(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 646 669**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011 PCT/US2011/043104**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006377**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11736499 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2590670**

(54) Título: **Procedimientos de aumento de una respuesta inmunitaria mediante el suministro de ARN**

(30) Prioridad:

06.07.2010 US 361789 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.12.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

GEALL, ANDREW;
RAMSAUER, KATRIN;
OTTEN, GILLIS y
MANDL, CHRISTIAN

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Procedimientos de aumento de una respuesta inmunitaria mediante el suministro de ARN

Campo de la técnica

La presente invención está en el campo del suministro no vírico de ARN para la inmunización.

Técnica antecedente

El suministro de ácidos nucleicos para la inmunización de animales ha sido un objetivo durante varios años. Se han ensayado distintas estrategias, incluyendo el uso de ADN o ARN, de vehículos de suministro víricos o no víricos (o incluso sin vehículo de suministro, en una vacuna "desnuda"), o vectores de replicación o no replicación, o de vectores víricos o no víricos. En el documento WO99/11808 y Cheng y col. (Journal of Virology, 2001, 2368-2376) se suministra ARN desnudo a ratones. En el documento WO2009/042794 y Greer y col. (Vaccine, 2006, 481-489) se administran partículas replicones víricas.

Sigue existiendo la necesidad de más vacunas de ácidos nucleicos mejoradas.

Divulgación de la invención

De acuerdo con la invención, se suministra un ARN que codifica un inmunógeno a las células para desencadenar múltiples rutas de respuesta inmunitaria innata. El ARN suministrado desencadena tanto un receptor de inmunidad innata endosómico (TLR7) como también un receptor de inmunidad innata citoplasmático (MDA5 o RIG-I), aumentando de esta manera la respuesta inmunitaria que se produce cuando se expresa el inmunógeno codificado por el ARN.

Por lo tanto, la invención proporciona un ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno para su uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico de aumento de una respuesta inmunitaria en un vertebrado en el que el inmunógeno da lugar a una respuesta inmunitaria contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito, en el que el procedimiento comprende la administración de ARN a un vertebrado en combinación con liposomas, en el que el ARN está encapsulado en liposomas de manera que el ARN: (i) estimula el receptor de inmunidad innata endosómico TLR7; (ii) estimula el receptor de inmunidad innata citoplasmático RIG-I o MDA5; y (iii) se traduce para proporcionar la expresión del inmunógeno, a condición de que el ARN no incluya nucleótidos modificados.

Administración

La invención implica la administración de una molécula de ARN a un vertebrado. El sitio de administración será habitualmente el tejido muscular, tal como el músculo esquelético. Las alternativas a la administración intramuscular incluyen, pero no se limitan a: la administración intradérmica, intranasal, intraocular, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intersticial, bucal, transdérmica, o sub-lingual. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas.

La administración se puede conseguir mediante distintas maneras. Por ejemplo, se puede utilizar la inyección mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), particularmente para la administración intramuscular, subcutánea, intraocular, intraperitoneal o intravenosa. Se puede utilizar la inyección sin aguja como alternativa.

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

El sitio de administración incluye células no inmunitarias, tal como las células musculares (que pueden estar multinucleadas y se pueden disponer en fascículos) y/o fibroblastos. El ARN entra en el citoplasma de estas células después de (o mientras) administrarse. La entrada puede ser mediante endocitosis, por ejemplo, a través del sarcolema de una célula muscular, o a través de la membrana celular de un fibroblasto. El ARN escapa de los endosomas en el citoplasma, donde se puede unir mediante una ARN helicasa (por ejemplo, en la familia del receptor tipo RIG-I, es decir, RLR) tal como RIG-I (RLR-1), MDA5 (RLR-2) y/o LGP2 (RLR-3). Esta unión inicia la señalización mediada por RLR, desencadenando de esta manera una primera ruta inmunitaria innata que aumenta el efecto inmunogénico del ARN suministrado. Incluso si el ARN suministrado es de cadena sencilla, forma un ARN de doble cadena durante la replicación o debido a su estructura secundaria, lo que significa que el ARN puede iniciar también la señalización mediada por PKR, dando de nuevo lugar al desencadenamiento de una ruta inmunitaria innata citoplasmática. Tanto la señalización mediada por RLR como la mediada por PKR puede dar lugar a la secreción de interferones de tipo I (por ejemplo, el interferón α y/o β) por las células no inmunitarias. Las células no inmunitarias pueden sufrir apoptosis después de la transfección. La señalización mediada por RLR en las células no inmunitarias en presencia de un inmunógeno expresado es una combinación potente para iniciar una respuesta inmunitaria eficaz.

El sitio de administración también incluye células inmunitarias, tales como macrófagos (por ejemplo macrófagos derivados de médula ósea), células dendríticas (por ejemplo células dendríticas plasmacitoides derivadas de médula ósea y/o células dendríticas mieloides derivadas de médula ósea), monocitos (por ejemplo, monocitos humanos de

sangre periférica), etc. Estas células inmunitarias pueden estar presentes en el momento de la administración, pero habitualmente se infiltrarán en el sitio tras la administración. Por ejemplo, el daño tisular causado por la administración invasiva (por ejemplo, causado por la aguja en el sitio de administración) puede hacer que las células inmunitarias se infiltren en el área dañada. Estas células infiltrantes se encontraran con el ARN que está en ese momento en el sitio de suministro y el ARN puede entrar en las células inmunitarias mediante endocitosis. Dentro de los endosomas el ARN se puede unir a TLR7 (ssARN), TLR8 (ssARN) o TLR3 (dsARN), desencadenando de esta manera una segunda ruta inmunitaria innata. Estas células pueden secretar entonces interferones tipo I y/o citocinas pro-inflamatorias. El ARN puede producir este efecto mediante receptores de reconocimiento del patrón, tal como receptores tipo toll (por ejemplo, TLR7), helicasas intracelulares (por ejemplo, RIG-I) y PKR (proteína cinasa dependiente de dsARN). El ARN puede traducirse o no en las células inmunitarias, y por tanto, las células inmunitarias pueden expresar o no el inmunógeno. Si el inmunógeno se expresa por la célula inmunitaria puede presentarse por el MHC-I y/o MHC-II de las células inmunitarias. Si el inmunógeno no se expresa por la célula inmunitaria entonces puede como alternativa capturarse por la célula inmunitaria a partir de otras células (por ejemplo, células no inmunitarias) que ha captado el ARN y expresado el inmunógeno, y el inmunógeno se puede presentar de esta manera por el MHC-II y/o MHC-I de las células inmunitarias. La presentación de antígenos se producirá en general en los ganglios linfáticos de drenaje después de que las células inmunitarias hayan migrado del sitio de administración.

Por lo tanto, el ARN puede desencadenar por separado dos rutas inmunitarias innatas: una mediante señalización citoplasmática (por ejemplo, mediada por RLR y/o mediada por PKR) y la otra mediante señalización endosómica (por ejemplo, mediada por TLR7). Estos dos desencadenantes separados crean un ambiente inmunoestimulante que aumenta la respuesta inmunitaria que se produce cuando el inmunógeno codificado por el ARN se expresa como un polipéptido. Los dos desencadenantes se pueden proporcionar por el mismo tipo celular o por diferentes tipos celulares, por ejemplo, el primer desencadenante podría estar en un fibroblasto mientras que el segundo desencadenante podría estar en una célula dendrítica plasmacitoide. Cuando los dos desencadenantes se proporcionan por el mismo tipo celular, se pueden proporcionar incluso por la misma célula individual. Habitualmente, sin embargo, los dos desencadenantes se proporcionan por tipos celulares diferentes. En algunas realizaciones, el primer desencadenante (señalización mediada por RLR) se produce en células negativas a TLR7 y el segundo desencadenante (señalización mediada por TLR7) se produce en células negativas a RIG-I (o, más generalmente, en células negativas a RLR).

La capacidad de un ARN para estimular un receptor de inmunidad innata endosómico tal como el TLR7, o un receptor de inmunidad innata citoplasmático tal como RIG-I, se puede detectar por ensayos *in vitro* conocidos. La detección indirecta de la interacción ARN/receptor se puede basar en la detección de eventos corriente abajo que siguen a la estimulación del receptor, tal como la detección *in vitro* o *in vivo* de señales de citocina específicas o señales de expresión genética asociadas con receptores particulares. Se prefiere que el ARN “estimule” un receptor de inmunidad innata endosómico o un receptor de inmunidad innata citoplasmático por unión a ese receptor, es decir, el ARN “se une” al receptor más que simplemente “estimularlo”. Los ensayos para la unión de los ARN a estos receptores se conocen en la técnica.

Para aumentar la entrada tanto en células inmunitarias como no inmunitarias y también los efectos intercelulares posteriores, el ARN se administra en combinación con liposomas.

Liposomas

Distintos lípidos anfifílicos forman bicapas en un ambiente acuoso para encapsular un corazón acuoso que contiene el ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza aniónico, catiónico, o zwitteriónico hidrófilo. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos se remontan a los 60, y los lípidos que forman liposomas catiónicos se han estudiado desde los 90. Algunos fosfolípidos son aniónicos mientras que otros son zwitteriónicos y otros son catiónicos. Las clases de fosfolípidos adecuadas incluyen, pero no se limitan a fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, y fosfatidil-gliceroles, y se enumeran algunos fosfolípidos útiles en la Tabla 1. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero no se limitan a dioleoiltrimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-diestheariloxi-N, N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los lípidos zwitteriónicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos acil zwitteriónicos y lípidos éter zwitteriónicos. Ejemplos de lípidos zwitteriónicos útiles son DPPC, DOPC y dodecilfosfocolina. Los lípidos pueden ser saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido insaturado para la preparación de liposomas. Si un lípido insaturado tiene dos colas, ambas colas pueden estar insaturadas, o puede tener una cola saturada y la otra cola insaturada.

Los liposomas se pueden formar a partir de un único lípido o de una muestra de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos (ii) una mezcla de lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos zwitteriónicos (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos zwitteriónicos (vi) una mezcla de lípidos zwitteriónicos y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos zwitteriónicos. De manera similar, una mezcla puede comprender lípidos tanto saturados como insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (zwitteriónico, saturado), DlinDMA (catiónico, insaturado), y/o DMG (aniónico, saturado). Cuando se utiliza una mezcla de lípidos se puede mezclar con colesterol.

La parte hidrófila de un lípido puede éster PEGilada (es decir, modificada por la 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 el PEG utilizando técnicas tales como las que se desvelan en las referencias 1 y 2. Se pueden utilizar PEG de distintas longitudes, por ejemplo, entre 0,5-8 kDa.

