citomegalovirus (CMV). El replicón "vA160" codifica glucoproteínas de longitud completa H y L (gH/gL), mientras que el replicón "vA322" codifica una forma soluble (gHsol/gL). Las dos proteínas están bajo el control de promotores subgenómicos independientes en un único replicón; la coadministración de dos vectores independientes, uno que codifica gH y uno que codifica gL, no dio buenos resultados.
- 20 A ratones BALB/c, 10 por grupo, se les administraron vacunaciones bilaterales intramusculares (50 μ l por pata) los días 0, 21 y 42 con VRP que expresan gH/gL (1×10^6 UI), VRP que expresan gHsol/gL (1×10^6 UI) y PBS como controles. Dos grupos de ensayo recibieron 1 μ g del replicón vA160 o vA322 formulado en liposomas (40 % de DLinDMA, 10 % de DSPC, 48 % de Col, 2 % de PEG-DMG; preparado usando el procedimiento (A) tal como se ha descrito anteriormente, pero con un tamaño de lote de ARN de 150 μ g).
- 25 Los liposomas vA160 tenían un diámetro Zpro de 168 nm, un pdl de 0,144, y el 87,4 % de encapsulación. Los liposomas vA322 tenían un diámetro Zpro de 162 nm, un pdl de 0,131, y un 90 % de encapsulación.

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

Se recogieron sueros para análisis inmunológico el día 63 (3sd3). Los títulos de neutralización de CMV (los recíprocos de la dilución en suero que producía una reducción del 50 % del número de focos de virus positivos por pocillo, con respecto a los controles) eran los siguientes:

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

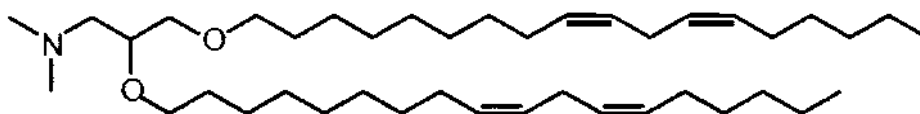
- 5 El ARN que expresa una longitud completa o una forma soluble del complejo gH/gL de CMV desencadenaba de este modo títulos elevados de anticuerpos neutralizantes, tal como se determinó en células epiteliales. Los títulos promedio desencadenados por el ARN encapsulados en liposomas eran al menos tal elevados como para los VRP correspondientes.

REFERENCIAS

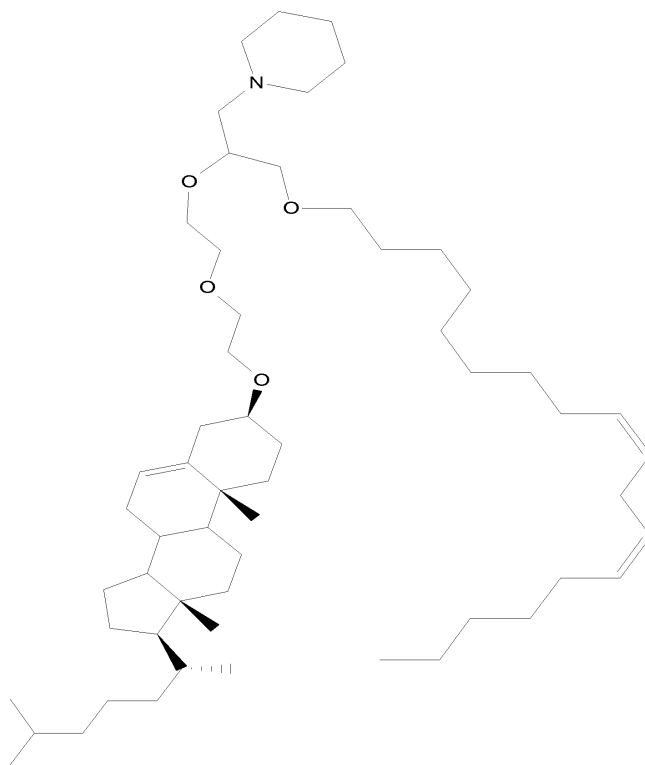
- 10 [1] Johanning y col. (1995) Nucleic Acids Res 23: 1495-1501.
 [2] WO2005/121348.
 [3] WO2008/137758.
 [4] WO2009/086558.
 [5] WO2011/076807.
- 15 [6] Heyes y col. (2005) J Controlled Release 107: 276-87.
 [7] WO2005/121348.
 [8] Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
 [9] Liposome Technology, volumes I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- 20 [10] Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002.
 [11] Jeffs y col. (2005) Pharmaceutical Research 22 (3): 362-372.
 [12] WO2005/113782.
 [13] WO2011/005799.
- 25 [14] E1 Ouahabi y col. (1996) FEBS Letts 380: 108-12.
 [15] Giuliani y col. (2006) Proc Natl Acad Sci EE. UU. 103(29): 10834-9.
 [16] WO2009/016515.
 [17] WO02/34771.
 [18] WO2005/032582.
- 30 [19] WO2010/119343.
 [20] WO2006/110413.
 [21] WO2005/111066.
 [22] WO2005/002619.
 [23] WO2006/138004.
- 35 [24] WO2009/109860.
 [25] WO02/02606.
 [26] WO03/018054.
 [27] WO2006/091517.
 [28] WO2008/020330.
- 40 [29] WO2006/089264.
 [30] WO2009/104092.
 [31] WO2009/031043.
 [32] WO2007/049155.
- 45 [33] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [34] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
 [35] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
 [36] Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 50 [37] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [38] Ausubel y col. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).
 [39] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)
 [40] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
 [41] Yoneyama & Fujita (2007) Cytokine & Growth Factor Reviews 18: 545-51.
- 55 [42] Maurer y col. (2001) Biophysical Journal, 80: 2310-2326.
 [43] Perri y col. (2003) J Virol 77: 10394-10403.
 [44] Iavarone y col. (2011) J Immunol 186: 4213-22.
 [45] WO2011/057020.

REIVINDICACIONES

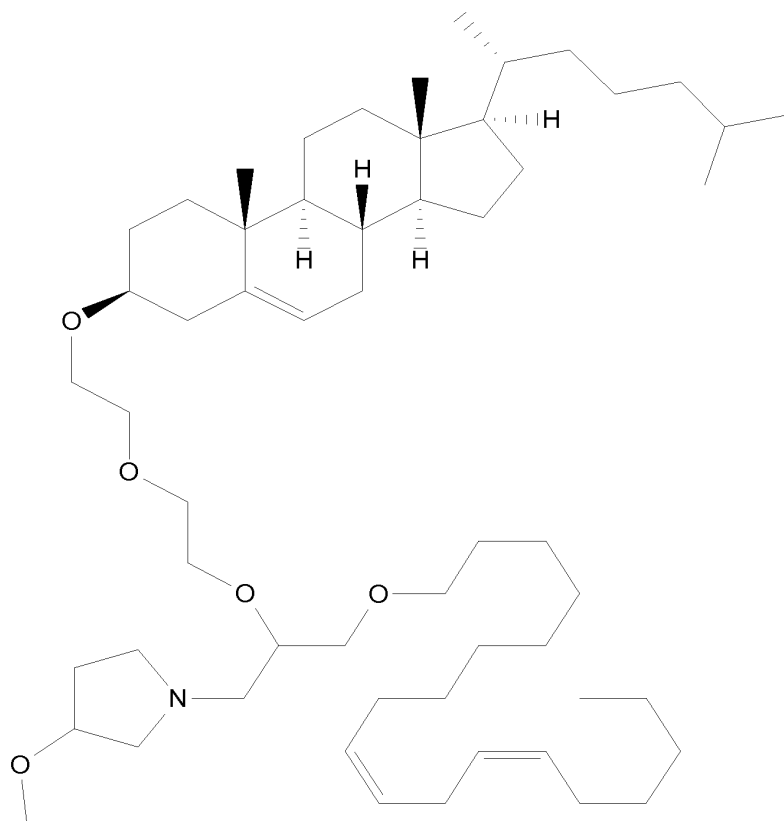
1. Un liposoma para suministro *in vivo* de ARN a una célula de vertebrado, teniendo el liposoma una bicapa lipídica que encapsula un núcleo acuoso, en el que: (i) la bicapa lipídica comprende un lípido que tiene un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8 cuando se mide tal como se describe en la sección "medición del pKa" de la descripción; y (ii) el núcleo acuoso incluye un ARN que codifica un inmunógeno.
2. El liposoma de la reivindicación 1, en el que el lípido que tiene un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8 tienen una amina terciaria.
3. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que el pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8 está entre 5,6 y 6,8.
4. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que el pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8 está entre 5,7 y 5,9.
5. El liposoma de la reivindicación 1, en el que el lípido que tiene un pKa en el intervalo de 5,0 a 6,8 tiene la fórmula mostrada en el presente documento para RV01:



