

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 580**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011** E 11736497 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** EP 2591114

54 Título: **Inmunización de mamíferos grandes con dosis bajas de ARN**

30 Prioridad:

**06.07.2010 US 361794 P**

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

**17.10.2016**

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 2 586 580 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

Inmunización de mamíferos grandes con dosis bajas de ARN

**Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de la liberación no vírica de ARN para inmunización.

5 **Antecedentes de la técnica**

La liberación de ácidos nucleicos para la inmunización de animales ha sido una meta durante varios años. Se han ensayado diversos enfoques, incluyendo el uso de ADN o ARN, de vehículos de liberación víricos o no víricos (o incluso sin vehículo de liberación, en una vacuna “desnuda”), de vectores replicantes o no replicantes, o de vectores víricos o no víricos.

- 10 Se han liberado diversas dosis diferentes de ácidos nucleicos en estudios previos *in vivo*. La referencia 1 ha liberado 50 µg de lipoplexos de ARNm o ADN en ratones, pero también ha usado dosis intralinguales de 1 µg y 10 µg para analizar la expresión de la luciferasa en el tejido de la lengua. La referencia 2 ha liberado 12 µg de ARNm que codifica una nucleoproteína del virus de la gripe en ratones. La referencia 3 ha liberado 0,1 µg, 1 µg o 10 µg de ARN auto-replicante que codifica β-galactosidasa en ratones. La referencia 4 ha liberado 10 µg de ARN auto-replicante
- 15 que codifica una glucoproteína del virus de la rabia en ratones. La referencia 5 ha liberado un total de 2 µg o 4 µg de ADN que codifica la hemaglutinina de la gripe en humanos, pero no ha liberado ARN. Fleeton y col. (Journal of Infectious Diseases, vol. 183, n.º 9, 2001, páginas 1395-1398) ha liberado 10 µg de ARN auto-replicante en ratones. El documento WO 02/061113 ha liberado 0,1 µg, 1 µg o 10 µg de ARN auto-replicante en ratones. Leitner y col. (Vaccine, vol. 18, 1999, páginas 765-777) informa de datos en los que se ha liberado 0,1 µg de ARN auto-replicante
- 20 en ratones. Chambers y col. (Clinical Infectious Diseases, vol. 30, Suplemento 3, 2000, páginas S283-S287) ha liberado 100 µg de ADN en ratones o 1 mg de ADN en ganado. Vassilev y col. (Vaccine, vol. 19, n.º 15-16, 2001, páginas 2012-2019) ha liberado 0,6 µg de ARN infeccioso a terneros u ovejas.

- La experiencia con las vacunas de ADN se ha fomentado en trabajos anteriores con animales pequeños (por ejemplo, ratones) pero a medida que la tecnología se trasladó a animales grandes (por ejemplo, seres humanos) se hizo evidente que se reducía la potencia. Por consiguiente se necesitarían dosis muy altas (por ejemplo, miligramos mejor que microgramos), pero el ADN de grado clínico es caro de fabricar.
- 25

Persiste una necesidad de vacunas de ácidos nucleicos adicionales y mejoradas.

**Divulgación de la invención**

- 30 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se libera ARN que codifica un inmunógeno en un mamífero grande a una dosis de entre 2 µg y 100 µg como se define en las reivindicaciones. Como se muestra a continuación, una dosis de 66 µg es inmunogénica en terneros. Una vaca adulta tiene un peso corporal ~ 10x el de un adulto humano y así el inventor ha mostrado que una dosis en seres humanos de ARN de 5-10 µg es realista.

- 35 Como se muestra a continuación, una dosis de ~ 0,94 µg/kg es inmunogénica en el ganado. Los estudios de la técnica anteriores han usado de 100 ng a 10 µg de ARN en ratones que, con un peso corporal de ~ 20 g, es de 5 µg/kg a 500 µg/kg.

- Por consiguiente la invención proporciona un ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno para su uso en un procedimiento *in vivo* de aumento de una respuesta inmunitaria en un mamífero grande mediante la liberación no vírica de dicho ARN, en la que el procedimiento comprende la administración de entre 2 µg y 100 µg de ARN al mamífero, en el que el mamífero grande es un ser humano, caballo, ganado, o cerdo y el ARN se administra en combinación con un sistema de liberación que comprende: (i) liposomas; (ii) micropartículas de un polímero no tóxico y biodegradable; y/o (iii) una emulsión de aceite en agua submicrométrica catiónica.
- 40

- La invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de inmunización de un ser humano, caballo, ganado, o cerdo frente a una enfermedad, que comprende entre 2 µg y 100 µg de ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno para la liberación no vírica por unidad de dosis y un sistema de liberación que comprende: (i) liposomas; (ii) micropartículas de un polímero no tóxico y biodegradable; y/o (iii) una emulsión de aceite en agua submicrométrica catiónica. En un volumen de dosificación normal de 0,5 ml la concentración del ARN que codifica un inmunógeno será por lo tanto de entre 4 µg/ml y 200 µg/ml.
- 45

- Puede usarse un dispositivo de liberación (*por ejemplo*, una jeringa, nebulizador, pulverizador, inhalador, parche dérmico, *etc.*) que contiene la composición farmacéutica para su administración a un mamífero grande, en el que la composición en el dispositivo contiene entre 2 µg y 100 µg de ARN que codifica un inmunógeno.
- 50

Puede usarse un recipiente herméticamente sellado que contenga la composición farmacéutica para la administración a un mamífero grande, en el que la composición en el recipiente contiene entre 2 µg y 100 µg de ARN

que codifica un inmunógeno.

### **Administración**

La invención implica la administración de ARN a un mamífero grande, como se define en las reivindicaciones. El lugar de administración normalmente será el tejido muscular, tal como el músculo esquelético. Las alternativas a la administración intramuscular incluyen, pero sin limitación: la administración intradérmica, intranasal, intraocular, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intersticial, bucal, transdérmica, o sublingual. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas.

La administración puede lograrse de diversas maneras. Por ejemplo, puede usarse una inyección mediante una aguja (*por ejemplo*, una aguja hipodérmica), particularmente para la administración intramuscular, subcutánea, intraocular, intraperitoneal o intravenosa. Puede usarse como una alternativa la inyección sin aguja.

La inyección intramuscular es la vía preferida de administración de ARN de acuerdo con la invención. Es típica la inyección en la parte superior del brazo, el músculo deltoides o del muslo (*por ejemplo*, muslo anterolateral).

El lugar de administración puede incluir tanto células inmunitarias (tales como macrófagos, *por ejemplo*, macrófagos derivados de la médula ósea), células dendríticas (*por ejemplo*, células dendríticas plasmocitoides derivadas de la médula ósea y/o células dendríticas mieloides derivadas de la médula ósea), monocitos (*por ejemplo*, monocitos de sangre periférica de seres humanos), *etc.*) y células no inmunitarias (tales como células musculares, que pueden ser multinucleadas y pueden disponerse en fascículos, y/o fibroblastos). Las células inmunitarias pueden estar presentes en el momento de la administración, pero normalmente infiltrarán el lugar después de la administración. *Por ejemplo*, el daño tisular causado por una administración invasiva (*por ejemplo*, causado por una aguja en el lugar de administración) puede producir que las células inmunitarias infiltren el área dañada.

El ARN entra en el citoplasma de las células inmunitarias y/o las células no inmunitarias. La entrada puede ser mediante endocitosis. Dentro de los endosomas de las células inmunitarias el ARN puede unirse al TLR7 (ARNcs), TLR8 (ARNcs) o TLR3 (ARNcd), desencadenando de este modo rutas inmunitarias innatas. Cuando el ARN se escapa de los endosomas en el citoplasma de las células inmunitarias y no inmunitarias puede unirse a las ARN helicinas (*por ejemplo*, en la familia del receptor de tipo RIG I es decir los RLR) tales como RIG-I (RLR-1), MDA5 (RLR-2) y/o LGP2 (RLR-3), desencadenando también rutas inmunitarias innatas. El ARN también puede traducirse en las células inmunitarias y/o no inmunitarias, conduciendo a la expresión del inmunógeno, y en última instancia a la presentación del inmunógeno expresado mediante el sistema CMH. Las células también pueden secretar interferones de tipo I y/o citoquinas pro-inflamatorias para proporcionar un efecto adyuvante local.

Para aumentar tanto la entrada en las células inmunitarias y no inmunitarias como también los efectos intercelulares posteriores, y también para reducir la cantidad de ARN requerida para un buen efecto inmunogénico, el ARN se administra en combinación con un sistema de liberación que comprende: (i) liposomas (ii) micropartículas de un polímero no tóxico y biodegradable (iii) emulsiones de aceite en agua catiónicas submicrométricas. Los liposomas son un sistema de liberación preferido.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, el ARN que codifica un inmunógeno se libera a un mamífero grande a una dosis de entre 2 µg y 100 µg, como se define en las reivindicaciones. *Por ejemplo*, la dosis puede ser entre 5 µg y 75 µg, entre 6 µg y 50 µg, entre 7 µg y 25 µg, entre 8 µg y 20 µg, o entre 9 µg y 15 µg.

Las dosis específicas pueden ser 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 11 µg, 12 µg, 13 µg, 14 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg, o 100 µg. Una dosis para un ser humano puede ser 5-10 µg.

### Liposomas

Diversos lípidos anfífilos pueden formar bicapas en un medio acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN como liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza hidrófilo aniónico, catiónico o zwitteriónico. La formación de liposomas de fosfolípidos aniónicos existe desde la década de los 60 del siglo XX, y los lípidos que forman liposomas catiónicos se han estudiado desde de la década de los 90 del siglo XX. Algunos fosfolípidos son aniónicos mientras que otros son zwitteriónicos y otros son catiónicos. Las clases adecuadas de fosfolípidos incluyen, pero sin limitación, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, y fosfatidilgliceroles, y algunos fosfolípidos útiles se indican en la Tabla 1. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero sin limitación, dioleoil trimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DEDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los lípidos zwitteriónicos incluyen, pero sin limitación, lípidos acil zwitteriónicos y lípidos éter zwitteriónicos. Los ejemplos de lípidos zwitteriónicos útiles son DPFC, DOFC y dodecilsfosfocolina. Los lípidos pueden ser saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido insaturado para la preparación de liposomas. Si un lípido insaturado tiene dos colas, ambas colas pueden ser insaturadas, o puede tener una cola saturada y una cola insaturada.

- Los liposomas pueden formarse a partir de un único lípido o a partir de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos (ii) una mezcla de lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos zwitteriónicos (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos zwitteriónicos (vi) una mezcla de lípidos zwitteriónicos y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos zwitteriónicos. De manera similar, una mezcla puede comprender tanto lípidos saturados como insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DEFC (zwitteriónico, saturado), DlinDMA (catiónico, insaturado), y/o DMG (aniónico, saturado). Cuando se usa una mezcla de lípidos, no todos los componentes lipídicos en la mezcla necesitan ser anfífilos, por ejemplo, uno o más lípidos anfífilos pueden mezclarse con colesterol.
- 5 La parte hidrófila de un lípido puede estar pegilada (*es decir*, modificada mediante unión covalente de un polietilenglicol). Esta modificación puede aumentar la estabilidad y prevenir la adsorción no específica de los liposomas. Por ejemplo, los lípidos pueden conjugarse con PEG usando técnicas tales como las desveladas en la referencia 6 y 7. Pueden usarse diversas longitudes de PEG, por ejemplo entre 0,5-8 kDa.

Se usa una mezcla de DEFC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol en los ejemplos.

- 15 Los liposomas normalmente se dividen en tres grupos: vesículas multilamelares (VML); vesículas unilamelares pequeñas (VUP); y vesículas unilamelares grandes (VUG). Las VML tienen múltiples bicapas en cada vesícula, formando varios compartimentos acuosos independientes. Las VUP y VUG tienen una única bicapa que encapsula un núcleo acuoso; las VUP normalmente tienen un diámetro  $\leq 50$  nm, y las VUG tienen un diámetro  $> 50$  nm. Los liposomas útiles de la invención son idealmente las VUP con un diámetro en el intervalo de 50-220 nm. Para una composición que comprende una población de VUP con diferentes diámetros: (i) al menos el 80 % en número debería tener diámetros en el intervalo de 20-220 nm, (ii) el diámetro medio (promedio Z, por intensidad) de la población está idealmente en el intervalo de 40-200 nm, y/o (iii) los diámetros deberían tener un índice de polidispersidad  $< 0,2$ . Se espera que los complejos liposoma/ARN de la referencia 1 tengan un diámetro en el intervalo de 600-800 nm y que tengan una alta polidispersidad.
- 20 Las técnicas para la preparación de liposomas adecuados se conocen bien en la técnica, *por ejemplo*, véanse las referencias 8 a 10. Se describe un procedimiento útil en la referencia 11 e implica mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) un tapón, seguido de un mezclado, equilibrado, dilución y purificación. Los liposomas preferidos de la invención son obtenibles mediante este procedimiento de mezclado.
- 25 El ARN preferentemente se encapsula en los liposomas, y de esta manera los liposomas forman una capa externa alrededor de un núcleo acuoso que contiene el ARN. Se ha encontrado que esta encapsulación protege al ARN de la digestión de la ARNasa. Los liposomas pueden incluir algún ARN externo (*por ejemplo*, en la superficie de los liposomas), pero al menos la mitad del ARN (e idealmente todo él) está encapsulado.

#### Micropartículas poliméricas

- 35 Diversos polímeros pueden formar micropartículas para encapsular o adsorber el ARN. El uso de un polímero esencialmente no tóxico significa que un receptor puede recibir de manera segura las partículas, y el uso de un polímero biodegradable significa que las partículas pueden metabolizarse después de la liberación para evitar la permanencia a largo plazo. Los polímeros útiles también son esterilizables, para ayudar a la preparación de formulaciones de grado farmacéutico.
- 40 Los polímeros no tóxicos y biodegradables adecuados incluyen, pero sin limitación, poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), ácidos polihidroxi butíricos, polilactonas (incluyendo policaprolactonas), polidioxanonas, polivalerolactona, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, policarbonatos derivados de tirosina, polivinil-pirrolidionas o poliéster-amidas y combinaciones de los mismos.
- 45 En algunas realizaciones, las micropartículas se forman a partir de poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), tales como unas poli(lactidas) ("PLA"), copolímeros de lactida y glicolida tales como una poli(D,L-lactida-co-glicolida) ("PLG"), y copolímeros de D,L-lactida y caprolactona. Los polímeros de PLG útiles incluyen los que tienen una relación molar lactida/glicolida que varía, por ejemplo, de 20:80 a 80:20, *por ejemplo*, 25:75, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 75:25. Los polímeros de PLG útiles incluyen los que tienen un peso molecular entre, por ejemplo, 5.000-200.000 Da, por ejemplo, entre 10.000-100.000, 20.000-70.000, 30.000-40.000, 40.000-50.000 Da.
- 50 Las micropartículas idealmente tienen un diámetro en el intervalo de 0,02  $\mu\text{m}$  a 8  $\mu\text{m}$ . Para una composición que comprende una población de micropartículas con diferentes diámetros al menos el 80 % en número deberían tener diámetros en el intervalo de 0,03-7  $\mu\text{m}$ .

- Las técnicas para la preparación de micropartículas adecuadas se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véanse las referencias 10,12 (en particular el capítulo 7) y 13. Para facilitar la adsorción de ARN, una micropartícula puede incluir, por ejemplo, un tensioactivo y/o lípido catiónico como se desvela en las referencias 14 & 15. Una vía alternativa de fabricación de micropartículas poliméricas es, por ejemplo, moldeando y curando como se desvela en la referencia 16.
- 55

Las micropartículas de la invención pueden tener un potencial zeta de entre 40-100 mV.

Una ventaja de las micropartículas sobre los liposomas es que se liofilizan fácilmente para un almacenamiento estable.

5 El ARN puede adsorberse a las micropartículas, y la adsorción se facilita incluyendo materiales catiónicos (por ejemplo, lípidos catiónicos) en la micropartícula.

#### Emulsiones de aceite en agua catiónicas

10 Las emulsiones de aceite en agua catiónicas se conocen por ser adyuvantes de las vacunas de la gripe por ejemplo, el adyuvante MF59™ en el producto FLUAD™, y el adyuvante AS03 en el producto PEPANDRIX™. La liberación del ARN de acuerdo con la presente invención puede utilizar una emulsión de aceite en agua, siempre que la emulsión incluya una o más moléculas catiónicas. Por ejemplo, un lípido catiónico puede incluirse en la emulsión para proporcionar una superficie de la gota positiva a la que puede unirse el ARN cargado negativamente.

15 La emulsión comprende uno o más aceites. El/los aceite(s) adecuado(s) incluye(n) el/los de, por ejemplo, una fuente animal (por ejemplo, tal como el pescado) o una vegetal. El aceite es idealmente biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las fuentes para aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. Son ejemplos de aceites de frutos secos, el aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más disponibles comúnmente. El aceite de jojoba puede usarse, por ejemplo, obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. 20 Los ésteres con ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, mientras que no se produzcan de manera natural en los aceites de semillas, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados comenzando a partir de los aceites de frutos secos y semillas. Las grasas y aceites de la leche de los mamíferos se metabolizan y de este modo pueden usarse. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para la obtención de aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. 25

30 La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y aceite de ballena tal como el esperma de ballena son ejemplos de diversos aceites de pescado que pueden usarse en el presente documento. Una cantidad de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y generalmente se denominan como terpenoides. Las emulsiones preferidas comprenden escualeno, un aceite de hígado de tiburón que es un terpenoide ramificado insaturado ( $C_{30}H_{50}$ ;  $[(CH_3)_2C(=CHCH_2CH_2C(CH_3)_2=CHCH_2-)]_2$ ; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; NR CAS 7683-64-9). También puede usarse el escualano, el análogo saturado del escualeno. Los aceites de pescado, incluyendo el escualeno y el escualano están disponibles fácilmente de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

35 Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando la fase de aceite de una emulsión incluye un tocoferol, puede usarse cualquiera de los tocoferoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  o  $\xi$ , pero se prefieren los  $\alpha$ -tocóferoles. Pueden usarse tanto D- $\alpha$ -tocóferol como DL- $\alpha$ -tocóferol. Un  $\alpha$ -tocóferol preferido es el DL- $\alpha$ -tocóferol. Puede usarse una combinación de aceites que comprenda escualeno y un tocoferol (por ejemplo DL- $\alpha$ -tocóferol).