Se utiliza en los ejemplos una mezcla de DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol.

Los liposomas se dividen habitualmente en tres grupos: vesículas multilaminares (MLV); vesículas unilaminares pequeñas (SUV); y vesículas unilaminares grandes (LUV). Las MLV tiene múltiples bicapas en cada vesícula, formando varios compartimentos acuosos separados. Las SUV y LUV tienen una única bicapa que encapsula un corazón acuoso; las SUV normalmente tienen un diámetro ≤ 50 nm, y las LUV tienen un diámetro > 50 nm. Los liposomas útiles con la invención son idealmente LUV con un diámetro en el intervalo de 50-220 nm. Para una composición que comprende una población de LUV de diferentes diámetros: (i) al menos un 80 % por cantidad deberían tener diámetros en el intervalo de 20-220 nm, (ii) el diámetro medio (Zav, por intensidad) de la población idealmente está en el intervalo de 40-200 nm, y/o (iii) se espera que los diámetros deberían tener un índice de polidispersión < 0,2. Los complejos liposoma/ARN de la referencia 37 tengan un diámetro en el intervalo de 600-800 nm y que tengan una alta polidispersión.

Las técnicas para la preparación de liposomas adecuados se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véase las referencias 3 a 5. Un procedimiento útil se describe en la referencia 6 e implica mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) un tampón, seguido por mezclado, equilibrado, dilución y purificación. Los liposomas preferidos se obtienen por este procedimiento de mezclado.

El ARN se encapsula en los liposomas, y de esta manera el liposoma una capa externa alrededor del núcleo acuoso que contiene el ARN. Se ha descubierto que esta encapsulación protege al ARN de la digestión por RNasa. Los liposomas pueden incluir algunos ARN externos (por ejemplo en la superficie de los liposomas), pero al menos la mitad del ARN (e idealmente todos) está encapsulado.

El ARN

La invención implica el suministro *in vivo* de ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno. El ARN desencadena dos rutas de inmunidad innata separadas y también se traduce, dando lugar a la expresión del inmunógeno.

El ARN es +-catenario, y por lo tanto se puede traducir sin necesitar la intervención de etapas de replicación tales como la transcripción inversa.

Los ARN +-catenarios son auto-replicantes. Una molécula de ARN auto-replicante (replicón) puede, cuando se suministra a una célula de vertebrado incluso sin ninguna proteína, dar lugar a múltiples ARN hermanos por transcripción de sí mismo (mediante una copia antisentido que se genera de sí mismo). Una molécula de ARN auto-replicante es por tanto una molécula +-catenaria que se puede traducir directamente después del suministro en la célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que entonces produce transcripciones tanto antisentido como en sentido a partir del ARN suministrado. Por lo tanto, el ARN suministrado da lugar a la producción de múltiples ARN hermanos. Estos ARN hermanos, así como las transcripciones subgenómicas co-lineales, se pueden traducir por sí mismas para proporcionar la expresión *in situ* de un inmunógeno codificado, o pueden transcribirse para proporcionar transcripciones adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que se traduce para proporcionar la expresión *in situ* del inmunógeno. Los resultados totales de esta secuencia de transcripciones es una gran amplificación del número de ARN replicones introducidos y por lo tanto el inmunógeno codificado se convierte en el producto polipeptídico principal de las células.

Un sistema adecuado para conseguir la auto-replicación es utilizar un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones +-catenarios se traducen tras el suministro en una célula para dar lugar a una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se auto-escinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias --catenarias del ARN +-catenario suministrado. Estas transcripciones --catenarias pueden transcribirse ellas mismas para dar copias adicionales del ARN +-catenario parental y también para dar una transcripción subgenómica que codifica el inmunógeno. La traducción de la transcripción subgenómica da lugar de esta manera a la expresión *in situ* del inmunógeno por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden utilizar una replicasa de un virus sindbis, un virus de la selva semliki, un virus de encefalitis equina oriental, un virus de encefalitis venezolana, etc. Se pueden utilizar secuencias víricas mutantes o de tipo silvestre, por ejemplo, se ha utilizado la mutante TC83 atenuada del VEEV [15].

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

Como los genomas naturales de alfavirus codifican proteínas estructurales del virión además de la replicasa poliproteica no estructural, se prefiere que una molécula de ARN auto-replicante de la invención no codifique proteínas estructurales del alfavirus. Por lo tanto, un ARN auto-replicante preferido puede dar lugar a la producción

de copias del propio ARN genómico en una célula, pero no a la producción de viriones que contengan el ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia del alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN auto-replicante no puede perpetuarse ella misma en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus de tipo silvestre están ausentes en los ARN auto-replicantes de la invención, y tiene lugar por codificación genética del inmunógeno de interés, de manera que la transcripción subgenómica codifica el inmunógeno más que las proteínas estructurales del virión de alfavirus.

Por lo tanto una molécula de ARN auto-replicante útil en la invención puede tener dos fases de lectura abierta. La primera fase de lectura abierta (5') codifica una replicasa; la segunda fase de lectura abierta (3') codifica un inmunógeno. En algunas realizaciones, el ARN puede tener fases de lectura abiertas adicionales (por ejemplo, corriente abajo) por ejemplo para codificar inmunógenos adicionales (véase posteriormente) o para codificar polipéptidos accesorios.

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

Las moléculas de ARN auto-replicante pueden tener distintas longitudes pero son normalmente de 5000-25000 nucleótidos de longitud, por ejemplo 8000-15000 nucleótidos, o 9000-12000 nucleótidos. Por lo tanto el ARN es más largo que el que se ve en el suministro de ARNip.

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

El nucleótido 5' de una molécula de ARN útil en la invención puede tener un grupo trifosfato 5'. En un ARN protegido este puede estar unido a una 7-metilguanosina mediante un puente 5'-5'. Un trifosfato en 5' puede aumentar la unión con RIG-I.

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

Una molécula de ARN útil en la invención será normalmente de cadena sencilla. Los ARN de cadena sencilla pueden iniciar en general un efecto adyuvante uniéndose a TLR7, TLR8, ARN helicasas y/o PKR. El ARN suministrado en forma de doble cadena (dsARN) se puede unir a TLR3, y este receptor también puede desencadenarse por el dsARN que se forma durante la replicación de un ARN de cadena sencilla o con la estructura secundaria de un ARN de cadena sencilla.

Una molécula de ARN útil en la invención se puede preparar convenientemente por transcripción *in vitro* (IVT). La IVT puede utilizar una matriz (ADNc) creado y propagado en forma de plásmidos en bacterias, o se crea sintéticamente (por ejemplo, por síntesis genética o por procedimientos de modificación con una reacción en cadena de polimerasa (PCR)). Por ejemplo, una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como la ARN polimerasas de bacteriófago T7, T3, o SP6) se pueden utilizar para transcribir el ARN a partir de una matriz de ADN. Las reacciones de protección y adición de poli-A apropiadas se pueden utilizar según se necesite (aunque la poli-A del replicón se codifica habitualmente en la matriz de ADN). Estas ARN polimerasa pueden tener necesidades rigurosas para el nucleótido transcrito 5' y en algunas realizaciones estas necesidades pueden coincidir con las necesidades de la replicasa codificada, para asegurar que el ARN transcrito por IVT puede funcionar eficazmente como sustrato para su replicasa auto-codificada.

El ARN incluye nucleobases no modificadas, e incluyen nucleótidos no modificados es decir, todos los nucleótidos de la ARN son los ribonucleótidos A, C, G y U convencionales (excepto para cualquier estructura protectora 5', que pueden incluir una 7'-metil-guanosina). El ARN puede incluir una protección en 5' que comprenda 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

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

El inmunógeno

Las moléculas de ARN que se utilizan en la invención codifica un inmunógeno polipeptídico. Tras la administración del ARN el inmunógeno se traduce *in vivo* y puede dar lugar a una respuesta inmunitaria contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta de anticuerpos (habitualmente incluyendo una IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. El inmunógeno polipeptídico normalmente dará lugar a una respuesta inmunitaria que reconozca el correspondiente polipéptido bacteriano, vírico, fúngico o parasitario, pero en algunas realizaciones el polipéptido puede actuar como un mimótopo para dar lugar a una respuesta inmunitaria que reconozca un sacárido bacteriano, vírico, fúngico o parasitario. El inmunógeno será normalmente un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glucoproteína de envoltura, una glucoproteína de fijación, etc.

Las moléculas de ARN pueden codificar un único inmunógeno polipeptídico o múltiples polipéptidos. Los múltiples

inmunógenos se pueden presentar como un único inmunógeno polipeptídico (fusión polipeptídica) o como polipéptidos separados. Si los inmunógenos se expresan como polipéptidos separados, entonces uno o más de estos se pueden proporcionar con un IRES corriente arriba o un elemento promotor vírico adicional. De manera alternativa, se pueden expresar múltiples inmunógenos a partir de una poliproteína que codifica inmunógenos individuales fusionados a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo una proteína del virus 2A de la enfermedad de pies y boca), o como inteínas.

A diferencia con las referencias 37 y 17, el ARN codifica un inmunógeno. Para evitar toda duda, la invención no engloba el ARN que codifica una luciferasa de luciérnaga o que codifica una proteína de fusión de β-galactosidasa de *E. coli* o que codifica una proteína fluorescente verde (GFP). también, el ARN no es un ARN total de timo de ratón.

En algunas realizaciones, el inmunógeno da lugar a una respuesta inmunitaria contra una de estas bacterias:

Neisseria meningitidis: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, las proteínas de membrana tales como adhesinas, auto-transportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro, y proteínas de unión al factor H. Una combinación de tres polipéptidos útiles se desvela en la referencia 18.

Streptococcus pneumoniae: Los inmunógenos polipeptídicos útiles se desvelan en la referencia 19. Estos incluyen, pero no se limitan a, la subunidad PrgB pilosa, el precursor beta-N-acetil-hexosaminidasa (spr0057), spr0096, proteína general de estrés GSP-781 (spr2021, SP2216), serina/treonina cinasa StkP (SP1732), y adhesina de superficie neumocócica PsaA.

Streptococcus pyogenes: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos desvelados en las referencias 20 y 21.

Moraxella catarrhalis.

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

Staphylococcus aureus: Los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos desvelados en la referencia 22, tal como hemolisina, esxA, esxB, proteína de unión a ferricromo (sta006) y/o la lipoproteína sta011.

Clostridium tetani: el inmunógeno típico es el toxoide tetánico.

Corynebacterium diphtheriae: el inmunógeno típico es el toxoide diftérico.

Haemophilus influenzae: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos desvelados en las referencias 23 y 24.