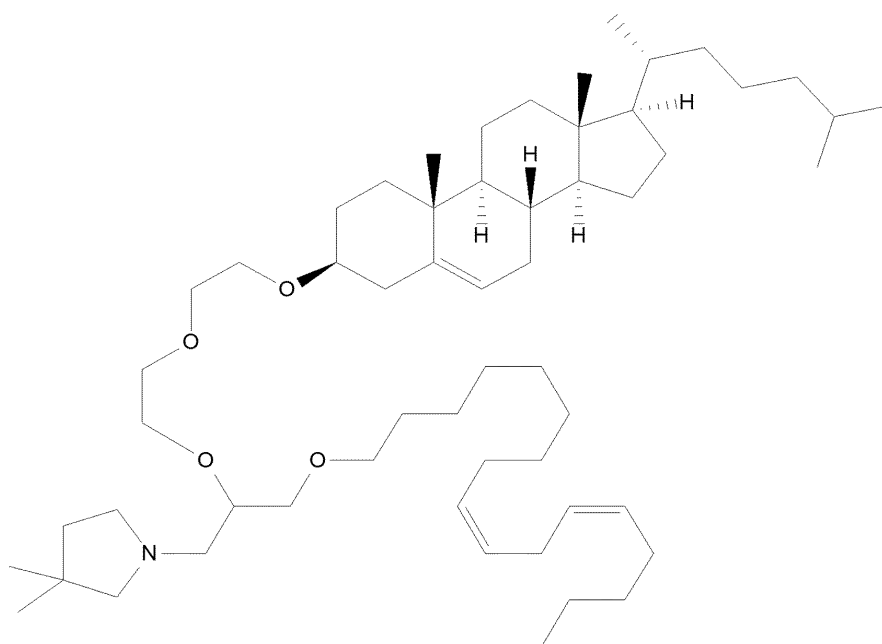
RV03:



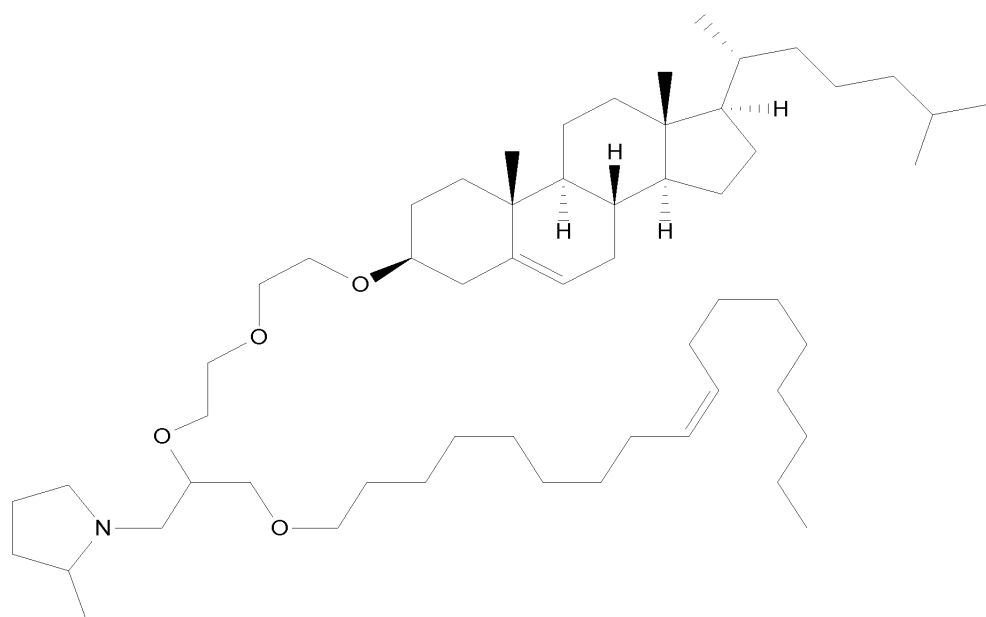
RV04:



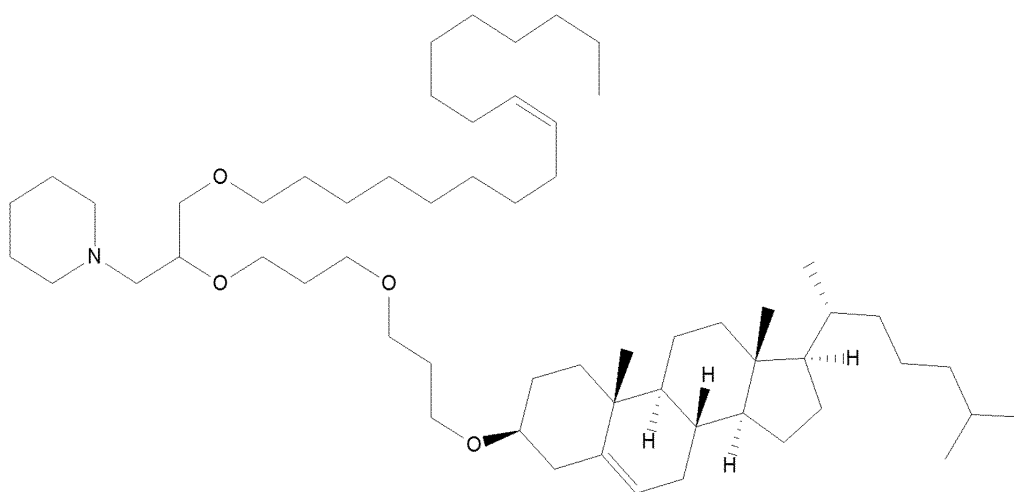
RV05:



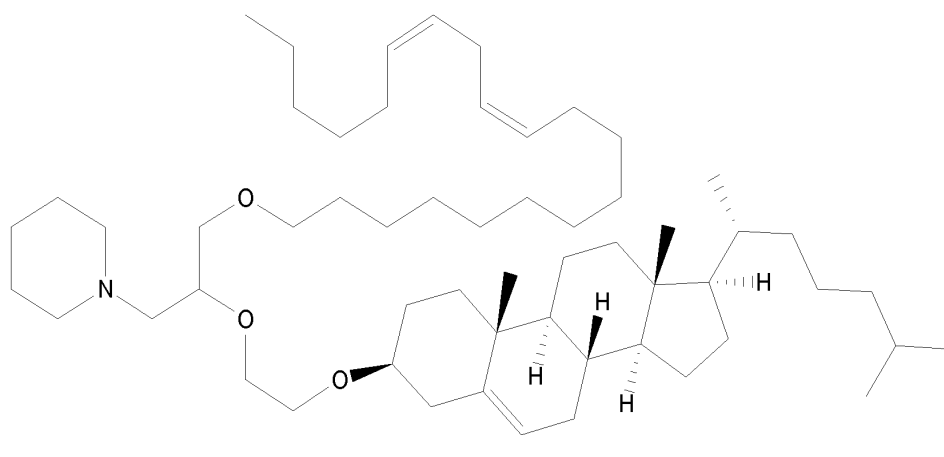
RV07:



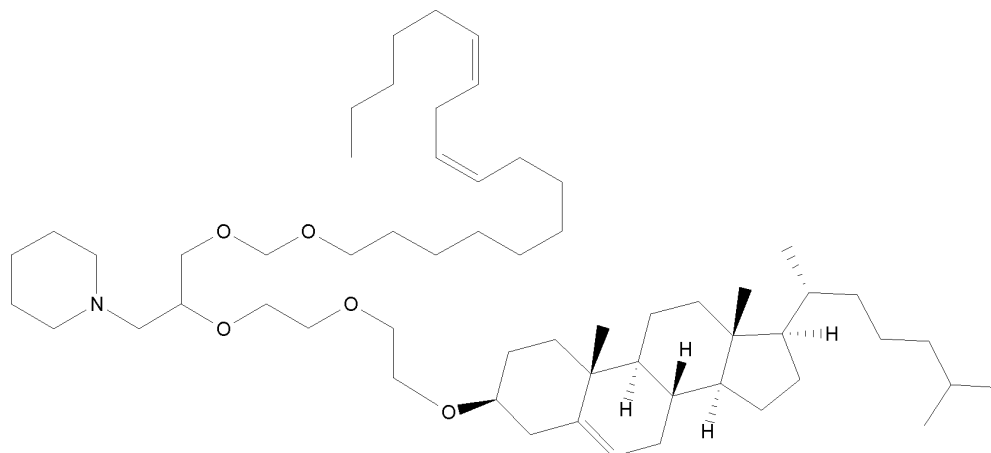
RV08:



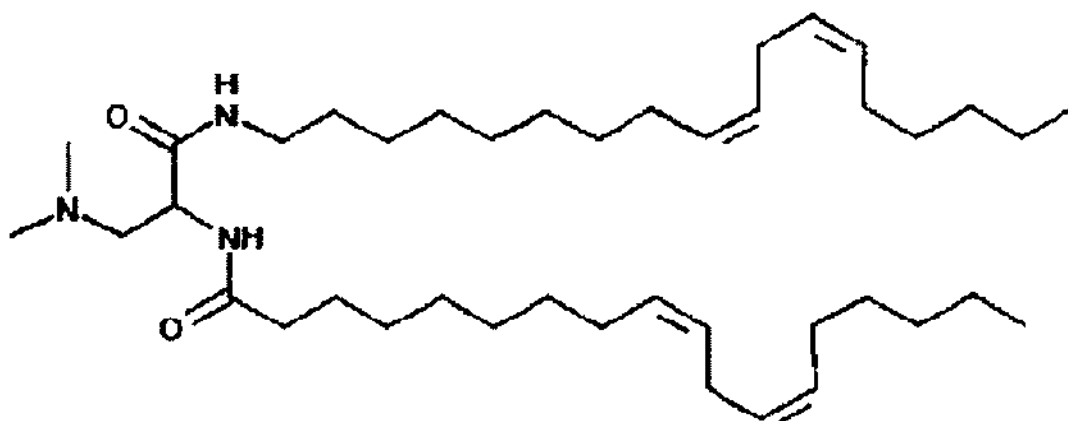
5 RV09:



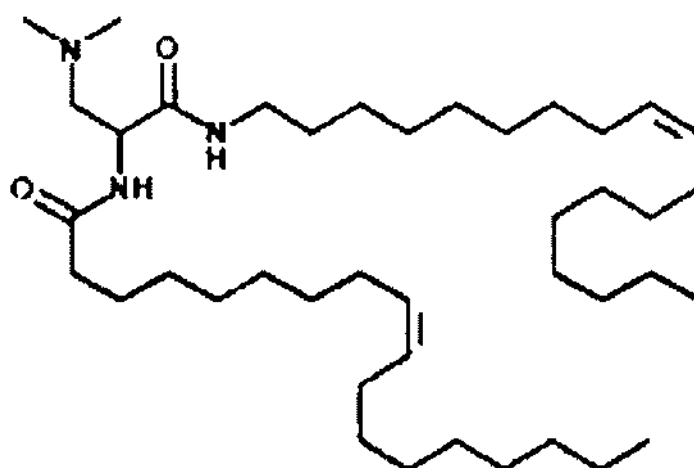
RV11:



RV16:



5 o RV17:



6. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, que tiene un diámetro en el intervalo de 20-220 nm.

7. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que la molécula de ARN codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN a partir de la molécula de ARN y (ii) un inmunógeno.

10 8. El liposoma de la reivindicación 6, en el que la molécula de ARN tiene dos marcos de lectura abierta, el primero de los cuales codifica una replicase de alfavirus y el segundo de los cuales codifica el inmunógeno.

9. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que la molécula de ARN tiene 9000-12000 nucleótidos de longitud.
10. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que el inmunógeno desencadena una respuesta inmunitaria *in vivo* contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.
- 5 11. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que el inmunógeno desencadena una respuesta inmunitaria *in vivo* contra: (a) glucoproteína F del virus respiratorio sincitial; (b) un virus que infecta a los peces, tal como: el virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS), virus de la enfermedad pancreática del salmón (VEPS), virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), virus del bagre del canal (VBC), virus de la enfermedad de la linfocistis del pescado (VLP), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), herpesvirus koi, virus tipo picorna del salmón (también conocidos como virus tipo picorna del salmón atlántico), virus de salmón encerrado (VSE), rotavirus del salmón atlántico (RSA), virus de la enfermedad de la fresa de la trucha (EFT), virus del tumor de salmón coho (VTSC), o virus de septicemia hemorrágica vírica (VSHV); (c) ortomixovirus, tales como virus de la gripe A, B y C; o (d) herpesvirus, tales como virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela-zoster (VVZ), virus Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HVV6), herpesvirus humano 7 (HVV7) y herpesvirus humano 8 (HVV8).
- 10
- 15 12. Una composición farmacéutica que comprende el liposoma de cualquier reivindicación anterior.
13. El liposoma de las reivindicaciones 1-11, o la composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado, que comprende la etapa de administrar al vertebrado una cantidad eficaz de dicho liposoma, o dicha composición farmacéutica.