40 El aceite en la emulsión puede comprender una combinación de aceites, por ejemplo, escualeno y al menos un aceite adicional.

45 El componente acuoso de la emulsión puede ser agua pura (por ejemplo, agua para inyección) o pueden incluir componentes adicionales, por ejemplo, solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, *por ejemplo*, sales de citrato o fosfato, tales como sales de sodio. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón de histidina; o un tampón citrato. Se prefiere una fase acuosa tamponada, y tampones que normalmente se incluirán en el intervalo de 5-20 mM.

50 La emulsión también incluye un lípido catiónico. Preferentemente este lípido es un tensioactivo de manera que pueda facilitar la formación y estabilización de la emulsión. Los lípidos catiónicos útiles generalmente contienen un átomo de nitrógeno que está cargado positivamente a condiciones fisiológicas, por ejemplo, como una amina terciaria o cuaternaria. Este nitrógeno puede estar en el grupo de la cabeza hidrófila de un tensioactivo anfifílico. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero sin limitación: 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3'-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol (DC Colesterol), dimetildioctadecilamonio (DDA, por ejemplo, bromuro), 1,2-dimiristoil-3-trimetil-amoniopropano (DMTAP), dipalmitoil(C16:0)trimetil amonio propano (DPTAP), diestearoiltrimetilamonio propano (DETAP). Otros lípidos catiónicos útiles son: cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio, cetramida (que contiene bromuro de tetradeciltrimetilamonio y posiblemente pequeñas cantidades de bromuro de dedeciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cloruro de cetilpiridinio (CCP), cloruro de cetiltrimetilamonio (CCTA), N,N',N'-polioxietileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de alquil trimetil amonio mixto, cloruro de bencildimetilododecilamonio, 55

cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, metóxido de benciltrimetilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de dimetildiocadecil amonio (BDDA), cloruro de metilbencetonio, cloruro de decametonio, cloruro mixto de metilo y trialquil amonio, cloruro de metil triocetilamonio, cloruro de N,N-dimetil-N-[2-(2-metil-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxi]-etoxi)-etil]-bencenometanaminio (DEBDA), sales de dialquildimetilamonio, cloruro de [1-(2,3-dioleilo)-propil]-N,N,N-trimetilamonio, 1,2-diacil-3-(trimetilamonio)propano (grupo acilo = dimiristoil, dipalmitoil, diestearoil, dioleoil), 1,2-diacil-3(dimetilamonio)propano (grupo acilo = dimiristoil, dipalmitoil, diestearoil, dioleoil), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio)butanoil-sn-glicerol, éster de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol colina, butanoato de colesteryl(4'-trimetilamonio), sales de N-alquil piridinio (por ejemplo, bromuro de cetilpiridinio y cloruro de cetilpiridinio), sales de N-alquilpiperidinio, electrolitos bolaform dicatiónicos (C<sub>12</sub>Me<sub>6</sub>; C<sub>12</sub>Bu<sub>6</sub>), dialquiliglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L- $\alpha$ -dioleoil-fosfatidiletanolamina, éster de colina con hemisuccinato de colesterol, lipopoliaminas, incluyendo pero sin limitación dioctadecilamidoglicilespermina (DOGE), dipalmitoil fosfatidiletanol amidospermina (DPFEE), lipopoli-L (o D)-lisina (LPLL, LPDL), poli(L (o D)-lisina conjugada con N-glutarilfosfatidiletanolamina, éster de didodecil glutamato con un grupo amino colgante (C<sub>12</sub>GluPhCnN<sup>+</sup>), éster de ditetradecil glutamato con un grupo amino colgante (C<sub>12</sub>GluPhCnN<sup>+</sup>), derivados catiónicos de colesterol, incluyendo pero sin limitación sal de colesteryl-3- $\beta$ -oxisuccinamidaetiltrimetilamonio, colesteryl-3- $\beta$ -oxisuccinamidoetileno-dimetilamina, sal de colesteryl-3- $\beta$ -carboxiamidoetileno-trimetilamonio y colesteryl-3- $\beta$ -carboxiamidoetileno-dimetilamina. Se describen otros lípidos catiónicos útiles en las referencias 17 y 18.

El lípido catiónico es preferentemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible.

Además del aceite y el lípido catiónico, una emulsión puede incluir un tensioactivo no iónico y/o un tensioactivo zwitteriónico. Dichos tensioactivos incluyen, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de sorbitán polioxietileno (comúnmente denominados como los Tweens), especialmente el polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) y/u óxido de butileno (OB), vendidos con el nombre comercial DOWFAX™, tales como los copolímeros en bloque de OE/OP lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de repetición de los grupos etoxi (oxi-1,2-etanodil), con octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) siendo de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos polioxietileno derivados de alcoholes laurílicos, cetílicos, estearílicos y oleílicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); polioxietileno-9-lauril éter; y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los Spans), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos preferidos para incluirlos en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de sorbitán polioxietileno), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Pueden incluirse las mezclas de estos tensioactivos en la emulsión, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85, o mezclas de Tween 80/Triton X-100. También es adecuada una combinación de un éster de sorbitán polioxietileno tal como monooleato de sorbitán polioxietileno (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 plus un éster de sorbitán polioxietileno y/o un octoxinol. Las mezclas útiles pueden comprender un tensioactivo con un valor EHL en el intervalo de 10-20 (por ejemplo, polisorbato 80, con un EHL de 15,0) y un tensioactivo con un valor EHL en el intervalo de 1-10 (por ejemplo, trioleato de sorbitán, con un EHL de 1,8).

Las cantidades preferidas de aceite (% en volumen) en la emulsión final están entre 2-20 %, *por ejemplo*, 5-15 %, 6-14 %, 7-13 %, 8-12 %. Es particularmente útil un contenido de escualeno de aproximadamente 4-6 % o aproximadamente 9-11 %.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) en la emulsión final están entre 0,001 % y 8 %. Por ejemplo: de 0,2 a 4 % de ésteres de sorbitán polioxietileno (tales como polisorbato 80), en particular entre 0,4-0,6 %, entre 0,45-0,55 %, aproximadamente 0,5 % o entre 1,5-2 %, entre 1,8-2,2 %, entre 1,9-2,1 %, aproximadamente 2 %, o 0,85-0,95 %, o aproximadamente 1 %; de 0,02 a 2 % de ésteres de sorbitán (tales como trioleato de sorbitán), en particular aproximadamente 0,5 % o aproximadamente 1 %; de 0,001 a 0,1 % de octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100), en particular de 0,005 a 0,02 %; de 0,1 a 8 % de éteres de polioxietileno (tales como laureth 9), preferentemente de 0,1 a 10 % y en particular de 0,1 a 1 % o aproximadamente 0,5 %.

Las cantidades absolutas de aceite y tensioactivo, y su relación, pueden variarse dentro de amplios límites, mientras que todavía formen una emulsión. Un experto puede variar fácilmente las proporciones relativas de los componentes para obtener una emulsión deseada, pero es típica una relación en peso de entre 4:1 y 5:1 para aceite y tensioactivo (exceso de aceite).

Un parámetro importante para garantizar la actividad inmunoestimulante de una emulsión, en particular en animales grandes, es el tamaño de las gotas de aceite (diámetro). Las emulsiones más eficaces tienen un tamaño de las gotas en el intervalo submicrométrico. Los tamaños de las gotas adecuados estarán el intervalo de 50-750 nm. Más útilmente el tamaño medio de las gotas es de menos de 250 nm, por ejemplo, de menos de 200 nm, de menos de 150 nm. El tamaño medio de las gotas de manera útil está en el intervalo de 80-180 nm. De manera ideal, al menos el 80 % (en número) de las gotas de aceite de la emulsión son de menos de 250 nm en diámetro, y preferentemente al menos el 90 %. Están disponibles en el mercado aparatos para la determinación del tamaño medio de las gotas en una emulsión, y la distribución de tamaños. Estos usan típicamente las técnicas de dispersión dinámica de luz y/o

sensores ópticos de partículas individuales, *por ejemplo*, las series de instrumentos Accusizer™ y Nicomp™ disponibles de Particle Sizing Systems (Santa Bárbara, Estados Unidos), o los instrumentos Zetasizer™ de Malvern Instruments (Reino Unido), o los instrumentos Particle Size Distribution Analyzer de Horiba (Kyoto, Japón).

5 De manera ideal, la distribución de los tamaños de las gotas (en número) tiene solo un máximo, *es decir*, existe una única población de gotas distribuidas alrededor de una media (moda), en lugar de tener dos máximos. Las emulsiones preferidas tienen una polidispersidad de < 0,4 *por ejemplo*, 0,3, 0,2, o menos.

10 Pueden obtenerse las emulsiones adecuadas con gotas submicrométricas y una distribución de tamaños estrecha mediante el uso de la microfluidización. Esta técnica reduce el tamaño medio de las gotas de aceite mediante la propulsión de corrientes de los componentes de entrada a través de canales fijados geoméricamente a alta presión y alta velocidad. Estas corrientes se ponen contacto con las paredes del canal, las paredes de la cámara y entre sí. Los resultados de las fuerzas de cizalla, impacto y cavitación provocan una reducción en el tamaño de las gotas. Pueden realizarse etapas repetidas de microfluidización hasta que se alcance una emulsión con una media y distribución de tamaños de las gotas deseados.

15 Como alternativa a la microfluidización, pueden usarse procedimientos térmicos para provocar la inversión de fase, como se desvela en la referencia 19. Estos procedimientos también pueden proporcionar una emulsión submicrométrica con una distribución de tamaño de las partículas estrecha.

Las emulsiones preferidas pueden esterilizarse por filtración, *es decir*, sus gotas pueden pasar a través de un filtro de 220 nm. Además de proporcionar una esterilización, este procedimiento también retira cualquiera de las gotas grandes en la emulsión.

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

50 En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es DC Colesterol. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender DC Colesterol a de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de DC Colesterol. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender DC Colesterol de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,62 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2,46 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,92 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2,46 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0,1

mg/ml a aproximadamente 0,62 mg/ml, aproximadamente 0,15 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,62 mg/ml, aproximadamente 0,9 mg/ml, aproximadamente 1,2 mg/ml, aproximadamente 2,46 mg/ml, aproximadamente 4,92 mg/ml, etc. En una realización ejemplar, la emulsión de aceite en agua catiónica comprende de aproximadamente 0,62 mg/ml a aproximadamente 4,92 mg/ml de DC Colesterol, tal como 2,46 mg/ml.

En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es DDA. La emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de DDA. Por ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender DDA a de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,45 mg/ml, de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,73 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0,9 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1,2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1,45 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 1,2 mg/ml, aproximadamente 1,45 mg/ml, etc. Alternativamente, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender DDA a aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 21,5 mg/ml, aproximadamente 21,6 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml. En una realización ejemplar, la emulsión de aceite en agua catiónica comprende de aproximadamente 0,73 mg/ml a aproximadamente 1,45 mg/ml de DDA, tal como 1,45 mg/ml.

Ciertas composiciones preferidas de la invención para la administración a un paciente comprenden escualeno, span 85, polisorbato 80 y DOTAP. Por ejemplo: el escualeno puede estar presente a 5-15 mg/ml; el span 85 puede estar presente a 0,5-2 mg/ml; el polisorbato 80 puede estar presente a 0,5-2 mg/ml; y el DOTAP puede estar presente a 0,1-10 mg/ml. La emulsión puede incluir la misma cantidad (en volumen) de span 85 y polisorbato 80. La emulsión puede incluir más escualeno que tensioactivo. La emulsión puede incluir más escualeno que DOTAP.

### **EI ARN**

La invención implica la liberación *in vivo* de ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno. El ARN puede desencadenar rutas de inmunidad innata y también traducirse, conduciendo a la expresión del inmunógeno.

El ARN es de cadena +, y de esta manera puede traducirse sin necesidad de que intervenga ninguna de las etapas de replicación tales como la transcripción inversa.

La molécula de ARN auto-replicante (replicón) puede, cuando se libera a una célula de un mamífero incluso sin ninguna proteína, conducir a la producción de múltiples ARN hijos mediante transcripción de sí mismo (mediante una copia antisentido que genera de sí misma). Una molécula de ARN auto-replicante es por lo tanto normalmente una molécula de cadena + que puede traducirse directamente tras la liberación a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que después produce tanto transcripciones antisentido como en sentido del ARN liberado. Por lo tanto el ARN liberado conduce a la producción de múltiples ARN hijos. Estos ARN hijos, así como los transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse por sí mismos para proporcionar *in situ* la expresión de un inmunógeno codificado, o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN liberado que se traducen para proporcionar *in situ* la expresión del inmunógeno. El resultado global de esta secuencia de transcripción es una gran amplificación en el número de los replicones de ARN introducidos y de esta manera el inmunógeno codificado se convierte en un producto polipéptido principal de las células.

Un sistema adecuado para lograr la auto-replicación es usar un replicón de ARN de un alfavirus. Estos replicones de cadena + se traducen después de la liberación en una célula para proporcionar una replicasa (o una replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se auto-adhiere para proporcionar un complejo de replicación que crea copias genómicas de cadena - del ARN liberado de cadena +. Estos transcritos de cadena - pueden transcribirse por ellos mismos para proporcionar copias adicionales del ARN padre de cadena + y también proporcionar un transcrito subgenómico que codifica el inmunógeno. La traducción del transcrito subgenómico por consiguiente conduce a la expresión *in situ* del inmunógeno por la célula infectada. Los replicones adecuados del alfavirus pueden usar una replicasa de un virus sindbis, un virus del bosque semliki, un virus de la encefalitis equina del este, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc. Pueden usarse secuencias de virus mutantes o de tipo salvaje, por ejemplo, se ha usado el mutante atenuado TC83 del VEEV en replicones [20].



Una molécula de ARN auto-replicante preferida de este modo codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN auto-replicante y (ii) un inmunógeno. La polimerasa puede ser una replicasa de un alfavirus, por ejemplo, que comprenda una o más proteínas nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 de alfavirus. Considerando que los genomas naturales del alfavirus codifican las proteínas estructurales del virión además de la poliproteína replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN auto-replicante de la invención no codifique las proteínas estructurales del alfavirus. Por consiguiente el ARN auto-replicante preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómicas de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contengan ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo salvaje, la molécula de ARN auto-replicante no puede perpetuarse por sí misma en la forma infecciosa. Las proteínas estructurales del alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus de tipo salvaje están ausentes de los ARN auto-replicantes de la invención y su lugar está ocupado por gen(es) que codifica(n) el inmunógeno de interés, de modo que el transcrito subgenómico codifica el inmunógeno en lugar de las proteínas estructurales del virión de alfavirus.

Por consiguiente una molécula de ARN auto-replicante útil con la invención puede tener dos marcos de lectura abierta. El primer marco de lectura abierta (5') codifica una replicasa; el segundo marco de lectura abierta (3') codifica un inmunógeno. En algunas realizaciones el ARN puede tener marcos de lectura abierta adicionales (por ejemplo, aguas abajo), por ejemplo, para codificar inmunógenos adicionales (véase a continuación) o para codificar polipéptidos accesorios.

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

Las moléculas de ARN auto-replicantes pueden tener diversas longitudes pero son normalmente de 5000-25000 nucleótidos de largo *por ejemplo*, 8000-15000 nucleótidos, o 9000-12000 nucleótidos. Por consiguiente el ARN es más largo que el observado en la liberación de ARNpi.

Una molécula de ARN útil con la invención puede tener una caperuza 5' (*por ejemplo*, una 7-metilguanosina). Este extremo 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 en 5'. En un ARN con caperuza este puede unirse a una 7-metilguanosina mediante un puente 5'-5'. Un trifosfato en 5' puede mejorar la unión a RIG-I.

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

Una molécula de ARN útil con la invención normalmente será de cadena simple. Los ARN de cadena simple en general, pueden iniciar un efecto adyuvante uniéndose al TLR7, TLR8, ARN helicasas y/o PKR. El ARN liberado en forma de cadena doble (ARNcd) puede unirse al TLR3, y este receptor también puede activarse por el ARNdc que se forma o bien durante la replicación de un ARN de cadena simple o dentro de la estructura secundaria de un ARN de cadena simple.

Una molécula de ARN útil con la invención pueden prepararse de manera conveniente mediante transcripción *in vitro* (TIV). La TIV puede usar un molde (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias, o creados sintéticamente (por ejemplo, por procedimientos de ingeniería de síntesis de genes y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como las ARN polimerasas de los bacteriófagos T7, T3 o SP6) puede usarse para transcribir el ARN a partir de un molde de ADN. Las reacciones apropiadas de formación de la caperuza y adición de la poli A pueden usarse según sea necesario (aunque la poli A del replicón generalmente está codificada en el molde de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener requisitos estrictos para el/los nucleótido(s) 5' transcrito(s) y en algunas realizaciones estos requisitos deben coincidir con los requisitos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito por TIV pueda funcionar eficazmente como sustrato para su replicasa auto-codificada.