Pseudomonas aeruginosa

Streptococcus agalactiae: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos desvelados en la referencia 20.

Chlamydia trachomatis: Los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, tipo OmpH, L7/L12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (por ejemplo, como se desvelan en la referencia 25. LcrE [26] y HtrA [27] son dos inmunógenos preferidos.

Chlamydia pneumoniae: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos desvelados en la referencia 28.

Helicobacter pylori: Los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a CagA, VacA, NAP, y/o ureasa [29].

Escherichia coli: Los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, inmunógenos derivados de la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregadora (EAggEC), *E. coli* adherente difusamente (DAEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Las cepas ExPEC incluyen la *E. coli* uropatogénica (UPEC) y las *E. coli* asociada con meningitis/sepsis (MNEC). Los inmunógenos polipeptídicos UPEC útiles se desvelan en las referencias 30 y 31. Los inmunógenos MNEC útiles se desvelan en la referencia 32. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es el AcfD [35].

Bacillus anthracis

Yersinia pestis: Los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los desvelados en las referencias 34 y 35.

Clostridium perfringens o *Clostridium botulinum*

Legionella pneumophila

Coxiella burnetii

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

Francisella, tal 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 da lugar a una respuesta inmunitaria contra uno de estos virus:

Ortomixovirus: Los inmunógenos útiles pueden ser de un virus influenza A, B o C, tal como la hemaglutinina, neuraminidasa o proteínas M2 de la matriz. Cuando el inmunógeno es una hemaglutinina del virus influenza 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 *Paramixoviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen pero no se limitan a, los derivados de Pneumovirus (por ejemplo, virus respiratorio sincitial, RSV), Rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), Paramixovirus (por ejemplo, virus para influenza), Metapneumovirus y Morbilivirus (por ejemplo, sarampión).

Poxviridae: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de *Ortopoxvirus* tal como *Variola vera*, incluyendo pero sin limitarse a *Variola major* y *Variola minor*.

Picornavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Picornavirus, tales como Enterovirus, Rinovirus, Heparnavirus, Cardiovirus, y Aftovirus. En una realización, el enterovirus es un poliovirus, por ejemplo un poliovirus tipo 1, tipo 2, y/o tipo 3. En otra realización, el enterovirus es un enterovirus EV71. En otra realización el enterovirus en un virus coxsackie A o B.

Bunyavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un *Ortobunyavirus*, tal como el virus de la encefalitis de California, un *Flebovirus*, tal como el virus de la fiebre del Valle del Rift, o un *Nairovirus*, tal como el virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo.

Heparnavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Heparnavirus, tales como el virus de la hepatitis A (VHA).

Filovirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un filovirus, tal como un virus de Ébola (incluyendo un ebolavirus de Zaire, Costa de Marfil, Reston o Sudán) o un virus de Marburgo.

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

Flavivirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a los derivados de Flavivirus, tales como el virus de encefalitis producida por bacterias (TBE), virus del Dengue (tipos 1, 2, 3, o 4), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus de la selva Kyasanur, virus de la encefalitis del Nilo occidental, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis de primavera-verano Rusa, virus de la encefalitis Powassan.

Pestivirus: Los inmunógenos víricos incluyen pero no se limitan a, los derivados de un Pestivirus, tal como el de la diarrea vírica bovina (BVDV), fiebre porcina clásica (CDFV) o enfermedad fronteriza (BDV).

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

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

Rabdovirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Rabdovirus, tal como un Lyssavirus (por ejemplo, virus de la rabia) y Vesiclovirus (VSV).

Caliciviridae: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Caliciviridae, tal como el virus Norwalk (Norovirus), y virus tipo Norwalk, tal como el virus Hawai y el virus de Snow Mountain.

Coronavirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un coronavirus SARS, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis del ratón (MHV), y virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV). El inmunógeno de coronavirus puede ser un polipéptido de fijación.

Retrovirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Oncovirus, un Lentivirus (por ejemplo, VIH-1 o VIH-2) o un Espumavirus.

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

Parvovirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados del Parvovirus B19.

Herpesvirus: Los inmunógenos incluyen pero no se limitan a, los derivados de un herpesvirus humano, tal como, a modo de ejemplo solo, virus del herpes simple (HSV) (por ejemplo, HSV tipo 1 y 2), virus de la varicela-zoster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV), Citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HHV6), herpesvirus humano 7 (HHV7), y herpesvirus humano 8 (HHV8).

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

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

En algunas realizaciones, el inmunógeno da lugar a una respuesta inmunitaria contra un virus que infecta peces, tales como: el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), el virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus del pez gato del canal (CCV), virus de la enfermedad linfoquística de peces (FLDV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), herpesvirus de la carpa koi, virus tipo picorna del salmón (también conocido como virus tipo picorna del salmón atlántico), virus del salmón de interior (LSV), rotavirus de salmón atlántico (ASR), virus de la enfermedad fresa de la trucha (TSD), virus del tumor de salmón coho (CSTV), o virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV).

Los inmunógenos fúngicos se pueden derivar de Dermatofitos, que incluyen: *Epidermophyton floccusum, Microsporum audouini, Microsporum canis, Microsporum distortum, Microsporum equinum, Microsporum gypsum, Microsporum nanum, Trichophyton concentricum, Trichophyton equinum, Trichophyton gallinae, Trichophyton gypseum, Trichophyton megnini, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton quinckeanum, Trichophyton rubrum, Trichophyton schoenleini, Trichophyton tonsurans, Trichophyton verrucosum, T. verrucosum var. album, var. discoides, var. ochraceum, Trichophyton violaceum,* y/o *Trichophyton faviforme; o from Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus sydowi, Aspergillus flavatus, Aspergillus glaucus, Blastoschizomyces capitatus, Candida albicans, Candida enolase, Candida tropicalis, Candida glabrata, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida stellatoidea, Candida kusei, Candida parakwsei, Candida lusitaniae, Candida pseudotropicalis, Candida guilliermondi, Cladosporium carrionii, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatidis, Cryptococcus neoformans, Geotrichum clavatum, Histoplasma capsulatum, Klebsiella pneumoniae, Microsporidia, Encephalitozoon spp., Septata intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi; the less common are Brachiola spp, Microsporidium spp., Nosema spp., Pleistophora spp., Trachipleistophora spp., Vittaforma spp Paracoccidioides brasiliensis, Pneumocystis carinii, Pythiumn insidiosum, Pityrosporum ovale, Sacharomyces cerevisae, Saccharomyces boulardii, Saccharomyces pombe, Scedosporium apiosperum, Sporothrix schenckii, Trichosporon beigelii, Toxoplasma gondii, Penicillium marneffei, Malassezia spp., Fonsecaea spp., Wangiella spp., Sporothrix spp., Basidiobolus spp., Conidiobolus spp., Rhizopus spp, Mucor spp, Absidia spp, Mortierella spp, Cunninghamella spp, Saksenaea spp., Alternaria spp, Curvularia spp, Helminthosporium spp, Fusarium spp, Aspergillus spp, Penicillium spp, Monolinia spp, Rhizoctonia spp, Paecilomyces spp, Pithomyces spp,* y *Cladosporium spp.*

En algunas realizaciones, el inmunógeno da lugar a una respuesta inmunitaria contra un parásito del género *Plasmodium*, tal como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. Por lo tanto, la invención puede utilizarse para la inmunización contra la malaria. En algunas realizaciones, el inmunógeno da lugar a una respuesta inmunitaria contra un parásito de la familia *Galigidae*, particularmente los de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus*, por ejemplo, los piojos marinos tales como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus regercersseyi*.

Composiciones farmacéuticas

El ARN se administrará como un componente en una composición farmacéutica para inmunizar sujetos contra distintas enfermedades. Estas composiciones incluirán normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable además del ARN, a menudo como parte de un sistema de suministro como se ha descrito anteriormente. Una exposición completa de los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 36.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir una o más moléculas pequeñas inmunopotenciadoras. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (por ejemplo, Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (por ejemplo un fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como E6020), un agonista de TLR7 (por ejemplo, imiquimod), un agonista de TLR8 (por ejemplo, resiquimod) y/o un agonista de TLR9 (por ejemplo, IC31). Cualquiera de dichos agonistas tiene un peso molecular de <2000 Da. Cuando se encapsula un ARN en algunas realizaciones, dichos agonistas también se encapsulan con el ARN, pero en otras realizaciones están sin encapsular. Cuando un ARN se adsorbe a una partícula, en algunas realizaciones dichos agonistas también están adsorbidos con el ARN, pero en otras realizaciones están no adsorbidos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir las partículas en agua normal (por ejemplo, api) o en un tampón, por ejemplo, un tampón de fosfato, un tampón Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato, un tampón de histidina, o un tampón de citrato. Las sales del tampón normalmente se incluyen en un 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 darles tonicidad. Es típica una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl, por ejemplo, aproximadamente 9 mg/ml.

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente estériles.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente no pirógenas por ejemplo, que contengan <1 UE (unidad endotóxica, una medida convencional) por dosis, y preferentemente <0,1 EU por dosis.

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

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

Las composiciones se pueden preparar como inyectables, sean soluciones o suspensiones. La composición se puede preparar para la administración pulmonar, por ejemplo, mediante un inhalador, utilizando un pulverizador fino. La composición se puede preparar para la administración nasal, auricular, u ocular, por ejemplo, como un pulverizador o gotas. Los inyectables para la administración intramuscular son típicos.

Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de ARN, así como otros componentes, según sea necesario. Por “cantidad inmunológicamente eficaz” se quiere significar que la administración de esa cantidad a un individuo, sea en una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseada, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica del médico encargado, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encontrará en un amplio intervalo que se puede determinar mediante ensayos de rutina. El contenido de ARN de las composiciones de la invención se expresará en general en términos de la cantidad de ARN por dosis.

Una dosis preferida tiene ≤ 10 µg de ARN, y la expresión se puede ver a niveles mucho más bajos por ejemplo, ≤ 1 µg/dosis, ≤ 100 ng/dosis, ≤ 10 ng/dosis, ≤ 1 ng/dosis, etc.

Los ARN no se suministran en combinación con ribosomas y por tanto las composiciones farmacéuticas están libres de ribosomas.

Procedimientos de tratamiento* y *usos médicos

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

Aumentando la respuesta inmunitaria el vertebrado puede protegerse contra distintas enfermedades y/o infecciones, por ejemplo, contra enfermedades bacterianas y/o víricas, como se ha expuesto anteriormente. Las composiciones que contienen ARN son inmunogénicas, y son más preferentemente composiciones vacunales. 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 serán normalmente profilácticas.