FIGURA 1

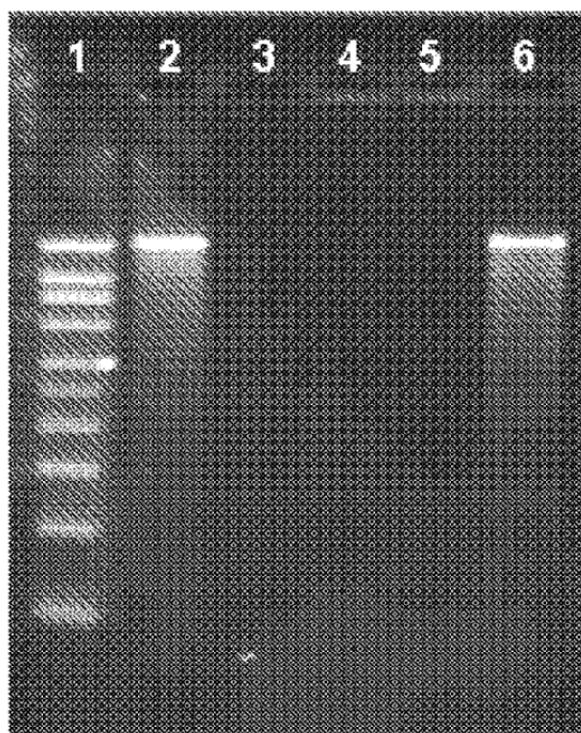


FIGURA 2

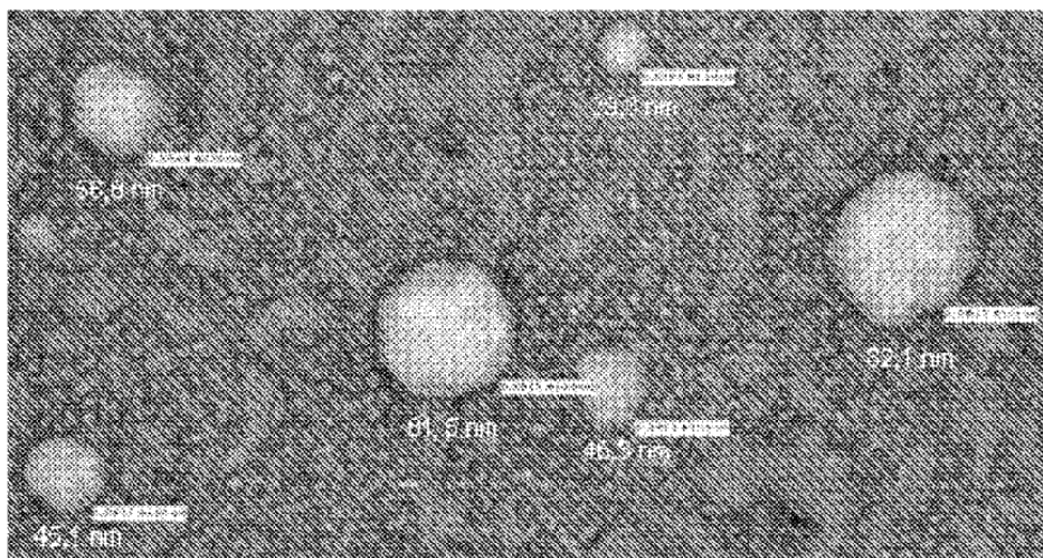


FIGURA 3

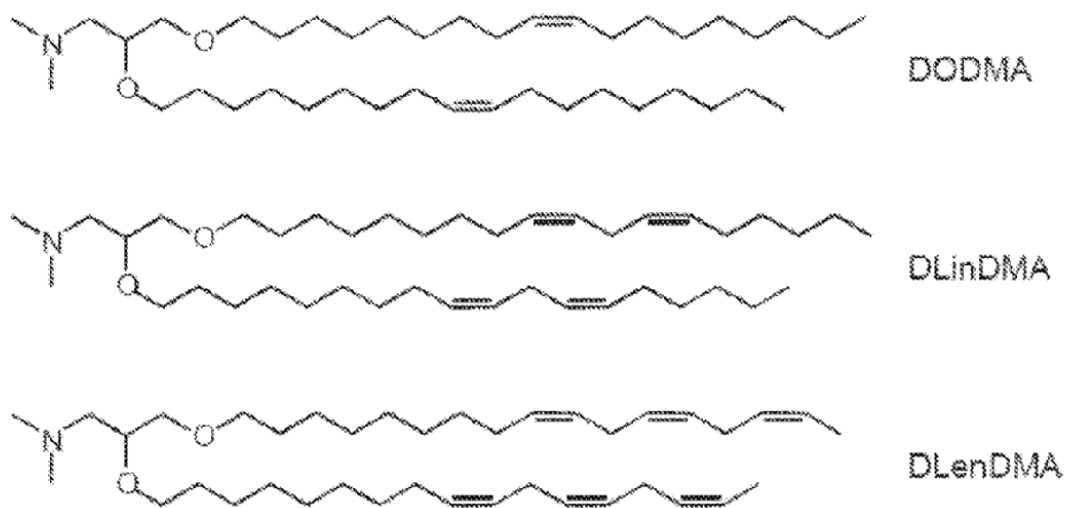


FIGURA 4

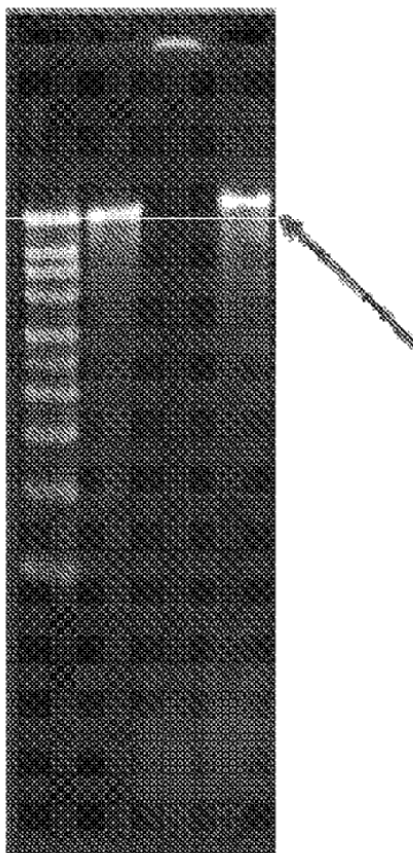


FIGURA 5