Como se ha discutido en la referencia 21, el ARN auto-replicante puede incluir (además de cualquier estructura con caperuza 5') uno o más nucleótidos que tienen una nucleobase modificada. Por consiguiente el ARN puede comprender m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina); m2A (2-metiladenosina); Am (2'-O-metiladenosina); ms2m6A (2-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-treonil carbamoiladenosina); ms2t6A (2-metil-2'-O-metiladenosina); hn6A (N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); 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)); iW (wibutosina); o2iW (peroxiwibutosina); OHiW (hidroxiwibutosina); OHiW\*

(hidroxiwibutosina submodificada); imG (wiosina); mimG (metilguanosa); Q (queosina); oQ (epoxiqueosina); galQ (galtactosil queosina); manQ (manosil queosina); preQo (7-ciano-7-deazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-deazaguanosina); G\* (arqueosina); D (diidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp3U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho5U (5-hidroxiuridina); mo5U (5-metoxiuridina); cmo5U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo5U (éster metílico del ácido uridina-5-oxiacético); chm5U (5-(carboxi hidroximetil) uridina)); mchm5U (éster metílico de la 5-(carboxihidroximetil) uridina)); mcm5U (5-metoxicarbonil metiluridina); mcm5Um (S-metoxicarbonilmetil-2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxicarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm5U (5-metilaminometiluridina); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetil uridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina); cnmm5Um (5-carboximetilaminometil-2-L-O-metiluridina); cmnm5s2U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m62A (N6,N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitidina); m4Cm (N4,2-O-dimetilcitidina); hm5C (5-hidroximetilcitidina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carboximetiluridina); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosina); rm62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosa); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosa); m3Um (3,2T-O-dimetiluridina); m5D (5-metildiidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosa); m'Am (1,2-O-dimetil adenosina) irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina)); imG-14 (4-desmetil guanosa); imG2 (isoguanosa); o ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxoadenina, derivados 7-sustituidos de los mismos, diidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C1C6)-alquiluracilo, 5-metiluracilo, 5-(C2-C6)-alqueniluracilo, 5-(C2-C6)-alquiniluracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(C1-C6)-alquilitosina, 5-metilcitosina, 5-(C2-C6)-alquenilcitosina, 5-(C2-C6)-alquinilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 7-deazaguanina, 8-azaguanina, 7-deaza-7-guanina sustituida, 7-deaza-7-(C2-C6)alquinilguanina, 7-deaza-8-guanina sustituida, 8-hidroxi guanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-deazapurina sustituida, 7-deaza-7-purina sustituida, 7-deaza-8-purina sustituida, o un nucleótido abásico. Por ejemplo, un ARN auto-replicante puede incluir una o más nucleobases de pirimidina modificada, tales como residuos pseudouridina y/o 5-metilcitosina. En algunas realizaciones, sin embargo, el ARN incluye nucleobases no modificadas, y pueden incluir nucleótidos no modificados, *es decir*, todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos de A, C, G y U convencionales (excepto para cualquier estructura con caperuza 5', que puede incluir una 7'-metilguanosa). En otras realizaciones, el ARN puede incluir una caperuza 5' que comprende una 7'-metilguanosa, 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 de manera ideal incluye solo enlaces fosfodiéster entre los nucleósidos, pero en algunas realizaciones puede contener enlaces de fosforamidoato, fosforotioato y/o metilfosfonato.

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

### **El inmunógeno**

Las moléculas de ARN usadas con la invención codifican un inmunógeno polipéptido. Tras la administración del ARN el inmunógeno se traduce *in vivo* y puede provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria frente a una bacteria, un virus, un hongo o un parásito (o, en algunas realizaciones, frente a un alérgeno; y en otras realizaciones, frente a un antígeno tumoral). La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta con anticuerpos (incluyendo normalmente IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. El inmunógeno polipéptido normalmente provocará una respuesta inmunitaria que reconoce el correspondiente polipéptido bacteriano, vírico, fúngico o de un parásito (o alérgeno o tumor) pero en algunas realizaciones, el polipéptido puede actuar como un mimótopo para provocar una respuesta inmunitaria que reconoce un sacárido bacteriano, vírico, fúngico o de un parásito. El inmunógeno normalmente será un polipéptido de superficie, *por ejemplo*, una adhesina, una hemaglutinina, una glucoproteína de envoltura, una glucoproteína de la espícula, *etc.*

Las moléculas de ARN pueden codificar un único inmunógeno polipéptido o múltiples polipéptidos. Los inmunógenos múltiples pueden presentarse como un único inmunógeno polipéptido (polipéptido de fusión) o como polipéptidos separados. Si los inmunógenos se expresan como polipéptidos separados entonces uno o más de estos pueden proporcionarse con un IRES aguas arriba o un elemento promotor vírico adicional. De manera alternativa, los inmunógenos múltiples pueden expresarse a partir de una poliproteína que codifica inmunógenos individuales fusionados a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo, proteína 2A del virus de la enfermedad de pie y boca), o como inteínas.

A diferencia de las referencias 1 y 22, el ARN codifica un inmunógeno. Para evitar dudas, la invención no abarca un ARN que codifica una luciferasa de luciérnaga o que codifica una proteína de fusión de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* o que codifica una proteína verde fluorescente (PVF). Además, el ARN no es ARN completo de timo de ratón.

En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria frente a una de estas bacterias:

- Neisseria meningitidis*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, proteínas de membrana tales como adhesinas, autotransportadoras, toxinas, proteínas de adquisición de hierro y proteínas de unión al factor H. Se desvela una combinación de los tres polipéptidos útiles en la referencia 23.
- 5 *Streptococcus pneumoniae*: los inmunógenos polipéptidos útiles se desvelan en la referencia 24. Estos incluyen, pero sin limitación, la subunidad del pilus RrgB, el precursor de la beta-N-acetil-hexosaminidasa (spr0057), spr0096, proteína de estrés general GSP-781 (spr2021, SP2216), serina/treonina quinasa StkP (SP 1732), y la adhesina de superficie neumocócica PsaA.
- Streptococcus pyogenes*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en las referencias 25 y 26.
- 10 *Moraxella catarrhalis*.
- Bordetella pertussis*: los inmunógenos de pertussis útiles incluyen, pero sin limitación, toxina o toxoide de tos ferina (TTF), hemaglutinina filamentosa (HAF), pertactina y aglutinógenos 2 y 3.
- Staphylococcus aureus*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en la referencia 27, tales como hemolisina, esxA, esxB, proteína de unión a ferricromo (sta006) y/o la lipoproteína sta011.
- 15 *Clostridium tetani*: el inmunógeno típico es el toxoide de tétanos.
- Corynebacterium diphtheriae*: el inmunógeno típico es el toxoide de difteria.
- Haemophilus influenzae*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en las referencias 28 y 29.
- 20 *Pseudomonas aeruginosa*
- Streptococcus agalactiae*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en la referencia 25.
- Chlamydia trachomatis*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, OmpHlike, L7/L12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (*por ejemplo*, como se desvela en la referencia 30). El LcrE [31] y HtrA [32] son dos inmunógenos preferidos.
- 25 *Chlamydia pneumoniae*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en la referencia 33.
- Helicobacter pylori*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, CagA, VacA, NAP, y/o ureasa [34].
- Escherichia coli*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, inmunógenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa (ECEAg), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* patógena extraintestinal (ECPEX) y/o *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). Las cepas de ECPEX incluyen *E. coli* uropatógena (ECUP) y *E. coli* asociada a meningitis/sepsis (ECMN). Los inmunógenos polipéptidos de ECUP útiles se desvelan en las referencias 35 y 36. Los inmunógenos ECMN útiles se desvelan en la referencia 37. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es AcfD [38].
- 30 *Bacillus anthracis*
- Yersinia pestis*: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los desvelados en las referencias 39 y 40.
- Staphylococcus epidermis*
- Clostridium perfringens* o *Clostridium botulinums*
- Legionella pneumophila*
- 40 *Coxiella burnetii*
- Brucella*, tales como *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. pinnipediae*.
- Francisella*, tales como *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. tularensis*.
- Neisseria gonorrhoeae*
- Treponema pallidum*
- 45 *Haemophilus ducreyi*

*Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*

*Staphylococcus saprophyticus*

*Yersinia enterocolitica*

*Mycobacterium tuberculosis*

5 *Rickettsia*

*Listeria monocytogenes*

*Vibrio cholerae*

*Salmonella typhi*

*Borrelia burgdorferi*

10 *Porphyromonas gingivalis*

*Klebsiella*

En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria frente a uno de estos virus:

15 *Orthomyxovirus*: Los inmunógenos útiles pueden ser de un virus de la gripe A, B o C, tales como la hemaglutinina, neuraminidasa o proteínas de matriz M2. Cuando el inmunógeno es una hemaglutinina del virus de la gripe A puede ser de cualquier subtipo *por ejemplo*, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

*Virus Paramyxoviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de Pneumovirus (*por ejemplo*, el virus respiratorio sincitial, VRS), Rubulavirus (*por ejemplo*, virus de las paperas), Paramixovirus (*por ejemplo*, virus parainfluenza), Metapneumovirus y Morbilivirus (*por ejemplo*, virus del sarampión).

20 *Poxviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de *Orthopoxvirus* tales como *Variola vera*, incluyendo pero sin limitación, *Variola mayor* y *Variola menor*.

25 *Picornavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de Picornavirus, tales como Enterovirus, Rinovirus, Heparnavirus, Cardiovirus y Aptovirus. 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.

*Bunyavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un *Orthobunyavirus*, tal como el virus de la encefalitis de California, un *Phlebovirus*, 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*.

30 *Heparnavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Heparnavirus, tal como el virus de la hepatitis A (VHA).

*Filovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un filovirus, tal como un virus del Ébola (incluyendo un ebolavirus de Zaire, Costa de Marfil, Reston o Sudán) o un virus de Marburgo.

*Togavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Togavirus, tal como un Rubivirus, un Alphavirus, o un Arterivirus. Esto incluye el virus de la rubeola.

35 *Flavivirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Flavivirus, tal como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), virus del dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus del bosque de Kyasanur, virus de la encefalitis del Nilo Occidental, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis rusa de primavera-verano, virus de la encefalitis de Powassan.

40 *Pestivirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Pestivirus, tal como la diarrea viral bovina (DVB), la peste porcina clásica (PPC) o la enfermedad de la frontera (EF).

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

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

*Rhabdovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Rhabdovirus, tal como un Lisavirus (por ejemplo, virus de la rabia) y Vesiculovirus (VSV).

*Caliciviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de Caliciviridae, tales como el virus Norwalk (Norovirus), y virus de tipo Norwalk, tales como virus de Hawái y virus de nieve de la montaña.

5 *Coronavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un coronavirus del SARS, bronquitis infecciosa aviar (BI), virus de la hepatitis de ratón (VHR), virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT). El inmunógeno del coronavirus puede ser un polipéptido de la espícula.

*Retrovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Oncovirus, un Lentivirus (por ejemplo, VIH-1 o VIH-2) o un Espumavirus.

10 *Reovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Ortoreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus, o un Coltivirus.

*Parvovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de Parvovirus B19.

15 *Herpesvirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un virus del herpes humano, tal como, a modo solo de ejemplo, virus de herpes simple (VHS) (por ejemplo, VHS de los tipos 1 y 2), virus de la varicela zoster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB), Citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (VHH6), virus del herpes humano 7 (VHH7) y virus del herpes humano 8 (VHH8).

*Papovaviruses*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero sin limitación, los derivados de los Papilomavirus y los Poliomavirus. El virus del papiloma (humano) puede ser del serotipo 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 o 65, por ejemplo, de uno o más de los serotipos 6, 11, 16 y/o 18.

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

En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria frente a un virus que infecta al pez, tal como: virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS), virus de la enfermedad pancreática del salmón (VEPS), virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), virus de bagre de canal (VBC), virus de la enfermedad de Linfocistis del pez (VELP), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), herpesvirus koi, virus tipo picorna del salmón (también conocido como virus tipo picorna del salmón atlántico), virus del salmón encerrado (VSE), rotavirus del salmón atlántico (RSA), virus de la enfermedad de la fresa de la trucha (EFT), virus del tumor del salmón plateado (VTSP) o virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV).

30 Los inmunógenos fúngicos pueden derivarse de dermatofitos, incluyendo: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouini*, *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 guilliermondi*, *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* spp, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiosperum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marnettei*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Mortierella* spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp, y *Cladosporium* spp.

50 En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria frente a un parásito del género *Plasmodium*, tal como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. Por consiguiente la invención puede usarse para la inmunización contra la malaria. En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria frente a un parásito de la familia de *Caligidae*, de manera particular los de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus*, por ejemplo, el piojo de mar tal como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.

55 En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria frente a: alérgenos del polen (alérgenos del polen de árbol, hierba, maleza y césped); alérgenos de insectos o arácnidos (alérgenos inhalantes, saliva y veneno, por ejemplo, alérgenos de los ácaros, cucarachas y alérgenos de jejenes, alérgenos de veneno de himenópteros); alérgenos del pelo y caspa de animales (de por ejemplo, perro, gato, caballo, rata, ratón, etc.); y

alérgenos alimentarios (*por ejemplo*, una gliadina). Los alérgenos importantes del polen de árboles, césped y hierbas son los procedentes de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y Platanaceae que incluyen, pero sin limitación, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), árbol del plátano (*Platanus*), el orden de Poales incluyendo hierbas de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de Asterales y Urticales que incluyen hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros alérgenos por inhalación importantes son los de los ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento, por ejemplo, *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, jejenes, y pulgas, por ejemplo, *Blattella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, y los de mamíferos tales como el gato, perro y caballo, los alérgenos de veneno incluyendo los procedentes de insectos que pican o muerden tales como los del orden taxonómico de Hymenoptera incluyendo abejas (*Apidae*), avispas (*Vespipea*) y hormigas (*Formicoidea*).

En algunas realizaciones el inmunógeno es un antígeno tumoral seleccionado de: (a) antígenos de cáncer de testículo tales como NY-ESO-1, SSX2, SCP1 así como RAGE, BAGE, polipéptidos de la familia 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 hacer frente a melanomas, tumores de pulmón, cabeza y cuello, CPNM, mama, gastrointestinales y de vejiga); (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con varios tumores sólidos, *por ejemplo*, cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociados con, *por ejemplo*, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, *por ejemplo*, melanoma), MUM1 (asociado con, *por ejemplo*, melanoma), caspasa-8 (asociada con, *por ejemplo*, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, *por ejemplo*, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina (asociada con, *por ejemplo*, melanoma), TCR (asociado con, *por ejemplo*, linfoma no Hodgkin de células T), BCR-Ab1 (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*, la 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 (asociados con, *por ejemplo*, cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), mamaglobina, alfa-fetoproteína (asociada con, *por ejemplo*, hepatoma), KSA (asociada 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 ovario), G-250 (asociado con, *por ejemplo*, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, *por ejemplo*, cáncer de mama, colon) y el 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 del melanoma-melanocitos tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína-1 relacionada con la tirosinasa/TRP1 y proteína-2 relacionada con la 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 inmunoglobulinas (asociados con mieloma y linfomas de células B, por ejemplo). En ciertas realizaciones, los inmunógenos tumorales incluyen, pero sin limitación, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del papilomavirus humano (PVH), incluyendo E6 y E7, antígenos del virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de células T humanas, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG72-4, 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**

El ARN se administrará como un componente en una composición farmacéutica para la inmunización de sujetos frente a diversas enfermedades. Estas composiciones incluirán normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable además del ARN, a menudo como parte de un sistema de liberación como se ha descrito anteriormente. Está disponible una discusión a fondo de los vehículos farmacéuticamente aceptables en la referencia 41.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir uno o más inmunopotenciadores de moléculas pequeñas. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista del TLR2 (por ejemplo, Pam3CSK4), un agonista del TLR4 (*por ejemplo*, un fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como E6020), un agonista del TLR7 (*por ejemplo*, imiquimod), un agonista del TLR8 (*por ejemplo*, resiquimod) y/o un agonista del TLR9 (*por ejemplo*, IC31). Cualquiera de dichos agonista de manera ideal tiene un peso molecular de <2000 Da. Cuando un ARN se encapsula, en algunas realizaciones dicho(s) agonista(s) también se encapsula(n) con el ARN, pero en otras realizaciones están sin encapsular. Cuando un ARN se adsorbe a una partícula, en algunas realizaciones dicho(s) agonista(s) también se adsorbe(n) con el ARN, pero en otras realizaciones están sin adsorber.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir las partículas en agua pura (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 del tampón se incluirán normalmente 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 de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para proporcionar tonicidad. Es típica una concentración de NaCl de  $10 \pm 2$  mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 9 mg/ml.

5 Las composiciones de la invención pueden incluir quelantes de iones metálicos. Estos pueden prolongar la estabilidad del ARN retirando los iones que pueden acelerar la hidrólisis del fosfodiéster. Por consiguiente una composición puede incluir uno o más de los ácidos EDTA, EGTA, BAPTA, pentético, etc. Dichos quelantes normalmente están presentes a entre 10-500  $\mu$ M, por ejemplo, 0,1 mM. Una sal de citrato, tal como citrato de sodio, también puede actuar como un quelante, mientras que de manera ventajosa también proporciona actividad de tamponamiento.

10 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 las composiciones libres de mercurio, y pueden prepararse vacunas libres de conservantes.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención preferentemente son estériles.

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

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

20 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, o como soluciones o suspensiones. La composición puede prepararse para la administración pulmonar, por ejemplo, mediante un inhalador, usando una pulverización fina. La composición puede prepararse para la administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, como pulverización o gotas. Son típicos los inyectables para la administración intramuscular.

