

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 892**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/155** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011** **PCT/US2011/043103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012** **WO12006376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011** **E 11741348 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016** **EP 2590676**

54 Título: **Partículas de administración de tipo virión para moléculas de ARN autorreplicante**

30 Prioridad:

**06.07.2010 US 361828 P**

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

**13.02.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GEALL, ANDREW;**  
**MANDL, CHRISTIAN;**  
**O'HAGAN, DEREK y**  
**SINGH, MANMOHAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 600 892 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

Partículas de administración de tipo virión para moléculas de ARN autorreplicante

**Campo de la técnica**

La presente invención está en el campo de la administración no vírica de ARN autorreplicante para inmunización.

5 **Técnica anterior**

La administración ácidos nucleicos para inmunizar animales ha sido un objetivo durante varios años. Se han probado diversos enfoques, incluyendo el uso de ADN o ARN, de vehículos de administración víricos o no víricos (o incluso sin vehículo de administración, en una vacuna "desnuda"), de vectores replicantes o no replicantes o de vectores víricos o no víricos. Zhou y col., (Human Gene Therapy, 1999, vol. 10, no. 16, p. 2719–2724) y Saeki y col., (Human Gene Therapy, 1997, vol. 8, no. 17, p. 2133–2141) usaron liposomas HVJ, que comprendían una cápside proteica. Levine y col., (Nature Immunology, 2004, vol. 5, n.º 5, pág. 460–464) notifican el empaquetamiento del ARN replicón en viriones. Mockey y col., (Cancer Gene Therapy, 2007, vol. 14, n.º 9, pág. 802–814) y Martinon y col., (European Journal of Immunology, 1993, vol. 23, n.º 7, pág. 1719–1722) libran ARNm pero no ARN autorreplicante. Cannon y col., (DNA and Cell Biology, 2002, vol. 21, n.º 12, pág. 953–961) comunican datos en los que el ARN se empaquetó en viriones, se usó en forma desnuda o se adsorbió a partículas de oro.

Sigue habiendo una necesidad de más y mejores vacunas de ácido nucleico y, en particular, de formas mejoradas para administrar vacunas de ácidos nucleicos.

**Divulgación de la invención**

De acuerdo con la invención, la inmunización con ácido nucleico se logra mediante la administración de un ARN autorreplicante encapsulado dentro de partícula pequeña. El ARN codifica un inmunógeno de interés y la partícula puede administrar este ARN simulando la función administración de un virus natural.

Por tanto, la invención proporciona una partícula sin virión que no comprende una cápside proteica, para la administración *in vivo* de ARN en una célula de vertebrado, en la que la partícula es un liposoma y comprende un material de administración que encapsula una molécula de ARN autorreplicante que codifica un inmunógeno, en el que el inmunógeno es un polipéptido de la superficie y puede provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito, y el ARN no incluye nucleótidos modificados y, opcionalmente, incluye una caperuza en 5'. Estas partículas son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para la inmunización de sujetos contra diversas enfermedades. La combinación de la utilización de una partícula sin virión para administrar un ARN autorreplicante proporciona una manera de provocar una respuesta inmunitaria fuerte y específica contra el inmunógeno al tiempo que administra solamente una dosis baja de ARN. Además, estas partículas pueden fabricarse fácilmente a una escala comercial.

**La partícula**

Las partículas de la invención son partículas sin viriones, es decir, no son un virión. Por tanto, la partícula no comprende una cápside proteica. Al evitar la necesidad de crear una partícula de la cápside, la invención no requiere una línea celular de empaquetamiento, permitiendo de este modo un escalado más fácil para la producción comercial y la reducción al mínimo riesgo de que se produzcan inadvertidamente virus infecciosos peligrosos.

En lugar de encapsular el ARN en un virión, las partículas de la invención se forman a partir de un material de administración. Diversos materiales son adecuados para formar partículas que pueden administrar ARN a una célula de vertebrado *in vivo*. Los materiales de administración de particular interés son los lípidos anfífilos que pueden formar liposomas. Cuando la administración es por liposoma, el ARN debe estar encapsulado.

Por lo tanto, una realización de una partícula de la invención comprende un liposoma que encapsula una molécula de ARN autorreplicante que codifica un inmunógeno, tal como se define en las reivindicaciones. Las partículas son, preferiblemente, sustancialmente esféricas.

El ARN está encapsulado dentro de las partículas (la partícula es un liposoma). Esto significa que el ARN dentro de las partículas está (como en un virus natural) separado de cualquier medio externo por el material de administración y se ha descubierto que la encapsulación protege al ARN de la digestión de la ARNasa. La encapsulación puede adoptar diversas formas. Por ejemplo, en algunas formas de realización (como en un liposoma unilamellar), el material de administración forma una capa exterior alrededor de un núcleo acuoso que contiene ARN. Las partículas pueden incluir algunos ARN externo (por ejemplo, en la superficie de las partículas), pero al menos la mitad del ARN (y, preferiblemente, todo él) está encapsulado. La encapsulación en liposomas es distinta de, por ejemplo, los complejos de lípido/ARN divulgados en la referencia 1.

Liposomas

Varios lípidos anfifílicos pueden formar bicapas en un ambiente acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza hidrófilo aniónico, catiónico o zwitteriónico. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos se remonta a la década de 1960 y los lípidos catiónicos formadores de liposomas se llevan estudiando desde la década de 1990. Algunos fosfolípidos aniónicos, mientras que otros son zwitteriónicos y otros son catiónicos. Entre las clases adecuadas de fosfolípidos se incluyen, pero no se limitan a, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, y fosfatidilglicerol, y algunos fosfolípidos útiles se enumeran en la tabla 1. Entre los lípidos catiónicos útiles se incluyen, pero no se limitan a, dioleoil trimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-disteariloxi-N, N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 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). Entre los lípidos zwitteriónicos se incluyen, pero no se limitan a, lípidos zwitteriónicos de acilo y lípidos zwitteriónicos de éter. Ejemplos de lípidos zwitteriónicos útiles son DPPC, DOPC y dodecilsfosfolina. Los lípidos pueden ser saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido insaturado para preparar liposomas. Un lípido insaturado tiene dos colas, ambas colas pueden ser insaturadas o puede tener una cola saturada y una cola insaturada.

Las partículas liposómicas de la invención pueden formarse a partir de un único lípido o 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. Del mismo modo, una mezcla puede comprender lípidos tanto saturados como insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (zwitteriónico, saturado), DLinDMA (catiónico, insaturado), y/o DMG (aniónico, saturado). Cuando se usa una mezcla de lípidos, no todos de los lípidos de los componentes en la mezcla tienen que ser anfifílicos, por ejemplo uno o más lípidos anfifílicos se pueden mezclar con colesterol.

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 evitar la adsorción no específica de los liposomas. Por ejemplo, los lípidos se pueden conjugar con PEG usando técnicas tales como las divulgadas en la referencia 2 y 3. Se pueden utilizar varias longitudes de PEG, por ejemplo, entre 0,5-8 kDa.

En los ejemplos se usa una mezcla de DSPC, DLinDMA, PEG-DMG y colesterol.

Las partículas de liposomas se suelen dividir 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 separados. Las VUP y las VUG tienen una sola bicapa que encapsula un núcleo acuoso; las VUP normalmente tienen un diámetro  $\leq 50$  nm, y las VUG tienen un diámetro  $> 50$  nm. Las partículas liposómicas de la invención son, idealmente, VUG con un diámetro en el intervalo de 50 a 220 nm. Para una composición que comprende una población de VUG con diferentes diámetros: (i) al menos un 80 % en número debe tener diámetros en el intervalo de 20 a 220 nm, (ii) el diámetro promedio ( $Z_{av}$ , por intensidad) de la población está, idealmente, en el intervalo de 40-200 nm, y/o (iii) los diámetros deben tener un índice de polidispersidad  $< 0,2$ . Se espera que los complejos liposoma/ARN de la referencia 1 tengan un diámetro en el intervalo de 600-800 nm y tengan una polidispersidad alta.

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

**El ARN**

Las partículas de la invención incluyen una molécula de ARN autorreplicante que (a diferencia del ARNip) codifica un inmunógeno. Después de la administración *in vivo* de las partículas, el ARN se administra de las partículas y se traduce dentro de una célula para proporcionar el inmunógeno *in situ*.

A diferencia de referencia 13, el ARN en las partículas de la invención es autorreplicante. Una molécula de RNA autorreplicante (replicón) puede, cuando se administra a una célula de vertebrado, incluso sin ninguna proteína, conducir a la producción de múltiples ARN hija mediante transcripción de sí mismo (a través de una copia antisentido que se genera a partir de sí mismo). Una molécula de RNA autorreplicante es, por tanto, típicamente una molécula de hebra - + que se puede traducir directamente después de la administración a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que luego produce transcritos tanto sentido como antisentido a partir del ARN administrado. Por tanto, el RNA administrado conduce a la producción de múltiples ARN hijas. Estos ARN hija, así como los transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse a sí mismos para proporcionar la expresión *in situ* de un inmunógeno codificado, o pueden transcribirse para proporcionar más transcripciones con el mismo sentido que el ARN administrado, que se traducen para proporcionar la expresión *in*

*situ* del inmunógeno. Los resultados globales de esta secuencia de transcripciones es una amplificación enorme del número de ARN replicones introducidos y, por tanto, el inmunógeno codificado se convierte en un producto polipeptídico importante de las células.

Un sistema adecuado para la consecución de la autorreplicación de esta manera es utilizar un replicón basado en alfavirus. Estos replicones son ARN de hebra + - que conducen a la traducción de una replicasa (o replicasa transcriptasa) después de la administración en una célula. La replicasa se traduce como una poliproteína, que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de hebra -- genómica del ARN administrado de hebra +-. Estos transcritos de hebra -- pueden transcribirse a sí mismos a dar más copias del ARN parental de hebra +- y, también, para dar un transcrito subgenómico que codifica el inmunógeno. Por tanto, la traducción del transcrito subgenómico conduce a la expresión *in situ* del inmunógeno por la célula infectada. Replicones de alfavirus adecuados pueden utilizar una replicasa de un virus Sindbis, virus del bosque Semliki una, un virus de la encefalitis equina del este, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc. Se pueden usar secuencias de virus silvestres o mutantes, por ejemplo, el mutante atenuado TC83 de VEEV se ha utilizado en replicones [14].

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

Considerando que los genomas de alfavirus naturales codifican proteínas de virión estructurales además de la poliproteína de replicasa no estructural, se prefiere que las moléculas de ARN autorreplicantes de la invención no codifiquen proteínas estructurales de alfavirus. Por tanto, un ARN autorreplicante preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no para la producción de viriones que contienen ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN autorreplicante no puede perpetuarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus de tipo silvestre están ausentes de los ARN autorreplicantes de la invención y su lugar está ocupado por gen o genes que codifican el inmunógeno de interés, tal que el transcrito subgenómico codifica el inmunógeno en lugar de las proteínas del virión alfavirus estructurales.

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

Una molécula de ARN autorreplicante preferida tiene una caperuza en 5' (por ejemplo, una 7-metilguanosina). Esta caperuza puede mejorar la traducción del ARN *in vivo*. En algunas realizaciones, la secuencia 5' de la molécula de ARN autorreplicante debe seleccionarse para asegurar la compatibilidad con la replicasa codificada.

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

Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden tener diferentes longitudes, pero por lo general tienen una longitud de 5000-25000 nucleótidos, por ejemplo, 8000-15000 nucleótidos, o 9000-12000 nucleótidos. Por tanto, el ARN es más largo de lo que se ve en la administración de ARNpi.

Las moléculas de ARN autorreplicantes serán típicamente de una sola hebra. Los ARN de una sola hebra en general, pueden iniciar un efecto adyuvante mediante la unión a TLR7, TLR8, ARN helicasas y/o PKR. El ARN administrado en forma de doble hebra (ARNdc) se puede unir a TLR3, y este receptor también puede ser activado por ARNdc que se forma, bien durante la replicación de un ARN de cadena sencilla o dentro de la estructura secundaria de un ARN de cadena sencilla.

El ARN autorreplicante se pueden preparar convenientemente mediante transcripción *in vitro* (TIV). La TIV puede utilizar un molde (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias o creado sintéticamente (por ejemplo, mediante procedimientos de ingeniería de síntesis génica y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, se puede usar una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como las ARN polimerasas de bacteriófagos T7, T3 o SP6) para transcribir el ARN autorreplicante partir de un molde de ADN. Las reacciones de protección y de adición de poli A se pueden usar según sea necesario (aunque la poli-A del replicón generalmente se codifica dentro del molde de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener requisitos estrictos para el o los nucleótidos transcritos en 5' y en algunas realizaciones estos requisitos deben coincidir con los requisitos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito por TIV puede funcionar eficazmente como un sustrato para su replicasa autocodificada.

El ARN incluye nucleótidos no modificados, es decir todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos normales de A, C, G y U (con excepción de cualquier estructura de la caperuza en 5', que puede incluir una 7'-metilguanosina). En algunas realizaciones, el ARN puede incluir una caperuza en 5' comprende una 7'-

metilguanosa, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos en 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

Un RNA utilizado con la invención incluye idealmente solo enlaces fosfodiéster entre los nucleósidos, pero en algunas realizaciones puede contener enlaces fosforamidoato, fosforotioato y/o metilfosfonato.

- 5 La cantidad de RNA por partícula puede variar y el número de moléculas de ARN autorreplicantes individuales por partícula puede depender de las características de la partícula que se esté usando. En general, una partícula puede incluir de 1-500 moléculas de ARN. Para un liposoma, el número de moléculas de ARN es típicamente  $\leq 50$  por liposoma, por ejemplo,  $<20$ ,  $<10$ ,  $<5$ , o 1-4. Para una micropartícula polimérica, el número de moléculas de ARN dependerá del diámetro de las partículas, pero puede ser  $\leq 50$  por partícula (por ejemplo  $<20$ ,  $<10$ ,  $<5$ , o 1 a 4) o 50 - 200 por partícula. Idealmente, una partícula incluye menos de 10 especies diferentes de ARN, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o especies diferentes; más preferiblemente, una partícula incluye una única especie de ARN, es decir, todas las moléculas de ARN en la partícula tienen la misma secuencia y la misma longitud.

### El inmunógeno

- 15 Las moléculas de ARN autorreplicantes que se utilizan con la invención codifican un inmunógeno polipeptídico. Después de la administración de las partículas, el inmunógeno se traduce *in vivo* y puede provocar una respuesta inmunitaria en el receptor contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito (y, en algunas realizaciones, contra un alérgeno, y, en otras realizaciones, contra un antígeno tumoral). La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta de anticuerpos (normalmente incluyendo IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. El inmunógeno polipeptídico típicamente provocará una respuesta inmunitaria que reconoce el correspondiente polipéptido bacteriano, vírico, fúngico o parasitario (o alérgeno o tumor), pero, en algunas realizaciones, el polipéptido puede actuar como un mimotopo para provocar una respuesta inmunitaria que reconoce un sacárido bacteriano, vírico, fúngico o parásito. El inmunógeno es un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glicoproteína de la envoltura, una glicoproteína de espícula, etc.

- 25 Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden codificar un único inmunógeno polipeptídico múltiples polipéptidos. Múltiples inmunógenos se pueden presentar como un único inmunógeno polipeptídico (polipéptido de fusión) o como polipéptidos separados. Si los inmunógenos se expresan como polipéptidos separados, uno o más de estos pueden proporcionarse con un IRES aguas arriba o un elemento promotor vírico adicional. Como alternativa, múltiples inmunógenos se pueden expresar a partir de una poliproteína que codifica inmunógenos individuales fusionados a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo, la proteína 2A del virus de la enfermedad pie-boca), o como internas.

- 30 A diferencia de referencias 1 y 16, el ARN codifica un inmunógeno. Para evitar dudas, la invención no abarca ARN que codifica una luciferasa de luciérnaga o que codifica una proteína de fusión de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* o que codifica una proteína verde fluorescente (GFP). Además, el ARN no es ARN total de timo de ratón.

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

- 35 *Neisseria meningitidis*: inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, proteínas de membrana tales como adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro, y la proteína de unión al factor H. Una combinación de tres polipéptidos útiles se describe en la referencia 17.

*Streptococcus pneumoniae*: inmunógenos polipeptídicos útiles se divulgan en la referencia 18. Estos incluyen, pero no se limitan a, la subunidad de pilus RRG, el precursor beta-N-acetil-hexosaminidasa (spr0057), spr0096, la proteína de estrés general GSP-781 (spr2021, SP2216), serina/treonina quinasa StkP (SP 1732) y la adhesina de la superficie neumocócica PsaA.

- 40 *Streptococcus pyogenes*: inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos divulgados en las referencias 19 y 20.