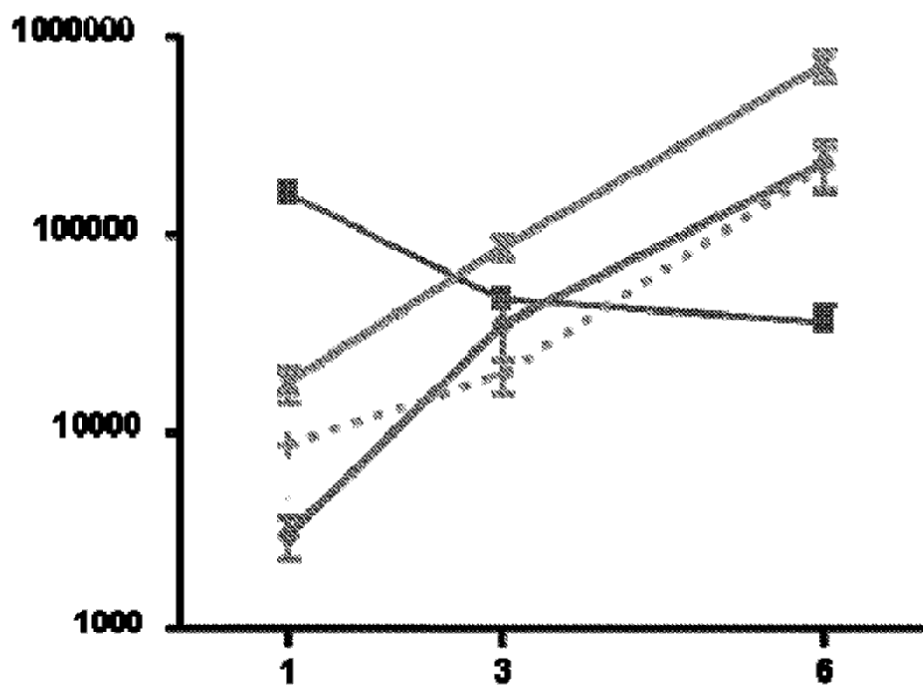


FIGURA 6

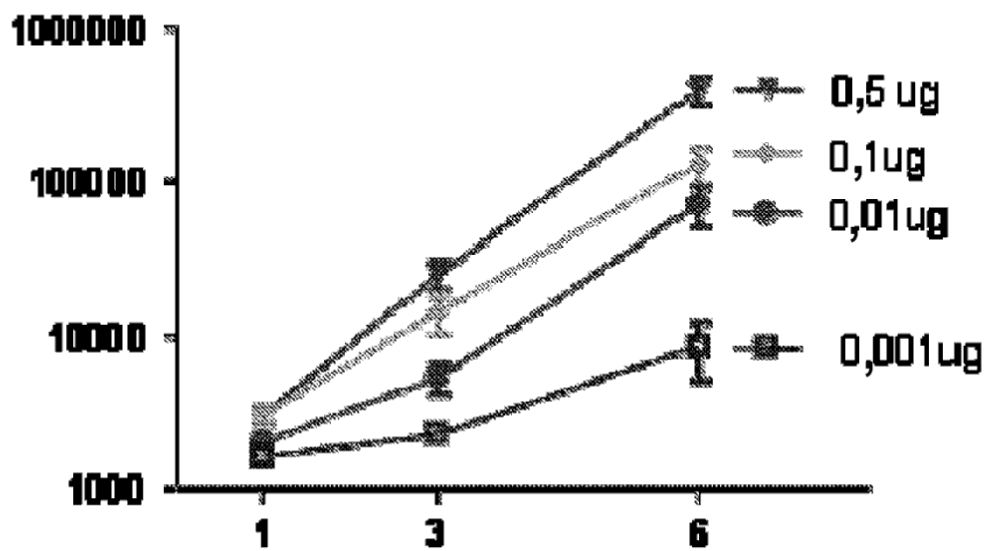


FIGURA 7

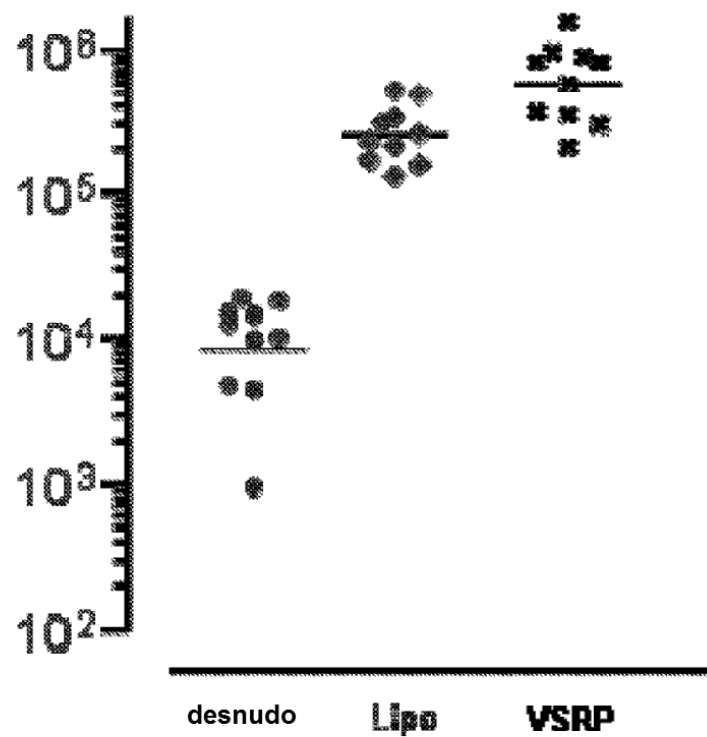


FIGURA 8

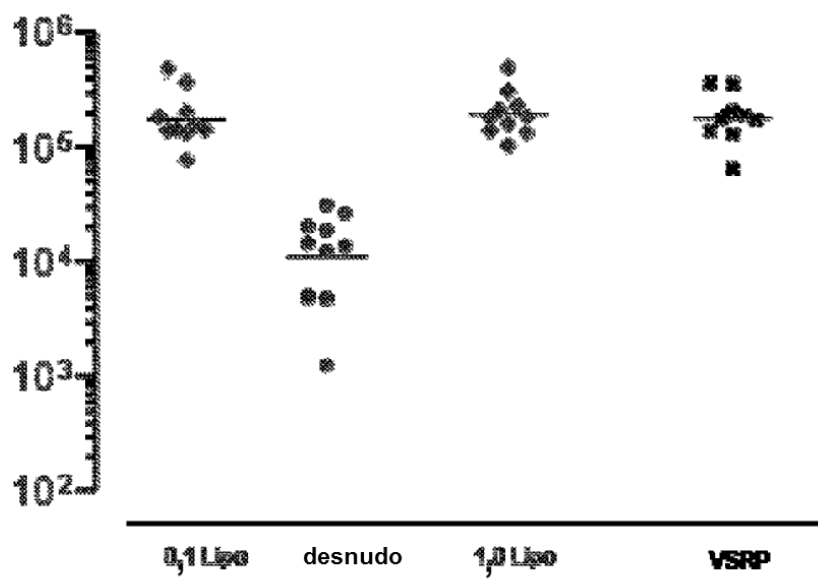


FIGURA 9