25 El contenido de ARN de las composiciones de la invención se expresa en términos de la cantidad de ARN por dosis unitaria. El ARN se cuantifica fácilmente usando las técnicas disponibles.

Los ARN no se liberan en combinación con ribosomas y por lo tanto las composiciones farmacéuticas de la invención están libres de ribosomas.

### **Procedimientos de tratamiento y usos médicos**

30 El ARN liberado de acuerdo con la invención es para provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* frente a un inmunógeno de interés. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica una inmunidad mediada por anticuerpos y/o células. El procedimiento puede aumentar una respuesta de refuerzo.

35 Aumentando una respuesta inmunitaria el mamífero puede protegerse frente a diversas enfermedades y/o infecciones, por ejemplo, frente a enfermedades bacterianas y/o víricas como se ha discutido anteriormente. Las composiciones que contienen ARN son inmunogénicas, y más preferentemente son composiciones de vacunas. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser o profilácticas (*es decir*, para prevenir una infección) o terapéuticas (*es decir*, para tratar una infección), pero normalmente serán profilácticas.

40 El mamífero inmunizado de acuerdo con la presente invención es un mamífero grande, que es un ser humano o un caballo, ganado, o cerdo. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano preferentemente es un niño (*por ejemplo*, un niño pequeño o bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano preferentemente es un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

45 Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como adultos. Por consiguiente un paciente humano puede tener menos de 1 año de edad, menos de 5 años de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo,  $\geq 50$  años de edad,  $\geq 60$  años de edad y preferentemente  $\geq 65$  años de edad), los jóvenes (*por ejemplo*,  $\leq 5$  años de edad), pacientes hospitalizados, los trabajadores de la salud, personal del servicio armado y militar, mujeres embarazadas, los pacientes enfermos crónicos o inmunodeficientes. Las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos y, sin embargo, pueden usarse más generalmente en una población.

50 Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. La liberación directa puede conseguirse mediante inyección parenteral (por ejemplo, vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa,

intramuscular, o al espacio intersticial de un tejido; a diferencia de la referencia 1, la inyección intralingual normalmente no se usa con la presente invención), o vía mucosa, tal como rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverización), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa. La inyección puede ser mediante una aguja (*por ejemplo*, una aguja hipodérmica), pero puede usarse alternativamente la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es 0,5 ml.

La invención puede usarse para provocar una inmunidad sistémica y/o de la mucosa, preferentemente para provocar un aumento de la inmunidad sistémica y/o de la mucosa.

La dosificación puede ser mediante una pauta de una sola dosis unitaria o una pauta de múltiples dosis unitarias. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta de múltiples dosis las diversas dosis pueden proporcionarse mediante las mismas o diferentes rutas, por ejemplo, una principal parenteral y una de refuerzo mucosa, una principal mucosa y una de refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples normalmente se administrarán al menos separadas 1 semana (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). En una realización, puede administrarse una dosis unitaria aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas tras el nacimiento, por ejemplo, a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se usa a menudo en el Programa Ampliado de Inmunización ("PAI") de la Organización Mundial de la Salud. En una realización alternativa, se administran dos dosis unitarias primarias aproximadamente separadas dos meses, por ejemplo, aproximadamente separadas 7, 8 o 9 semanas, seguido de una o más dosis unitarias de refuerzo aproximadamente de 6 meses a 1 año tras la segunda dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses tras la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias aproximadamente separadas dos meses, por ejemplo, aproximadamente separadas 7, 8 o 9 semanas, seguido de una o más dosis de refuerzo aproximadamente de 6 meses a 1 año tras la tercera dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses tras la tercera dosis primaria.

#### 25 **Realizaciones generales**

En algunas realizaciones de la invención, el ARN incluye nucleótidos no modificados (véase anteriormente). En otras realizaciones el ARN opcionalmente puede incluir al menos un nucleótido modificado, siempre que también se requiera una más de las siguientes características (ya desveladas anteriormente):

30 A. Cuando el ARN se libera con un liposoma, el liposoma comprende DEDMA, DODMA, DLinDMA y/o DLenDMA.

B. Cuando el ARN se encapsula en un liposoma, la parte hidrófila de un lípido en el liposoma está pegilada.

C. Cuando el ARN se encapsula en un liposoma, al menos el 80 % en número de los liposomas tienen diámetros en el intervalo de 20-220 nm.

35 D. Cuando el ARN se libera con una micropartícula, la micropartícula es una micropartícula de un polímero no tóxico y biodegradable.

E. Cuando el ARN se libera con una micropartícula, las micropartículas tienen un diámetro en el intervalo de 0,02  $\mu\text{m}$  a 8  $\mu\text{m}$ .

F. Cuando el ARN se libera con una micropartícula, al menos el 80 % en número de las micropartículas tienen un diámetro en el intervalo de 0,03-7  $\mu\text{m}$ .

40 G. Cuando el ARN se libera con una micropartícula, la composición se liofiliza.

H. Cuando el ARN se libera con una emulsión, la emulsión comprende un aceite biodegradable (*por ejemplo*, escualeno).

I. Cuando el ARN se libera con una emulsión, la emulsión incluye una o más moléculas catiónicas, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos.

45 J. El ARN tiene una cola de poli A 3', y el inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* frente a una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.

K. El ARN se libera en combinación con un quelante de iones metálicos con un sistema de liberación seleccionado de (i) liposomas (ii) micropartículas de un polímero no tóxico y biodegradable (iii) emulsiones de aceite en agua catiónicas submicrométricas.

#### 50 **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 de la experiencia de la técnica.



Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, *por ejemplo*, las referencias 42-48, *etc.*

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

El término “aproximadamente” en relación a un valor numérico *x* es opcional y significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

- 5 La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando es necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

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

- 10 El TLR3 es el receptor de tipo Toll 3. Es un receptor individual que atraviesa la membrana que desempeña un papel clave en el sistema inmunitario innato. Los agonistas del TLR3 conocidos incluyen poli(I:C). El “TLR3” es el nombre aprobado del CNGH para el gen que codifica este receptor, y su único ID del CNGH es CNGH: 11849. La secuencia de referencia para el gen del TLR3 humano es GI: 2459625.

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

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

- 25 La familia del receptor de tipo RIG-I (“RLR”) incluye diversas ARN helicasas que desempeñan papeles clave en el sistema inmunitario innato [49]. El RLR-1 (también conocido como RIG-I o gen 1 inducible por ácido retinoico) tiene dos dominios de reclutamiento de caspasas cerca de su N-terminal. El nombre aprobado del CNGH para el gen que codifica la helicasa RLR-1 es “DDX58” (para el polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala Asp) 58) y el único ID del CNGH es CNGH: 19102. La secuencia de referencia para el gen del RLR-1 humano es GI: 77732514. El RLR-2 (también conocido como MDA5 o gen 5 asociado con la diferenciación del melanoma) también tiene dos dominios de reclutamiento de caspasas cerca de su N-terminal. El nombre aprobado del CNGH para el gen que codifica la helicasa RLR-2 es “IFIH1” (para el interferón inducido con el dominio C de la helicasa 1) y el único ID del CNGH es CNGH: 18873. La secuencia de referencia para el gen del RLR-2 humano es GI: 27886567. El RLR-3 (también conocido como LGP2 o laboratorio de genética y fisiología 2) no tiene dominios de reclutamiento de caspasas. El nombre aprobado del CNGH para el gen que codifica la helicasa RLR-3 es “DHX58” (para el polipéptido de caja DEXH (Asp-Glu-X-His) 58) y el único ID del CNGH es CNGH: 29517. La secuencia de referencia para el gen del RLR-3 humano es GI: 149408121.

- 35 La PKR es una proteína quinasa dependiente de ARN de cadena doble. Desempeña un papel clave en el sistema inmunitario innato. El “EIF2AK2” (para la alfa quinasa 2 del factor de iniciación de la traducción eucariótico 2) es el nombre aprobado del CNGH para el gen que codifica esta enzima, y su único ID del CNGH es CNGH: 9437. La secuencia de referencia para el gen de la PKR humana es GI: 208431825.

### **Breve descripción de los dibujos**

- 40 La FIG 1 muestra un gel con un ARN teñido. Los carriles muestran (1) los marcadores (2) el replicón desnudo (3) el replicón después del tratamiento con ARNasa (4) el replicón encapsulado en el liposoma (5) el liposoma después del tratamiento con ARNasa (6) el liposoma tratado con ARNasa después de someterse a extracción con fenol/cloroformo.

La FIG 2 es una micrografía electrónica de los liposomas.

- 45 La FIG 3 muestra la expresión de las proteínas (como unidades de luz relativa, ULR) en los días 1, 3 y 6 después de la liberación del ARN como un replicón empaquetado en viriones (cuadrados), ARN desnudo (triángulos), o como micropartículas (círculos).

La FIG 4 muestra un gel con un ARN teñido. Los carriles muestran (1) los marcadores (2) el replicón desnudo (3) el replicón encapsulado en el liposoma (4) el liposoma tratado con ARNasa después de someterse a extracción con fenol/cloroformo.

- 50 La FIG 5 muestra la expresión de las proteínas en los días 1, 3 y 6 tras la liberación del ARN como un replicón empaquetado en viriones (cuadrados), como ARN desnudo (diamantes), o en liposomas (+ = 0,1 µg, x = 1 µg).

La FIG 6 muestra la expresión de las proteínas en los días 1, 3 y 6 tras la liberación de cuatro dosis diferentes del ARN encapsulado en liposomas.

La FIG 7 muestra los títulos de IgG anti-F en los animales que han recibido replicón empaquetado en viriones (PRV o PRSV), 1 µg de ARN desnudo, y 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.

La FIG 8 muestra los títulos de IgG anti-F en los animales que han recibido PRV, 1 µg de ARN desnudo, y 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.

5 La FIG 9 muestra los títulos de los anticuerpos neutralizados en los animales que han recibido PRV o, o bien 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.

La FIG 10 muestra los niveles de expresión tras la liberación de un replicón como ARN desnudo (círculos), ARN encapsulado en liposomas (triángulo & cuadrado), o como un lipoplexo (triángulo invertido).

10 La FIG 11 muestra los títulos de IgG específicas de F (2 semanas tras la segunda dosis) tras la liberación de un replicón como ARN desnudo (0,01-1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,01-10 µg), o empaquetado como un virión (PRV, 10<sup>6</sup> unidades infecciosas o UI).

15 La FIG 12 muestra los títulos de IgG específicas de F (círculos) y títulos del ENRP (cuadrados) tras la liberación de un replicón como ARN desnudo (1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg), o empaquetado como un virión (PRV, 10<sup>6</sup> UI). También se muestran los títulos en ratones naive. Las líneas continuas muestran las medias geométricas.

La FIG 13 muestra la producción intracelular de citoquinas tras la re-estimulación con péptidos sintéticos que representan los epítomos principales en la proteína F, 4 semanas después de una segunda dosis. El eje y muestra el % de citoquinas de CD8+ CD4-.

20 La FIG 14 muestra los títulos de IgG específicas de F (media de los títulos en log<sub>10</sub> ± desviación estándar) durante 63 días (FIG. 14A) y 210 días (FIG. 14B) tras la inmunización de terneros. Las cuatro líneas se distinguen fácilmente en el día 63 y son, de abajo a arriba: control negativo con PBS; ARN liberado en liposomas; ARN liberado en emulsión; y el producto "Triángulo 4".

### **Modos para llevar a cabo la invención**

#### ***Replicones de ARN***

25 A continuación se usan diversos replicones. En general estos son en base a un genoma de un alfavirus híbrido con proteínas no estructurales del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), una señal de empaquetamiento del virus Sindbis, y una RNT 3' del virus Sindbis o un mutante del VEEV. El replicón es de aproximadamente 10 kb de largo y tiene una cola de poli A.

30 El ADN del plásmido que codifica los replicones del alfavirus (denominados: pT7-mVEEV-FL.RSVF o A317; pT7-mVEEV-FASE o A306; pSP6-VCR-PVF o A50) sirvió como molde para la síntesis de ARN *in vitro*. Los replicones contienen elementos genéticos del alfavirus requeridos para la replicación del ARN pero al faltar los productos de los genes que los codifican necesarios para el ensamblado de las partículas; las proteínas estructurales se sustituyen en su lugar por una proteína de interés (o bien un reportero, tal como FASE o PVF, o un inmunógeno, tal como la proteína F del VRS de longitud completa) y por lo tanto los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de un bacteriófago (T7 o SP6) aguas arriba del ADNc del alfavirus facilita la síntesis del ARN del replicón *in vitro* y una ribozima del virus de la hepatitis delta (VHD) inmediatamente aguas abajo de la cola de poli (A) genera el extremo 3' correcto a través de su auto-actividad de escisión.

40 Después de la linealización del ADN del plásmido aguas abajo de la ribozima del VHD con una endonucleasa de restricción adecuada, las copias de los transcritos se sintetizaron *in vitro* usando la 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 nucleósidos trifosfato (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion). Después de la transcripción el ADN molde se digirió con TURBO ADNasa (Ambion). El ARN del replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. Al ARN sin la caperuza se le unió la caperuza post-transcripcionalmente con la enzima de formación de la caperuza de Vaccinia (ECV) usando el sistema de formación de la caperuza ScriptCap m7G (Epicentre Biotechnologies) como se indica en el manual del usuario; a los replicones con la caperuza formada de esta manera se les proporciona el prefijo "v", por ejemplo, vA317 es el replicón A317 con la caperuza formada por la ECV. El ARN con la caperuza formada post-transcripcionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo la DO<sub>260nm</sub>. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó mediante electroforesis en gel desnaturante de agarosa.

#### ***Adsorción a PLG***

Las micropartículas se fabricaron usando 500 mg de PLG RG503 (relación molar lactida/glicolida 50:50, PM ~ 30 kDa) y 20 mg de DOTAP usando un homogeneizador Omni Macro. La suspensión de partículas se agitó a 150 rpm

5 toda la noche y después se filtró a través de un filtro estéril de 40  $\mu\text{m}$  para el almacenamiento a 2-8 °C. El ARN auto-replicante se adsorbió a las partículas. Para preparar 1 ml de suspensión de PLG/ARN se añadió el volumen requerido de suspensión de las partículas de PLG a un vial y se añadió agua libre de nucleasas para llevar el volumen a 900  $\mu\text{l}$ . Se añadieron gota a gota 100  $\mu\text{l}$  de ARN (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a la suspensión de PLG, con agitación constante. El PLG/ARN se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Para 1 ml de suspensión reconstituida, se añadieron 45 mg de manitol, 15 mg de sacarosa y 250-500  $\mu\text{g}$  de APV. Los viales se congelaron a -80 °C y se liofilizaron.

10 Para evaluar la adsorción de ARN, se centrifugaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de partículas a 10.000 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante. El PLG/ARN se reconstituyó usando 1 ml de agua libre de nucleasas. Se añadió a 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de partículas (1  $\mu\text{g}$  de ARN), 1 mg de sulfato de heparina. La mezcla se agitó en un mezclador de vórtice y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min para la desorción del ARN. La suspensión de partículas se centrifugó y se recogió el sobrenadante.

15 Para la estabilidad de la ARNasa, se incubaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de partículas con 6,4 mUA de ARNasa a temperatura ambiente durante 30 min. La ARNasa se inactivó con 0,126 mUA de proteinasa K a 55 °C durante 10 min. Se añadió 1 mg de sulfato de heparina para la desorción del ARN seguido de centrifugación. Las muestras del sobrenadante que contenían ARN se mezclaron con colorante de carga en formaldehído, se calentaron a 65 °C durante 10 min y se analizaron usando un gel desnaturalizante al 1% (460 ng de ARN cargados por carril).

20 Para evaluar la expresión, los ratones Balb/c se inmunizaron con 1  $\mu\text{g}$  de ARN en 100  $\mu\text{l}$  de volumen de inyección intramuscular (50  $\mu\text{l}/\text{pata}$ ) en el día 0. Los sueros se recogieron en los días 1, 3 y 6. La expresión de las proteínas se determinó usando un ensayo de quimioluminiscencia. Como se muestra en la FIG. 3, la expresión era mayor cuando el ARN se liberó por la PLG (triángulos) que sin alguna partícula de liberación (círculos).

### **Nanoemulsión catiónica**

25 Se preparó una emulsión de aceite en agua mediante microfluidificación con escualeno, span 85, polisorbato 80 y cantidades variables de DOTAP. En resumen, los componentes solubles en aceite (escualeno, span 85, lípidos catiónicos, tensioactivos lipídicos) se combinaron en un vaso de precipitados, los componentes lipídicos se disolvieron en un disolvente orgánico. La solución lipídica resultante se añadió directamente a la fase oleosa. El disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 2 horas en una campana de ventilación antes de la combinación de la fase acuosa y la homogeneización de la muestra para proporcionar una materia prima homogénea. Las emulsiones primarias se pasaron de tres a cinco veces a través de un microfluidizador con un serpentín en un baño de hielo. Las muestras de los lotes se retiraron de la unidad y se almacenaron a 4 °C.

30 De este modo esta emulsión es similar al adyuvante comercial MF59, pero suplementada por un DOTAP catiónico para proporcionar una nanoemulsión catiónica ("NEC"). La composición final de la emulsión "NEC17" era escualeno (4,3 % en peso), span 85 (0,5 % en peso), polisorbato 80 (0,5 % en peso), DOTAP (1,4 mg/ml), en tampón citrato 10 mM, pH 6,5.

35 El ARN se adsorbe a la superficie de las gotas de aceite en estas emulsiones catiónicas. Para adsorber el ARN se diluye una solución de ARN a la concentración apropiada en agua libre de ARNasa y después se añade directamente en un volumen igual de la emulsión mientras se agita suavemente en un mezclador de vórtice. La solución se deja reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas para permitir la adsorción. La solución resultante se diluye a la concentración de ARN requerida antes de la administración.