*Moraxella catarrhalis*.

*Bordetella pertussis*: inmunógenos de pertussis útiles incluyen, pero no se limitan a, la toxina o el toxoide pertussis (TP), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina y los aglutinógenos 2 y 3.

- 45 *Staphylococcus aureus*: inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos divulgados en la referencia 21, tales como una hemolisina, esxA, esxB, proteína de unión a ferricromo-(sta006) y/o la lipoproteína sta011.

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

*Cornynebacterium diphtheriae*: el inmunógeno típico es el toxoide de la difteria.

- 50 *Haemophilus influenzae*: inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos divulgados en las referencias 22 y 23.

*Pseudomonas aeruginosa*

*Streptococcus agalactiae*: inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos divulgados en la referencia 19.

*Chlamydia trachomatis*: inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, PepA, LCRE, ArtJ, DnaK, CT398, OmpH-como, L7/L12, OmcA, Atos, CT547, Eno, HtrA y murg (por ejemplo, como se divulga en la referencia 24. LcrE [25] y HtrA [26]) son dos inmunógenos preferidos.

*Chlamydia pneumoniae*: inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos divulgados en la referencia 27.

*Helicobacter pylori*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, CagA, VacA, NAP, y/o ureasa [28].

*Escherichia coli*: Los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, inmunógenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), se *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Las cepas de ExPEC incluyen *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada con meningitis/sepsis (MNEC). Los inmunógenos polipeptídicos UPEC útiles se divulgan en las referencias 29 y 30. Los inmunógenos MNEC útiles se describen en la referencia 31. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es ACFD [32].

*Bacillus anthracis*

*Yersinia pestis*: inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos divulgados en las referencias 33 y 34.

*Staphylococcus epidermis*

*Clostridium perfringens* o *Clostridium botulinums*

*Legionella pneumophila*

*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*

*Haemophilus ducreyi*

*Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*

*Staphylococcus saprophyticus*

*Yersinia enterocolitica*

*Mycobacterium tuberculosis*

*Rickettsia*

*Listeria monocytogenes*

*Vibrio cholerae*

*Salmonella typhi*

*Borrelia burgdorferi*

*Porphyromonas gingivalis*

*Klebsiella*

En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra una de estos virus:

*Ortomixovirus*: inmunógenos útiles pueden ser de un virus de la gripe A, B o C, tales como las proteínas hemaglutinina, neuraminidasa o M2 de la matriz. 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 no se limitan a, aquellos derivados de pneumovirus (por ejemplo, el virus respiratorio sincitial, VRS), Rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), paramixovirus (por ejemplo, virus parainfluenza), metaneumovirus y morbilivirus (por ejemplo, sarampión).

5 *Poxviridae*: inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de Ortopoxvirus como *Variola vera*, incluyendo pero no limitados a, viruela mayor y viruela menor.

*Picornavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de picornavirus, tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiavirus y aftovirus. En una realización, el enterovirus es un ejemplo poliovirus, por ejemplo un poliovirus de tipo 1, de tipo 2 y/o de tipo 3. En otra realización, el enterovirus es un enterovirus EV71. En otra realización, el enterovirus es un virus coxsackie A o B.

10 *Bunyavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un *Orthobunyavirus*, tales como el virus de la encefalitis de California, un *Phlebovirus*, tal como el virus de la fiebre de Rift Valley, o un *Neurovirus*, como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

*Heparnavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de heparnavirus, tales como virus del virus de la hepatitis A (VHA).

15 *Filovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un filovirus, tal como el virus de ébola (incluyendo un virus ébola de Zaire, Costa de Marfil, Reston o Sudán) o un virus de Marburg.

*Togavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Togavirus, tales como un Rubivirus, un alfavirus, o un Arterivirus. Esto incluye el virus de la rubéola.

20 *Flavivirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Flavivirus, tales como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), el virus del dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de Kyasanur Forest, el virus de la encefalitis del Nilo occidental, el virus de la encefalitis de San Luis, el virus de la encefalitis rusa de primavera-verano, el virus de la encefalitis Powassan

25 *Pestivirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un pestivirus, tal como la diarrea bovina (vírica BVDV), la peste porcina clásica (CSFV) o la enfermedad de la frontera (BDV).

*Hepadnavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de hepadnavirus, tales como el virus de la hepatitis B (VHB). Una composición puede incluir antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

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

*Rhabdovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de rhabdovirus, tales como un Lyssavirus (por ejemplo, un virus de la rabia) y Vesiculovirus (VSV).

35 *Caliciviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de Caliciviridae, tales como el virus de Norwalk (norovirus), y los virus similares a Norwalk, tales como el virus de Hawai y el virus de montaña de nieve.

*Coronavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de coronavirus SARS, virus de la bronquitis aviar infecciosa (VBI), virus de la hepatitis de ratón (VHR) y virus de la gastroenteritis transmisible porcina (VGET). El inmunógeno de coronavirus puede ser un polipéptido espiga.

40 *Retrovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un oncovirus, un lentivirus (por ejemplo VIH-1 o VIH-2) o una espumavirus.

*Reovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un ortoreovirus, un rotavirus, un orbivirus, o un coltivirus.

*Parvovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de Parvovirus B19.

45 *Herpesvirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un virus del herpes humano, tales como, a modo de ejemplo únicamente, virus del herpes simple (VHS) (por ejemplo, VHS de tipos 1 y 2), virus de la varicela zoster (VVZ), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (VHH 6), virus del herpes humano 7 (VHH 7), y virus del herpes humano 8 (VHH 8).

50 *Papovavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de papilomavirus y poliomavirus. El papilomavirus (humana) puede ser de serotipo 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 o 65 por ejemplo, de uno o más de los serotipos 6, 11, 16 y/o 18.

*Adenovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de adenovirus de serotipo 36 (Ad-36).

- En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra un virus que infecta a los peces, tales como: virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus del siluro del canal (CCV), virus de la enfermedad de linfocistis del pescado (FLDV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI), herpesvirus koi, el virus de tipo picorna del salmón (también conocido virus de tipo picorna del salmón atlántico), virus del salmón encerrado (LSV), rotavirus del salmón del atlántico (ASR), virus de la enfermedad de la fresa de la trucha (TSD), virus del tumor del salmón coho (CSTV) o virus de la septicemia hemorrágica (SHV) vírica.
- Los inmunógenos fúngicos pueden derivar de dermatofitos, incluyendo: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton naeglini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. *album*, var. *discoideus*, var. *ochraceum*, *Trichophyton violaceum*, and/or *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 parakrusei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporidia*, *Encephalitozoon* spp., *Septata intestinalis* y *Enterocytozoon bienersi*; the less common are *Brachiola* spp, *Microsporidium* spp., *Nosema* spp., *Pleistophora* spp., *Trachipleistophora* spp., *Vittaforma* spp *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffe*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Mortierella* spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp y *Cladosporium* spp.
- En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra un parásito del género *Plasmodium*, tales como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. Por tanto, la invención se puede usar para inmunizar contra la malaria. En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra un parásito de la familia *Caligidae*, en particular los de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus* por ejemplo el piojo de mar, tales como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.
- En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra: Alérgenos del polen (alérgenos de polen de árboles, hierbas, malas hierbas y céspedes), alérgenos de insectos o arácnidos (inhalados, alérgenos de saliva y veneno, por ejemplo alérgenos de ácaros, alérgenos de cucarachas y mosquitos, alérgeno de veneno de himenópteros), alérgenos de pelo y caspa de animales (de, por ejemplo, perros, gatos, caballos, ratas, ratones, etc.) y alérgenos de alimentos (por ejemplo, *gliadina*). Alérgenos importantes de polen de árboles, céspedes y hierbas son los que proceden de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y platanaceae, incluidos, pero sin limitaciones, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), el orden de *Poales*, incluidos, entre otros céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales*, incluidos, entre otros, hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros importantes alérgenos de inhalación son los de ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaro de bodega, p. ej., *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquitos y pulgas, por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, y los de mamíferos tales como perros, gatos y caballos, alérgenos de venenos incluidos los que proceden de picaduras o mordeduras de insectos, tales como los del orden taxonómico de los himenópteros, incluidas abejas (*Apidae*), avispa (*Vespidae*) y hormigas (*Formicoidae*).
- En algunas realizaciones, el inmunógeno es un antígeno tumoral seleccionado de: (a) antígenos de cáncer de testículos, tales como NY-ESO-1, SSX2, SCP1 así como polipéptidos de las familias RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, y MAGE-12 (que se puede utilizar, por ejemplo, para hacer frente a tumores de melanoma, pulmón, cabeza y cuello, CPNMC, mama, gastrointestinal 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 (asociado con, por ejemplo, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, melanoma), caspasa-8 (asociada con, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina ( asociada con, por ejemplo, melanoma), TCR (asociado con, por ejemplo, linfoma no Hodgkin de células T), BCR-abl (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), isomerasa de trifosfato, KIA 0205, CDC-27, y LDLR -FUT; (c) antígenos sobreexpresados, por ejemplo, galactina 4 (asociada con, por ejemplo, cáncer colorrectal), galactina 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 (asociada con, por ejemplo, melanoma), HER-2/neu (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, de colon, de pulmón y de ovarios), mamaglobina, alfa-fetoproteína (asociada con, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada con, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica de la telomerasa, MUC-1 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama y de ovarios), G-250 (asociado con, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama y de colon), y antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, y cánceres del tracto gastrointestinal tal como cáncer colorrectal); (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanoma-melanocitos, tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína 1/TRP1 relacionada con la tirosinasa y proteína 2/TRP2 relacionada con la tirosinasa (asociada con, por ejemplo, melanoma); (e) antígenos asociados a la próstata, tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados con, por ejemplo, cáncer de próstata; (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados a mieloma y linfomas de células B, por ejemplo). En ciertas realizaciones, los inmunógenos de tumores incluyen, pero no se limitan a, p 15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del papilomavirus humano (HPV), incluyendo E6 y E7, antígenos del virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de células T, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27,29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2 /proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, y similares.

### **Composiciones farmacéuticas**

Las partículas de la invención son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para la inmunización de sujetos contra diversas enfermedades. Estas composiciones incluirán, típicamente un vehículo farmacéuticamente aceptable además de las partículas. En la referencia 35 se puede encontrar una exhaustiva discusión de vehículos farmacéuticamente aceptables.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir una o más inmunopotenciadores de molécula pequeña. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (por ejemplo Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (por ejemplo, un fosfato de aminoalquil lucosaminida, tal como E6020), un agonista de TLR7 (por ejemplo, imiquimod), un agonista TLR8 (por ejemplo, resiquimod) y/o un agonista de TLR9 (por ejemplo, IC31). Cualquier agonista idealmente tiene un peso molecular de <2000 Da. Cuando un RNA está encapsulado, en algunas realizaciones tales agonistas también están encapsulados con el ARN, pero en otras realizaciones no están encapsulados.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir las partículas en agua corriente (por ejemplo w.f.i.) o en un tampón, por ejemplo, un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón histidina o un tampón citrato. Normalmente, las sales tampón estarán incluidas en el intervalo de 5-20 mM.

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

Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro sódico) para dar tonicidad. Una concentración de  $10 \pm 2$  mg/ml de NaCl es típica, por ejemplo de aproximadamente 9 mg/ml.

Las composiciones de la invención pueden incluir quelantes de iones metálicos. Estos pueden prolongar la estabilidad del ARN mediante la eliminación de iones que pueden acelerar la hidrólisis de fosfodiéster. Por tanto, una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, etc. Tales quelantes están presentes, típicamente, 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 también ventajosamente proporciona actividad de tamponamiento.

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

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

Preferentemente, las composiciones de la invención son estériles.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la invención son apirógenas, por ejemplo que contienen < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente, < 0,1 UE por dosis.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la invención no tienen gluten.

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

Las composiciones se pueden preparar en forma de inyectables, bien como soluciones o suspensiones. La composición se puede preparar para administración pulmonar, *por ejemplo* en forma de un inhalador, usando un atomizador. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular, *por ejemplo* en forma de gotas o aerosol. Son típicos los inyectables para administración intramuscular.

- 5 Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de partícula, así como de cualquier otro componente especificado, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se quiere decir que la administración de dicha cantidad a un individuo, bien en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía en función de la salud y el estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (p. ej., primate no humano, primate etc.), la
- 10 capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico encargado del tratamiento de la situación médica y otros factores relevantes. Cabe esperar que la cantidad entre dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina. La partícula y el contenido de ARN de las composiciones de la invención se expresará, generalmente, en términos de la cantidad de ARN por dosis. Una dosis preferida tiene  $\leq 100 \mu\text{g}$  de ARN (por
- 15 ejemplo, 10 a  $100 \mu\text{g}$ , tal como aproximadamente  $10 \mu\text{g}$ ,  $25 \mu\text{g}$ ,  $50 \mu\text{g}$ ,  $75 \mu\text{g}$  o  $100 \mu\text{g}$ ), pero la expresión se puede ver a niveles mucho más bajos, por ejemplo,  $\leq 1 \mu\text{g/dosis}$ ,  $\leq 100 \text{ ng/dosis}$ ,  $\leq 10 \text{ ng/dosis}$ ,  $\leq 1 \text{ ng/dosis}$ , etc.

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

- 20 Las partículas de la invención no incluyen los ribosomas.

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

Al contrario que las partículas divulgadas en la referencia 16, las partículas y las composiciones farmacéuticas de la invención son para su uso *in vivo* para provocar una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno de interés

- 25 La invención proporciona una composición de partículas o farmacéutica de la invención para uso en un procedimiento para producir una respuesta inmunitaria en un vertebrado que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una partícula o composición farmacéutica de la invención. La respuesta inmunitaria es protectora y, preferiblemente, implica anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. El procedimiento puede provocar una respuesta de refuerzo.

- 30 Provocando una respuesta inmunitaria en el vertebrado mediante estos usos y procedimientos, se puede proteger al vertebrado contra varias enfermedades y/o infecciones por ejemplo contra las enfermedades bacterianas y/o víricas como se ha tratado anteriormente. Las partículas y las composiciones son inmunogénicas, y son más preferiblemente, composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas.

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

- 40 Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. Por tanto, un paciente humano puede ser de menos de 1 año de edad, de menos de 5 años de edad, de 1-5 años de edad, de 5-15 años de edad, de 15-55 años de edad, o de al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, de  $\leq 50$  años de edad,  $\geq 60$  años de edad, y, preferiblemente  $\geq 65$  años de edad), los jóvenes (por ejemplo, de  $\leq 5$  años de edad), pacientes hospitalizados, profesionales sanitarios,
- 45 servicios armados y personal militar, mujeres embarazadas, los pacientes con enfermedades crónicas o inmunodeficientes. No obstante, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, y pueden usarse en una población más general.

- En general, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido; al contrario que la referencia 1, la inyección intraglosal normalmente no se usa con la presente invención). Las vías de administración alternativas incluyen las
- 50 vías rectal, oral (por ejemplo, comprimido, aerosol), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración mucosa. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas. La inyección se puede realizar a través de una aguja (p. ej., una aguja hipodérmica) pero, como
- 55 alternativa, se puede usar la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

La invención puede utilizarse para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa, preferentemente para provocar una inmunidad sistémica y/o de la mucosa mejorada.

- La dosis puede seguir un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. En un calendario de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por la misma o diferentes vías, por ejemplo una sensibilización parenteral y un refuerzo en la mucosa, una sensibilización en la mucosa y un refuerzo parenteral etc. Las múltiples dosis se administrarán normalmente de al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). En una realización, se pueden administrar múltiples dosis aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del nacimiento, por ejemplo, a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como la frecuencia usada en el Programa de ampliación de la inmunización de la Organización Mundial de la Salud ("EPI"). En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias con aproximadamente dos meses de diferencia, por ejemplo, con aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguidas de una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias con aproximadamente dos meses de diferencia, por ejemplo, con aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguidas de una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses a 1 año después de la tercera dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

### General

- La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la literatura. Véanse, por ejemplo, las referencias 36-42 etc.

El término "que comprende" abarca (que incluye" además de "constituido por", *por ejemplo* una composición "que comprende" X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo* X + Y.

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

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

Las referencias a cargas, cationes, aniones, zwitteriones etc., se toman a un pH de 7.