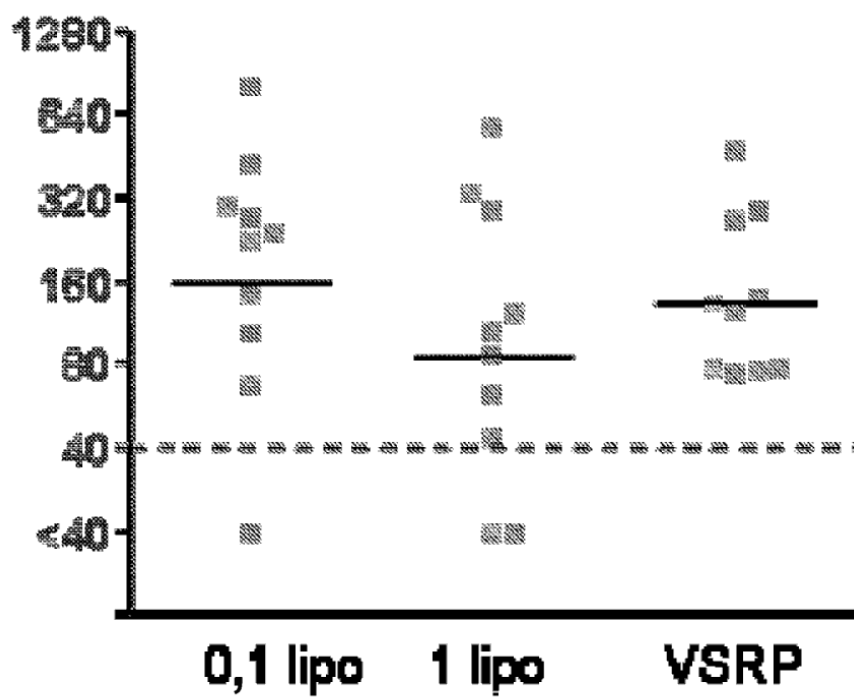


FIGURA 10

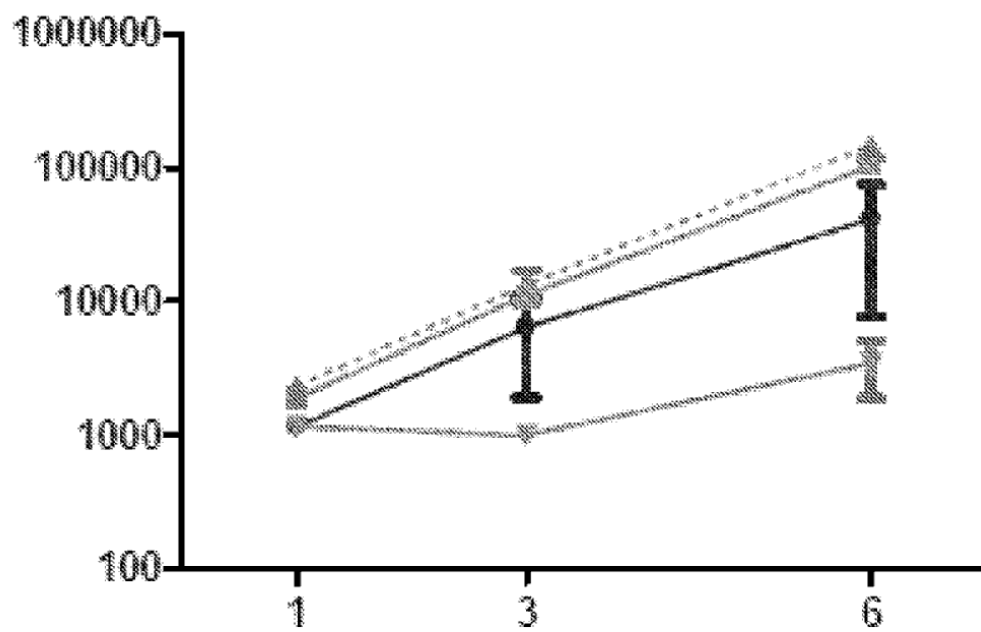


FIGURA 11

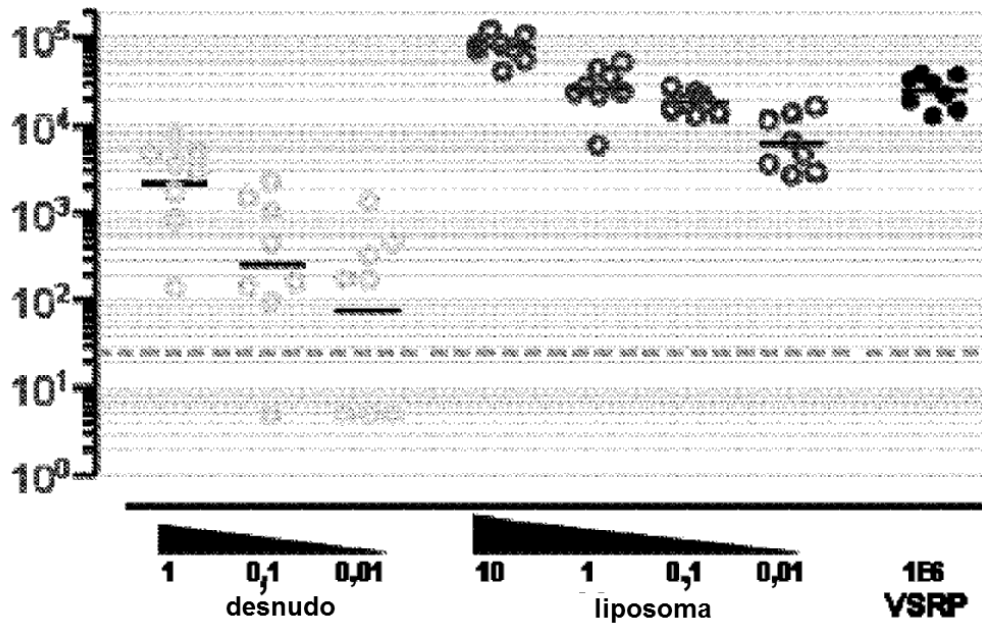


FIGURA 12

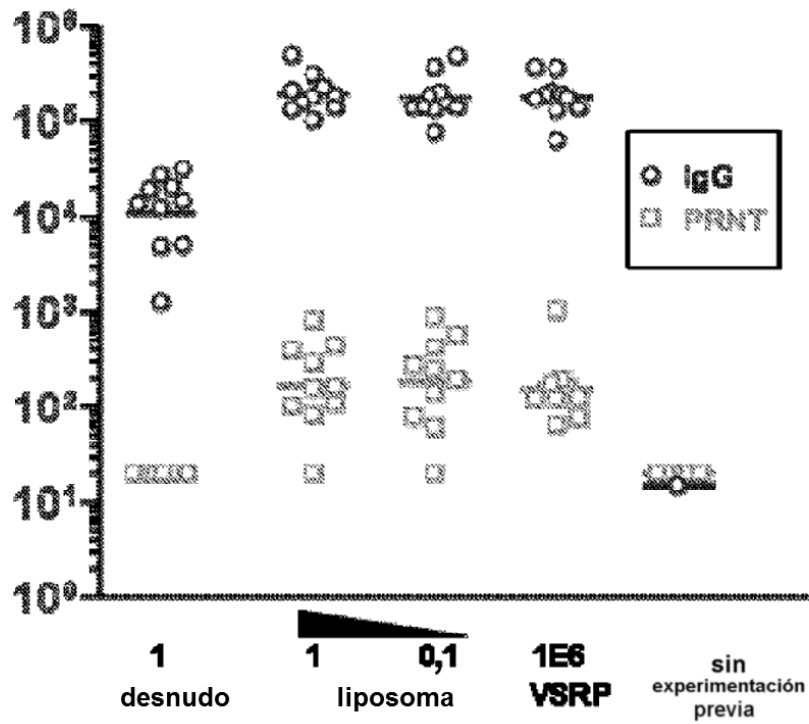


FIGURA 13