El vertebrado es preferentemente un mamífero, tal como un ser humano o un mamífero grande veterinario (por ejemplo, caballos, ganado bovino, ciervos, cabras, cerdos). Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño en edad de gatear o un bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna concebida para niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención se pueden utilizar para tratar tanto niños como adultos. Por lo tanto un paciente humano puede ser menor de 1 año de edad, menor de 5 años de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos de 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad, y preferentemente ≥ 65 años de edad), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicio amado y personal militar, mujeres embarazadas, pacientes enfermos crónicamente o inmunodeficientes. Sin embargo, las vacunas son adecuadas no solamente para estos grupos, y se pueden utilizar más generalmente en una población.

Las composiciones de la invención se administrarán en general directamente al paciente. El suministro directo se puede conseguir por inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, o en el espacio intersticial de un tejidos, a diferencia de la referencia 37, la inyección intraglosal no se utilizan normalmente en la presente invención), o mucosa, tal como por administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverizador), vaginal, tópica, transdérmica, o transcutánea, intranasal, ocular, auricular, pulmonar u otra administración mucosa. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero se puede utilizar alternativamente la inyección libre de aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

La invención se puede utilizar para dar lugar a una inmunidad sistémica o mucosa, preferentemente para dar lugar a una inmunidad sistémica y/o mucosa aumentada.

La dosificación puede ser mediante un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis Las múltiples dosis se pueden utilizar en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. En un calendario de dosis múltiples las distintas dosis se pueden dar por la misma o diferentes vías, por ejemplo una primaria parenteral y un refuerzo mucoso, una primaria mucosa y un refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples se administrarán normalmente al menos con una semana de separación (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, las dosis múltiples se pueden administrar aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del nacimiento, por ejemplo a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se utiliza a menudo en el Programa de Inmunización Expandida de la Organización Mundial de la Salud (“EPI”). En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias con aproximadamente dos meses de separación, por ejemplo, aproximadamente con 7, 8 o 9 semanas de separación, seguido por una o más dosis de refuerzo aproximadamente de 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8 ,10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias aproximadamente con dos meses de separación, por ejemplo con aproximadamente 7, 8 o 0 semanas de separación, seguido por una o más dosis de refuerzo aproximadamente de 6 meses a 1 año después de la tercera dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10, o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

General

La práctica de la presente invención empleará, a menos de que se indique otra c osa, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, en la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, las referencias 38-44, etc.

La expresión “que comprende” engloba “que incluye” así como “que insiste”, por ejemplo, una composición que “comprende “ X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y..

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

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

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

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

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

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

La familia del receptor tipo RIG-I (“RLR”) incluye varias ARN helicasas que tienen papeles clave en el sistema inmunitario innato [45]. El RLR-1 (también conocido como RIG-I o gen I inducible por ácido retinoico) tiene dos dominios de reclutamiento de caspasa cerca de su extremo N. El nombre de HGNC para el gen que codifica la RLR-1 helicasa es “DDX58” (por el polipéptido box DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 58) y el HGNC ID único es HGNC: 19102. La secuencia RefSeq para el gen de RLR-1 humano es GI: 77732514. El RLR-2 (también conocido como MDA5 o gen 5 asociado con la diferenciación del melanoma) también tiene dos dominios de reclutamiento de caspasa cerca de su extremo N. El nombre HGNC aprobado para el gen que codifica la RLR-2 helicasa es “IFIH1” (por interferón 1 inducido con el domino 1 de helicasa C) y el HGNC ID único es HGNC: 18873. La secuencia RefSeq para el gen de RLR-2 humano es GI: 27886567. El RLR-3 (también conocido como LGP2 o laboratorio de genética y fisiología 2) no tiene dominios de reclutamiento de caspasa. El nombre HNGC aprobado para el gen que codifica la RLR- helicasa es “DHX58” (por polipéptido box DEXH (Asp-Glu-X-His) 58) y el HGNC ID único es HGNC: 29517. La secuencia RefSeq para el gen de RLR-3 humano es GI: 149408121.

PKR es una proteína cinasa dependiente de ARN de cadena doble. Tiene un papel clave en el sistema inmunitario innato. “EIF2AK2” (por alfa cinasa 2 del factor 2 de inicio de la traducción en eucariotas) es el nombre HGNC aprobado para el gen que codifica esta enzima, y su único HGNC ID es HGNC: 9437. La RefSeq para el gen PKR humano es GI: 208431825.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un gel con ARN teñido. Las calles muestran (1) marcadores (2) replicón desnudo (3) replicón tras el tratamiento con RNasa (4) replicón encapsulado en un liposoma (5) liposoma tras el tratamiento con RNasa (6) liposoma tratado con RNasa y luego sometido a extracción con fenol/cloroformo.

La Figura 2 es una micrografía electrónica de liposomas.

La Figura 3 muestra la expresión proteica (como unidades de luz relativas, RLU) los días 1, 3 y 6 tras el suministro de ARN como replicones empaquetados en viriones (cuadrados), ARN desnudo (triángulos), o como micropartículas (círculos).

La Figura 4 muestra un gel con ARN teñido. Las calles muestran (1) marcadores (2) replicón desnudo (3) replicón encapsulado en liposoma (4) liposoma tratado con RNasa y luego sometido a extracción con fenol/cloroformo.

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

La Figura 6 muestra la expresión proteica los días 1, 3 y 6 tras el suministro de cuatro dosis diferentes de ARN encapsulado en liposomas.

La Figura 7 muestra los títulos de IgG anti-F en animales que recibieron el 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 animales que recibían 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 anticuerpo neutralizante en animales que recibían VRP o 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.

La Figura 10 muestra los niveles de expresión tras el suministro de un replicón como ARN desnudo (círculos), ARN encapsulado en liposomas (triángulo y cuadrado), o como un lipoplex (triángulo invertido).

La Figura 11 muestra los títulos de IgG especifica de F (2 semanas después de la segunda dosis) tras el suministro de un replicón como ARN desnudo (0,01-1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,01-10 µg) o empaquetado como un virión (VRP, 10^6 unidades infecciosas o UI).

La Figura 12 muestra los títulos de IgG específica de F (círculos) y títulos de PRNT (cuadrados) tras el suministro de un replicón como ARN desnudo (Vg), ARN encapsulado en liposomas (0,1 o Vg) o empaquetado como un virión (VRP, 10^6 UI). También se muestran los títulos en ratones intactos. Las líneas continuas muestran las medias geométricas.

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

La Figura 14 muestra los títulos de IgG específica de F (títulos medios de Log_{10} ± desv. est.) sobre 63 días (Figura 14A) y 210 días (Figura 14B) tras la inmunización de terneros. Las cuatro líneas se distinguen fácilmente el día 63 y son, de abajo a arriba: control negativo PBS; ARN suministrado en liposomas; ARN suministrado en emulsión; y el producto “Triángulo 4”.

La Figura 15 muestra (A) IFN-β y (B) IL-6 liberado por fibroblastos. Los gráficos incluyen dos grupos de 4 barras. El cuarto izquierdo son para los ratones de control; el cuarto derecho son para los ratones inmunizados con ARN. Las 4 barras de cada cuarto, de izquierda a derecha, muestran los datos de los ratones *rig-i* +/-, *rig-i* -/-, *mda5* +/- y *mda5* -/-. Las figuras son pg/ml.

La Figura 16 muestra (A) IL-6 y (B) IFN-α (pg/ml) liberados por pDC. Hay 4 pares de barras, de izquierda a derecha; control; inmunizados con ARN+DOTAP; inmunizados con ARN+lipofectamina; e inmunizados con ARN en liposomas. En cada par la barra negra es de los ratones tipo silvestre, gris es el mutante *rsq1*.

Modos de llevar a cabo la invención

Replicones ARN

Se utilizan distintos replicones posteriormente. En general se basan en un genoma de alfavirus híbrido con proteínas no estructurales del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), una señal de empaquetamiento de virus sindbis, y una 3’ UTR de 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 (llamados pT7-mvEEV-FLRSVF o A317; pT7-mVEEV-SEAP o A306; pSP6-VCR-GFP o A50) servían como matriz para la síntesis de ARN *in vitro*. Los replicones contienen los elementos genéticos de alfavirus necesarios para la replicación de ARN pero carecen de los productos genéticos codificantes necesarios para el ensamblaje de partículas; las proteínas estructurales se remplazan en su lugar por una proteína de interés (sea un indicador, tal como SEAP o GFP, o un inmunógeno, tal como la proteína F de RSV de longitud completa) y así los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago (T7 o SP6) corriente arriba del ADNc de alfavirus facilita la síntesis del replicón de ARN *in vitro* y una ribozima del virus de hepatitis delta (HDV) inmediatamente corriente debajo de la cola poli(A) genera el extremo 3’ correcto mediante su actividad de auto-escisión.

A continuación del alineamiento del ADN plasmídico corriente debajo de la ribozima de HDV con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron *in vitro* las transcripciones utilizando la ARN polimerasa dependiente de ADN derivado de bacteriófagos T7 o SP6. Las transcripciones se llevaron a cabo durante 2 horas a 37 ºC en presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa de T7) o 5 mM de (ARN polimerasa de SP6) de cada uno de los trifosfatos de nucleósido (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion). A continuación de la transcripción la matriz de ADN se digirió con TURBO DNasa (Ambion). El replicón de ARN se precipitó con LiCl y se reconstituye en agua libre de nucleasas. El ARN no protegido se protegió post-transcripcionalmente con enzima de protección Vaccinia (VCE) utilizando el sistema de protección ScriptCap m7G

(Epicentre Biotechnologies) como se destaca en el manual del usuario; los replicones protegidos de esta manera tienen el prefijo “v”, por ejemplo, vA317 es el replicón A317 protegido mediante VCE. El ARN protegido post-transcripcionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. La concentración de las muestras de ARN se determinaron midiendo la DO_{260nm}. La integridad de las transcripciones *in vitro* se confirmaron por desnaturalización por electroforesis en gel de agarosa.

Adsorción de PLG (ejemplo de referencia)

Se produjeron micropartículas utilizando 500 mg de PLG RG503 (relación molar láctido/glicólido 50:50, PM ~ 30 kDa) y 20 mg de DOTAP utilizando un Homogeneizador Omni Macro. La suspensión de partículas se agitó a 150 rpm durante una noche y entonces se filtró a través de un filtro estéril de 40 µm para almacenarlo a 2-8 ºC. El ARN auto-replicante se adsorbió a las partículas. Para preparar 1 ml de suspensión de PLG/ARN se añadió el volumen de suspensión de partículas PLG a un vial y se añadió agua libre de nucleasas hasta un volumen de 900 µl. Se añadieron 100 µl de ARN (10 µl/ml) gota a gota a la suspensión de PLG, con agitado constante. Se incubó la PLG/ARN a temperatura ambiente durante 30 min. Para 1 ml de suspensión reconstituida, se añadieron 45 mg de manitol, 15 mg de sacarosa y 250-500 µg de PVA. Los viales se congelaron a -80 ºC y se liofilizaron.