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

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

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

- El receptor de tipo RIG-I ("RLR"), la familia incluye varias ARN helicasas que desempeñan papeles clave en el sistema inmunológico innato [43]. RLR-1 (también conocido como RIG-I o el gen I inducible de ácido retinoico) tiene dos dominios de reclutamiento de caspasas cerca de su extremo N-terminal. El nombre HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-1 es "DDX58" (por DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) polipéptido de la caja 58) y la única ID de HGNC es HGNC: 19.102. La secuencia RefSeq para el gen de RLR-1 humano es GI: 77732514. 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 extremo N-terminal. El nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-2 es "IFIH1" (para interferón inducido con el dominio 1 de la helicasa C 1) y la única ID de HGNC es HGNC: 18873. La secuencia RefSeq para el gen humano del RLR-2 es GI: 27886567. RLR-3 (también conocida como LGP2 o laboratorio de la genética y fisiología 2) no tiene dominios de reclutamiento de caspasas. El nombre HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-3 es "DHHX58" (para DExH (Asp-Glu-His-X) polipéptido de la caja 58) y la única ID de HGNC es HGNC: 29.517. La secuencia RefSeq para el gen RLR-3 humana es GI: 149408121.

- PKR es una proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena. Desempeña un papel clave en el sistema inmunológico innato. "EIF2AK2" (para el factor de iniciación de la traducción en eucariotas 2-alfa quinasa 2) es el nombre HGNC aprobado para el gen que codifica esta enzima y su ID única HGNC es HGNC:9437. La secuencia

RefSeq para el gen de PKR humano es GI: 208431825.

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

- 5 La Figura 1 muestra un gel con ARN teñido. Los carriles muestran (1) marcadores (2) replicón desnudo (3) replicón después de tratamiento con ARNasa (4) replicón encapsulado en liposoma (5) liposoma después de tratamiento con ARNasa (6) liposoma tratado con ARNasa después se sometió a extracción con fenol/cloroformo.
- La Figura 2 es una micrografía electrónica de liposomas.
- 10 La figura 3 muestra la expresión proteica (como unidades de luz relativa, ULR) los días 1, 3 y 6 después de la administración de ARN como un replicón empaquetado en virión (cuadrados), ARN desnudo (triángulos) o como micropartículas (círculos).
- La figura 4 muestra un gel con ARN teñido. Los carriles muestran (1) marcadores (2) replicón desnudo (3) replicón encapsulado en liposoma (4) liposoma tratado con ARNasa, después se sometió a extracción con fenol/cloroformo.
- 15 La figura 5 muestra la expresión de proteínas los días 1, 3 y 6 después de la administración de ARN como un replicón empaquetado en viriones (cuadrados), como ARN desnudo (rombos) o en liposomas (+ = 0,1 µg, x = 1 µg).
- La figura 6 muestra la expresión de proteínas los días 1, 3 y 6 después de la administración de cuatro dosis diferentes de ARN encapsulado en liposomas.
- 20 La figura 7 muestra los títulos de IgG anti-F en los animales que recibieron replicón empaquetado en viriones (VRP o VSRP), 1 µg de ARN desnudo, y 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.
- La figura 8 muestra los títulos de IgG anti-F en los animales que recibieron VRP, 1 µg de ARN desnudo y 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.
- La figura 9 muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes en animales que recibieron VRP o sea 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.
- 25 La figura 10 muestra los niveles de expresión después de la administración de un replicón como ARN desnudo (círculos), ARN encapsulado en liposomas (triángulo y cuadrado), o como un lipoplex (triángulo invertido).
- La figura 11 muestra los títulos de IgG específicas de F (2 semanas después de la segunda dosis) después de la administración de un replicón como ARN desnudo (0,01–1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,01–10 µg), o empaquetado como un virión (VRP, 10<sup>6</sup> unidades infecciosas o UI).
- 30 La figura 12 muestra los títulos de IgG específicas de F (círculos) y títulos de PRNT (cuadrados) después de la administración de un replicón como ARN desnudo (1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg), o empaquetado como un virión (VRP, 10<sup>6</sup> unidades infecciosas o UI). También se muestran los títulos en los ratones no tratados. Las líneas continuas muestran las medias geométricas.
- 35 La figura 13 muestra la producción de citoquinas intracelulares después de la reestimulación con los péptidos sintéticos que representan los principales epítomos en la proteína F, 4 semanas después de una segunda dosis. El eje Y muestra el % de citocinas de las células CD8 + CD4 +.
- La figura 14 muestra los títulos de IgG específicos de F (media de los títulos log<sub>10</sub> ± desviación estándar) en 63 días (Figura 14A) y 210 días (Figura 14B) después de la vacunación de terneros. Las tres líneas se distinguen fácilmente el día 63 y son, de abajo a arriba: control negativo de PBS; ARN administrado de liposomas y el producto "Triángulo 4".
- 40 La figura 15 muestra los títulos de IgG anti-VIH en suero en respuesta a ADN desnudo ("ARN") o encapsulado en liposomas ("LNP") ARN, o ADN administrado mediante electroporación en músculo.
- La figura 16 muestra los títulos de IgG en 13 grupos de ratones. Cada círculo es un ratón individual, y las líneas continuas muestran las medias geométricas. La línea horizontal discontinua es el límite de detección del ensayo. Los 13 grupos son, de izquierda a derecha, de A a M como se describe a continuación.
- 45 La figura 17 muestra (A) IL-6 y (B) IFNα (pg/ml) administrado por pDC. Hay 4 pares de barras, de izquierda a derecha: control; inmunizados con RNA + DOTAP; inmunizados con RNA + lipofectamina; e inmunizados con ARN en liposomas. En cada par, la barra negra son ratones de tipo silvestre, la gris es mutante *rsq1*.

## **Modos para realizar la invención**

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

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

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

Después de la linealización del ADN plasmídico aguas abajo de la ribozima del HDV con una endonucleasa de restricción adecuada, los transcritos no iniciados *in vitro* se sintetizaron usando la ARN polimerasa dependiente de ADN derivada del bacteriófago T7 o SP6. 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 trifosfatos de nucleósidos (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 replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. El ARN sin caperuza se protegió postranscripcionalmente con la enzima de protección de vaccinia (VCE) utilizando el Sistema de protección ScriptCap m7G (Epicentre Biotechnologies) como se indica en el manual del usuario; los replicones protegidos de este modo reciben el prefijo "v", por ejemplo vA317 es el replicón A317 protegido mediante VCE. El ARN protegido postranscripcionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo DO<sub>260nm</sub>. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa de desnaturalización.

### ***Absorción de PLG (ejemplo de referencia)***

Las micropartículas se fabricaron utilizando 500 mg de PLG RG503 (relación molar 50:50 de lactida/glicólido, PM ~ 30 kDa) y 20 mg de DOTAP usando un homogeneizador Omni Macro. La suspensión de partículas se agitó a 150 rpm durante la noche y después se filtró a través de un filtro estéril de 40 µm para el almacenamiento a 2-8 °C. El ARN autorreplicante fue adsorbido a las partículas. Para preparar 1 ml de suspensión PLG/ARN se añadió el volumen requerido de la suspensión de partículas de PLG a un vial y se añadió agua libre de nucleasa para llevar el volumen a 900 µl. Se añadió, gota a gota, 100 µl de ARN (10 µg/ml) a la suspensión de PLG, con agitación constante. Se incubó PLG/RNA a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para 1 ml de la suspensión reconstituida, se añadieron 45 mg de manitol, 15 mg de sacarosa y 250 a 500 µg de PVA. Los viales se congelaron a -80 °C y se liofilizaron.

Para evaluar la adsorción de ARN, la suspensión de 100 µl de partículas se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. PLG/ARN se reconstituyó con 1 ml de agua libre de nucleasa. A la suspensión de partículas de 100 µl (1 µg de ARN), se añadió 1 mg de sulfato de heparina. La mezcla se agitó con vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para la desorción del ARN. La suspensión de partículas se centrifugó y se recogió el sobrenadante.

Para la estabilidad de ARNasa, la suspensión de partículas de 100 µl se incubó con 6,4 mUA de ARNasa A a temperatura ambiente durante 30 minutos. La ARNasa se inactivó con 0,126 mUA de proteinasa K a 55 °C durante 10 minutos. Se añadió 1 mg de sulfato de heparina para desorber el ARN, seguido de centrifugación. Las muestras de sobrenadante que contienen ARN se mezclaron con colorante de carga de formaldehído, se calentaron a 65 °C durante 10 minutos y se analizaron usando un gel desnaturalizante al 1 % (460 ng de ARN cargados por carril).

Para evaluar la expresión, se inmunizó a ratones Balb/c con 1 µg de ARN en 100 µl de volumen de inyección intramuscular (50 µl/pata) el día 0. Los sueros se recogieron los días 1, 3 y 6. La expresión de proteínas se determinó utilizando un ensayo de quimioluminiscencia. Como se muestra en la Figura 3, la expresión fue mayor cuando el ARN se administró mediante PLG (triángulos) que sin ninguna partícula de administración (círculos).

### ***Encapsulación en liposomas***

El ARN se encapsula en liposomas preparados por el procedimiento de las referencias 7 y 44. Los liposomas se fabricaron con 10 % de DSPC (zwitteriónicos), 40 % de DlinDMA (catiónicos), 48 % de colesterol y 2 % de DMG conjugado con PEG (2 kDa de PEG). Estas proporciones se refieren al 5 en moles en el liposoma total.

DlinDMA (1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) se sintetizó usando el procedimiento de referencia 2. DSPC (1,2-diastearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) se adquirió en Genzyme. El colesterol se obtuvo en Sigma-Aldrich. DMG conjugada con PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [metoxi(polietilenglicol), sal de amonio), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, sal de cloruro) y DC-Chol (3 $\beta$ - [N-(N',N'-dimetilaminoetano) carbamoil] clorhidrato de colesterol) eran de Avanti Polar Lipids.

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

Por ejemplo, en un procedimiento particular, se prepararon soluciones madre de lípidos frescas en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre lipídica recién preparada se balanceó suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 755  $\mu$ l de la solución madre a 1,245 ml de etanol para hacer una solución madre de lípidos 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 2 ml de ARN de trabajo a partir de una solución madre de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l en 100 mM de tampón citrato 100 mM (pH 6). Tres viales de 20 ml de vidrio (con barras de agitación) se aclararon con solución ARNasa Away (Molecular Bioproducts) y se lavaron con abundante agua Milli-Q antes de su uso para la descontaminación de los viales de ARNasas. Uno de los viales se utilizó para la solución de trabajo de ARN y los otros para la recogida de las mezclas de lípidos y de ARN (como se describe más adelante). Las soluciones de trabajo de lípidos y de ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarse en jeringas de cierre de tipo luer de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contienen ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador de T (PEEK™ 500  $\mu$ m Identificación de conexiones, IDEX Health Science) utilizando tubos de FEP (propileno-etileno fluorado; todos los tubos de FEP utilizados tenían un diámetro interno de 2 mm y un diámetro exterior de 3 mm; obtenido de IDEX Health Science). La salida de la mezcladora T era también un tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón citrato fue conectado a una pieza separada de la tubería. Todas las jeringas se accionaron a continuación a un caudal de 7 ml/min utilizando una bomba de jeringa. Las salidas de tubos se posicionaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). La barra de agitación se sacó y se dejó que la solución de etanol/acuosa se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se conectó a una pieza de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cc conectada a una longitud igual de tubo de FEP, se aisló una cantidad igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 7 ml/min utilizando la bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agita). A continuación, la mezcla obtenida de la segunda etapa de mezcla (liposomas) se pasó a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico al que se unen y se retiran moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation). Antes de utilizar esta membrana para los liposomas, 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6) se hicieron pasar sucesivamente a través de la misma. Los liposomas se calentaron durante 10 minutos a 37 °C antes de pasar a través de la membrana. A continuación, los liposomas se concentraron hasta 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de 1X PBS utilizando por filtración de flujo tangencial antes de recuperar el producto final. El sistema TFF y las membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs (Rancho Domínguez) y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron membranas de filtración de polisulfona de fibra hueca con un corte de tamaño de poro de 100 kD d y 8 cm<sup>2</sup> de área de superficie. Para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con 1X PBS. Otros procedimientos de fabricación de liposomas se describen a continuación.

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

El porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN determinaron mediante el kit de reactivos Quant-iT RiboGreen (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El patrón del ARN ribosómico proporcionado en el kit se utilizó para generar una curva estándar. Los liposomas se diluyeron 10 veces o 100 veces en 1X TE del tampón (del kit) antes de la adición del colorante. Por separado, los liposomas se diluyeron 10 veces o 100 veces en tampón 1X TE que contiene 0,5 % de Triton X antes de la adición del colorante (para interrumpir los liposomas y, por lo tanto, para analizar el ARN total). A partir de entonces se añadió una cantidad igual del colorante a cada solución y luego ~ 180  $\mu$ l de cada solución después de la adición de colorante se cargó 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* basado en la cantidad encapsulada de ARN.

La encapsulación en liposomas se demostró que protegía el ARN de la digestión de ENASA. Los experimentos utilizaron 3,8 mUA de la ARNasa A por microgramo de ARN, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La ARNasa se inactiva con proteinasa K a 55 °C durante 10 minutos. Una mezcla 1: 1 v/v de la muestra a 25: 24: 1 v/v/v, fenol: cloroformo:alcohol isoamílico se añadió para extraer el ARN a partir de los lípidos en la fase acuosa. Las muestras se mezclaron por agitación en vórtex durante unos segundos y después se introdujeron en una centrífuga durante 15 minutos a 12 k rpm. La fase acuosa (que contenía en ARN) se retiró y se utilizó para analizar el ARN. Antes de la carga (400 ng de ARN por pocillo) todas las muestras se incubaron con medio de carga

de formaldehído, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65 °C y se enfriaron a temperatura ambiente. Se usaron marcadores Ambion Millennium para aproximar el peso molecular de la construcción de ARN. El gel se pasó a 90 V. El gel se tiñó usando 0,1 % de oro SYBR de acuerdo con las instrucciones del fabricante en agua mediante balanceo a temperatura ambiente durante 1 hora. Figura 1 muestra que la ENASA digiere completamente el ARN en ausencia de encapsulación (carril 3). El ARN es indetectable después de la encapsulación (carril 4) y no se ve ningún cambio si estos liposomas son tratados con ARNasa (carril 4). Después de someter a los liposomas tratados con ARNasa a extracción con fenol, se ve ARN sin digerir (carril 6). Incluso después de 1 semana a 4 °C, se pudo ver el ARN sin ninguna fragmentación (Figura 4, flecha). La expresión de proteínas *in vivo* se mantuvo sin cambios después de 6 semanas a 4 °C y un ciclo de congelación-descongelación. Por lo tanto, el ARN encapsulado en liposomas es estable.

Para evaluar la expresión *in vivo* del ARN, una enzima indicadora (SEAP; fosfatasa alcalina secretada) estaba codificada en el replicón, en lugar de un inmunógeno. Los niveles de expresión se midieron en sueros diluidos 1:4 en tampón de dilución 1X Phospha-Light usando un sustrato de fosfatasa alcalina quimioluminiscente. En ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad (5/grupo) se inyectó por vía intramuscular el día 0, 50 µl por pata con dosis de 0,1 µg o 1 µg de ARN. Lo mismo vector también se administró sin los liposomas (en 1X PBS sin ARNasa) a 1 µg. Los replicones empaquetados en viriones también se analizaron. Los replicones empaquetados en viriones utilizados en el presente documento (a los que se hace referencia como "VRP") se obtuvieron mediante los procedimientos de la referencia 45, en el que el replicón alfavirus deriva del VEEV mutante o una quimera derivada del genoma de VEEV modificada por ingeniería genética para que contenga la 3' UTR de virus Sindbis y una señal de empaquetamiento del virus Sindbis (PS), se empaquetaron mediante co-electroporación en células BHK con ARN auxiliares defectuosos que codifican la cápside del virus Sindbis y genes de glicoproteínas.

Como se muestra en la Figura 5, la encapsulación aumentó los niveles de SEAP en aproximadamente ½ log a la dosis de 1 µg y la expresión el día 6 de una dosis encapsulada de 0,1 µg coincidió con los niveles observados con la dosis de 1 µg sin encapsular. El día 3, los niveles de expresión superaron los alcanzados con VRP (cuadrados). Por lo tanto, la expresión aumentó cuando el ARN se formuló en los liposomas en relación con el control de ARN desnudo, incluso a una dosis 10 veces más baja. La expresión también fue mayor en relación con el control de VRP, pero la cinética de expresión fue muy diferente (véase la Figura 5). La administración del ARN con la electroporación resultó en un aumento de la expresión con respecto al control de ARN desnudo, pero estos niveles fueron más bajos que con liposomas.

Otros experimentos de SEAP mostraron una respuesta clara a la dosis *in vivo*, observándose expresión después de la administración de tan sólo 1 ng de ARN (Figura 6). Otros experimentos que comparan la expresión de replicones encapsulados y desnudos indicaron que 0,01 µg de ARN encapsulado era equivalente a 1 µg de ARN desnudo. A una dosis de 0,5 µg de ARN, el material encapsulado dio una expresión 12 veces más alta el día 6; a la dosis de 0,1 µg, los niveles fueron 24 veces más altos el día 6.