### **Encapsulación liposomal**

40 El ARN se encapsuló en liposomas fabricados mediante el procedimiento de las referencias 11 y 50. Los liposomas se fabricaron de DEFC (zwitteriónico) al 10 %, DlinDMA (catiónico) al 40 %, colesterol al 48 % y DMG conjugado con PEG (2 kDa de PEG) al 2 %. Estas proporciones hacen referencia al % en moles en el liposoma total.

45 El DlinDMA (1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) se sintetizó usando el procedimiento de la referencia 6. La DEFC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina) se adquirió de Genzyme. El colesterol se obtuvo de Sigma-Aldrich. El DMG conjugado con PEG (sal de amonio del 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)]), el DOTAP (sal de cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano) y el DC-Colesterol (clorhidrato de  $3\beta$ -[N-(N',N'-dimetilamino)etano]-carbamoil] colesterol) eran de Avanti Polar Lipids.

50 En resumen, los lípidos se disolvieron en etanol (2 ml), se disolvió el replicón de ARN en tampón (2 ml, citrato de sodio 100 mM, pH 6) y éstos se mezclaron con 2 ml de tampón, seguido de 1 hora de equilibrado. La mezcla se diluyó con 6 ml de tampón después de filtrarse. El producto resultante contenía liposomas, con una eficiencia de encapsulación del ~ 95 %.

55 Por ejemplo, en un procedimiento particular, se prepararon soluciones madre lipídicas recientes en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DEFC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre lipídica recién preparada se mecía suavemente a 37 °C durante

aproximadamente 15 min para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 755  $\mu$ l de la madre a 1,245 ml de etanol para fabricar una solución madre lipídica de trabajo de 2 ml. Se utilizó esta cantidad de lípidos para formar liposomas con 250  $\mu$ g de ARN. También se preparó una solución de trabajo de 2 ml de ARN de una solución madre de  $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  en tampón citrato 100 mM (pH 6). Se enjuagaron tres viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con una solución sin ARNasa (Molecular Bioproducts) y se lavaron con abundante agua Milli-Q antes de su uso para descontaminar los viales de ARNasas. Uno de los viales se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para la recogida de las mezclas de lípidos y ARN (como se describe más adelante). Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 min antes de cargarse en jeringas luer-loc de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador en T (PEEK™ d.i. de la unión de 500  $\mu$ m, IDEX Health Science) usando tubos de FEP (propileno-etileno fluorado); todos los tubos de FEP usados tenían un diámetro interno de 2 mm y un diámetro externo de 3 mm; obtenidos de IDEX Health Science). La salida del mezclador en T también era de tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón citrato se conectó a un trozo separado de tubo. Después todas las jeringas se impulsaron a un caudal de 7 ml/min usando una bomba de jeringa. Las salidas de los tubos se posicionaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). Se sacó la barra de agitación y la solución acuosa de etanol se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 1 h. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se conectó a un trozo de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cc conectada a un tubo de FEP de la misma longitud, se cargó la misma cantidad de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se impulsaron a un caudal de 7 ml/min usando la bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, la mezcla recogida de la segunda etapa de mezclado (liposomas) se hizo pasar a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que une y retira las moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation). Antes de usar esta membrana para los liposomas, se hicieron pasar sucesivamente a través de ella 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6). Los liposomas se calentaron durante 10 min a 37 °C antes de hacerlos pasar a través de la membrana. A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron frente a 10-15 volúmenes de PBS 1X usando filtración por flujo tangencial antes de recuperar el producto final. El sistema de FFT y las membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs (Rancho Dominguez) y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de polisulfona con un corte de tamaño de poro de 100 kD y un área superficial de 8 cm<sup>2</sup>. Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con PBS 1X.

La FIG. 2 muestra un ejemplo de micrografía electrónica de los liposomas preparados mediante estos procedimientos. Estos liposomas contienen ARN encapsulado que codifica el antígeno F del VRS de longitud completa. La dispersión de luz dinámica de un lote mostró un diámetro medio de 141 nm (en intensidad) o 78 nm (en número).

El porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN se determinaron mediante el conjunto de reactivos de ARN de Quant-iT RiboGreen (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN ribosomal convencional proporcionado en el conjunto se usó para generar una curva patrón. Los liposomas se diluyeron 10x o 100x en tampón TE 1X (del conjunto) antes de la adición del colorante. De manera separada, los liposomas se diluyeron 10x o 100x en tampón TE 1X que contenía Triton X al 0,5 % antes de la adición del colorante (para romper los liposomas y por lo tanto para valorar el ARN total). A partir de ahí se añadió la misma cantidad de colorante a cada solución y después se cargaron  $\sim 180$  ml de cada solución tras la adición de colorante por duplicado en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. La fluorescencia (Ex 485 nm, Em 528 nm) se leyó en un lector de microplacas. Todas las formulaciones de liposomas se dosificaron *in vivo* en base a la cantidad encapsulada de ARN.

Se mostró que la encapsulación en liposomas protegía el ARN de la digestión por la ARNasa. Los experimentos usaron 3,8  $\mu$ U de ARNasa A por microgramo de ARN, que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La ARNasa se inactivó con proteinasa K a 55 °C durante 10 minutos. Después se añadió una mezcla 1:1 v/v de la 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 un mezclador de vórtice durante unos pocos segundos y después se colocaron en una centrífuga durante 15 minutos a 12 k 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 en formaldehído, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65 °C y se enfriaron a temperatura ambiente. Se usaron los marcadores Ambion Milenio para aproximar el peso molecular de la construcción de ARN. El gel se operó a 90 V. El gel se tiñó usando oro SYBR al 0,1 % de acuerdo con las instrucciones del fabricante en agua mecidiendo a temperatura ambiente durante 1 hora. La FIG. 1 muestra que la ARNasa digiere completamente el ARN en ausencia de encapsulación (carril 3). El ARN es indetectable tras la encapsulación (carril 4), y no se observa ningún cambio si estos liposomas se tratan con ARNasa (carril 4). Después los liposomas tratados con ARNasa se someten a extracción con fenol, se observa el ARN sin digerir (carril 6). Incluso después de 1 semana a 4 °C el ARN pudo observarse sin ninguna fragmentación (FIG. 4, flecha). La expresión de las proteínas *in vivo* se mantuvo sin cambios después de 6 semanas a 4 °C y un ciclo de congelación-descongelación. De este modo el ARN encapsulado en liposomas es estable.

Para evaluar la expresión *in vivo* del ARN se codificó una enzima reportera (FASE; fosfatasa alcalina secretada) en el replicón, en lugar de un inmunógeno. Los niveles de expresión se midieron en sueros diluidos 1:4 en tampón de

dilución PhosphaLight 1X usando un sustrato de fosfatasa alcalina quimioluminiscente. Se inyectaron ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad (5/grupo) por vía intramuscular en el día 0, 50 µl por pata con una dosis de 0,1 µg o 1 µg de ARN. El mismo vector se administró también sin los liposomas (en PBS 1X libre de ARNasa) a 1 µg. También se ensayaron los replicones empaquetados en viriones. Los replicones empaquetados en viriones usados en el presente documento (a los que se hace referencia como "PRV") se obtuvieron mediante los procedimientos de la referencia 51, donde el replicón de alfavirus se deriva del VEEV mutante o una quimera derivada del genoma del VEEV diseñado para contener el RNT 3' del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento (SR) del virus Sindbis, empaquetados mediante la co-electroporación de estos en células BHK con los ARN auxiliares defectuosos que codifican la cápside del virus Sindbis y los genes de las glucoproteínas.

Como se muestra en la FIG. 5, la encapsulación aumentó los niveles de la FASE en aproximadamente  $1/2$  log a la dosis de 1 µg, y en el día 6 la expresión de una dosis encapsulada de 0,1 µg coincidió con los niveles observados con una dosis sin encapsular de 1 µg. En el día 3 los niveles de expresión superaron los alcanzados con las PRV (cuadrados). De este modo lo expresado aumentó cuando el ARN se formuló en los liposomas en relación al control de ARN desnudo, incluso a una dosis más baja de 10x. La expresión también era mayor en relación al control de la PRV, pero las cinéticas de expresión eran muy diferentes (véase la FIG. 5). La liberación del ARN con electroporación resultó en la expresión aumentada en relación al control de ARN desnudo, pero estos niveles eran más bajos que con los liposomas.

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

Adicionalmente los experimentos de la FASE mostraron una respuesta clara a la dosis *in vivo*, con una expresión observada tras la liberación tan pequeña como 1 ng de ARN (FIG. 6). Los experimentos adicionales que compararon la expresión de los replicones encapsulados y desnudos indicaron que 0,01 µg de ARN encapsulado era equivalente a 1 µg de ARN desnudo. A una dosis de 0,5 µg de ARN el material encapsulado proporcionó una expresión 12 veces más alta en el día 6; a unos niveles de dosis de 0,1 µg eran 24 veces más altos en el día 6.

En lugar de observar los niveles medios en el grupo, también se estudiaron los animales individuales. Considerando que varios animales eran no respondedores a replicones desnudos, la encapsulación eliminó a los no respondedores.

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

Para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* se construyó un replicón para expresar la proteína F de longitud completa del virus respiratorio sincitial (VRS). Éste se liberó desnudo (1 µg), encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg), o empaquetado en viriones ( $10^6$  UI; "PRV") en los días 0 y 21. La FIG. 7 muestra los títulos de IgG anti-F 2 semanas después de la segunda dosis, y los liposomas aumentan claramente la inmunogenicidad. La FIG. 8 muestra los títulos 2 semanas más tarde, en cuyo momento no hubo una diferencia estadística entre el ARN encapsulado a 0,1 µg, el ARN encapsulado a 1 µg, o el grupo de la PRV. Los títulos de neutralización (medidos como una reducción del 60 % de las placas "ENRP60") no eran significativamente diferentes en estos tres grupos 2 semanas después de la segunda dosis (FIG. 9). La FIG. 12 muestra tanto los títulos de IgG como los de ENRP 4 semanas después de la segunda dosis.

La FIG. 13 confirma que el ARN provoca una respuesta fuerte de las células T CD8.

Los experimentos adicionales compararon los títulos de IgG específicas de F en ratones que recibieron las PRV, 0,1 µg de ARN encapsulado en liposomas o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas. Las relaciones de los títulos (PRV:liposoma) en diversos momentos tras la segunda dosis eran como sigue:

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

De este modo el ARN encapsulado en liposomas fundamentalmente induce la misma magnitud de respuesta inmunitaria que la observada con la liberación del virión.

Experimentos adicionales mostraron respuestas superiores de la IgG específicas de F con una dosis de 10 µg, respuestas equivalentes para dosis de 1 µg y 0,1 µg, y una menor respuesta con una dosis de 0,01 µg. La FIG. 11

muestra los títulos de IgG en los ratones que recibieron el replicón en la forma desnuda a 3 dosis diferentes, en liposomas a 4 dosis diferentes, o como PRV ( $10^6$  UI). La respuesta observada con  $1 \mu\text{g}$  de ARN encapsulado en liposomas era estadísticamente no significativa (ANOVA) cuando se comparó con las PRV, pero la respuesta más alta observada con  $10 \mu\text{g}$  de ARN encapsulado en liposomas era estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) cuando se comparó con ambos de estos grupos.

Un estudio adicional confirmó que  $0,1 \mu\text{g}$  de ARN encapsulado en liposomas proporcionó respuestas mucho más altas de IgG anti-F (15 días después de la segunda dosis) que  $0,1 \mu\text{g}$  de ADN liberado, e incluso era más inmunogénico que  $20 \mu\text{g}$  de ADN del plásmido que codifica el antígeno F, liberado por electroporación (Sistema de liberación de ADN Elgen™, Inovio).

Se realizó un estudio adicional en ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*) en lugar de ratones. A una dosis de  $1 \mu\text{g}$  la encapsulación en liposomas aumentó los títulos de IgG específicas de F en 8,3 veces en comparación con el ARN desnudo y aumentó los títulos del ENRP en 9,5 veces. La magnitud de la respuesta de los anticuerpos era equivalente a la inducida por  $5 \times 10^6$  UI de PRV. Tanto el ARN desnudo como el encapsulado en liposomas eran capaces de proteger a las ratas del algodón del estímulo del VRS ( $1 \times 10^5$  unidades formadoras de placa), reduciendo la carga viral del pulmón en al menos 3,5 logs. La encapsulación aumentó la reducción en aproximadamente 2 veces.

#### **Respuestas de defensa del huésped a dosis de ARN más altas**

Se usaron ratones para observar si las respuestas de defensa del huésped (inmunidad innata o adaptativa) podrían limitar la respuesta inmunitaria para los antígenos codificados a dosis de ARN más altas.

Se usaron tres ARN diferentes para este estudio: (i) el replicón “vA317” que expresa la F del VRS, es decir, la glucoproteína de fusión de superficie del VRS; (ii) el replicón “vA17” que expresa la PVF; y (iii) el “vA336” que es de replicación defectuosa y codifica la PVF.

Los ARN se liberaron o bien desnudos o con liposomas fabricados con DlinDMA al 40%, DEFC al 10%, colesterol al 48% y PEG-DMG al 2% (las proporciones están en % en moles de liposoma total). Estos liposomas se prepararon en lotes de  $75 \mu\text{g}$ . Se prepararon soluciones madre lipídicas recientes en etanol. Se pesaron  $37 \text{ mg}$  de DlinDMA,  $11,8 \text{ mg}$  de DEFC,  $27,8 \text{ mg}$  de colesterol y  $8,07 \text{ mg}$  de PEG-DMG y se disolvieron en  $7,55 \text{ ml}$  de etanol. La solución madre lipídica recién preparada se mezcló suavemente a  $37^\circ\text{C}$  durante aproximadamente  $15 \text{ min}$  para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron  $226,7 \mu\text{l}$  de la madre a  $1,773 \text{ ml}$  de etanol para fabricar una solución madre lipídica de trabajo de  $2 \text{ ml}$ . Se utilizó esta cantidad de lípidos para formar liposomas con  $75 \mu\text{g}$  de ARN. También se preparó una solución de trabajo de  $2 \text{ ml}$  de ARN de una solución madre de  $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  en tampón citrato  $100 \text{ mM}$  ( $\text{pH } 6$ ). Se enjuagaron tres viales de vidrio de  $20 \text{ ml}$  (con barras de agitación) con una solución sin ARN (Molecular Bioproducts) y se lavaron con abundante agua Milli Q antes de su uso para descontaminar los viales de ARN. Uno de los viales se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para la recogida de las mezclas de lípidos y ARN (como se describe más adelante). Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a  $37^\circ\text{C}$  durante  $10 \text{ min}$  antes de cargarse en jeringas de  $3 \text{ cc}$ . Se cargaron  $2 \text{ ml}$  de tampón citrato ( $\text{pH } 6$ ) en otra jeringa de  $3 \text{ cc}$ . Las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador en T (PEEK™ d.i. de la unión de  $500 \mu\text{m}$ ) usando tubos de FEP. La salida del mezclador en T también era de tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón citrato se conectó a un trozo separado de tubo. Después todas las jeringas se impulsaron a un caudal de  $7 \text{ ml}/\text{min}$  usando una bomba de jeringa. Las salidas de los tubos se posicionaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de  $20 \text{ ml}$  (mientras se agitaba). Se sacó la barra de agitación y la solución acuosa de etanol se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante  $1 \text{ h}$ . Después se cargó la mezcla en una jeringa de  $5 \text{ cc}$ , que se conectó a un trozo de tubo de FEP y en otra jeringa de  $5 \text{ cc}$  con un tubo de FEP de la misma longitud, se cargó la misma cantidad de tampón citrato  $100 \text{ mM}$  ( $\text{pH } 6$ ). Las dos jeringas se impulsaron a un caudal de  $7 \text{ ml}/\text{min}$  usando una bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de  $20 \text{ ml}$  (mientras se agitaba). A continuación, los liposomas se concentraron a  $2 \text{ ml}$  y se dializaron frente a  $10\text{-}15$  volúmenes de PBS 1X usando FFT antes de recuperar el producto final. El sistema de FFT y las membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de poliétersulfona (PES) (número de componente P-C1-100E-100-01N) con un corte de tamaño de poro de  $100 \text{ kD}$  y un área superficial de  $20 \text{ cm}^2$ . Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con PBS 1X.