Para evaluar la adsorción de ARN, se centrifugaron 100 µl de suspensión de partículas a 10.000 rpm durante 5 min y se recolectó el sobrenadante. Se reconstituyó el PLG/ARN utilizando 1 ml de agua libre de nucleasa. Se añadió a 100 µl de suspensión de partículas (1 µg de ARN), 1 mg de sulfato de heparina. La mezcla se removió y se permitió que se asentara a temperatura ambiente durante 30 min para la desorción de ARN. La suspensión de partículas se centrifugó y se recolectó el sobrenadante.

Para la estabilidad de la RNasa, se incubaron 100 µl de suspensión de partículas con 6,4 mAU de RNasa A a temperatura ambiente durante 30 min. La RNasa se inactivó con 0,126 mAU de Proteinasa K a 55 ºC durante 10 min. Se añadió 1 mg de sulfato de heparina para des-adsorber el ARN seguido por centrifugación. Las muestras del sobrenadante que contenían ARN se mezclaron con colorante cargado con formaldehído, se calentó a 65 ºC durante 10 min y se analizó utilizando un 1 % de gel desnaturalizante (460 ng de ARN cargado por calle).

Para evaluar la expresión, se inmunizaron ratones Balb/c con 1 µg de ARN en 100 µl de volumen de inyección intramuscular (50 µl/pata) el día 0. Se recolectaron los sueros los días 1, 3 y 6. La expresión proteica se determinó utilizando un ensayo de quimioluminiscencia. Como se muestra en la Figura 3, la expresión era mayor cuando el ARN se suministraba mediante PLG (triángulos) que sin la partícula de suministro (círculos).

Nanoemulsión catiónica (ejemplo de referencia)

Se preparó una emulsión de aceite en agua por microfluidificación de escualeno, span 85, polisorbato 80 y cantidades variables de DOTAP. En resumen, los componentes solubles en aceite (escualeno, span 84, lípidos catiónicos, tensioactivos lipídicos) se combinaron en un matraz, se disolvieron los componentes lipídicos en un disolvente orgánico. La solución lipídica resultante se añadió directamente a la fase oleosa. Se permitió que el disolvente se evaporara a temperatura ambiente durante 2 horas en una campana de extracción antes de combinar la fase acuosa y la homogeneización de la muestra para proporcionar una materia prima homogénea. Las emulsiones primarias se pasaron de tres a cinco veces a través de un Microfluidificador con un calderín en un baño de hielo. Los lotes de muestras se retiraron de la unidad y se almacenaron a 4 ºC.

Esta emulsión es por tanto similar al adyuvante comercial MF59, pero se suplementa con un DOTAP catiónico para proporcionar una nanoemulsión catiónica (“CNE”). La composición final de la emulsión “CNE17” era escualeno (un 4,3 % por peso), span 85 (un 0,5 % por peso), polisorbato 80 (un 0,5 % por peso), DOTAP (1,4 mg/ml), en 10 mM de tampón de citrato, pH 6,5.

El ARN se adsorbe a la superficie de las gotículas de aceite en estas emulsiones catiónicas. Para adsorber el ARN se diluyó una solución de ARN hasta una concentración apropiada con agua libre de RNasa y entonces se añadió directamente en un volumen igual de emulsión mientras se removía ligeramente. Se permitió que la solución se asentara a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas para permitir la adsorción. La solución resultante se diluyó hasta la concentración de ARN necesaria antes de la administración.

Encapsulación liposómica

El ARN se encapsuló en liposomas producidos por el procedimiento de las referencias 6 y 46. Los liposomas se fabricaron con un 10 % de DSPC (zwitteriónico), un 40 % de DlinDMA (catiónico), un 48 % de colesterol y un 2 % de DMG conjugado con PEG (PEG de 2 kDa). Estas proporciones se refieren al % molar en el liposoma total.

Se sintetizó el DlinDMA (1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) utilizando el procedimiento de la referencia 1. Se obtuvo el DSPC (1,2-Diastearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) en Genzyme. El colesterol se obtuvo en Sigma-Aldrich. El DMG conjugado con PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol), sal amónica), el DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano), sal de cloruro) y DC-chol (3β-[N-(N’,N’-dimetilaminoetano)-carbamoil] hidrocloruro de colesterol) eran de Avanti Polar Lipids.

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

Por ejemplo, en un procedimiento particular, se prepararon soluciones lipídicas madre recientes 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 lipídica madre recién preparada se agitó suavemente a 37 ºC durante aproximadamente 15 min para formar una mezcla homogénea. Después, 755 µl de la solución madre se añadió a 1,245 ml de etanol para producir una solución lipídica madre de trabajo de 2 ml. Esta cantidad de lípidos se utilizó para formar liposomas con 250 µg de ARN. También se prepararon 2 ml de solución de ARN de trabajo a partir de una solución madre de ~1 µg/ µl en 100 mM de tampón de citrato (pH 6). Se enjuagaron tres viales de cristal de 20 ml (con barras de remover) con solución RNase Away (Molecular BioProducts) y se lavaron con agua completa de MillQ antes de su uso para descontaminar los viales de RNasas. Uno de los viales se utilizó para la solución de ARN de trabajo y los otros para recolectar las mezclas de lípido y ARN (como se describe posteriormente). Las soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 ºC durante 19 min antes de cargarse en jeringas con boquilla luer de 3 cc. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contenían el ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador T (PEEK™ unión ID 500 mm, Idex Health Science) utilizando un tubo FEP (etileno-propileno fluorado, todos los tubos FEP tenían un diámetro interno de 2 mm y un diámetro externo de 3 mm; obtenido en Idex Health Science). La conexión del mezclador T también tenía tubos FEP. La tercera jeringa que contenía en tampón de citrato se conectó a una pieza de tubo distinta.

Todas las jeringas se dirigieron a un caudal de 7 ml/min utilizando una bomba de jeringas. Las conexiones de los tubos se posicionaron para recolectar las mezclas en un vial de 30 ml (mientras se agitaba). Se sacaron las barras de agitado y se permitió que la solución acuosa/etanol se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 h. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se conectó a una pieza de tubo FEP y en otra jeringa de 5 ccc conectada a un tubo FEP de igual longitud, se cargó una cantidad igual de 100 mM de tampón citrato (pH 6). las dos jeringas se dirigieron a un caudal de 7 ml/min utilizando la bomba de jeringas y la mezcla final se recolectó en un vial de cristal de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, la mezcla recolectada de la segunda etapa de mezclado (liposomas) se pasó por una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que retira las moléculas aniónicas, obtenida en Pall Corporation). Antes de utilizar esta membrana para los liposomas, se pasaron sucesivamente 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón de citrato 100 mM (pH 6) a través de la misma. Los liposomas se calentaron durante 10 min a 37 ºC antes de pasarlos a través de la membrana. A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de 1x PBS utilizando una filtración por flujo tangencial antes de recuperar el producto final. El sistema TFF y las membranas de filtración de fibras huecas se adquirieron en Spectrum Labs (Rancho Dominguez) y se utilizaron de acuerdo con las directrices del fabricante. Se utilizaron membranas de filtración de fibra hueca de Polisulfona con un tamaño de corte de poro de 100 kD y un área de superficie de 8 cm^2. Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* las formulaciones se diluyeron a las concentraciones de ARN necesarias con 1x de PBS.

La Figura 2 muestra un ejemplo de micrografía electrónica de liposomas preparados por estos procedimientos. Estos liposomas contienen ARN encapsulado que codifica el antígeno F de RSV de longitud completa. La dispersión de luz dinámica de un lote mostraba un diámetro de 141 nm (por intensidad) o 78 nm (por número).

El porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN se determinaron con el kit de reactivo ARN Quant-iT RiboGreen (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La referencia de ARN ribosómico proporcionado en el kit se utilizó para generar una curva de referencia. Los liposomas se diluyeron 10x o 100x en 1x de tampón TE (del kit) antes de la adición del colorante. Por separado, se diluyeron los liposomas 10x o 100x en 1x de tampón TE que contenía un 0,5 % de Triton X antes de la adición del colorante (para destruir los liposomas y así ensayar el ARN total). A continuación se añadió una cantidad igual de colorante a cada solución y entonces se cargaron ~180 µl de cada solución tras la adición del colorante por duplicado en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Se leyó la fluorescencia (Ex 485 nm, Em 528 nm) en un lector de microplacas. Todas las formulaciones de liposomas se dosificaron *in vivo* basándose en la cantidad de ARN encapsulado.

Se demostró que la encapsulación en liposomas protegía al ARN de la digestión con RNasa. Los experimentos utilizaron 3,8 mAU de RNasa A por microgramo de ARN, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La RNasa se inactivó con Proteinasa K a 55 ºC durante 10 minutos. Se añadió entonces una mezcla 1:1 v/v de muestra a 25:24:1 v/v/v, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para extraer el ARN de los lípidos en la fase acuosa. Las muestras se mezclaron removiendo unos segundos y entonces se colocaron en una centrífuga durante 15 minutos a 12k RPM. La fase acuosa (que contenía el 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 el colorante que carga formaldehído, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65 ºC y se enfrió a temperatura ambiente. Se utilizaron marcadores Ambion Millenium para aproximar el peso molecular de la construcción de ARN. El gel se ejecutó a 90 V. El gel se tiñó utilizando un 0,1 de SYBR oro de acuerdo con las directrices del fabricante en agua agitando a temperatura ambiente durante 1 hora. La Figura 1 muestra que la RNasa digería completamente el ARN en ausencia de encapsulación (calle 3). El ARN es indetectable tras la encapsulación (calle 4), y no se ve ningún cambio si los liposomas se tratan con RNasa (calle 4). Después, los liposomas tratados con RNasa se sometieron a extracción

con fenol, se ve el ARN sin digerir (calle 6). Incluso tras 1 semana a 4 ºC el ARN se podía ver sin ninguna fragmentación (Figura 4, flecha): La expresión proteica *in vivo* no cambiaba tras 6 semanas a 4 ºC y un ciclo de congelación-descongelación. Por lo tanto el ARN encapsulado es estable.