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

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

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

La figura 13 confirma que el RNA provoca una sólida respuesta de las células T CD8.

En otros experimentos se compararon los títulos de IgG específicos de F en ratones tratados con VRP, 0,1 µg de ARN encapsulado en liposomas o 1,0 µg de ARN encapsulado en liposomas. Las relaciones de títulos (VRP: Liposoma) a varios tiempos después de la segunda dosis fueron las siguientes:

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

Por tanto, el ARN encapsulado en liposomas induce esencialmente la misma magnitud de la respuesta inmunitaria que la que se ve con la administración del virión.

Otros experimentos mostraron respuestas de IgG específicas de F superiores con una dosis de 10 µg, respuestas equivalentes para las dosis de 1 µg y 0,1 µg y una respuesta menor con una dosis de 0,01 µg. La Figura 11 muestra los títulos de IgG en ratones que recibieron el replicón en forma desnuda a 3 dosis diferentes, en liposomas a 4 dosis diferentes, o como VRP (10<sup>6</sup> UI) La respuesta observada con 1 µg de ARN encapsulado en liposomas fue estadísticamente insignificante (ANOVA) en comparación con VRP, pero la mayor respuesta observada con 10 µg de ARN encapsulado en liposomas fue estadísticamente significativa (p < 0,05) en comparación con estos grupos.

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

Ratones mostraron pocos signos visuales de angustia (pérdida de peso, etc.) después de recibir el replicón de ARN encapsulado en liposomas, aunque se observó una pérdida de peso transitoria de 3-4 % después de una segunda dosis de 10 µg de ARN. Por el contrario, la administración de 10 µg de ADN encapsulado en liposomas condujo a una pérdida de peso del 8-10 %.

#### **Mecanismo de acción:**

Las células dendríticas derivadas de la médula ósea (pDC) se obtuvieron de ratones de tipo silvestre o de la cepa mutante "ResQ" (*rsq1*). La cepa mutante tiene una mutación puntual en el amino terminal de su receptor TLR7 que suprime la señalización de TLR7 sin afectar a la unión del ligando [46]. Las células se estimularon con el ARN replicón formulado con DOTAP, lipofectamina 2000 o dentro de un liposoma. Como se muestra en la Figura 17, se indujeron IL-6 e INFα en las células WT, pero esta respuesta se anuló casi completamente en ratones mutantes. Estos resultados muestran que se requiere TLR7 para el reconocimiento de ARN en las células inmunitarias y que los replicones encapsulados en liposomas pueden causar que las células inmunitarias secreten altos niveles tanto de interferones como de citocinas proinflamatorias.

En general, se mostró que los replicones de ARN administrados en liposomas inducían varias citocinas en suero en un plazo de 24 horas desde la inyección intramuscular (IFN-α, IP-10 (CXCL-10), IL-6, KC, IL-5, IL-13, MCP-1 y MIP-a), mientras que solo se indujo MIP-1 mediante ARN desnudo y el liposoma solo indujo únicamente IL-6.

Se demostró que el IFN-α contribuía a la respuesta inmunitaria al replicón que codifica F de VRS encapsulado en liposomas, ya que un anticuerpo del receptor anti-IFNα redujo los niveles de IgG en suero específicos de F a una reducción por 10 veces después de 2 vacunaciones.

Generalmente se ha observado que los replicones de ARN administrados en liposomas producían un perfil de subtipo IgG1:IgG2a en ratones, a veces con una relación de IgG2a/IgG1 mayor que la observada con el ADN sometido a electroporación o con inmunizaciones con proteína/MF59 (es decir, una respuesta inmunitaria de tipo Th1).

#### **Procedimientos de fabricación de liposomas**

En general, se han utilizado ocho procedimientos diferentes para la preparación de liposomas de acuerdo con la invención. Estos se denominan en el texto procedimientos (A) a (H) y difieren principalmente en la relación con las etapas de filtración y TFF. Los detalles son los siguientes:

(A) Se prepararon soluciones madre de lípidos frescas en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG DMG 2000 y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre lipídica recién preparada se balanceó suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 755 µl de la solución madre a 1,245 ml de etanol para hacer una solución madre de lípidos de trabajo de 2 ml. Se utilizó esta cantidad de lípidos para formar liposomas con 250 µg de ARN. También se preparó una solución de 2 ml de ARN de trabajo a partir de una solución madre de 1 µg/µl en 100 mM de tampón citrato 100 mM (pH 6). Tres viales de 20 ml de vidrio (con barras de agitación) se aclararon con solución ARNasa Away (Molecular Bioproducts, San Diego, CA) y se lavaron con abundante agua Milli-Q antes de su uso para la descontaminación de los viales de ARNasas. Uno de los viales se utilizó para la solución de trabajo de ARN y los otros para la recogida de las mezclas de lípidos y de ARN (como se describe más adelante). Las soluciones de trabajo de lípidos y de ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarse en jeringas de cierre de tipo luer de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contienen ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador de T (PEEK™ 500 µm Identificación de conexiones, Idex Health Science, Oak Harbor, WA) utilizando tubos de FEP (propileno-etileno fluorado; todos los tubos de FEP tenían un diámetro interno de 2 mm y un diámetro exterior de 3 mm; suministrado por Idex Health Science). La salida de la mezcladora T era también un tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón citrato fue conectado a una pieza separada de tubos de FEP. Todas las jeringas se accionaron a continuación a un caudal de 7 ml/min utilizando una bomba de jeringa. Las salidas de



tubos se posicionaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). La barra de agitación se sacó y se dejó que la solución de etanol/acuosa se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se conectó a una pieza del tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cc conectada a una longitud igual de tubo de FEP, se aisló una cantidad igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 7 ml/min utilizando la bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agita). A continuación, la mezcla obtenida de la segunda etapa de mezcla (liposomas) se pasó a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico al que se unen y se retiran moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation, Ann Arbor, MI, EE.UU.). Antes de pasar los liposomas, 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6) se hicieron pasar sucesivamente a través de la membrana Mustang. Los liposomas se calentaron durante 10 minutos a 37 °C antes de pasar a través de la membrana. A continuación, los liposomas se concentraron hasta 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de 1X PBS utilizando TFF antes de recuperar el producto final. El sistema TFF y las membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron de Spectrum Labs y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron membranas de filtración de polisulfona de fibra hueca (número de parte P/N: X1AB-100-20P) con un corte de tamaño de poro de 100 kD y 8 cm<sup>2</sup> de área de superficie. Para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con 1X PBS.

(B) Como procedimiento (A), excepto que, después del balanceo, se añadieron 226,7 µl l de la solución madre a 1.773 ml de etanol para preparar una solución madre lipídica de trabajo de 2 ml, modificando así la relación de lípido: ARN.

(C) Como procedimiento (B), excepto que la filtración Mustang se omitió, por lo que los liposomas pasaron del vial de vidrio de 20 ml en la diálisis TFF.

(D) Como procedimiento (C), excepto que la TFF utilizó membranas de fibra hueca de polietersulfona (PES) (número de pieza P-C1-100E-100-01N) con un corte de tamaño de poro de 100 kD y 20 cm<sup>2</sup> de superficie.

(E) Como procedimiento (D) excepto que se utilizó una membrana de Mustang, como en el procedimiento (A)

(F) Como procedimiento (A), excepto que la filtración Mustang se omitió, por lo que los liposomas pasaron del vial de vidrio de 20 ml en la diálisis TFF.

(G) como el procedimiento (D), excepto que se preparó una solución de 4 ml de ARN de trabajo a partir de una solución madre de 1 µg/µl en 100 mM de tampón citrato 100 mM (pH 6). Después, se prepararon cuatro viales de vidrio de 20 ml de la misma manera. Dos de ellos se utilizaron para la solución de trabajo de ARN (2 ml en cada vial) y los otros para la recogida de las mezclas de lípidos y de ARN, como en (C). En lugar de usar el mezclador T, las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a uMitos Droplet junction Chip (un dispositivo para microfluidos de vidrio obtenida de Syrris, parte número 3000158) usando tubos de PTFE (diámetro interno de 0,07 cm x 0,17 cm de diámetro externo) usando un conector de bordes de 4 lados (Syrris). Las bombas de jeringa impulsaron dos corrientes de ARN y una corriente de lípidos y la mezcla del etanol y la fase acuosa se realizó en la unión X (100 µm x 105 µm) del circuito. El caudal de de las tres corrientes se mantuvo a 1,5 ml/min, por lo tanto, la relación del caudal total de la fase acuosa y la etanólica fue 2:1. La salida del tubo se posicionó para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agita). La barra de agitación se sacó y se dejó que la solución de etanol/acuosa se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la mezcla se cargó en una jeringa de 5 cc, que estaba equipada con otra pieza del tubo de PTFE; en otra jeringa de 5 cc con una longitud igual de los tubos de PTFE, se cargó un volumen igual de 100 mM de tampón citrato (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 3 ml/min utilizando una bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agita). A continuación, los liposomas se concentraron hasta 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de 1X PBS utilizando TFF como en (D).

(H) Como el procedimiento (A), excepto que los 2 ml de la solución madre lipídica de trabajo se hizo mezclando 120,9 µl de la solución madre de lípidos con 1879 ml de etanol. Además, después de la mezcla en el mezclador T, los liposomas del vial de 20 ml se cargaron en un casete de diálisis Pierce Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, de mayor resistencia, capacidad de 0,5-3 ml) y se dializó frente a 400-500 ml de 1X PBS durante la noche a 4 °C en un recipiente de plástico en autoclave antes de recuperar el producto final.

## Expresión de BHK

Los liposomas con diferentes lípidos se incubaron con células BHK durante la noche y se evaluaron para determinar la potencia de expresión de proteínas. Desde un momento basal con la expresión de lípidos de RV05 se podría aumentar 18x mediante la adición de 10 % de 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE) al liposoma, 10x mediante la adición de 10 % de 18:2 (cis) fosfatidilcolina, y 900x en lugar de utilizar RV01.

En general, los estudios *in vivo* mostraron que las colas de lípidos insaturados tienden a mejorar los títulos de IgG dirigidos contra antígenos codificados.

## Inmunogenicidad del VRS

El replicón autorreplicantes vA317 que codifican la proteína F de VRS se administró a ratones BALB/c, 4 u 8 animales por grupo, mediante vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con el replicón (1 µg) solo o formulado como liposomas con DlinDMA ("RV01") o DOTAP ("RV13"). Los liposomas RV01 tenían 40 % de DlinDMA, 10 % de DSPC, 48 % de colesterol y 2 % de PEG-DMG, pero con diferentes cantidades de ARN. Los liposomas RV13 tenían 40 % de DOTAP, 10 % de DPE, 48 % de colesterol y 2 % de PEG-DMG. Para la

comparación, el ADN plásmido desnudo (20 µg) que expresan el mismo antígeno F del VRS se administró usando electroporación o con liposomas RV01 (10) (0,1 µg de ADN). Se utilizaron cuatro ratones como grupo de control intacto.

- 5 Los liposomas se prepararon por el procedimiento de (D) o el procedimiento (B). Para algunos liposomas preparados por el procedimiento (D) se utilizó el doble o la mitad de la cantidad de ARN. El diámetro promedio Z de partícula, el índice de polidispersidad y la eficiencia de la encapsulación de los liposomas fueron los siguientes:

RV	Zav (nm)	pdl	% de encapsulación	Preparación
RV01 (10)	158,6	0,088	90,7	(A)
RV01 (08)	156,8	0,144	88,6	(A)
RV01 (05)	136,5	0,136	99	(B)
RV01 (09)	153,2	0,067	76,7	(A)
RV01 (10)	134,7	0,147	87,8 *	(A)
RV13 (02)	128,3	0,179	97	(A)
*Para esta formulación RV01 (10), el ácido nucleico fue ADN no ARN				

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

- 10 Los títulos de IgG específicos de F en suero (GMT) fueron los siguientes:

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

La proporción de células T que son positivas para citocinas y específicas para el péptido RSV F51-66 son las siguientes, lo que muestra solo las cifras que están estadísticamente significativamente por encima de cero:

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

- 15 Por tanto, las formulaciones de liposomas mejoraron de forma significativa la inmunogenicidad con respecto a los controles de ARN desnudo, tal como se determina por el aumento de los títulos de IgG específicas de F y las frecuencias de las células T. El ADN plasmídico formulado con liposomas, o administrado desnudo utilizando

electroporación, fue significativamente menos inmunogénico que el ARN autorreplicante formulado en liposomas.

Las vacunas de ARN RV01 eran más inmunogénicas que la vacuna RV13. RV01 tiene una amina terciaria en el grupo de cabeza con un  $pK_a$  de aproximadamente 5,8, y también incluyen colas alquilo insaturado. RV13 tiene colas alquilo insaturado, pero su grupo de cabeza tiene una amina cuaternaria y es muy fuertemente catiónico.

#### 5 **Liposomas: requisitos para encapsulación**

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

Otros experimentos utilizaron tres ARN diferentes: (i) replicón 'vA317' que expresa RSV-F, es decir, la glicoproteína de fusión de superficie de RSV; (ii) replicón 'va17' que expresa GFP; y (iii) 'vA336' con replicación defectuosa y codifica GFP.

Los ARN se administrados desnudos o con liposomas preparados por el procedimiento (D). Los liposomas vacíos se hicieron por el procedimiento de (D), pero sin ningún tipo de ARN. Cuatro formulaciones de liposomas tenían las siguientes características:

ARN	Zav del tamaño de partícula (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	—

Se administró a ratones BALB/c, a 5 animales por grupo, vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con:

20 Grupo 1 ARN RSV-F autorreplicante desnudo (vA317, 0,1 µg)

Grupo 2 ARN RSV-F autorreplicante (vA317, 0,1 µg) encapsulado en liposomas

Grupo 3 ARN RSV-F autorreplicante (vA317, 0,1 µg) añadido a liposomas vacíos

Grupo 4 Proteína de la subunidad F (5 µg)

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

Los títulos de IgG fueron los siguientes en los 10 grupos y en ratones de control no inmunizados

Día	1	2	3	4	—
14	22	1819	5	5	5
35	290	32533	9	19877	5
51	463	30511	18	20853	5

30

los títulos de neutralización en suero del CRS el día 51 fueron los siguientes:

Día	1	2	3	4
51	35	50	24	38

Los animales que muestren las células esplénicas CD4 + -específicos de F del VRS el día 51 fueron los siguientes, en la que se da un número (% de células positivas) solo si la respuesta estimulada fue estadística y

significativamente por encima de cero

Citocina	1	2	3	4
IFN- $\gamma$		0,04		
IL2	0,02	0,06		0,02
IL5				
TNF $\alpha$	0,03	0,05		

Los animales que muestren las células esplénicas CD8 + -específicos de F del VRS el día 51 fueron los siguientes, en la que se da un número solo si la respuesta estimulada fue estadística y significativamente por encima de cero

Citocina	1	2	3	4
IFN- $\gamma$	0,37	0,87		
IL2	0,11	0,40		0,04
IL5				
TNF $\alpha$	0,29	0,79		0,06

5

Por tanto, la encapsulación del ARN dentro de los liposomas es necesaria para la alta inmunogenicidad, como una simple mezcla de ARN y los liposomas (grupo 3) no fue inmunogénica (de hecho, menos inmunogénica que el ARN desnudo).

10

En otros estudios, los ratones recibieron diversas combinaciones de (i) ARN replicón autorreplicante que codifica la proteína F del VRS de longitud completa larga (ii) replicón de ARN autorreplicante que codifica GFP (iii) Replicón ARN que codifica GFP con una inactivación de nsP4 que elimina la autorreplicación (iv) proteína F del VRS de longitud completa. En total, 13 grupos recibieron:

A	–	–
B	0,1 $\mu$ g de (i), desnudo	–
C	0,1 $\mu$ g de (i), encapsulado en liposomas	–
D	0,1 $\mu$ g de (i), con liposomas aparte	–
E	0,1 $\mu$ g de (i), desnudo	10 $\mu$ g de (ii), desnudo
F	0,1 $\mu$ g de (i), desnudo	10 $\mu$ g de (iii), desnudo
G	0,1 $\mu$ g de (i), encapsulado en liposomas	10 $\mu$ g de (ii), desnudo
H	0,1 $\mu$ g de (i), encapsulado en liposomas	10 $\mu$ g de (iii), desnudo
I	0,1 $\mu$ g de (i), encapsulado en liposomas	1 $\mu$ g de (ii), encapsulado en liposomas
J	0,1 $\mu$ g de (i), encapsulado en liposomas	1 $\mu$ g de (iii), encapsulado en liposomas
K	5 $\mu$ g de proteína F	–
L	5 $\mu$ g de proteína F	1 $\mu$ g de (ii), encapsulado en liposomas
M	5 $\mu$ g de proteína F	1 $\mu$ g de (iii), encapsulado en liposomas

15

Resultados en la Figura 16 muestran que las respuestas de IgG específica de requirieron encapsulación en liposoma en lugar de la mera administración conjunta (comparación de los grupos C y D). Una comparación de los grupos K, L y M muestra que el ARN proporcionó un efecto adyuvante frente a la proteína administrada de forma conjunta, y este efecto se observó con el ARN tanto replicante como no replicante.