Las cuatro formulaciones de liposomas tenían las siguientes características:

ARN	Tamaño de partícula promedio Z (nm)	Polidispersidad	Encapsulación del ARN
vA317	155,7	0,113	86,6 %
vA17	148,4	0,139	92 %
vA336	145,1	0,143	92,9 %
Vacío	147,9	0,147	-

## ES 2 586 580 T3

A los ratones BALB/c, 5 animales por grupo, se les proporcionaron vacunaciones intramusculares bilaterales (50  $\mu$ l por pata) en los días 0 y 21 con:

Grupo 1 ARN de la F del VRS auto-replicante desnudo (vA317, 0,1  $\mu$ g)

Grupo 2 ARN de la F del VRS auto-replicante (vA317, 0,1  $\mu$ g) encapsulado en liposomas

5 Grupo 3 ARN de la F del VRS auto-replicante (vA317, 0,1  $\mu$ g) añadido a liposomas vacíos

Grupo 4 una mezcla de ARN de la F del VRS auto-replicante (vA317, 0,1  $\mu$ g) y ARN de la PVF auto-replicante (vA17, 10  $\mu$ g)

Grupo 5 una mezcla de ARN de la F del VRS auto-replicante (vA317, 0,1  $\mu$ g) y ARN de la PVF de replicación defectuosa (vA336, 10  $\mu$ g)

10 Grupo 6 una mezcla de ARN de la F del VRS auto-replicante formulado en liposomas (vA317, 0,1  $\mu$ g) y ARN de la PVF auto-replicante (vA17, 10  $\mu$ g)

Grupo 7 una mezcla de ARN de la F del VRS auto-replicante formulado en liposomas (vA317, 0,1  $\mu$ g) y ARN de la PVF de replicación defectuosa (vA336, 10  $\mu$ g)

15 Grupo 8 una mezcla de ARN de la F del VRS auto-replicante formulado en liposomas (vA317, 0,1  $\mu$ g) y ARN de la PVF auto-replicante formulado en liposomas (vA17, 1  $\mu$ g)

Grupo 9 una mezcla de ARN de la F del VRS auto-replicante formulado en liposomas (vA317, 0,1  $\mu$ g) y ARN de la PVF de replicación defectuosa formulado en liposomas (vA336, 1  $\mu$ g)

Grupo 10 proteína de la subunidad F (5  $\mu$ g)

20 Se recogió el suero para el análisis de anticuerpos en los días 14, 35 y 51. Se midieron los títulos de IgG del suero específicas de F (MGT); si un animal individual tenía un título de < 25 (límite de detección), se le asignó un título de 5. Además, se extrajeron los bazo de los ratones en el día 51 para el análisis de células T, para determinar las células que eran positivas en citoquinas y específicas para el péptido F51-66 del VRS (CD4+) o para los péptidos F85-93 y F249-258 de la F del VRS (CD8+).

Los títulos de IgG eran como sigue en los 10 grupos y en los ratones control no inmunizados.

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-
14	22	1819	5	5	24	174	1130	44	347	5	5
35	290	32533	9	5	746	6887	13171	773	4364	19877	5
51	463	30511	18	10	1076	7201	14426	922	4697	20853	5

25

Los títulos de neutralización del VRS en el suero en el día 51 eran como sigue:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
51	35	50	24	25	31	31	54	34	24	38

30

Los animales que mostraron células T esplénicas CD4+ específicas de F del VRS en el día 51 eran como sigue, donde se proporciona un número (% de células positivas) solo si la respuesta estimulada era estadísticamente significativa por encima de cero:

Citoquina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFN- $\gamma$		0,04			0,02		0,02			
IL2	0,02	0,06			0,02		0,02		0,02	0,02
IL5								0,01		
TNF $\alpha$	0,03	0,05					0,02		0,02	

Los animales que mostraron células T esplénicas CD8+ específicas de F del VRS en el día 51 eran como sigue, donde se proporciona un número solo si la respuesta estimulada era estadísticamente significativa por encima de cero:

Citoquina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFN- $\gamma$	0,37	0,87			0,37	0,40	0,49	0,06	0,54	
IL2	0,11	0,40			0,15	0,18	0,20	0,03	0,23	0,04
IL5										
TNF $\alpha$	0,29	0,79			0,35	0,42	0,40		0,53	0,06

Estos resultados muestran que las respuestas de defensa del huésped pueden limitar la respuesta inmunitaria al vector liberado. Por ejemplo, los grupos 2 y 6-9 usaron el mismo vector auto-replicante que codifica el antígeno, liberado en liposomas, pero los grupos 6-9 también tenían un exceso 100 veces o 10 veces de vector que codifica la PVF, liberado o bien desnudo o dentro de liposomas, y o bien auto-replicante o de replicación defectuosa. El ARN adicional redujo las respuestas anti-VRS, en particular si era auto-replicante y/o encapsulado.

Los experimentos adicionales se dirigieron para observar si las respuestas del huésped al ARN podrían limitar la expresión de las proteínas. De este modo la expresión se siguió durante solo 6 días, antes de que fuera evidente una respuesta adaptativa (anticuerpos, células T). El replicón "vA306" codifica la FASE; el replicón "vA17" codifica la PVF; el replicón "vA336" codifica la PVF, pero no puede auto-replicarse; el replicón "vA336\*\*" es el mismo que vA336 pero se preparó con un 10 % de uridinas sustituida con 5-metiluridina; el replicón "vA336\*\*\*" es el mismo que vA336 pero el 100 % de sus residuos de uridina son M5U. A los ratones BALB/c se les proporcionaron las vacunaciones intramusculares bilaterales (50  $\mu$ l por pata) en el día 0. Los animales, 35 en total, se dividieron en 7 grupos (5 animales por grupo) y se inmunizaron como sigue:

Grupo 1 Control Naive.

Al grupo 2 se les proporcionaron vacunaciones intramusculares bilaterales (50  $\mu$ l por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1  $\mu$ g, FASE) formulado en liposomas mezclado con ARN auto-replicante (vA17, 1,0  $\mu$ g, PVF) formulado en liposomas.

Al grupo 3 se les proporcionaron vacunaciones intramusculares bilaterales (50  $\mu$ l por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1  $\mu$ g, FASE) formulado en liposomas mezclado con ARN no replicante (vA336, 1,0  $\mu$ g, PVF) formulado en liposomas.

Al grupo 4 se les proporcionaron vacunaciones intramusculares bilaterales (50  $\mu$ l por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1  $\mu$ g, FASE) formulado en liposomas mezclado con ARN no replicante (vA336\*, 1,0  $\mu$ g, PVF) formulado en liposomas.

Al grupo 5 se les proporcionaron vacunaciones intramusculares bilaterales (50  $\mu$ l por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1  $\mu$ g, FASE) formulado en liposomas mezclado con ARN no replicante (vA336\*\*, 1,0  $\mu$ g, PVF) formulado en liposomas.

Al grupo 6 se les proporcionaron vacunaciones intramusculares bilaterales (50  $\mu$ l por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1  $\mu$ g, FASE) formulado en liposomas mezclado con liposomas vacíos a la misma dosis lipídica que en los grupos 2-5.

Al grupo 7 se les proporcionaron vacunaciones intramusculares bilaterales (50  $\mu$ l por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1  $\mu$ g, FASE) formulado en liposomas mezclado con ARN auto-replicante (vA17, 1,0  $\mu$ g, PVF) formulado en liposomas.

La actividad de la FASE en el suero (unidades relativas de luz) en los días 0, 3 y 6 eran como sigue (MGT):

	Día 1	Día 2	Día 3
1	898	1170	2670
2	1428	4219	28641
3	1702	9250	150472
4	1555	8005	76043
5	1605	8822	91019
6	10005	14640	93909
7	1757	6248	53497



5 El ARN competente para la replicación que codifica la PVF suprimió la expresión de la FASE más que el ARN de la PVF de replicación defectuosa, lo que sugiere una fuerte respuesta de defensa del huésped frente al ARN de replicación que conduce a la supresión de la expresión de la FASE. Es posible que los interferones inducidos en respuesta al ARN de la PVF suprimieran la expresión de la FASE. En el modelo de respuesta/supresión del huésped, se esperaría el bloqueo del reconocimiento del huésped del ARN para dar lugar a una expresión aumentada de la FASE, pero la metilación 5' de los residuos U en el ARN de la PVF no se asoció con la FASE aumentada, lo que sugiere que el reconocimiento del huésped del ARN era insensible a la metilación 5'.

**Volumen de liberación**

10 La liberación hidrodinámica emplea la fuerza generada por la inyección rápida de un gran volumen de solución para superar las barreras físicas de las membranas celulares que impiden que los compuestos grandes e impermeables a la membrana entren en las células. Se ha mostrado previamente que este fenómeno es útil para la liberación intracelular de vacunas de ADN.

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

20 El replicón vA317 se liberó a ratones BALB/c, 10 por grupo, en vacunaciones intramusculares bilaterales (5 o 50 por pata) en el día 0 y 21:

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

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

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

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

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

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

El suero se recogió para el análisis de anticuerpos en los días 14 y 35. Las MGT de IgG del suero específicas de F eran:

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

30 Por consiguiente la inmunogenicidad del replicón formulado no varió de acuerdo con el volumen liberado, indicando de este modo que estas vacunas de ARN no se basan en la liberación hidrodinámica para su eficacia.

**Estudio en un mamífero grande**

35 Se realizó un estudio en un animal grande en ganado. Los terneros (4-6 semanas de edad, ~ 60-80 kg, 5 por grupo) se inmunizaron con 66 µg del replicón vA317 que codifica la proteína F del VRS de longitud completa en los días 0, 21, 86 y 146. Los replicones se formularon o bien dentro de los liposomas o con la emulsión CNE17. El PBS solo se usó como control negativo, y se usó una vacuna autorizada como control positivo ("Triángulo 4" de Fort Dodge, que contenía virus muertos). Todos los terneros recibieron 15 µg de la proteína F ayudada con la emulsión MF59 en el día 146. Una vaca se vacunó por error con la vacuna basada en CNE17 el día 86 en lugar del Triángulo 4 y por eso sus datos se excluyeron del día 100 en adelante.

40 Las vacunas de ARN codificaron la F del VRS humano mientras que la vacuna "Triángulo 4" contiene la F del VRS bovino, pero la proteína F del VRS se conserva altamente entre el VRSB y el VRSH.

45 Los liposomas tenían la misma proporción de DlinDMA, DEFC, colesterol y PEG-DMG como se ha mencionado anteriormente. Se prepararon soluciones madre lipídicas recientes en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DEFC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre lipídica recién preparada se mezcló suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 min para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 226,7 µl de la madre a 1,773 ml de etanol para fabricar una solución madre lipídica de trabajo de 2 ml. También se preparó una solución de trabajo de 2 ml de ARN de una solución

madre de ~ 1 µg/µl en tampón citrato 100 mM (pH 6). Se enjuagaron tres viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con una solución sin ARNasa (Molecular Bioproducts) y se lavaron con abundante agua Milli Q antes de su uso para descontaminar los viales de ARNasas. Uno de los viales se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para la recogida de las mezclas de lípidos y ARN (como se describe más adelante). Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 min antes de cargarse en jeringas de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador en T (PEEK™ d.i. de la unión de 500 µm) usando tubos de FEP. La salida del mezclador en T también era de tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón citrato se conectó a un trozo separado de tubo de FEP. Después todas las jeringas se impulsaron a un caudal de 7 ml/min usando una bomba de jeringa. Las salidas de los tubos se posicionaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). Se sacó la barra de agitación y la solución acuosa de etanol se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 1 h. Después se cargó la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se conectó a un trozo de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cc con un tubo de FEP de la misma longitud, se cargó el mismo volumen de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se impulsaron a un caudal de 7 ml/min usando una bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, la mezcla recogida de la segunda etapa de mezclado (liposomas) se hizo pasar a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que une y retira las moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation, Ann Arbor, MI, Estados Unidos). Antes de hacer pasar los liposomas, se hicieron pasar sucesivamente a través de la membrana Mustang 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6). Los liposomas se calentaron durante 10 min a 37 °C antes de hacerlos pasar a través del filtro. A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron frente a 10-15 volúmenes de PBS 1X usando el sistema de FFT antes de recuperar el producto final. El sistema de FFT y las membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de poliétersulfona (PES) con un corte de tamaño de poro de 100 kD y un área superficial de 20 cm<sup>2</sup>. Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con PBS 1X.

Los terneros recibieron 2 ml de cada vacuna experimental, administrada vía intramuscular como 2x1 ml en cada lado del cuello. Por el contrario, la vacuna "Triángulo 4" se proporcionó como una dosis de 2 ml única en el cuello.

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

La FIG. 14A muestra los títulos de IgG específicas de F en los primeros 63 días. El replicón de ARN era inmunogénico en las vacas usando ambos sistemas de liberación, a pesar de que proporcionaron títulos más bajos que la vacuna autorizada. Todas las vacas vacunadas mostraron anticuerpos específicos de F tras la segunda dosis, y los títulos eran muy estables a partir del periodo de 2 a 6 semanas tras la segunda dosis (y eran particularmente estables para las vacunas de ARN). Los títulos con el sistema de liberación de liposomas estaba más estrechamente agrupados que con la emulsión.

La FIG. 14B muestra los títulos IgG del suero específicas de F (MGT) en 210 días, y los valores medidos hasta el día 202 eran como sigue:

	D0	3wp1 D21	2wp2 D35	5wp2 D56	~9wp2 D86	2wp3 D100	5wp3 D121	8wp3 D146	2wp4 D160	5wp4 D181	8wp4 D202
<b>PBS</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	46	98	150
<b>Liposoma</b>	5	5	12	11	20	768	428	74	20774	7022	2353
<b>CNE17</b>	5	5	34	46	56	773	538	70	8297	4843	2073
<b>Triángulo 4</b>	5	5	1784	721	514	3406	2786	336	13376	4775	2133

La vacuna ayudada con la emulsión indujo una respuesta de neutralización cuando se ensayó sin complemento, con títulos más altos que los del triángulo 4 (aunque más variable). Los títulos de los anticuerpos de neutralización del VRS en el suero eran como sigue:

	D0	2wp2 D35	5wp2 D56	2wp3 D100	3wp3 D107	4wp3 D114	8wp3 D146	2wp4 D160	3wp4 D167	4wp4 D174
<b>PBS</b>	12	10	10	14	18	20	14	10	10	10
<b>Liposoma</b>	13	10	10	20	13	17	13	47	26	21
<b>CNE17</b>	10	10	13	28	44	52	14	64	57	40
<b>Triángulo 4</b>	12	15	13	39	38	41	13	24	26	15

- Los datos de este estudio proporcionan una prueba de concepto para las vacunas del VRS de replicón de ARN en animales grandes, con dos de los cinco terneros en el grupo ayudado con la emulsión demostrando buenos títulos de anticuerpos de neutralización después de la tercera vacunación, tal como se mide mediante el ensayo de neutralización del VRSH independiente del complemento. Aunque las vacunas ayudadas con la emulsión parecen ser más inmunogénicas que las vacunas ayudadas con liposomas, un factor que lo complica es que el material usado para la segunda dosis de liposomas no estaba recién preparado, y el mismo lote de ARN mostró una disminución en la potencia en un estudio de inmunogenicidad en un ratón. Por lo tanto es posible que la vacuna ayudada con liposomas hubiera sido más inmunogénica si se hubiera usado el material reciente para todas las vacunas.
- 5
- 10 Cuando se ensayó con el complemento, se detectaron anticuerpos de neutralización en todas las vacas vacunadas. En este ensayo, todos los terneros vacunados tenían buenos títulos de anticuerpos de neutralización después de la segunda vacunación con ARN independientemente de la formulación. Además, ambas vacunas de ARN provocaron títulos de IgG en el suero específicas de F que se detectaron en unos pocos terneros después de la segunda vacunación y en todos los terneros después de la tercera.
- 15 La F del VRS ayudada con MF59 era capaz de estimular la respuesta de las IgG en todos los terneros vacunados previamente, y de estimular los títulos de neutralización del VRSH independiente del complemento de los terneros vacunados previamente con ARN.
- 20 La prueba de concepto para las vacunas de ARN en animales grandes es particularmente importante en vista de la pérdida en la potencia observada previamente con las vacunas basadas en ADN cuando se pasa de modelos de animales pequeños a animales y seres humanos más grandes. Una dosis típica para una vacuna de ADN para una vaca sería 0,5-1 mg [45,46] y por lo tanto es muy alentador que las respuestas inmunitarias se indujeran con solo 66 µg de ARN.

**Tabla 1: fosfolípidos útiles**

DDFC	1,2-Didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEFA	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfato
DEFC	1,2-Erucoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEFE	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEFG	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLOFC	1,2-Linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLFA	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfato
DLFC	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLFE	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLFG	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLFS	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMFA	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato
DMFC	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMFE	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMFG	1,2-Miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMFS	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DOFA	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfato
DOFC	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOFE	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina

(continuación)

**Tabla 1: fosfolípidos útiles**

DOFG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOFS	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPFA	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPFC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPFE	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPFG	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPFS	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DFyFE	1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DEFA	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfato
DEFC	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEFE	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEFG	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DEFS	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
FCH	FC de huevo
FCHH	FC de huevo hidrogenada
FCSH	FC de soja hidrogenada de alta pureza
FCSH	FC de soja hidrogenada
LYSOFC MIRÍSTICO	1-Miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPFC PALMÍTICO	1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOFC ESTEÁRICO	1-Estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
Esfingomielina de la leche MPFC	1-Miristoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
MEFC	1-Miristoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PMFC	1-Palmitoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POFC	1-Palmitoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POFE	1-Palmitoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOFG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol)...]
PEFC	1-Palmitoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
EMFC	1-Estearoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
EOFC	1-Estearoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
EPFC	1-Estearoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

**Referencias**

[1] Johanning y col. (1995) *Nucleic Acids Res* 23:1495-1501.

[2] Martinon y col. (1993) *Eur J Immunol* 22:1719-22.

5 [3] Ying y col. (1999) *Nature Medicine* 5:823-27.

[4] Saxena y col. (2009) *Vet Microbiol* 136:36-44.