Para evaluar la expresión *in vivo* de ARN se codificaba un enzima indicadora (SEAP; fosfatasa alcalina secretada) en el replicón, más que un inmunógeno. Los niveles de expresión se midieron en suero diluido 1:4 en 1x de tampón de dilución Phospha-Light utilizando un sustrato de fosfatasa alcalina quimioluminiscente. Se inyectó por vía intramuscular a ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad (5/grupo) el día 0, con una dosis de 50 µl por pata de 0,1 µg o 1 µg de ARN. También se administró el mismo vector sin liposomas (en 1x de PBS libre de RNasa) a 1 µg. También se ensayaron los replicones empaquetados en viriones. Los replicones empaquetados en viriones que se utilizan en el presente documento (a los que se hace referencia como "VRP") se obtuvieron por los procedimientos de la referencia 47, en los que el replicón de alfavirus se deriva del VEEV mutante o una quimera derivada del genoma del VEEV modificado para que contenga la 3' UTR del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento del virus Sindbis (PS), empaquetándolos por co-electroporación en células BHK con ARN auxiliares que codifican la cápside del virus Sindbis y genes de glucoproteínas deficientes.

Como se muestra en la Figura 5, la encapsulación aumentaba los niveles de SEAP aproximadamente 1/2 log a la dosis de 1 µg, y la expresión el día 6 de una dosis encapsulada de 0,1 µg se veían niveles coincidentes con una dosis no encapsulada de 1 µg. El día 3, los niveles de expresión excedían los conseguidos con VRP (cuadrados). Por tanto, la expresión aumentaba cuando el ARN se formulaba en liposomas con respecto al ARN desnudo de control, incluso a una dosis 10x menor. La expresión también era mayor con respecto al control de VRP, pero las cinéticas de expresión eran muy diferentes (véase la Figura 5). El suministro del ARN con electroporación daba como resultado un aumento de la expresión con respecto al ARN desnudo de control, pero estos niveles eran menores que con los liposomas.

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

Experimentos con SEAP adicionales demostraban una clara respuesta a la dosis *in vivo*, con expresión que se ve tras el suministro de tan poco como 1 ng de ARN (Figura 6). Experimentos adicionales que comparaban la expresión e replicones encapsulados y desnudos indicaban 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 daba una expresión 12 veces mayor el día 6; a niveles de dosis de 0,1 µg era 24 veces mayor el día 6.

Más que mirar los niveles medios del grupo, también se estudiaron los animales individuales. Mientras que varios animales no respondían a los replicones desnudos, la encapsulación eliminaba los que no respondían.

Experimentos adicionales remplazaban el DlinDMA con DOTAP. Aunque los liposomas con DOTAP daban una expresión mejor que el replicón desnudo, eran inferiores a los liposomas con DlinDMA (2 a 3 veces de diferencia el día 1).

Para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* se construyó un replicón que expresaba la proteína F de longitud completa del virus respiratorio sincitial (RSV). Este se suministró desnudo (1 µg), encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg), o empaquetado en viriones (10^6 UI; "VRP") los días 0 y 21. La Figura 7 muestra los títulos de IgG anti-F, 2 semanas después de la segunda dosis, y los liposomas aumentaban claramente la inmunogenicidad. La Figura 8 muestra los títulos 2 semanas después, en cuyo punto no había una diferencia estadística entre el ARN encapsulado a 0,1 µg, el ARN encapsulado a 1 µg, o el grupo VRP. Los títulos de neutralización (medidos como la reducción de placas del 60 %, "PRNT60") no eran significativamente diferentes en estos tres grupos, 2 semanas después de la segunda dosis (Figura 9). La Figura 12 muestra los títulos de IgG y PRNT, 4 semanas después de la segunda dosis.

La Figura 13 confirma que el ARN da lugar a una respuesta de linfocitos T CD8 robusta.

Experimentos adicionales comparaban los títulos de IgG específica de F en ratones que recibían VRP, 0,1 µg de ARN encapsulado en liposomas, o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas. Las relaciones de título (VRP: liposomas) en distintos momentos después de la segunda dosis eran las siguientes:

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

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

Experimentos adicionales demostraban respuestas de IgG específica de F superiores con una dosis de 10 µg, respuestas equivalentes para dosis de 1 µg y 0,1 µg, una respuesta más baja con una dosis de 0,01 µg. La Figura 11 muestra los títulos de IgG en ratones que recibieron el replicón en forma desnuda con 3 dosis diferentes en liposomas con 4 dosis diferentes, o como VRP (10^6 UI). La respuesta que se ve con 1 µg de ARN encapsulado en liposomas era estadísticamente insignificante (ANOVA) cuando se comparaba con VRP, pero se veía la respuesta mayor con 10 µg de ARN encapsulado en liposomas era estadísticamente significativa ($p<0,05$) en comparación con ambos de estos grupos.

Un estudio adicional confirmaba que 0,1 µg de ARN encapsulado en ribosomas daba respuestas mucho más altas (15 días después de la segunda dosis) que 0,1 µg de ADN suministrado, e incluso era más inmunogénico que 20 µg de ADN plasmídico que codifica el antígeno F, suministrado por electroporación (Sistema de suministro de ADN Elgen™, Inovio).

Un estudio adicional se llevó a cabo en ratas algodón (*Sigmodon hispidis*) en vez de en ratones. A una dosis de 1 µg de encapsulación en liposomas aumentaba los títulos de IgG específica de F unas 8,3 veces en comparación con el ARN desnudo y aumentaba los títulos de PRNT unas 9,5 veces. La magnitud de la respuesta de anticuerpos era equivalente a la inducida por 5×10^6 UI de VRP. Tanto el ARN desnudo como el encapsulado en liposomas eran capaces de proteger las ratas algodón del desafío con RSV (con 1×10^5 unidades formadoras de placas), reduciendo la carga vírica pulmonar al menos unos 3,5 logs. La encapsulación aumentaba la reducción aproximadamente unas 2 veces.

Se llevó a cabo un estudio de grandes animales en ganado bovino. Las vacas se inmunizaron con 55 µg de replicón que codificaba la proteína F de RSV de longitud completa los días 0, 21, 86 y 146, formulado dentro de liposomas o con la emulsión CNE17. El PBS solo se utilizó como control negativo, y una vacuna con licencia se utilizó como control positivo ("Triangle 4" de Fort Dodge, que contenía virus inactivados). La Figura 14 muestra los títulos de IgG específicos de F durante los primeros 63 días. El replicón ARN era inmunogénico en las vacas utilizando ambos sistemas de suministro, aunque daba títulos más bajos que la vacuna con licencia. Todas las vacas vacunadas presentaban anticuerpos específicos de F tras la segunda dosis, y los títulos eran muy estables desde el periodo de 2 a 6 semanas después de la segunda dosis (y eran particularmente estables para las vacunas con ARN). Los títulos con el sistema de suministro en liposomas estaban agrupados más estrechamente que con la emulsión.

Los datos de este estudio proporcionan pruebas del concepto de las vacunas con un replicón ARN RSV en grandes animales, demostrando dos de cinco terneras del grupo adyuvado con la emulsión buenos títulos de anticuerpos neutralizantes después de la tercera vacunación, según se medía por el ensayo de neutralización de HRSV independiente del complemento. En un ensayo de neutralización de HRSV amplificado por complemento todas las terneras vacunadas tenían buenos títulos de anticuerpos neutralizantes después de la segunda vacunación con ARN independientemente de la formulación. Además, ambas vacunas con ARN daban lugar a títulos de IgG en el suero específicos de F que se detectaban en unas cuantas terneras después de la segunda vacunación y en todas las terneras después de la tercera vacunación. La F de RSV adyuvada con MF59 era capaz de reforzar la respuesta de IgG en todas las terneras vacunadas previamente y reforzar los títulos de neutralización de HRSV independiente de complemento de terneras vacunadas previamente con ARN.

Mecanismo de acción

Se obtuvieron células dendríticas derivadas de médula ósea (pDC) a partir de ratones de tipo silvestre o de la cepa mutante "Resq" (*rsq1*). La cepa mutante tenía una mutación puntual en el extremo amino de su receptor TLR7 que abolía la señalización de TLR7 sin afectar la unión al ligando [48]. Las células se estimularon con el replicón ARN formulado con DOTAP, lipofectamina 2000 o en un liposoma. Como se muestra en la Figura 16, se inducían IL-6 e IFN-α en células TS pero esta respuesta se anulaba casi completamente en los ratones mutantes. Estos resultados demuestran que el TLR7 es necesario para el reconocimiento del ARN en las células inmunitarias, y que los replicones encapsulados en liposomas produce que las células inmunitarias secreten altos niveles tanto de interferones como de citocinas pro-inflamatorias.

La implicación de TLR7 se investigó adicionalmente, comparando las respuestas en ratones C57BL/6 de tipo silvestre (TS) y en la cepa mutante "Resq". Se les administraron a los ratones (5 por grupo) vacunas bilaterales intramusculares (50 µl por pata) los días 0 y 21 con 1 µg de ARN auto-replicante ("vA317", que codifica la glucoproteína de fusión de RSV) formulado en liposomas (un 40 % de DlinDMA, un 10 % de DSPC, un 48 % de colesterol, un 2 % de conjugado PEG-DMG), o con 2 µg de proteína F de RSV adyuvada con hidróxido de aluminio.

Se recolectó el suero para los análisis inmunológicos los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Los títulos de IgG en el suero específicos de F (GMT) eran los siguientes:

		Vacuna de ARN		Vacuna proteica	
	Día	TS	Resq	TS	Resq
IgG total	14	1038	145	2324	2601
	35	9038	1224	27211	17150
IgG 1	14	25	25	3657	2974
	35	125	125	34494	26459
IgG 2c	14	1941	211	25	25
	35	35804	2080	125	125

Con la vacuna proteica, los títulos de IgG específica de F en el suero eran comparables entre los ratones de tipo silvestre y los C56BL/6 Resq, es decir, la inmunogenicidad de la vacuna de proteína no era dependiente de TLR7. Por el contrario el ARN auto-replicante formulado en liposomas mostraba una disminución de 7 veces en los títulos de IgG específica de F en el suero tras ambas vacunaciones, indicando al menos una dependencia parcial del TLR7 para la inmunogenicidad de la vacuna de ARN.

Los resultados también muestran que la vacuna ARN puede dar lugar primariamente a una respuesta inmunitaria tipo Th1.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales con el mismo ARN y los mismos ratones mutantes. Los ratones recibieron vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con 1 µg del replicón ARN, formulado con una nanoemulsión de aceite en agua catiónica submicrométrica (escualeno, span 85, polisorbato 80, DOTAP) o con liposomas (un 40 % DlinDMA, un 10 % de DSPC, un 48 % de colesterol, un 2 % de DMG conjugado con PEG). Se utilizaron 2 µg de proteína F adyuvada con aluminio para la comparación. Los sueros se recolectaron para los análisis inmunológicos los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2).