#### ***Inmunogenicidad del VRS en diferentes cepas de ratón***

20

El replicón "vA142" codifica la glicoproteína de fusión (F) de superficie de tipo silvestre de longitud completa del VRS pero con el péptido de fusión eliminado, y el extremo 3' está formado por escisión mediada por ribozima. Se analizó en tres cepas diferentes de ratón

Se administró a los ratones Balb/c vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 22. Los animales se dividieron en 8 grupos de prueba (5 animales por grupo) y un control intacto (2 animales).

El grupo 1 recibió el replicón desnudo (1 µg).

5 El grupo 2 recibió 1 µg de replicón administrado en liposomas "RV01 (37)" con 40 % de DiinDMA, 10 % de DSPC, 48 % de Chol, 2 % de DMG conjugado con PEG.

El grupo 3 recibió lo mismo que el grupo 2, pero a 0,1 µg de ARN.

El grupo 4 recibió 1 µg de replicón en liposomas "RV17 (10)" (40 % de RV17 (véase anteriormente), 10 % de DSPC, 49,5 % de colesterol, 0,5 % de PEG-DMG).

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

El grupo 6 recibió 0,1 µg de replicón en los liposomas en "RV17 (10)".

El grupo 7 recibió 5 µg de la proteína de la subunidad RSV-F con adyuvante de hidróxido de aluminio.

El grupo 8 eran un control no tratados (2 animales)

15 Los sueros se recogieron para el análisis de anticuerpos los días 14, 35 y 49. Los valores de GMT IgG en suero específicos de F fueron los siguientes:

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

El día 35, los títulos de IgG2a (GMT) y IgG1 específicos de F fueron las siguientes:

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

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero del VRS los días 35 y 49 fueron los siguientes (los datos son un 60 % de reducción de los títulos de neutralización de las mezclas de 2-5 ratones, 1 mezcla por grupo).

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

20 Los bazos se recogieron el día 49 para el análisis de células T. Las frecuencias promedio de células T positivas para las citocinas específicas de F (CD4 + o CD8 +) fueron las siguientes, que solo muestran cifras que fueron estadísticamente significativas por encima de cero (específicos de los péptidos del VRS F51-66, F164-178, F309-323 para CD4 +, o para los péptidos F85-93 y F249-258 para CD8 +):

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

Se inmunizó a los ratones C57BL/6 de la misma manera, pero un 9º grupo recibió VRP ( $1 \times 10^6$  UI) que expresaba la glicoproteína de tipo silvestre de fusión superficial de longitud completa del VRS (deleción del péptido de fusión).

Los sueros se recogieron para el análisis de anticuerpos los días 14, 35 y 49 de títulos IgG específicos de F (GMT):

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

El día 35, los títulos de IgG2a (GMT) y IgG1 específicos de F fueron las siguientes:

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

5

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero del VRS los días 35 y 49 fueron los siguientes (los datos son un 60 % de reducción de los títulos de neutralización de las mezclas de 2-5 ratones, 1 mezcla por grupo).

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

10 Los bazos se recogieron el día 49 para el análisis de células T. Las frecuencias Promedio de las células T positivas para citocinas (CD8 +) fueron las siguientes, lo que muestra que solo las cifras que eran estadísticamente significativamente por encima de cero (específicos para los péptidos de RSV y F85-93 y F249-258):

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

Nueve grupos de ratones C3H/HeN fueron inmunizados de la misma forma. Los títulos de IgG específicos de F (GMT) fueron los siguientes:

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

15 El día 35, los títulos de IgG2a (GMT) e IgG1 específicos de F fueron las siguientes:

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

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero del VRS los días 35 y 49 fueron los siguientes:

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

Por tanto, tres diferentes lípidos (RV01, RV05, RV17; pKa 5,8, 5,85, 6,1) se analizaron en tres diferentes cepas puras ratón. Para todas las 3 cepas, RV01 fue más eficaz que RV17; par las cepas BALB/cy C3H, RV05 fue menos eficaz que cualquiera de los dos o RV01 RV17, pero fue más eficaz en la cepa B6. En todos los casos, sin embargo, los liposomas fueron más efectivos que dos nanoemulsiones catiónicos que se probaron en paralelo.

### **Immunogenicidad del CMV**

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

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

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

Los sueros se recogieron para el análisis de anticuerpos los días 14, 35 y 49 de títulos IgG específicos de F (GMT):

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

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

El ARN que manifieste una forma de longitud completa o soluble del complejo CMV gH/g produjo títulos altos de anticuerpos neutralizantes, como se analizó en las células epiteliales. Los títulos promedio provocados por los ARN encapsulados en liposomas eran al menos tan altos como para los correspondientes VRP.

La repetición de los experimentos confirmó que el replicón era capaz de expresar dos proteínas a partir de un solo vector. El replicón de ARN dio un título 3wp3 de 11.457, en comparación con 5516 con VRP.

Otros experimentos utilizaron diferentes replicones, además de vA160. El replicón vA526 expresa el complejo pentamérico del CMV (gH-gL-UL128-UL130-UL131) bajo el control de tres promotores subgenómicos: el primero dirige la expresión de gH; el segundo dirige la expresión de unidades gL; el tercero dirige la expresión de la poliproteína UL128-2<sup>a</sup>-UL130-2<sup>a</sup>-UL131, que contiene dos sitios de escisión 2<sup>a</sup> entre los tres genes de UL. El replicón vA527 expresa el complejo pentamérico del CMV a través de tres promotores subgenómicos y dos IRES: El primer promotor subgenómico dirige la expresión de gH; el segundo promotor subgenómico dirige la expresión de gL; el tercer promotor subgenómico dirige la expresión de UL128; UL130 está bajo el control de un del IRES EMCV; UL131 está bajo el control de un IRES EV71. Estos tres replicones fueron administrados por liposomas (procedimiento (H), con 150 µg de tamaño de lote) o por VRP.

Se administró a ratones BALB/c, 10 grupos de 10 animales, vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0, 21 y 42 con:

Grupo 1 VRP que expresan gH FL/gL ( $1 \times 10^6$  UI)

Grupo 2 pentamérico, 2<sup>a</sup> VRP ( $1 \times 10^5$  UI)

Grupo 3 pentamérico, 2<sup>a</sup> VRP ( $1 \times 10^6$  UI)

Grupo 4 pentamérico, IRES VRP ( $1 \times 10^5$  UI)

Grupo 5 ARN autorreplicante vA160 (1 µg) formulado en liposomas

Grupo 6 ARN autorreplicante vA526 (1 µg) formulado en liposomas

Grupo 7 ARN autorreplicante vA527 (1 µg) formulado en liposomas

Grupo 8 ARN autorreplicante vA160 (1 µg) formulado en una nanoemulsión catiónica

5 Grupo 9 ARN autorreplicante vA526 (1 µg) formulado en una nanoemulsión catiónica

Grupo 10 ARN autorreplicante vA527(1 µg) formulado en una nanoemulsión catiónica

Se recogieron los sueros para análisis inmunológicos los días 21 (3wp1), 42 (3wp2) y 63 (3wp3).

Los títulos de neutralización en suero de CMV los días 21, 42 y 63 fueron los siguientes

Grupo de vacuna	3wp1	3wp2	3wp3
1	126	6296	26525
2	N/A	N/A	6769
3	N/A	3442	7348
4	N/A	N/A	2265
5	347	9848	42319
6	179	12210	80000
7	1510	51200	130000
8	N/A	N/A	845
9	N/A	N/A	228
10	N/A	N/A	413

10 Por lo tanto, el ARN autorreplicante se puede utilizar para expresar múltiples antígenos a partir de un único vector y para provocar una respuesta inmunitaria potente y específica. El replicón puede expresar cinco antígenos (complejo pentamérico del CMV (GH-GL-UL128-UL130-UL-131) y provocar una respuesta inmunitaria potente. El ARN autorreplicante administrado en liposomas fue capaz de producir títulos altos de anticuerpos neutralizantes, según se analizó en células epiteliales, en todos los puntos de tiempo analizados (3wp1, 3wp2, 3wp3). Estas respuestas  
15 fueron superiores a los VRP correspondientes y a las nanoemulsiones catiónicas.

#### **Volumen de administración**

La administración hidrodinámica emplea la fuerza generada por la rápida inyección de un gran volumen de solución para superar las barreras físicas de las membranas celulares que impide la entrada de compuestos grandes e impermeables a la membrana en las células. Previamente se ha demostrado que este fenómeno es útil para la  
20 administración intracelular de vacunas de ADN

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

El replicón vA317 se administró a ratones BALB/c, 10 por grupo, mediante vacunaciones intramusculares bilaterales (5 o 50 por pata) los días 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

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

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

Los sueros se recogieron para el análisis de anticuerpos los días 14, 35 y 49. Los valores de GMT de IgG en suero específicos de F fueron:



Día	1	2	3	4
14	42	21	2669	2610
35	241	154	17655	18516

Por lo tanto, la inmunogenicidad del replicón formulado no varió de acuerdo con el volumen administrado, lo que indica que estas vacunas de ARN no se basan en la administración hidrodinámica para su eficacia.

### ***Cinética de la expresión***

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

Grupo 1 de ADN de luciferasa que expresa, administrado mediante electroporación (10 µg)

Grupo 2 ARN autorreplicante (1 µg) formulado en liposomas

- 10 Grupo 3 ARN autorreplicante (1 µg) formulado en una nanoemulsión catiónica

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

Grupo 5 VRP ( $1 \times 10^6$  UI) que expresa luciferasa

- 15 Antes de la vacunación se afeitó a los ratones. Se anestesió a los ratones (2 % de isoflurano en oxígeno), el pelo se eliminó primer con una máquina de afeitar eléctrica y después con crema química Nair. A continuación, los datos de bioluminiscencia se adquirieron usando un sistema de formación de imágenes Xenogen IVIS 200 (Caliper Life Sciences los días 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63 y 70. Cinco minutos antes de la formación de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal con 8 mg/kg de la solución de luciferina. A continuación, se anestesió a los animales y se transfirió al sistema de formación de imágenes. Los tiempos de adquisición de imágenes se mantuvieron constantes como señal de bioluminiscencia se midió con una cámara CCD enfriada.

- 20 En términos visuales, se observaron células que expresan luciferasa que permanecerán principalmente en el sitio de la inyección de ARN, y se realizaron imágenes de los animales después de la eliminación de quads no mostraron ninguna señal.

En términos cuantitativos, la expresión de luciferasa se midió como la radiancia promedio durante un período de 70 días ( $p // s/cm^2/sr$ ), y los resultados fueron los siguientes para los 5 grupos:

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

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

### Vía de administración

El ARN encapsulado en liposomas que codifica la gp140 del VIH se administró a los ratones por vía intramuscular, intradérmica, o subcutánea. Las tres vías condujeron a niveles de IgG en suero elevados de anticuerpos específicos del VIH (Figura 15), superando los títulos observados en respuesta al ADN intramuscular sometido a electroporación.

### Ratas de algodón

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

Otros trabajos con ratas del algodón utilizaron cuatro replicones diferentes: vA317 expresa VRS-F de longitud completa; vA318 expresa VRS-F truncado (transmembrana y citoplásmico con la cola eliminada); vA142 expresa VRS-F con su péptido de fusión eliminado; vA140 expresa VRS-F truncado también sin su péptido. Se administró a las ratas del algodón, de 4 a 8 animales por grupo, vacunaciones intramusculares (100 µl en una pierna los días 0 y 21 con los cuatro replicones diferentes a dos dosis (1,0 y 0,1 µg) formulados en liposomas fabricados mediante el procedimiento (D), pero con un tamaño de lote del ARN de 150 µg. Los grupos de control recibieron una vacuna de proteínas de la subunidad VRS-F (5 µg) con adyuvante con alumbre (8 animales/grupo), Los bree que expresan VRS-F de longitud completa ( $1 \times 10^6$  IU, 8 animales/grupo), o control no tratados (4 animales /grupo). Se recogió el suero para el análisis de anticuerpos los días 0, 21 y 34.

Los títulos de IgG en suero específicos de F y los títulos y de anticuerpos neutralizantes en suero del VRS los días 21 y 34 fueron los siguientes:

Grupo	IgG, día 21	IgG, día 34	NT, día 21	NT, día 34
1 µg de vA317	915	2249	115	459
0,1 µg de vA317	343	734	87	95
1 µg de vA31/	335	1861	50	277
0,1 µg de vA31/	129	926	66	239
1 µg de vA142	778	4819	92	211
0,1 µg de vA142	554	2549	78	141
1 µg de vA140	182	919	96	194
0,1 µg de vA140	61	332	29	72
5 µg de subunidad trimérica de F/alumbre	13765	86506	930	4744
$1 \times 10^6$ UI de VRP-F completo	1877	19179	104	4528
No tratadas antes	5	5	10	15

Los cuatro replicones evaluados en este estudio (vA317, vA318, vA142, vA140) fueron inmunogénicos en las ratas de algodón cuando fueron administrados por liposomas, aunque los títulos de neutralización en suero fueron al menos diez veces menores que los inducidos por las vacunas de proteína con adyuvante o por VRP. Las vacunas con liposoma/ARN provocaron IgG específica de F en suero y anticuerpos neutralizantes del VRS después de la primera vacunación, y una segunda vacunación reforzó la respuesta eficaz. Los títulos de IgG específica de F después de la segunda vacunación con 1 µg de replicón fueron de 2 a 3 veces mayores que después de la segunda vacunación con 0,1 µg de replicón. Los cuatro replicones provocaron títulos de anticuerpos comparables, lo que sugiere que el VRS-F de longitud completa y truncado, cada uno con o sin el péptido de fusión, son igualmente inmunogénicos en ratas del algodón.

Más trabajos realizados con ratas del algodón de nuevo utilizaron los replicones vA317, vA318 y vA142. Se administró a las ratas del algodón, de 2 a 8 animales por grupo, vacunaciones intramusculares (100 µl en una pierna los días 0 y 21 con los replicones diferentes a dos dosis (0,1 y 1 µg) encapsulados en liposomas RV01 fabricados mediante el procedimiento (D), pero con un tamaño de lote del ARN de 150 µg. Los grupos control recibieron la vacuna de la proteína de subunidad VRS-F (5 µg) con adyuvante con alumbre o VRP que expresan VRS-F de longitud completa ( $1 \times 10^6$  UI, 8 animales/grupo). Todos estos animales recibieron una tercera vacunación (día 56) con la vacuna de la proteína de la subunidad VRS-F (5 µg) con adyuvante con alumbre. Además, hubo un control no tratado (4 animales/grupo). Además, a un grupo adicional se aplicó se administraron vacunas intramusculares

bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 56 con 1 µg de ARN vA317 en liposomas, pero no recibió una tercera vacunación con la vacuna de proteína de subunidad.

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

	Día 21	Día 35	Día 56	Día 70
1 µg de vA317	260	1027	332	14263
0,1 µg de vA317	95	274	144	2017
1 µg de vA142	483	1847	1124	11168
0,1 µg de vA142	314	871	418	11023
1 µg de vA317	841	4032	1452	13852
1 x 10 <sup>6</sup> UI de VRP (F completo)	2075	3938	1596	14574
5 µg de subunidad trimérica de F/alumbre	12685	54526	25846	48864
No tratadas antes	5	5	5	5

5

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

	Día 21	Día 35	Día 56	Día 70
1 µg de vA317	58	134	111	6344
0,1 µg de vA317	41	102	63	6647
1 µg de vA142	77	340	202	5427
0,1 µg de vA142	35	65	56	2223
1 µg de vA317	19	290	200	4189
1 x 10 <sup>6</sup> UI de VRP (F completo)	104	1539	558	2876
5 µg de subunidad trimérica de F/alumbre	448	4457	1630	3631
No tratadas antes	10	10	10	

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

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

10

Por tanto, se confirma que los replicones son inmunogénicos en las ratas del algodón, y provocan anticuerpos de tipo IgG específica de F y neutralizantes del VRS en suero después de la primera vacunación. Una segunda vacunación reforzó las respuestas de manera efectiva. Los títulos de IgG específica de F después de la segunda vacunación con 1,0 µg de replicón fueron de 1,5 a 4 veces mayores que después de la segunda vacunación con 0,1 µg de replicón.