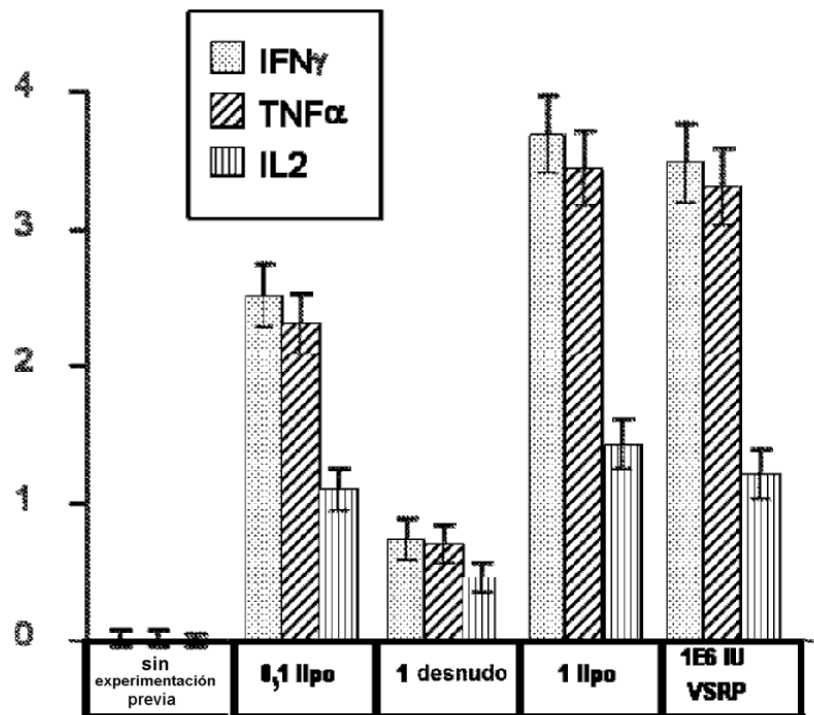


FIGURA 14

FIGURA 14A

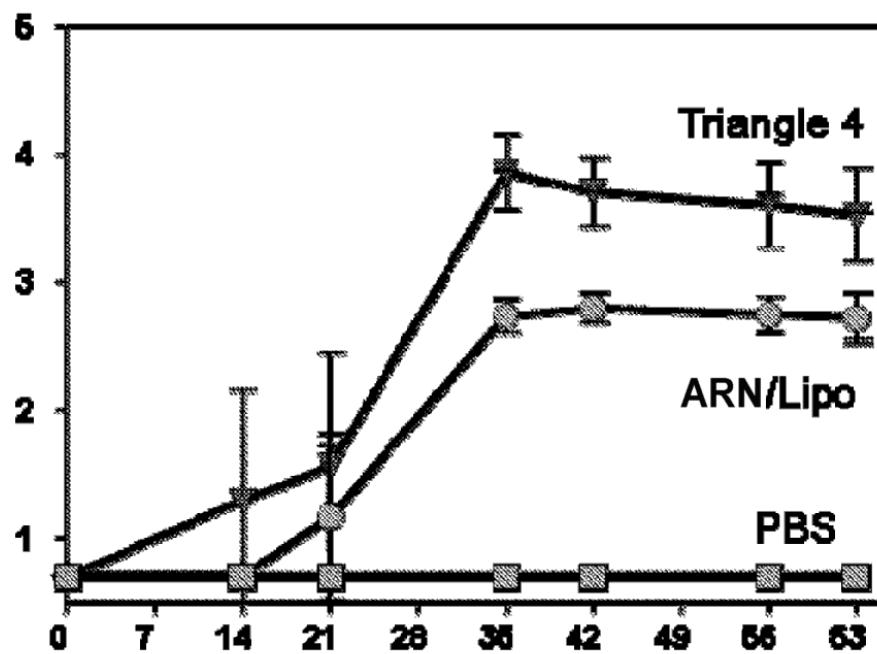


FIGURA 14B

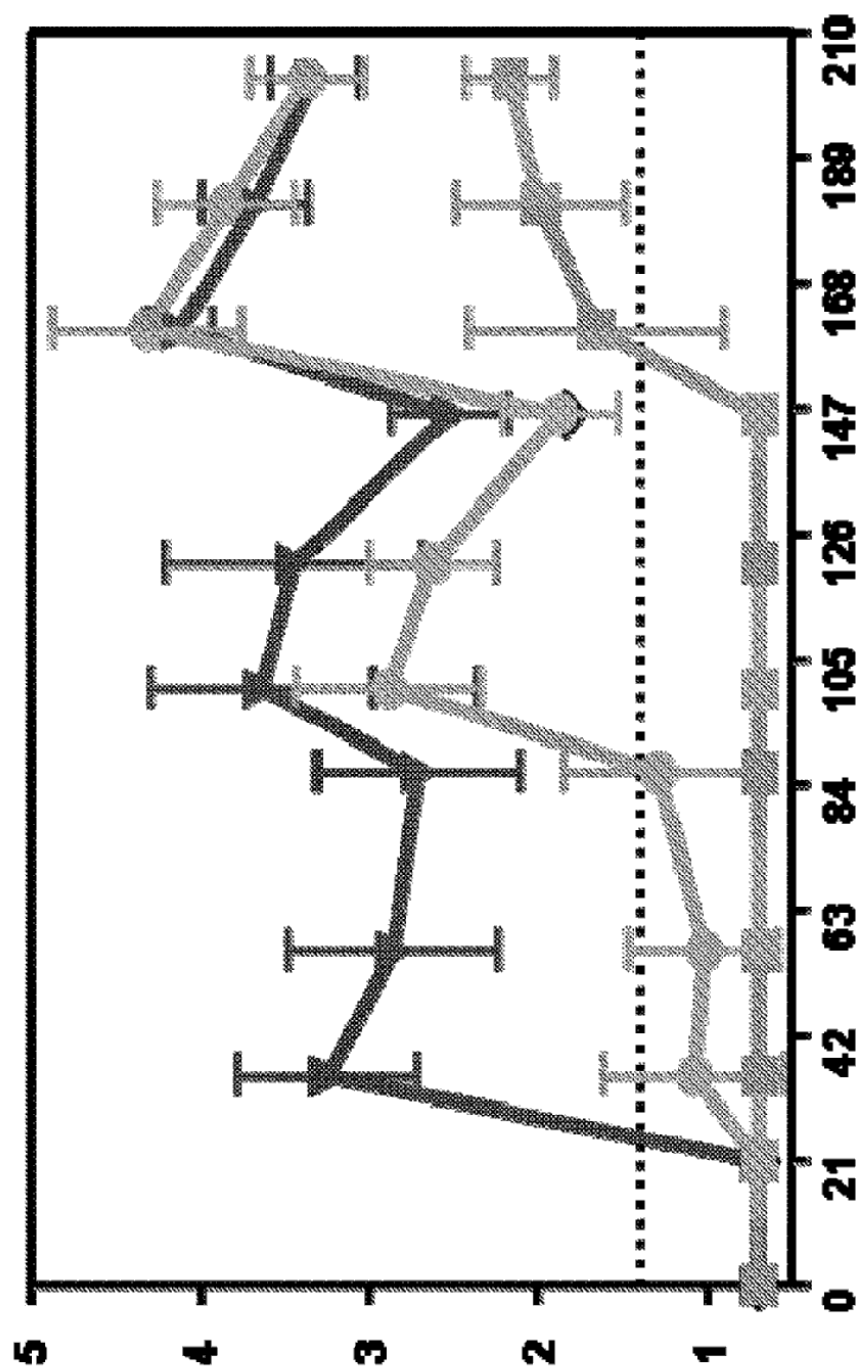


FIGURA 15

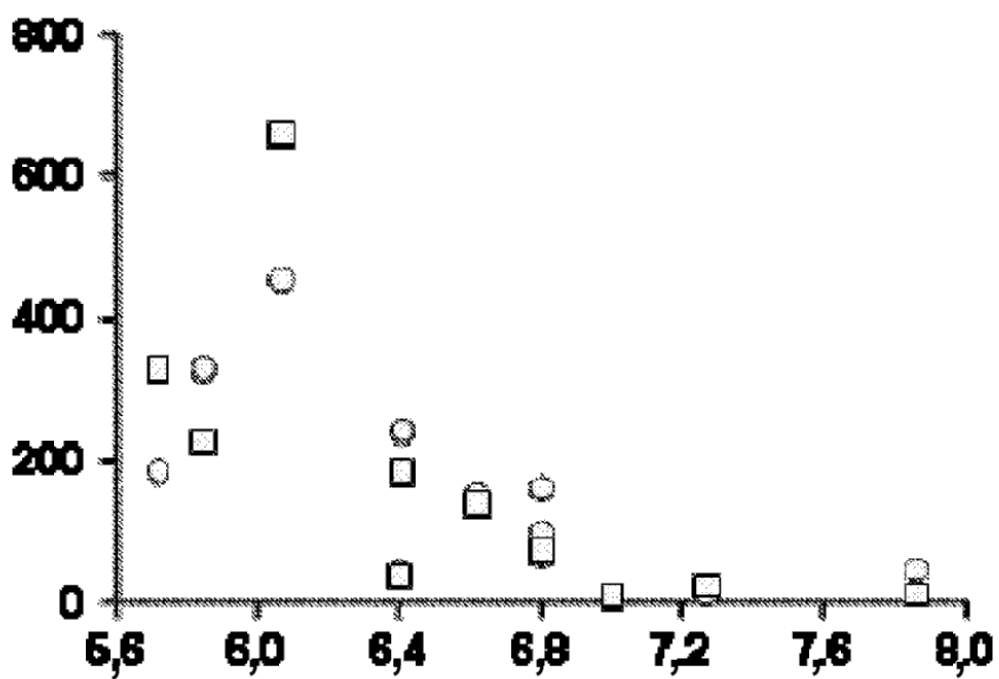


FIGURA 16