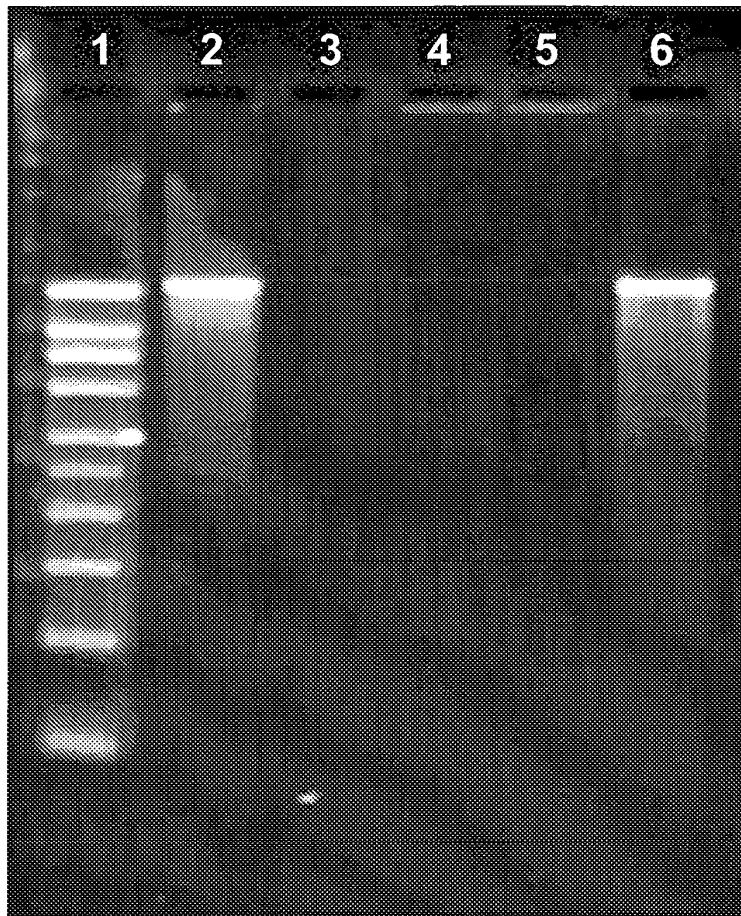
- [5] Jones y col. (2009) Vaccine 27:2506-12.
- [6] Heyes et al. (2005) J Controlled Release 107:276-87.
- [7] WO 2005/121348.
- 5 [8] Liposomes: Methods and Protocols, Volumen 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [9] Liposome Technology, volúmenes I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [10] Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002.
- [11] Jeffs y col. (2005) Pharmaceutical Research 22 (3):362-372.
- 10 [12] Polymers in Drug Delivery. (eds. Uchegbu & Schatzlein). CRC Press, 2006.
- [13] Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press 1996.
- [14] O'Hagan y col. (2001) J Virology 75:9037-9043.
- [15] Singh y col. (2003) Pharmaceutical Research 20: 247-251.
- 15 [16] WO 2009/132206.
- [17] US-2008/0085870.
- [18] US-2008/0057080.
- [19] US-2007/0014805.
- [20] WO 2005/113782.
- 20 [21] WO 2011/005799.
- [22] El Ouahabi y col. (1996) FEBS Letts 380:108-12.
- [23] Giuliani y col. (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103(29):10834-9.
- [24] WO 2009/016515.
- [25] WO 02/34771.
- 25 [26] WO 2005/032582.
- [27] WO/2010/119343.
- [28] WO 2006/110413.
- [29] WO 2005/111066.
- [30] WO 2005/002619.
- 30 [31] WO 2006/138004.
- [32] WO 2009/109860.
- [33] WO 02/02606.
- [34] WO 03/018054.
- [35] WO 2006/091517.
- 35 [36] WO 2008/020330.
- [37] WO 2006/089264.
- [38] WO 2009/104092.
- [39] WO 2009/031043

- [40] WO 2007/049155.
- [41] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [42] Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- 5 [43] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [44] Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [45] Handbook of surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [46] Ausubel y col. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).
- 10 [47] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)
- [48] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [49] Yoneyama & Fujita (2007) Cytokine & Growth Factor Reviews 18:545-51.
- [50] Maurer y col. (2001) Biophysical Journal, 80: 2310-2326.
- [51] Perri y col. (2003) J Virol 77:10394-10403.
- 15 [52] Boxus y col. (2007) J Virol 81:6879-89.
- [53] Taylor y col. (2005) Vaccine 23:1242-50.

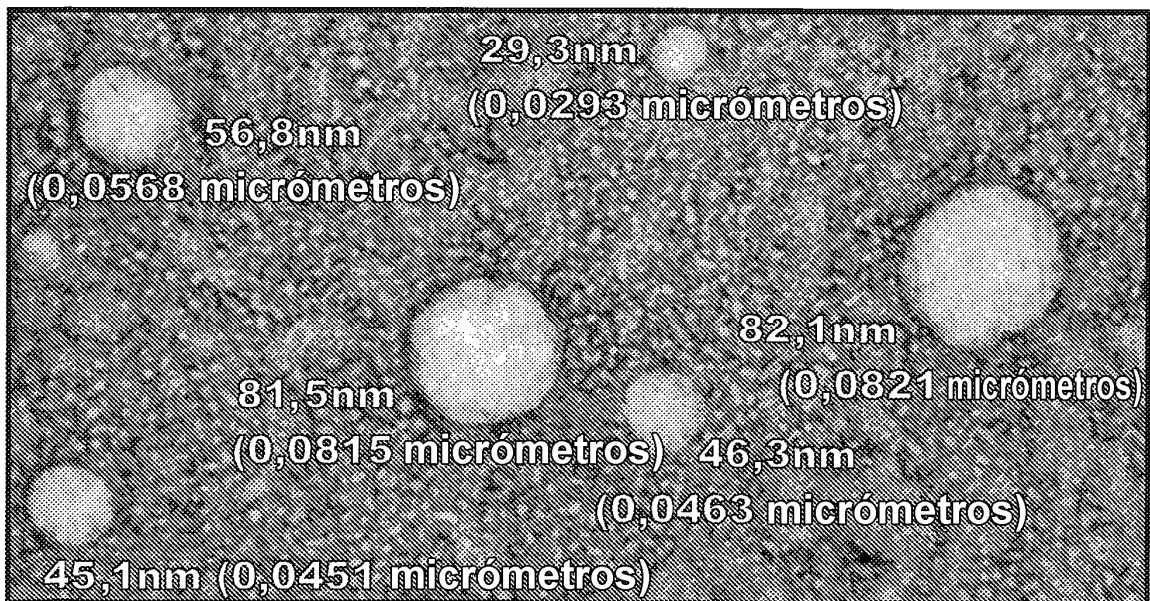
## REIVINDICACIONES

1. Un ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno para su uso en unos procedimientos profilácticos o terapéuticos de aumento de una respuesta inmunitaria en un mamífero grande mediante la liberación no vírica de dicho ARN, que comprende: (i) administrar al mamífero una dosis de entre 2 µg y 100 µg de dicho ARN que codifica un inmunógeno, en el que el mamífero grande es un ser humano, caballo, ganado o cerdo y el ARN se administra en combinación con un sistema de liberación que comprende: (i) liposomas; (ii) micropartículas de un polímero no tóxico y biodegradable; y/o (iii) una emulsión de aceite en agua catiónica submicrométrica.
- 5
2. El ARN para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ARN se administra al tejido del músculo esquelético.
- 10
3. El ARN para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el ARN se administra mediante inyección.
4. El ARN para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la inyección es mediante una aguja.
5. El ARN para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el ARN es de cadena +.
- 15
6. El ARN para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el ARN es un replicón de ARN basado en un alfavirus.
7. El ARN para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la molécula de ARN codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN auto-replicante y (ii) un inmunógeno.
8. El ARN para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la polimerasa es una replicasa de un alfavirus.
- 20
9. El ARN para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la molécula de ARN no codifica las proteínas estructurales de un alfavirus.
10. El ARN para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el ARN codifica un inmunógeno que puede provocar una respuesta inmunitaria frente a una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.
- 25
11. El ARN para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* frente al (a) virus respiratorio sincitial (VRS), tal como la glucoproteína F del VRS; (b) ortomixovirus, tal como el virus de la gripe A, B y C; o (c) virus del herpes, tal como el virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela zoster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (VHH6), virus del herpes humano 7 (VHH7) y virus del herpes humano 8 (VHH8).
- 30
12. El ARN para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el mamífero grande es un ser humano.
- 35
13. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de inmunización de un ser humano, caballo, ganado, o cerdo frente a una enfermedad, que comprende (a) entre 2 µg y 100 µg de ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno para la liberación no vírica por dosis unitaria y (b) un sistema de liberación que comprende: (i) liposomas; (ii) micropartículas de un polímero no tóxico y biodegradable; y/o (iii) una emulsión de aceite en agua catiónica submicrométrica.