Los títulos de IgG, IgG1 e IgG2c específicas de F en el suero (GMT) eran los siguientes:

		ARN + liposoma		ARN + CNE		Vacuna proteica	
	Day	TS	Resq	TS	Resq	TS	Resq
IgG total	14	718	401	849	99	2795	2295
	35	2786	1650	1978	374	41519	33327
IgG 1	14	25	25	136	76	3410	3238
	35	125	125	195	183	38150	48040
IgG 2c	14	1605	849	136	76	25	25
	35	14452	3183	7567	335	125	125

Estos resultados confirman los hallazgos previos que, a diferencia de que la vacuna proteica, la vacuna de ARN muestra al menos una dependencia parcial del TLR7 para su inmunogenicidad, particularmente con la emulsión adyuvante.

Respuestas adicionales de receptores* y *citocinas de inmunidad innata

Como se muestra anteriormente, un replicón que se suministra puede estimular las células dendríticas del ratón tipo silvestre para que secreten IFN-α e IL-6, pero la misma respuesta no se veía en células dendríticas de ratones que albergaban la mutación Resq en TLR7.

De manera similar, los replicones vA317 suministrados con lipofectamina pueden estimular los fibroblastos de ratón de tipo silvestre para secretar altos niveles de IFN-β e IL-6, pero los replicones estimulaban niveles mucho más bajos de estas citocinas en fibroblastos que carecían de MDA5 o RIG-I, es decir, receptores citoplasmáticos de ARN (véase la Figura 15). Estos fibroblastos son células no inmunitarias que no responden a los ligandos TLR7. Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de ratones knockout RIG-I y MDA5 (-/-) se estimularon con el ARN formulado con lipofectamina 2000. Los hermanos heterocigotos (+/-) se utilizaron como controles. El ARN estimulaba

IL-6 e IFN-β en los ratones heterocigotos pero en los ratones knockout la activación estaba casi completamente anulada. Por lo tanto estas helicasas son importantes para el reconocimiento del ARN en células no inmunitarias. En general, los replicones ARN suministrados en liposomas demostraban inducir varias citocinas séricas en 24 horas de la inyección intramuscular (IFN-α, IP-10 (CXCL-10), IL-6, KC, IL-5, IL-13, MCP-1, y MIP-a), mientras que solo la MIP-1 era inducida por el ARN desnudo y el liposoma solo inducía la IL-6 solamente.

Se demostró que el IFN-α contribuía a la respuesta inmunitaria del replicón que codifica la F de RSV encapsulado en liposomas debido a que anticuerpo anti-receptor de IFNα (IFNAR1) reducía la IgG específica de F del suero con una reducción de 10 veces después de 2 vacunaciones.

Cinética de expresión

Experimentos sobre la cinética de expresión utilizaba ARN que codificaba GFP o la enzima indicadora SEAP. El replicón "vA306" codifica SEAP; el replicón "vA17" codifica GFP; el replicón "vA336" codifica GFP pero no se auto-replica; el replicón "vA336*" es el mismo que el vA336 pero se preparó con un 10 % de uridina sustituidas por 5-metiluridinas; el replicón "vA336**" es el mismo que el vA336 pero el 100 % de sus restos de uridina son M5U. Se pusieron a los ratones BALB/c vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) el día 0. Los animales, 35 en total, se dividieron en 7 grupos (5 animales por grupo) y se inmunizaron de la siguiente manera.

Grupo 1 Control intacto.

Grupo 2 se les puso vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclados con ARN auto-replicante (vA17, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

Grupo 3 se les puso vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclados con ARN auto-replicante (vA336, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

Grupo 4 se les puso vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclados con ARN auto-replicante (vA336*, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

Grupo 5 se les puso vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclados con ARN auto-replicante (vA336**, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

Grupo 6 se les puso vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclados con liposomas vacíos a la misma dosis de lípidos que los grupos 2-5.

Grupo 7 se les puso vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclados con ARN auto-replicante (vA17, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

Estos experimentos ayudaron a ver si las respuestas del huésped al ARN podía limitar la expresión proteica. Por lo tanto la expresión se siguió solamente durante 6 días, antes de que fuera evidente una respuesta adaptativa (anticuerpos, linfocitos T). La actividad de SEAP en el suero (unidades de luz relativas) los días 0, 3 y 6 eran las siguientes (GMT):

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

El ARN competente para replicación que codifica GFP suprimía la expresión de SEAP más que el ARN de GFP deficiente para replicación, sugiriendo una respuesta fuerte de defensa del huésped contra el ARN replicante que da lugar a la supresión de la expresión de SEAP. Es posible que los interferones inducidos en respuesta al ARN GFP suprimieran la expresión de SEAP. En el modelo de supresión /respuesta del huésped, se esperaría que el bloqueo

del reconocimiento del ARN por el huésped diera lugar a una expresión aumentada de SEAP, pero la metilación 5' de los restos de U en el ARN de GFP no se asociaba con el aumento de SEAP, sugiriendo que el reconocimiento de ARN por el huésped era insensible a la metilación en 5'.

Tabla 1: fosfolípidos útiles

DDPC	1,2-Didecanoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-Fosfato
DEPC	1,2-Erucoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3 [Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-Fosfato
DLPC	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DLPS	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-Fosfato
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG	1,2-Miristoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DMPS	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfato
DOPC	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DOPS	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-Fosfato
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
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-Distearoil-sn-Glicero-3-Fosfato
DSPC	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DSPS	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenada
HSPC	PC de soja hidrogenada de alta pureza
HSPC	PC de soja hidrogenada
LYSOPC MIRÍSTICO	1-Miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMÍTICO	1-Palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC ESTEÁRICO	1-Estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
Esfingomielina de leche MPPC	1-Miristoil,2-palmitoil-sn-Glicero 3-fosfatidilcolina
MSPC	1-Miristoil,2-estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
PMPC	1-Palmitoil,2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-Palmitoil,2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)...]
PSPC	1-Palmitoil,2-estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-Estearoil,2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

(continuación)

SOPC	1-Estearoil,2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-Estearoil,2-palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

Referencias

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

[2] Documento WO2005/121348.

[3] Liposomes: Methods and Protocols, Volumen 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (Ed. Weis-sig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.

[4] Liposome Technology, volúmenes I, II y III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.

[5] Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (Eds. Arshady y Guyot). Citus Books, 2002.

[6] Jeffs y col. (2005) Pharmaceutical Research 22 (3):362-372.

[7] Polymers in Drug Delivery. (Eds. Uchegbu y Schatzlein). CRC Press, 2006.

[8] Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (Eds. Cohen y Bernstein). CRC Press, 1996.

[9] O'Hagan y col. (2001) J Virology 75:9037-9043.

[10] Singh y col. (2003) Pharmaceutical Research 20: 247-251.

[11] Documento WO2009/13220.

[12] Documento US-2008/0085870.

[13] Documento US-2008/0057080.

[14] Documento US-2007/0014805.

[15] Documento WO2005/113782.

[16] Documento WO2011/005799.

[17] El Ouahabi y col. (1996) FEBS Letts 380:108-12.

[18] Giuliani y col. (2006) Proc Natl Acad SciDocumento USA 103(29):10834-9.

[19] Documento WO2009/016515.

[20] Documento WO02/34771.

[21] Documento WO2005/032582.

[22] Documento WO2010/119343.

[23] Documento WO2006/110413.

[24] Documento WO2005/111066.

[25] Documento WO2005/002619.

[26] Documento WO2006/138004.

[27] Documento WO2009/109860.

[28] Documento WO02/02606.

[29] Documento WO03/018054.

[30] Documento WO2006/091517.

[31] Documento WO2008/020330.

[32] Documento WO2006/089264.

[33] Documento WO2009/104092.

[34] Documento WO2009/031043.

[35] Documento WO2007/049155.

[36] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.

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

[38] Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)

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

[40] Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

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

[42] Ausubel y col. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).

[43] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)

[44] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag)

[45] Yoneyama y Fujita (2007) Cytokine & Growth Factor Reviews 18:545-51.

[46] Maurer y col. (2001) Biophysical Journal, 80: 2310-2326.

[47] Perri y col. (2003) J Virol 77:10394-10403.

[48] Iavarone y col. (2011) J Immunol 186; 4213-22.

REIVINDICACIONES

1. Un ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno para su uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico de aumento de una respuesta inmunitaria en un vertebrado en el que el inmunógeno da lugar a una respuesta inmunitaria contra una bacteria, un virus, un hongo, o un parásito, que comprende la administración de dicho ARN que codifica un inmunógeno al vertebrado en combinación con liposomas, en el que el ARN está encapsulado en los liposomas de manera que el ARN: (i) estimula el receptor de inmunidad innata endosómico TLR7; (ii) estimula el receptor de inmunidad innata citoplasmático RIG-1 o MDA5; y (iii) se traduce para proporcionar la expresión del inmunógeno, a condición de que el ARN no incluya nucleótidos modificados.

2. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ARN se administra en el tejido muscular esquelético.

3. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el ARN se administra por inyección.

4. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la inyección es mediante una aguja.

5. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARN es + catenario.

6. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inmunógeno puede dar lugar a una respuesta inmunitaria *in vivo* contra: (a) glucoproteína F del virus respiratorio sincitial; (b) un virus que infecte peces, tal como el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), el virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus del pez gato del canal (CCV), virus de la enfermedad linfoquística de peces (FLDV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), herpesvirus de la carpa koi, virus tipo picorna del salmón (también conocido como virus tipo picorna del salmón atlántico), virus del salmón de interior (LSV), rotavirus de salmón atlántico (ASR), virus de la enfermedad fresa de la trucha (TSD), virus del tumor de salmón coho (CSTV), o virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV); (c) ortomixovirus, tal como el virus influenza A, B y C; o (d) herpesvirus, tal como los virus del herpes simple (HSV), virus varicela-zóster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus 6 humano (HHV6), herpesvirus 7 humano (HHV7), y herpesvirus 8 humano (HHV8).