15

La tercera vacunación (proteína el día 56) no reforzó los títulos en las ratas del algodón previamente vacunados con la subunidad trimérica de F + alumbre, pero sí proporcionó un gran refuerzo de los títulos en las ratas del algodón previamente vacunadas con replicón. En la mayoría de los casos, los títulos de neutralización en suero de VRS después de dos vacunaciones con replicón, seguido de refuerzo con proteínas fueron iguales o mayores que los títulos inducidos por dos o tres vacunas de proteínas secuenciales.

20

En este estudio también se evaluó la cinética de la respuesta de anticuerpos a 1,0 µg de vA317. Los títulos de IgG específica de F y los títulos de neutralización del VRS inducidos por una sola vacunación alcanzaron su punto máximo alrededor del día 21 y se mantuvieron durante al menos 56 días (descenso del 50-70 % en el título de IgG específicas de F, pocos cambios en el título de neutralización del VRS). Se administró una segunda vacunación homóloga a estos animales el día 56 y aumentó los títulos de anticuerpos a un nivel al menos igual al alcanzado cuando la segunda vacunación se administró el día 21.

25

- 5 Otros experimentos implicaron una exposición vírica. El replicón vA368 codifica la glicoproteína de fusión de la superficie de tipo silvestre de longitud completa del VRS con el péptido de fusión eliminado, con la expresión impulsada por el IRES EV71. Se administró a las ratas del algodón, 7 por grupo, vacunas intramusculares (100 µm por pata) los días 0 y 21 con vA368 en los liposomas preparados por el procedimiento (H), 175 µg de ARN de tamaño de lote o con VRP con el mismo replicón. Un grupo de control recibió 5 µg de proteína con adyuvante de alumbre y también se incluyó un grupo de control no tratados.

Todos los grupos recibieron una exposición intranasal (por vía intranasal) con  $1 \times 10^6$  de UFP del VRS durante cuatro semanas después de la inmunización final. Se recogió el suero para el análisis de anticuerpos los días 0, 21, 35. Los títulos pulmonares víricos se midieron 5 días después de la exposición. Los resultados fueron los siguientes:

	Liposoma	VRP	Proteína	No tratadas antes
<i>Títulos de IgG específicos de F (GMT)</i>				
<b>Día 21</b>	370	1017	28988	5
<b>Día 35</b>	2636	2002	113843	5
<i>Títulos neutralizantes (GMT)</i>				
<b>Día 21</b>	47	65	336	10
<b>Día 35</b>	308	271	5188	10
<b>Carga vírica pulmonar (UFP por gramo de pulmón)</b>				
<b>Día 54</b>	422	225	124	694110

Por tanto, la vacuna de ARN redujo carga vírica pulmonar en más de tres log, de aproximadamente  $10^6$  UFP/g en las ratas del algodón de control no vacunadas a menos de  $10^3$  UFP/g en ratas del algodón vacunadas.

#### **Estudio en mamíferos grandes**

- 15 Se realizó un estudio de mamíferos grandes en ganado bovino. Los terneros (4-6 semanas de edad, ~60-80 kg, 5 por grupo) fueron inmunizados con 66 µg de replicón vA317 que codifica la proteína F del VRS de longitud completa los días 0, 21, 86 y 146. Los replicones se formularon dentro de liposomas. Se usó PBS solo como control negativo y una vacuna autorizada se utilizó como control positivo ("Triángulo 4" de Fort Dodge, con virus muertos). Todos los terneros recibieron 15 µg de proteína F con adyuvante con la emulsión MF59 el día 146. Una vaca fue vacunada por error con la vacuna equivocada en el día 86 en lugar del Triángulo 4, por lo que sus datos se excluyeron del día 100 en adelante.

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

- 25 Los liposomas se fabricaron mediante el procedimiento de DESDE EL, excepto que se utilizaron 1,5 mg de tamaño de lote de ARN.

Los terneros recibieron 2 ml de cada vacuna experimental administrados, por vía intramuscular como 2 Xg1 ml en cada lado del cuello. Por el contrario, la vacuna del "Triángulo 4" se administró en una sola dosis de 2 ml en el cuello.

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

- 35 La Figura 14<sup>a</sup> muestra títulos de IgG específicos de F durante los primeros 63 días. El replicón de ARN era inmunogénico en las vacas a través de liposomas, a pesar de que dio títulos más bajos que la vacuna autorizada. Todas las vacas vacunadas mostraron anticuerpos específicos de F después de la segunda dosis y los títulos fueron muy estables desde el período de 2 a 6 semanas después de la segunda dosis (y fueron particularmente estables para las vacunas de ARN).

La Figura 14B muestra títulos de IgG en suero específicos de F (GMT) durante 210 días y los valores medidos hasta 202 días fueron los siguientes:

	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>Triángulo 4</b>	5	5	1784	721	514	3406	2786	336	13376	4775	2133

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

	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>Triángulo 4</b>	12	15	13	39	38	41	13	24	26	15

- 5 El material utilizado para la segunda dosis de liposomas no estaba recién preparado y el mismo lote de ARN mostró una disminución de la potencia en un estudio de inmunogenicidad de ratón. Por lo tanto es posible que la vacuna pudiera haber sido más inmunogénica si se hubiera usado material recién preparado para todas las vacunaciones.

- 10 Cuando se analizó con el complemento, se detectaron anticuerpos neutralizantes en todas las vacas vacunadas. En este ensayo, todos los terneros vacunados tenían buenos títulos de anticuerpos neutralizantes después de la segunda vacunación con ARN. Además, la vacuna con ARN produjo títulos de IgG en suero específicos de F detectados en algunos terneros después de la segunda vacunación y en todos los terneros después de la tercera.

La VSR-F adyuvada con MF59 fue capaz de reforzar la respuesta de IgG en todos los terneros vacunados previamente y de reforzar los títulos de neutralización independientes del complemento de los terneros vacunados previamente con ARN.

- 15 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 modelos de animales más grandes y seres humanos. Una dosis típica para una vacuna de ADN de vaca sería 0,5-1 µg [47,48] y, por tanto, es muy alentador que las respuestas inmunitarias se indujeron con solamente 66 µg de ARN

20

**Tabla 1: Fosfolípidos útiles**

DDPC	1,2-dioctanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-fosfato
DEPC	1,2-eurocoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-fosfatidileranolamina
DEPG	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)]
DLOPC	1,2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)]
DLPS	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina

(continuación)

DMPG	1,2-miristoil-sn-Glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)]
DMPS	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfato
DOPC	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-Dioleil-sn-Glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)]
DOPS	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerol)]
DPPS	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfato
DSPC	1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Dioestearpil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)]
DSPS	1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenado
HSPC	PC de soja hidrogenada de pureza alta
HSPC	PC se soja hidrogenada
LYSOPC MIRÍSTICO	1-Miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMÍTICO	1-Palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC ESTEÁRICO	1-Estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
MPPC de esfingomielina de la leche	1-Miristoil,2-palmitoil-sn-Glicero 3-fosfatidilcolina
MSPC	1-Miristoil,2-estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
PMPC	1-Palmitoil,2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-Palmitoil,2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilethanolamina
POPG	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)]
PSPC	1-Palmitoil,2-estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-Estearoil,2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-Estearoil,2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-Estearoil,2-palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

**Referencias**

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

5 [2] Heyes y col., (2005) J Controlled Release 107:276-87.

[3] WO2005/121348.

[4] Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.

- [5] Liposome Technology, volumes I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [6] Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002.
- [7] Jeffs y col., (2005) Pharmaceutical Research 22 (3):362–372.
- 5 [8] Polymers in Drug Delivery. (eds. Uchegbu & Schatzlein). CRC Press, 2006.
- [9] Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996.
- [10] O'Hagan y col., (2001) J Virology 75:9037–9043.
- [11] Singh y col., (2003) Pharmaceutical Research 20: 247–251.
- 10 [12] WO2009/132206.
- [13] Martinon y col., (1993) Eur J Immunol 23: 1719–22.
- [14] WO2005/113782.
- [15] WO2011/005799.
- [16] El Ouahabi y col., (1996) FEBS Letts 380:108–12.
- 15 [17] Giuliani y col., (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103(29):10834–9.
- [18] WO2009/016515.
- [19] WO02/34771.
- [20] WO2005/032582.
- [21] WO2010/119343.
- 20 [22] WO2006/110413.
- [23] WO2005/111066.
- [24] WO2005/002619.
- [25] WO2006/138004.
- [26] WO2009/109860.
- 25 [27] WO02/02606.
- [28] WO03/018054.
- [29] WO2006/091517.
- [30] WO2008/020330.
- [31] WO2006/089264.
- 30 [32] WO2009/104092.
- [33] WO12/031043.
- [34] WO2007/049155.
- [35] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [36] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- 35 [37] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I–IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [38] Sambrook y col., (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

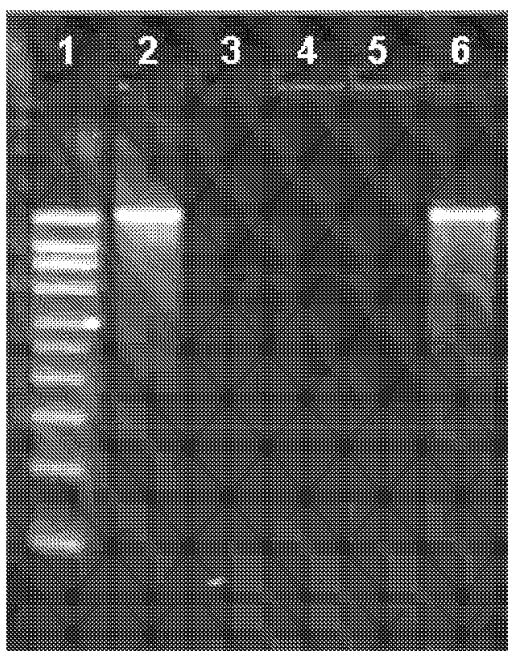
- [39] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [40] Ausubel y col., (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).
- [41] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)
- [42] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- 5 [43] Yoneyama & Fujita (2007) Cytokine & Growth Factor Reviews 18:545–51.
- [44] Maurer y col., (2001) Biophysical Journal, 80: 2310–2326.
- [45] Perri y col., (2003) J Virol 77:10394–10403.
- [46] Iavarone y col., (2011) J Immunol 186:4213–22.
- [47] Boxus y col., (2007) J Virol 81:6879–89.
- 10 [48] Taylor y col., (2005) Vaccine 23:1242–50.



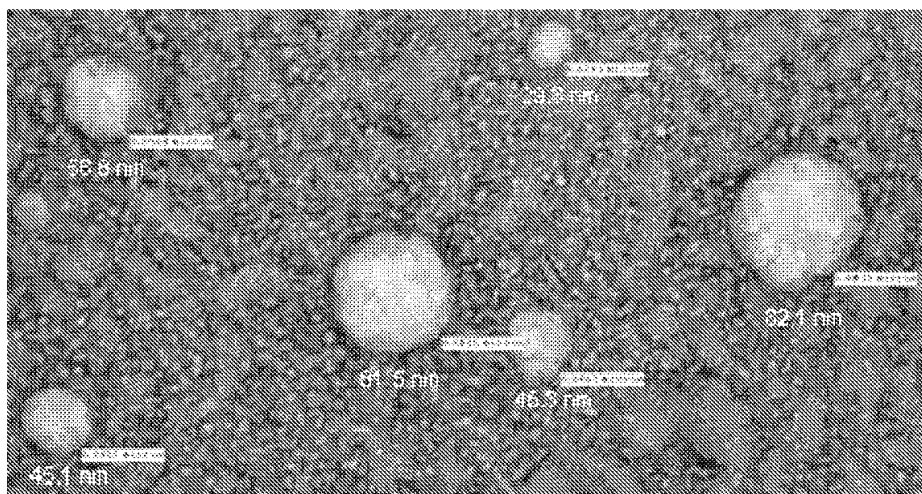
## REIVINDICACIONES

1. Una partícula sin virión que no comprende una cápside proteica, para la administración *in vivo* de ARN en una célula de vertebrado, en la que (a) la partícula es un liposoma y comprende un material de administración que encapsula una molécula de ARN autorreplicante que codifica un inmunógeno, en la que el inmunógeno es un polipéptido de superficie y puede provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito, y (b) el ARN no incluye nucleótidos modificados y, opcionalmente, incluye una caperuza en 5'.
2. La partícula de la reivindicación 1, en la que el liposoma comprende un lípido con un grupo de cabeza catiónico.
3. La partícula de la reivindicación 1, en la que el liposoma comprende un lípido con un grupo de cabeza zwitteriónico.
4. La partícula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el liposoma tiene un diámetro en el intervalo de 50 a 220 nm.
5. La partícula de cualquier reivindicación precedente, en la que la molécula de ARN autorreplicante codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN desde la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un inmunógeno.
6. La partícula de la reivindicación 5, en la que la polimerasa es una replicasa de alfavirus.
7. La partícula de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que la molécula de ARN tiene dos marcos de lectura abiertos, el primero de los cuales codifica una replicasa de alfavirus y el segundo de los cuales codifica el inmunógeno.
8. La partícula de la reivindicación 7, en la que la molécula de ARN tiene marcos de lectura abiertos adicionales, por ejemplo, que codifican inmunógenos adicionales o polipéptidos accesorios.
9. La partícula de cualquier reivindicación precedente, en la que la molécula de ARN tiene 5000-25000 nucleótidos de longitud.
10. La partícula de cualquier reivindicación precedente, en la que el inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* contra:
  - (a) una glicoproteína F del virus respiratorio sincitial; (b) un virus que infecta a los peces, tales como el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), el virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV), el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el virus del siluro del canal (CCV), el virus de la enfermedad de linfocistis del pescado (FLDV), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI), herpesvirus koi, el virus de tipo picorna del salmón (también conocido como virus de tipo picorna del salmón del atlántico), el virus del salmón encerrado (LSV), el rotavirus del salmón del atlántico (ASR), el virus de la enfermedad de la fresa de la trucha (TSD), el virus del tumor del salmón coho (CSTV) y el virus de la septicemia hemorrágica (SHV) vírica; (c) ortomixovirus, tales como el virus de la gripe A, B y C; o (d) herpesvirus, tales como el virus del herpes simple (HSV), el virus de la varicela zoster (VZV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el citomegalovirus (CMV), el virus del herpes humano 6 (VHH 6), el virus del herpes humano 7 (VHH 7) y el virus del herpes humano 8 (VHH 8).
11. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de cualquier reivindicación precedente.
12. Un dispositivo de administración que contiene la composición farmacéutica de la reivindicación 11.
13. La partícula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11, o el dispositivo de administración de la reivindicación 12, para su uso en un procedimiento para producir una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado, que comprende la etapa de administrar al vertebrado una cantidad eficaz de dicha partícula, o de dicha composición farmacéutica.