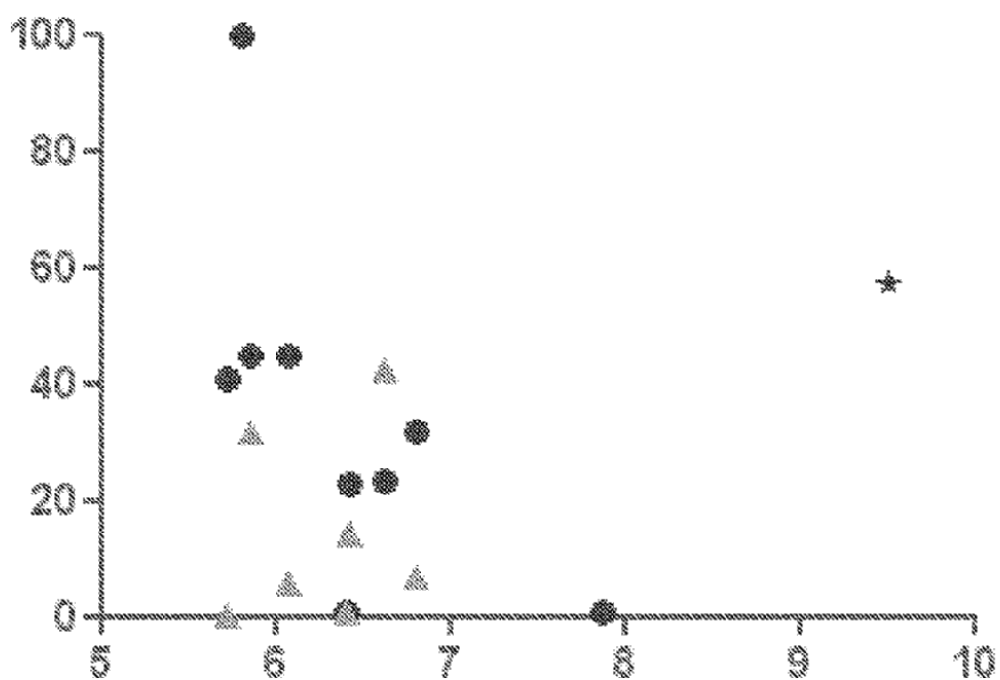


FIGURA 17

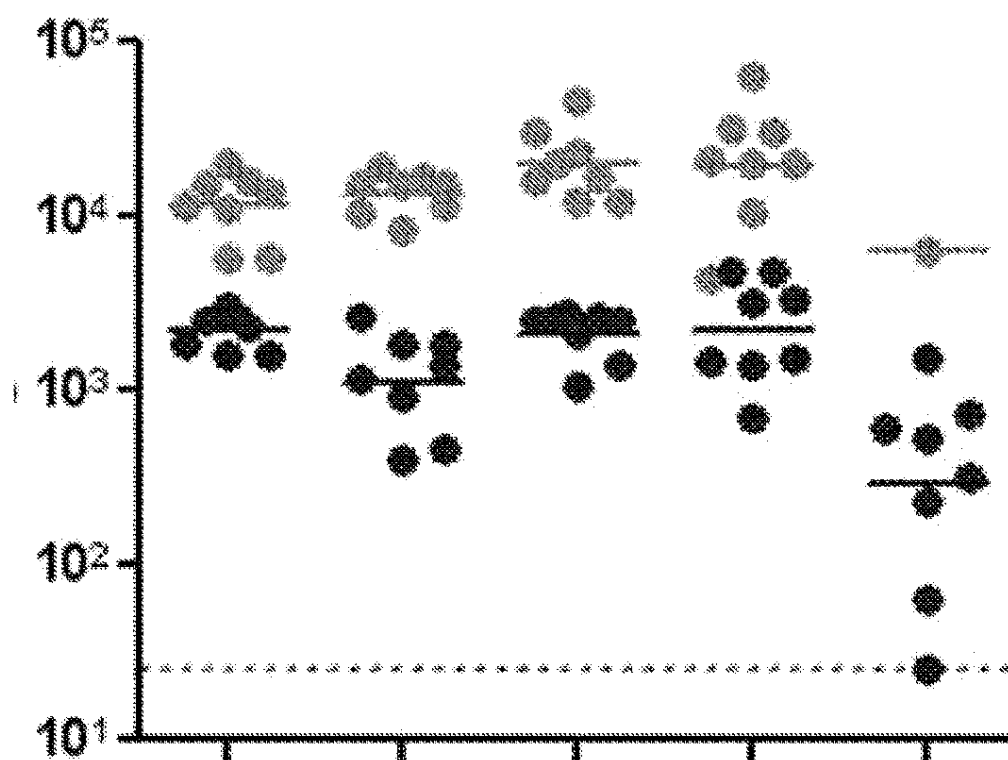


FIGURA 18

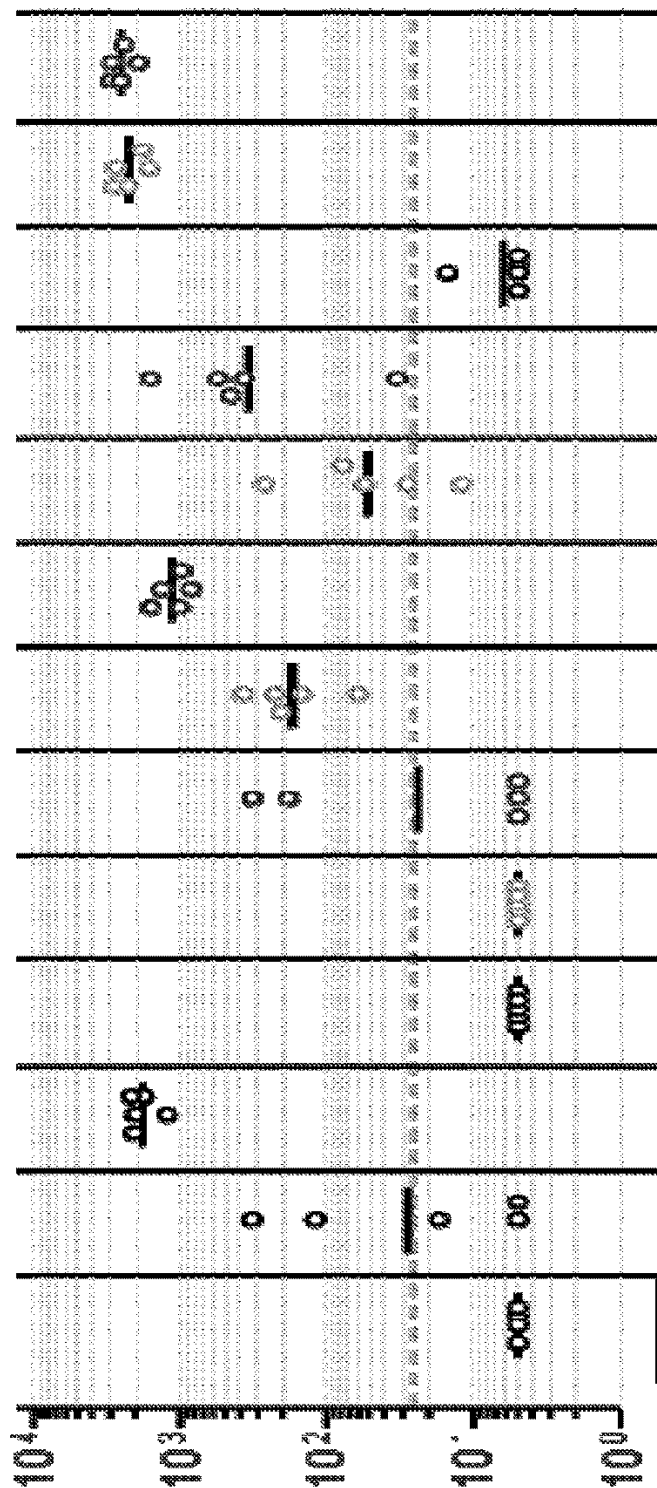


FIGURA 19

FIGURA 19A

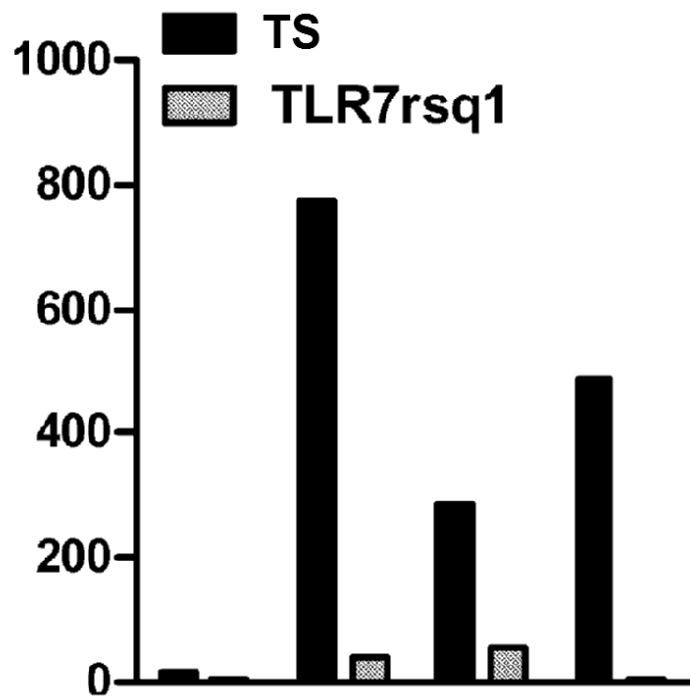


FIGURA 19B