**FIG. 1**

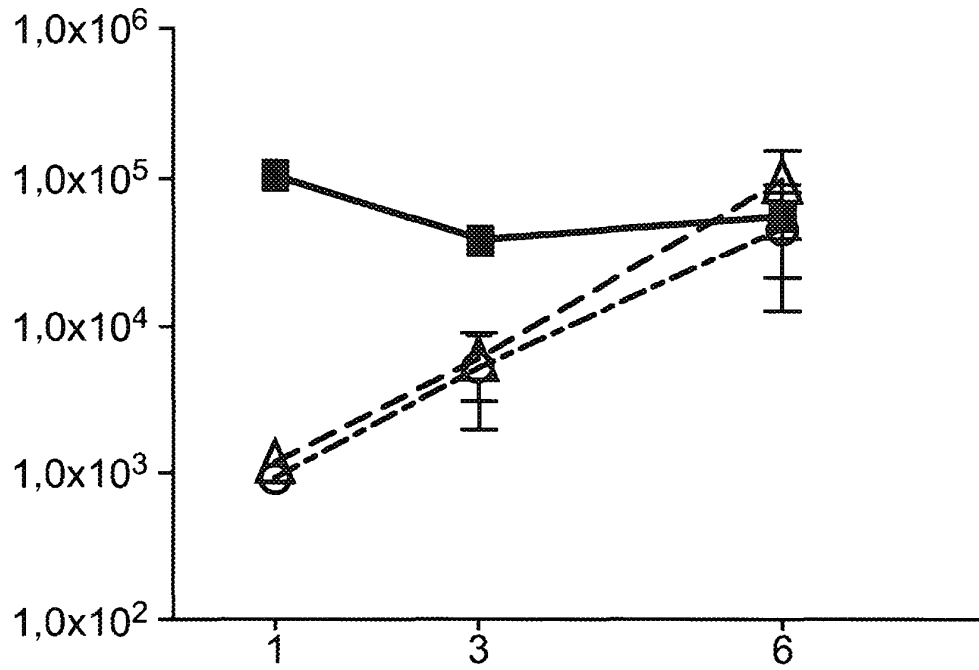


**FIG. 2**

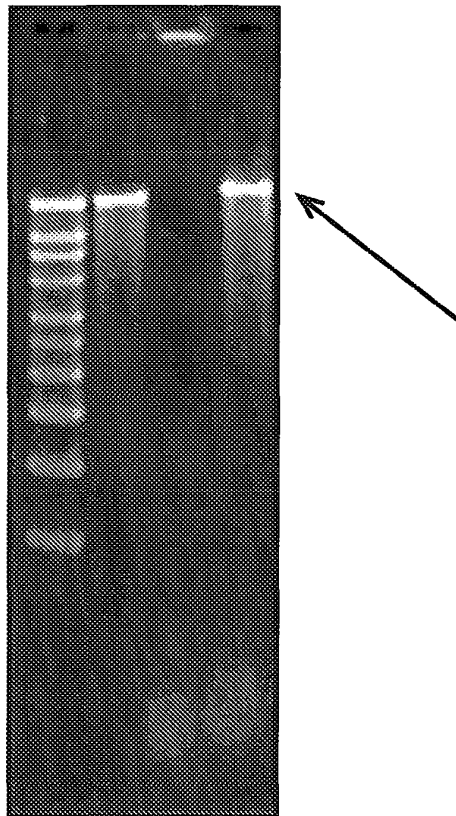




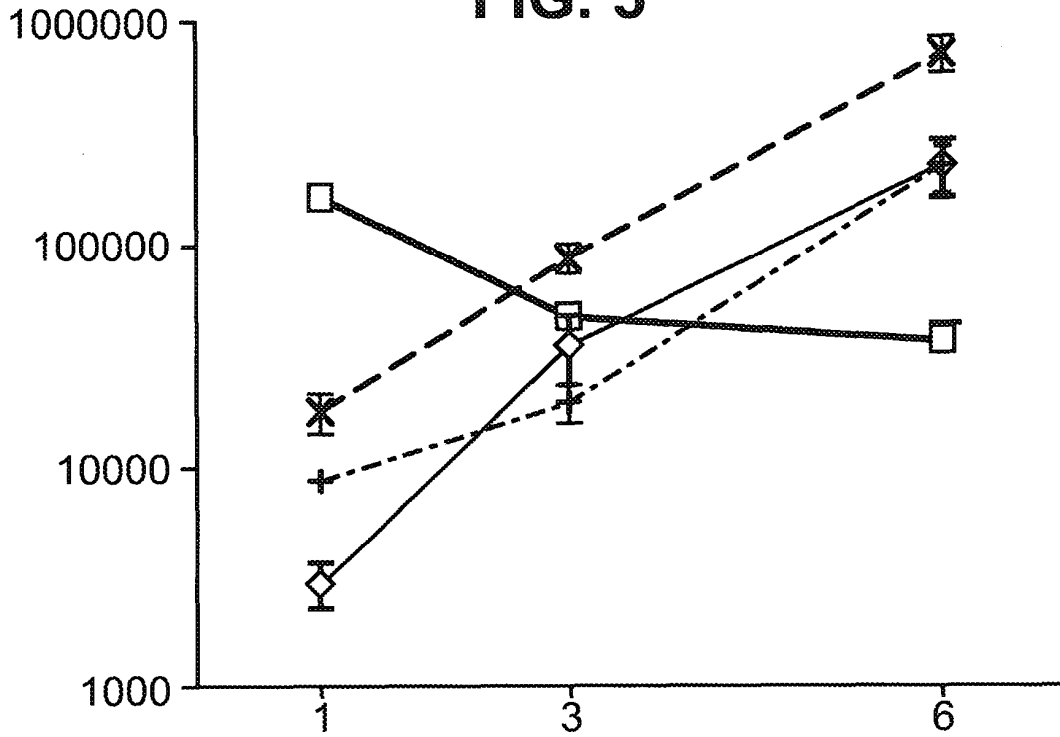
**FIG. 3**



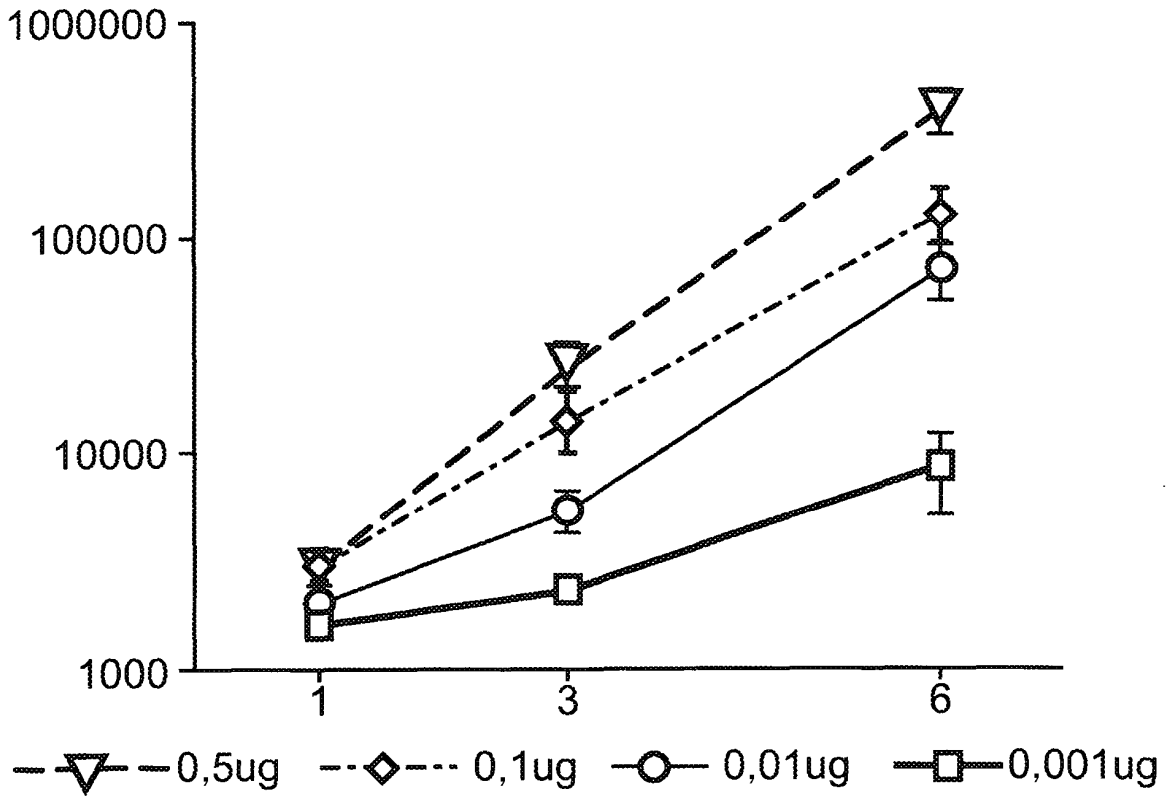
**FIG. 4**



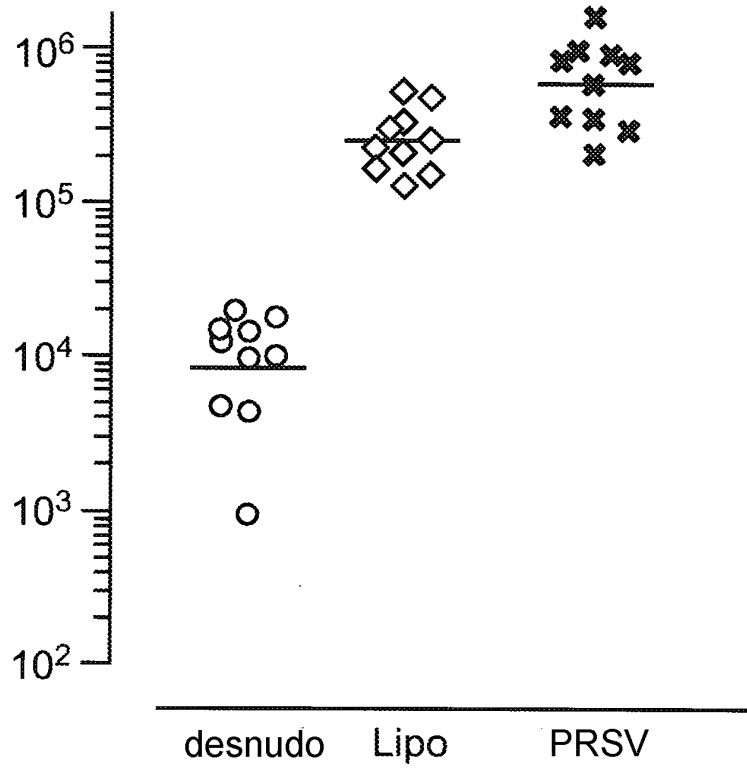
**FIG. 5**



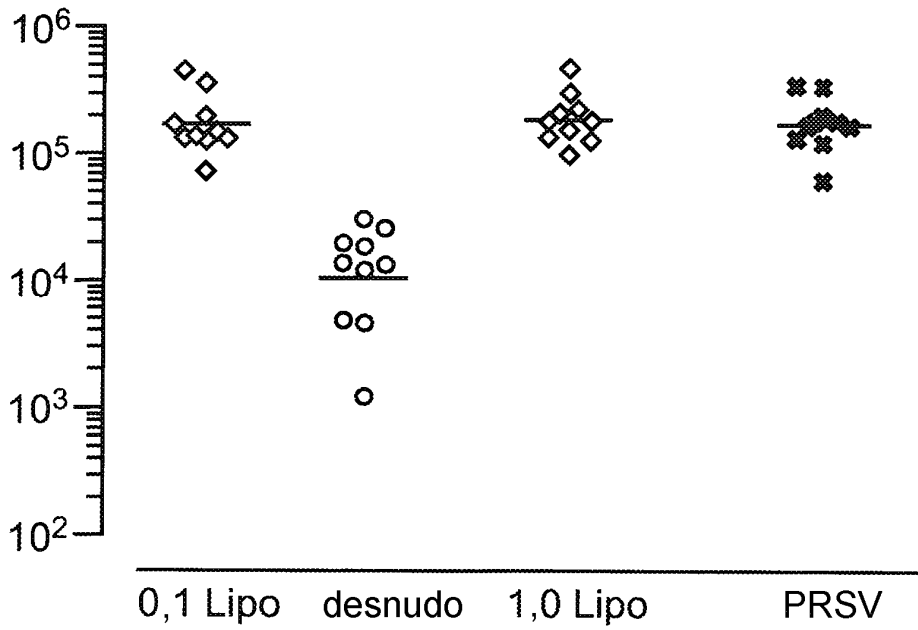
**FIG. 6**



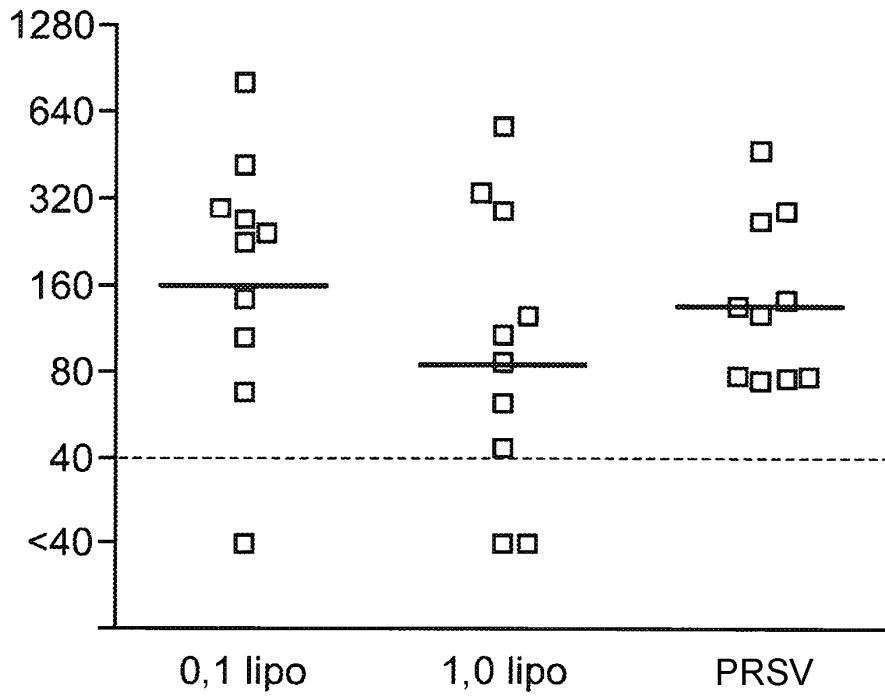
**FIG. 7**



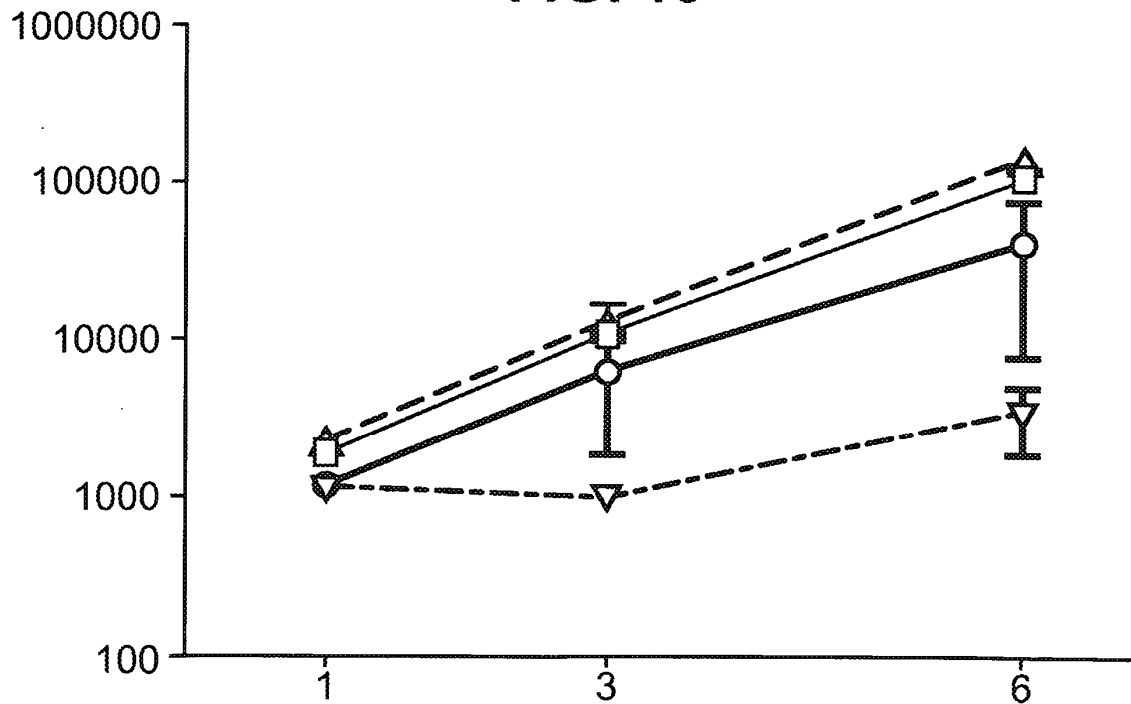
**FIG. 8**



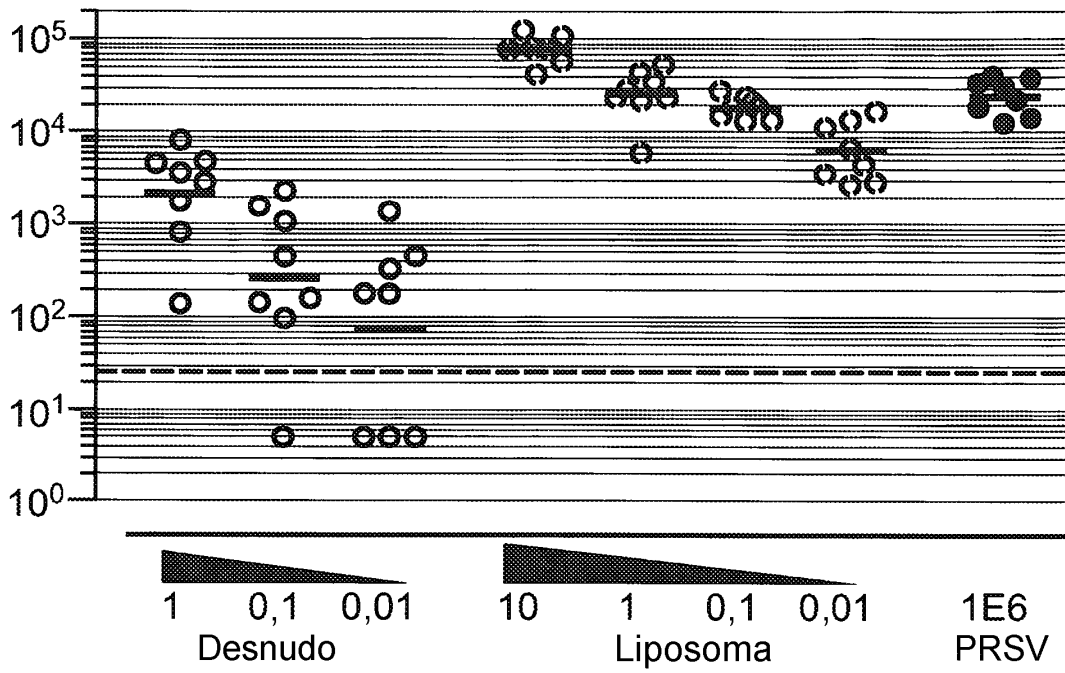
**FIG. 9**



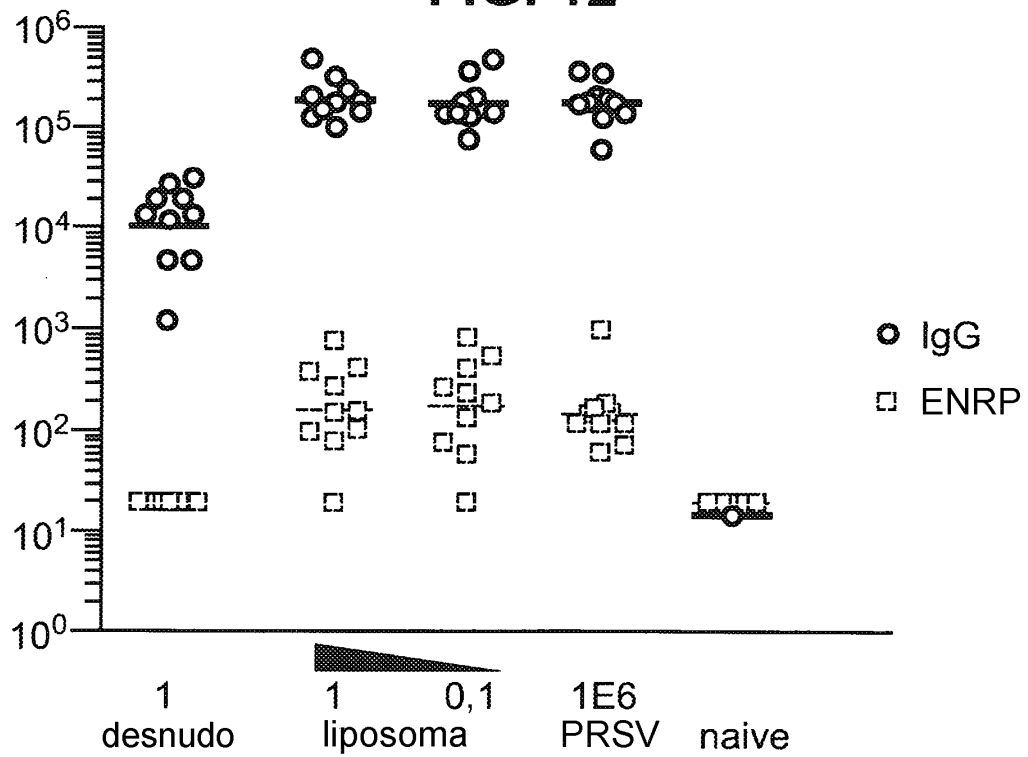
**FIG. 10**



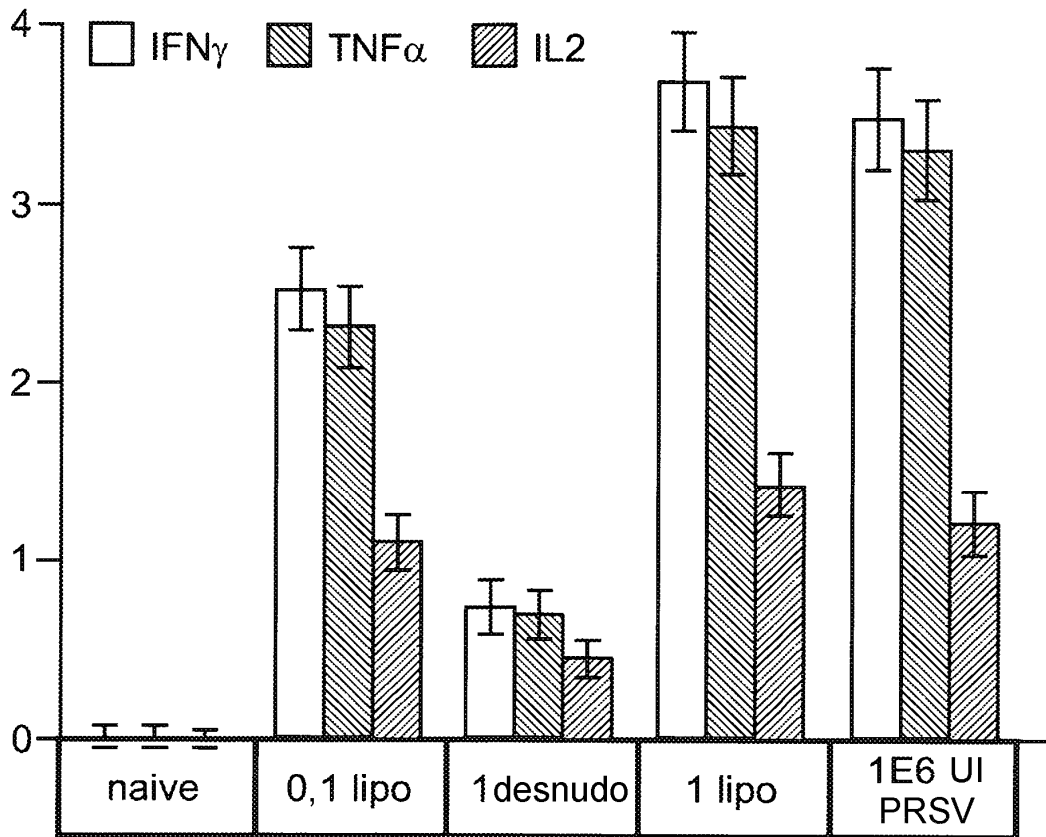
**FIG. 11**



**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14A**

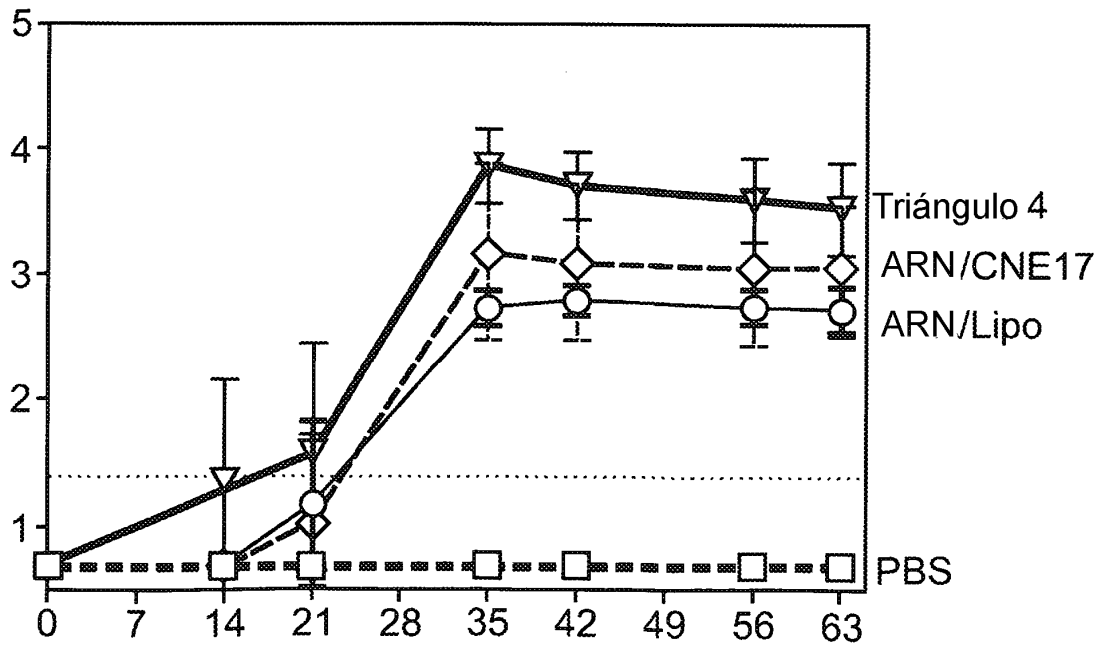


FIG. 14B