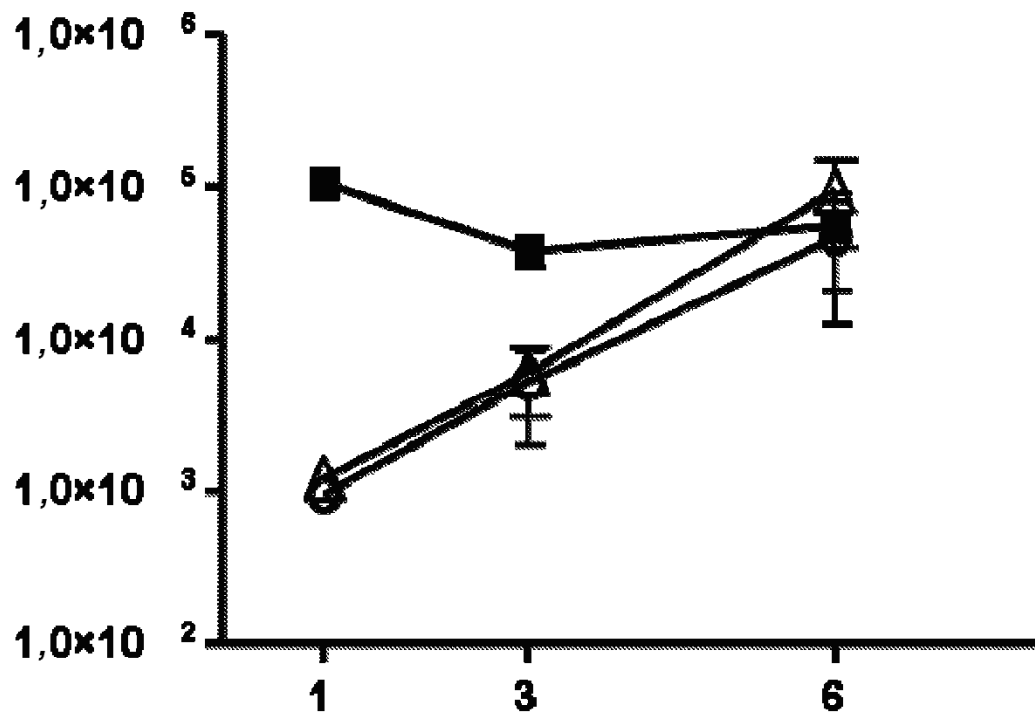
**FIGURA 1**



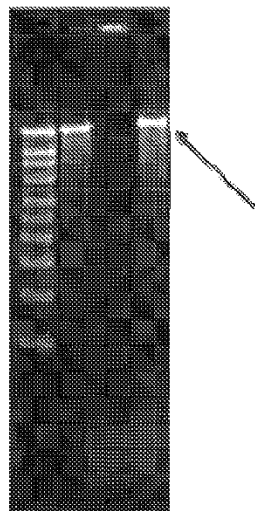
**FIGURA 2**



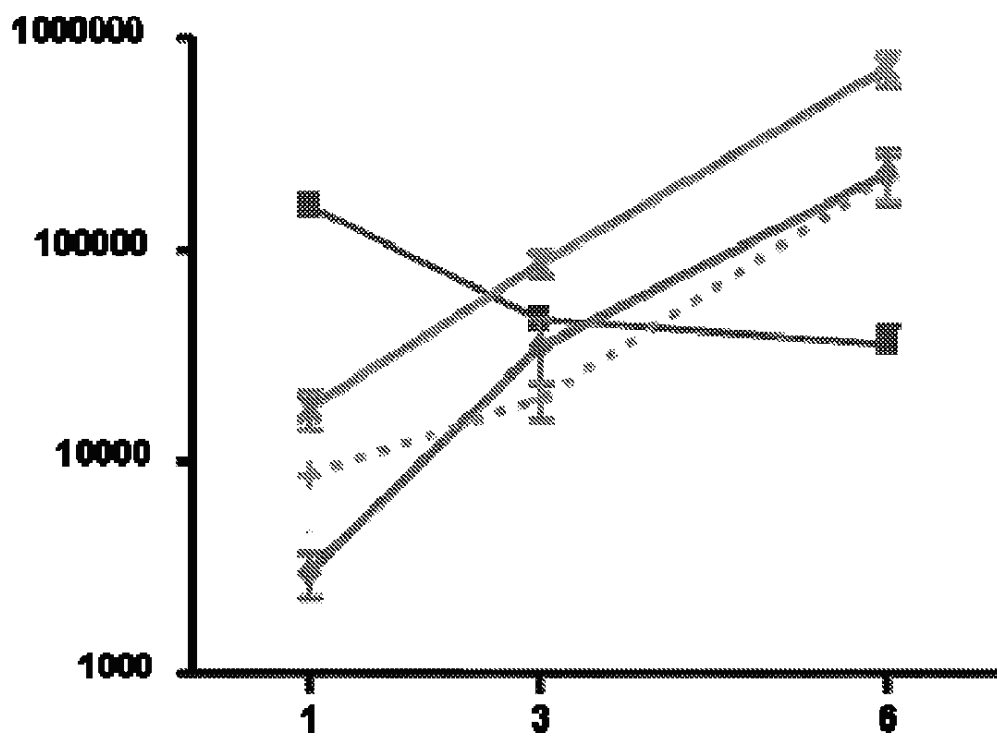
**FIGURA 3**



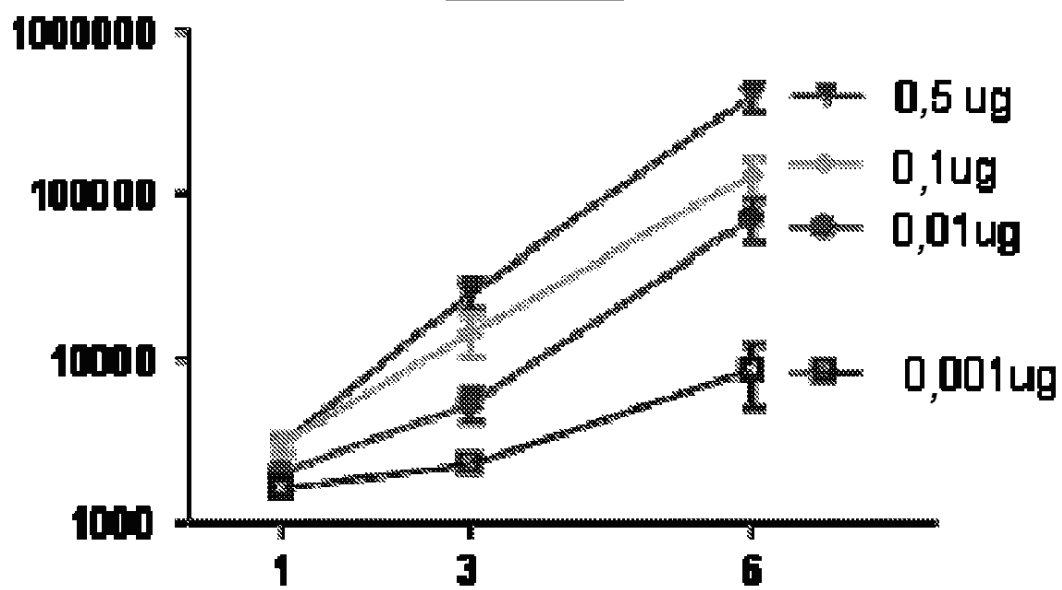
**FIGURA 4**



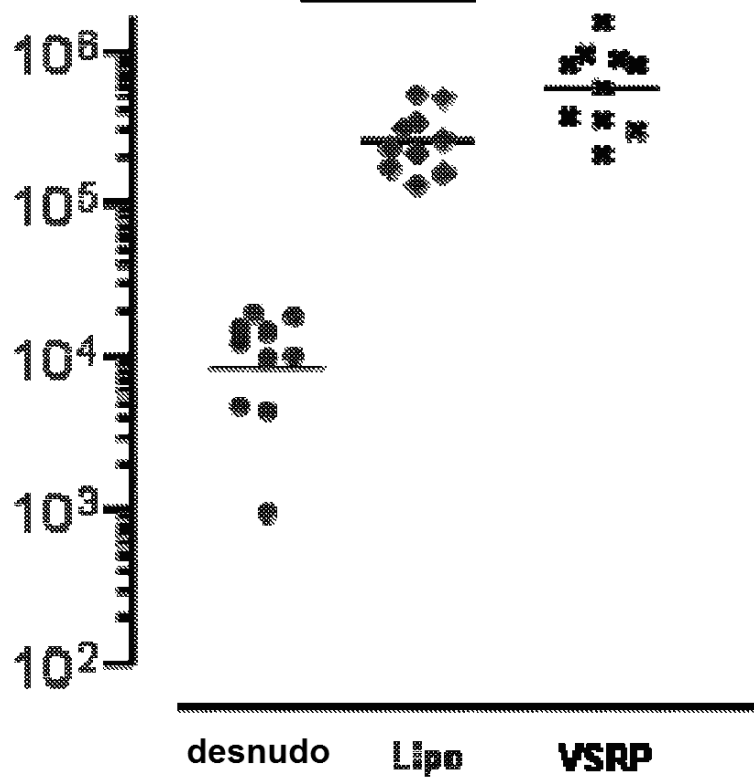
**FIGURA 5**



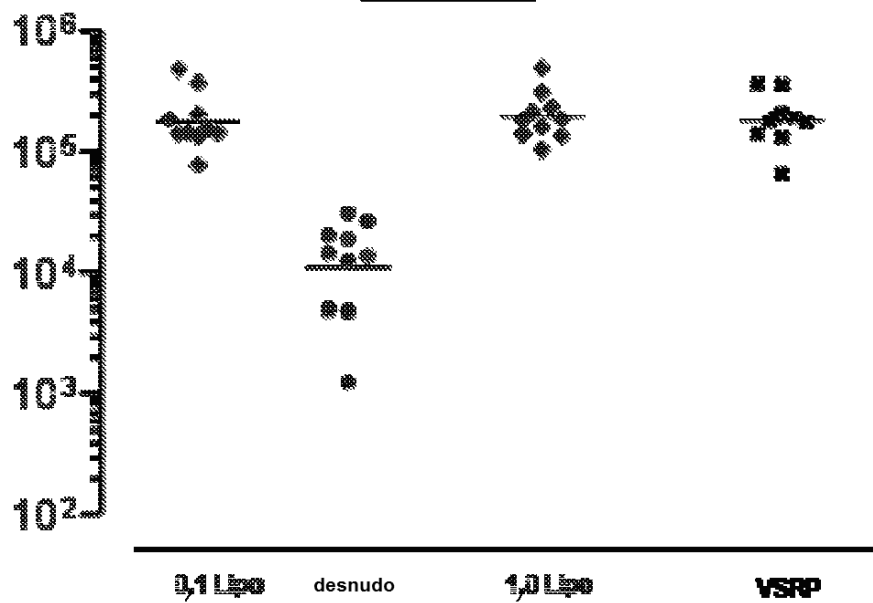
**FIGURA 6**



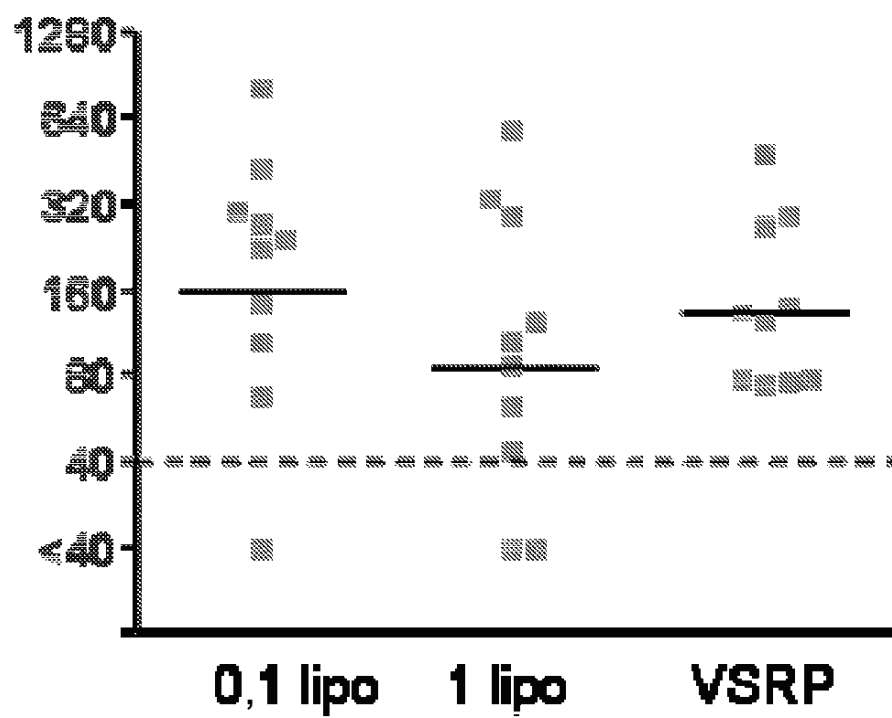
**FIGURA 7**



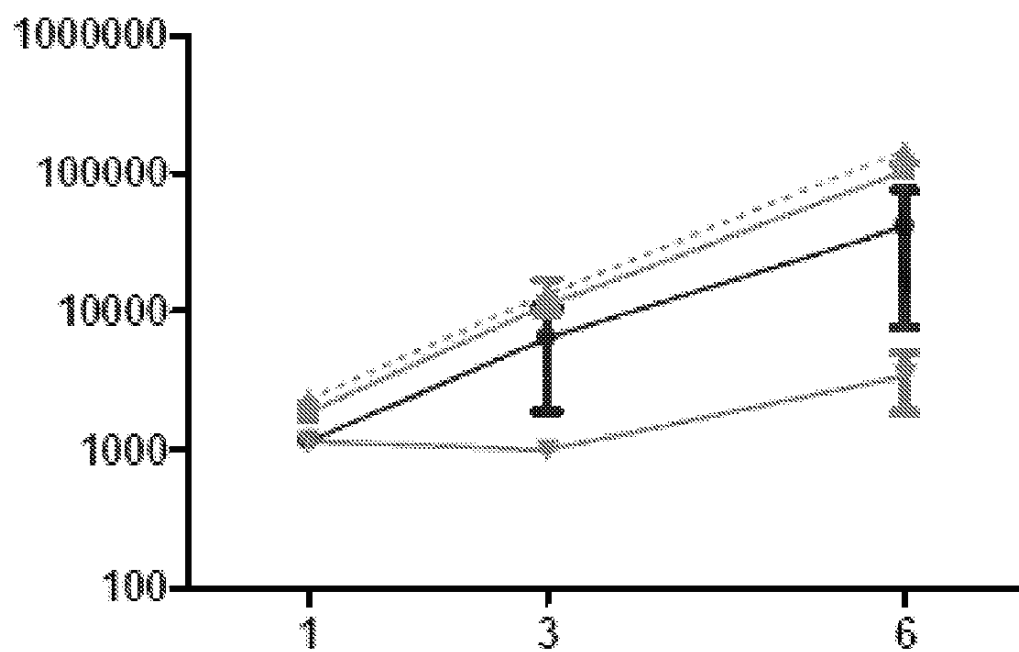
**FIGURA 8**



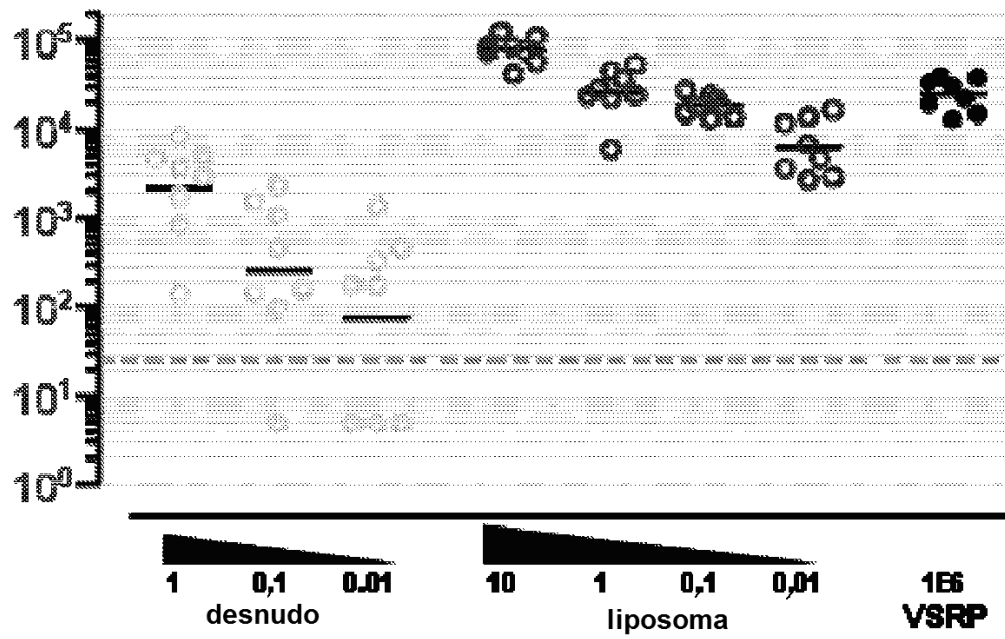
**FIGURA 9**



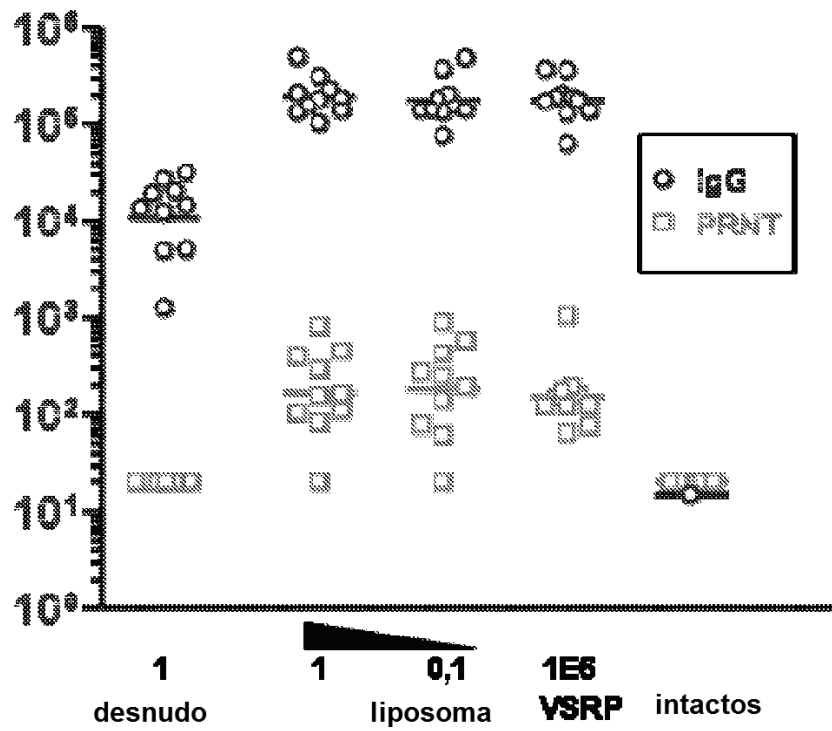
**FIGURA 10**



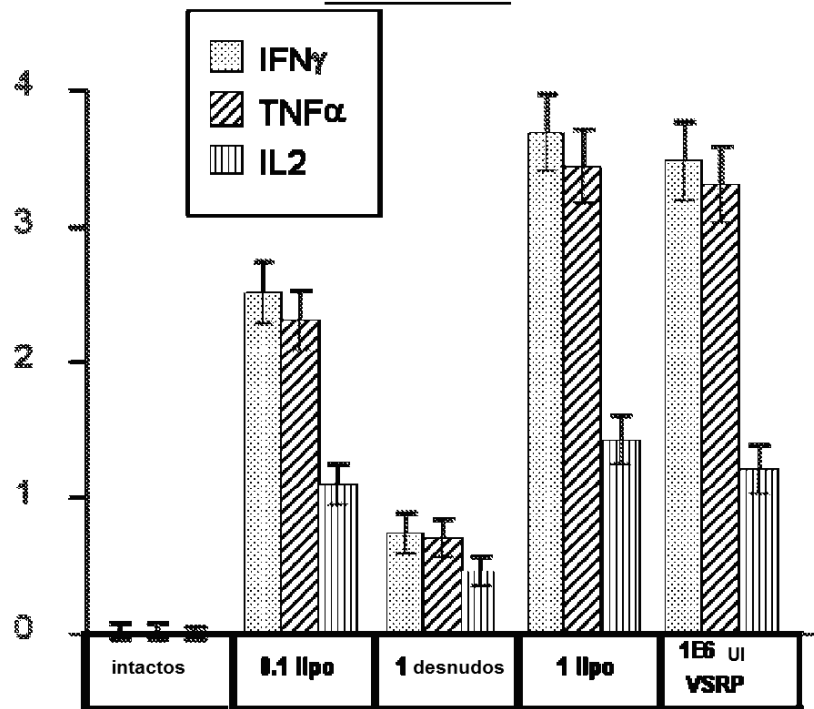
**FIGURA 11**



**FIGURA 12**

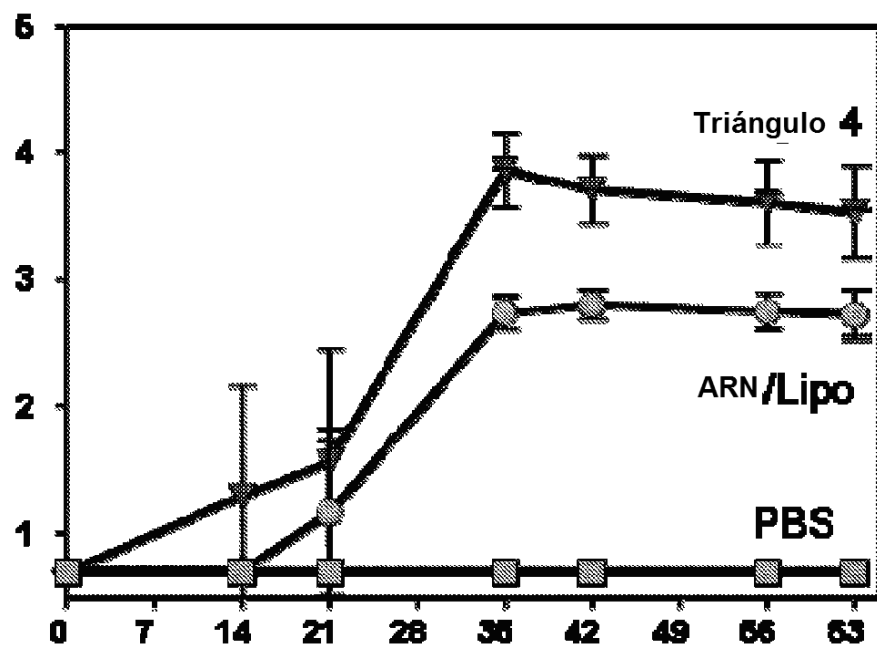


**FIGURA 13**



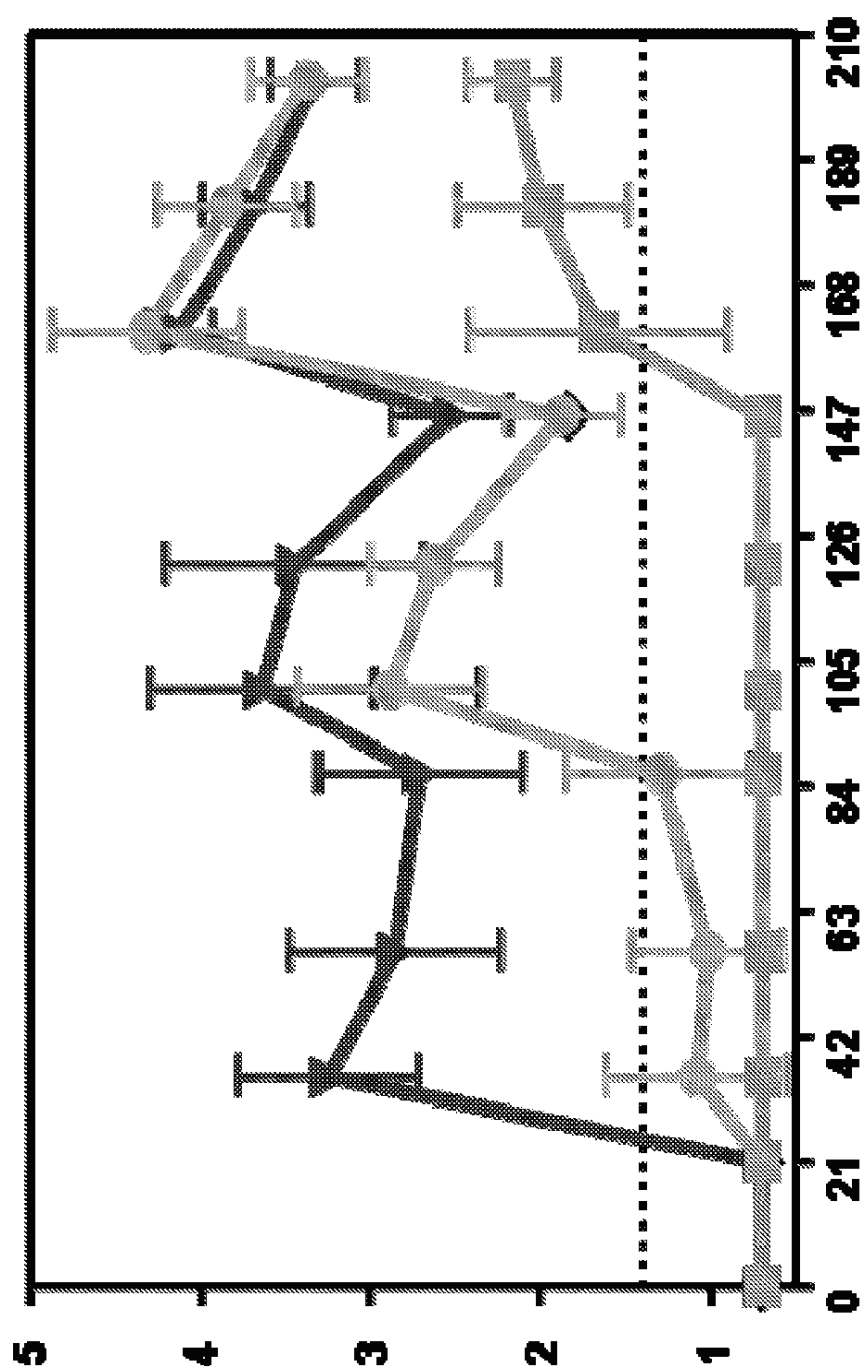
**FIGURA 14**

**FIGURA 14A**

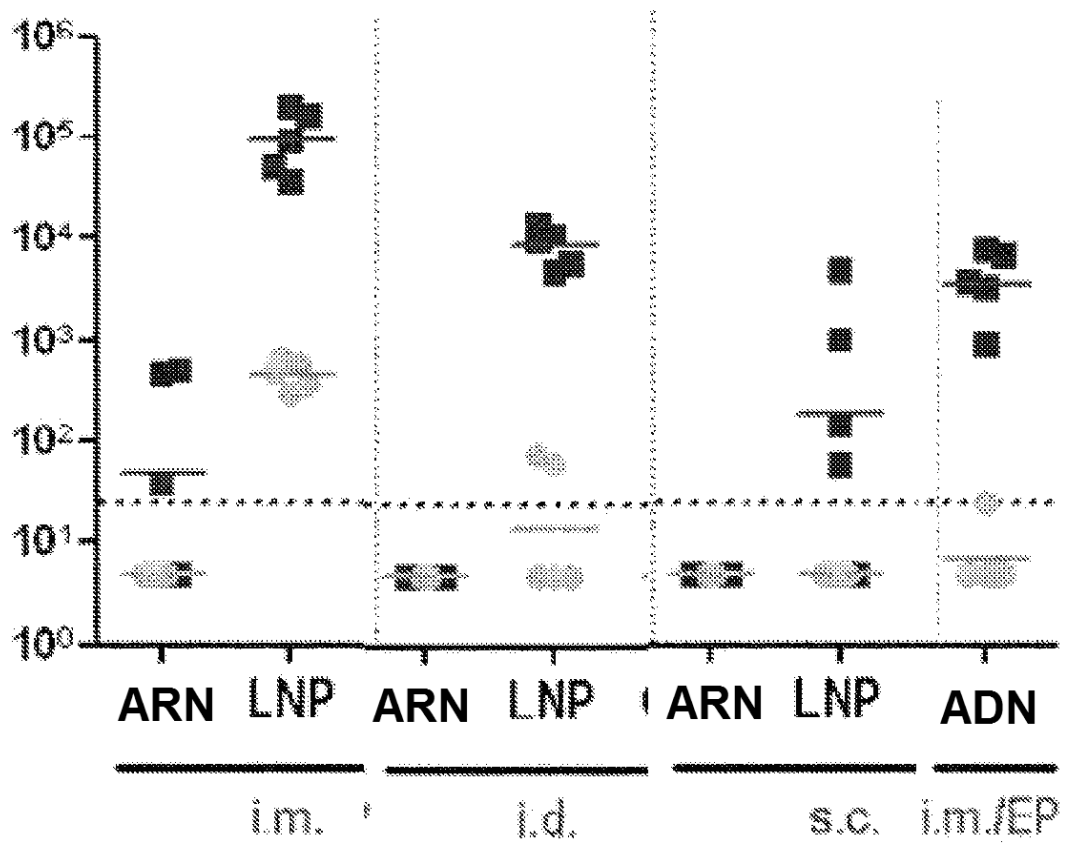




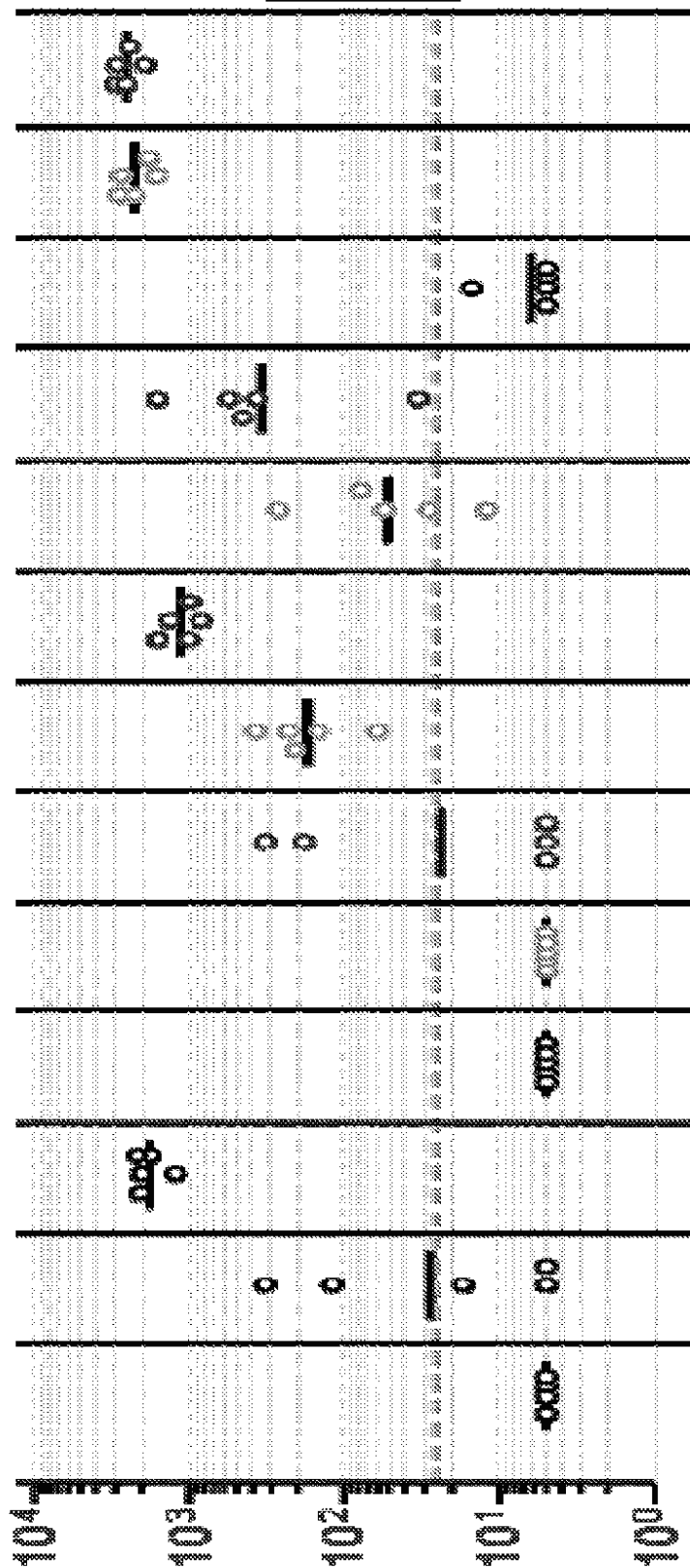
**FIGURA 14B**



**FIGURA 15**

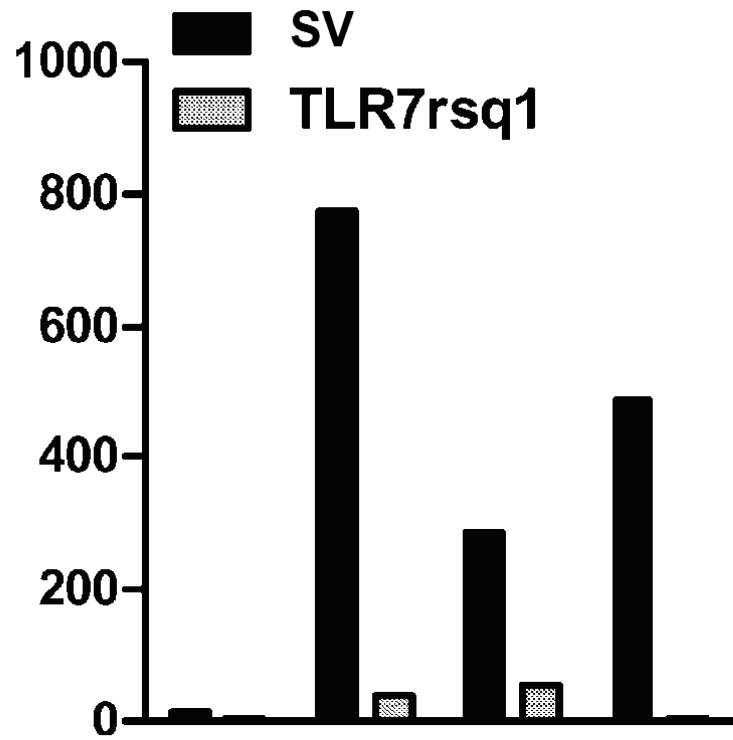


**FIGURA 16**



***FIGURA 17***

***FIGURA 17A***



***FIGURA 17B***