7. Una composición farmacéutica que comprende un ARN auto-replicante que codifica un inmunógeno para su uso en un procedimiento de inmunización de un sujeto vertebrado contra una enfermedad en la que el inmunógeno da lugar a una respuesta inmunitaria contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito, en el que el procedimiento comprende la administración de dicho ARN que codifica un inmunógeno al vertebrado en combinación con liposomas, en el que el ARN está encapsulado en los liposomas, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, de manera que el ARN: (i) estimula el receptor de inmunidad innata endosómico TLR7; (ii) estimula el receptor de inmunidad innata citoplasmático RIG-1 o MDA5; y (iii) se traduce para proporcionar la expresión del inmunógeno, en el que el inmunógeno da lugar a una respuesta inmunitaria contra un virus, un hongo o un parásito, a condición de que el ARN no incluya nucleótidos modificados.

8. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el ARN tiene una protección en 5'.

9. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la protección en 5' incluye una 7-metilguanosina.

FIGURA 1

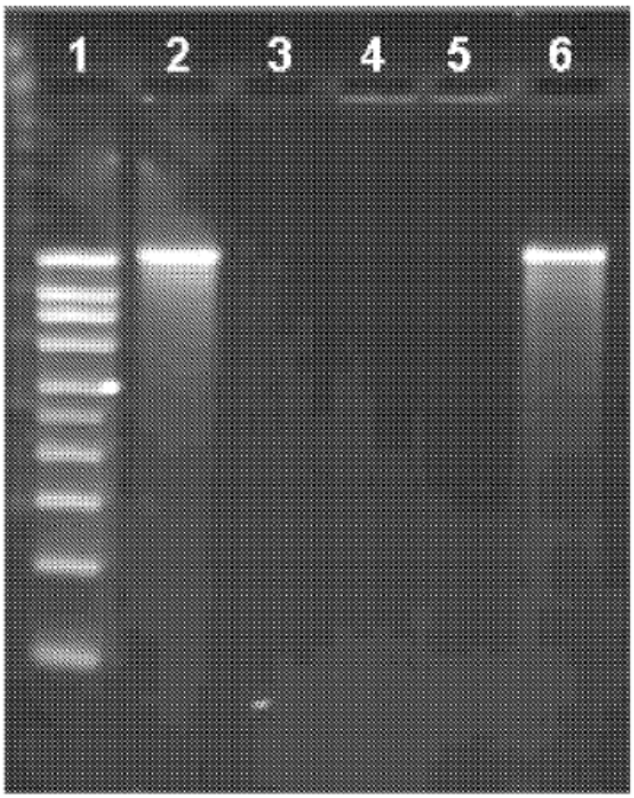

FIGURA 2

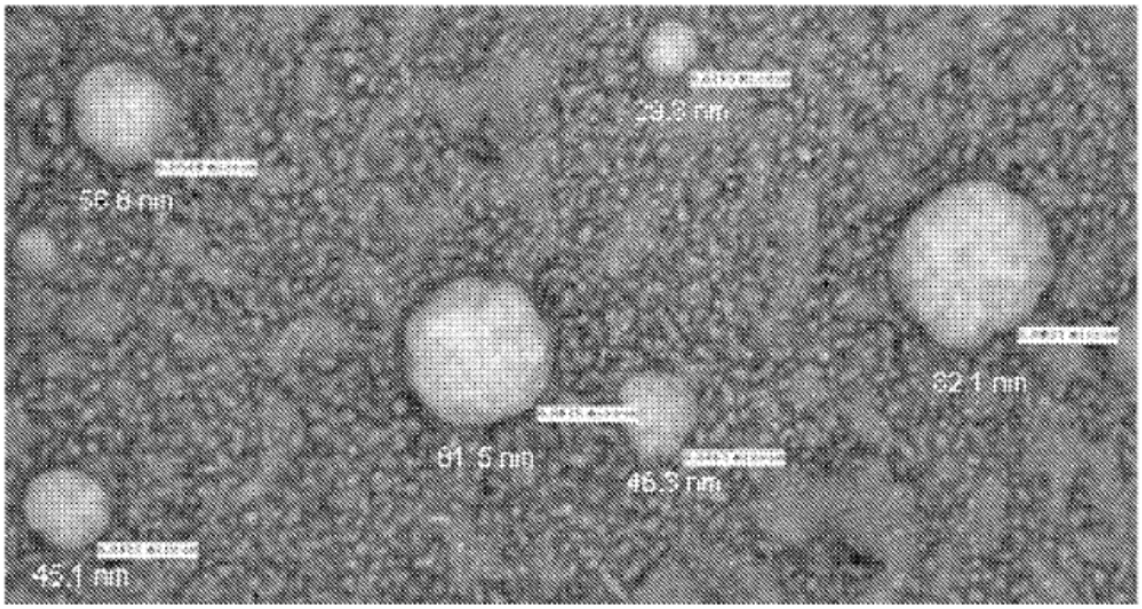

FIGURA 3

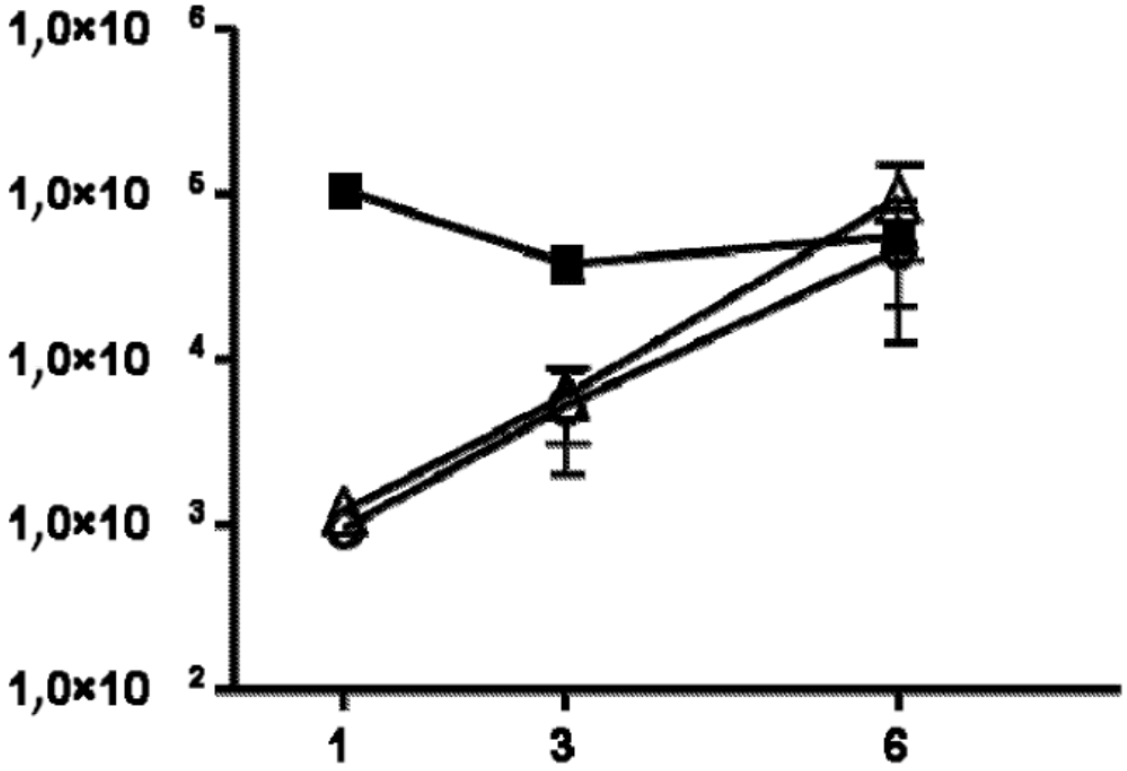

FIGURA 4

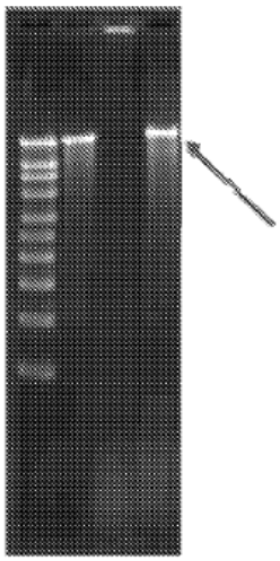

FIGURA 5

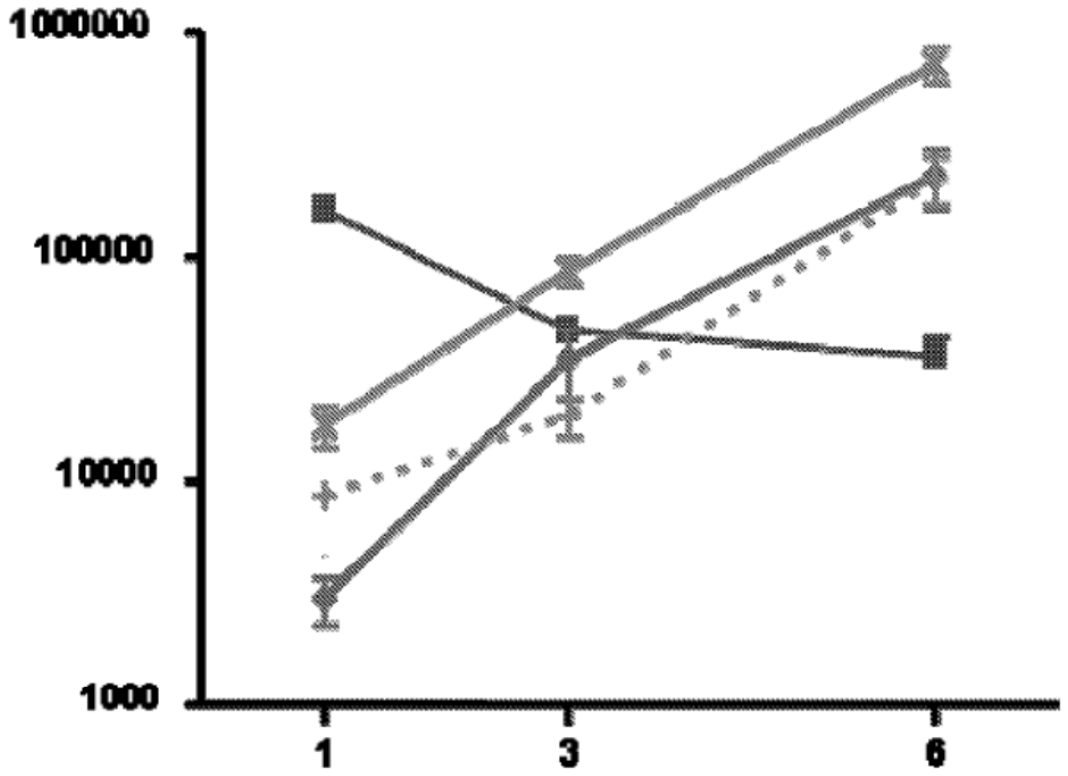

FIGURA 6

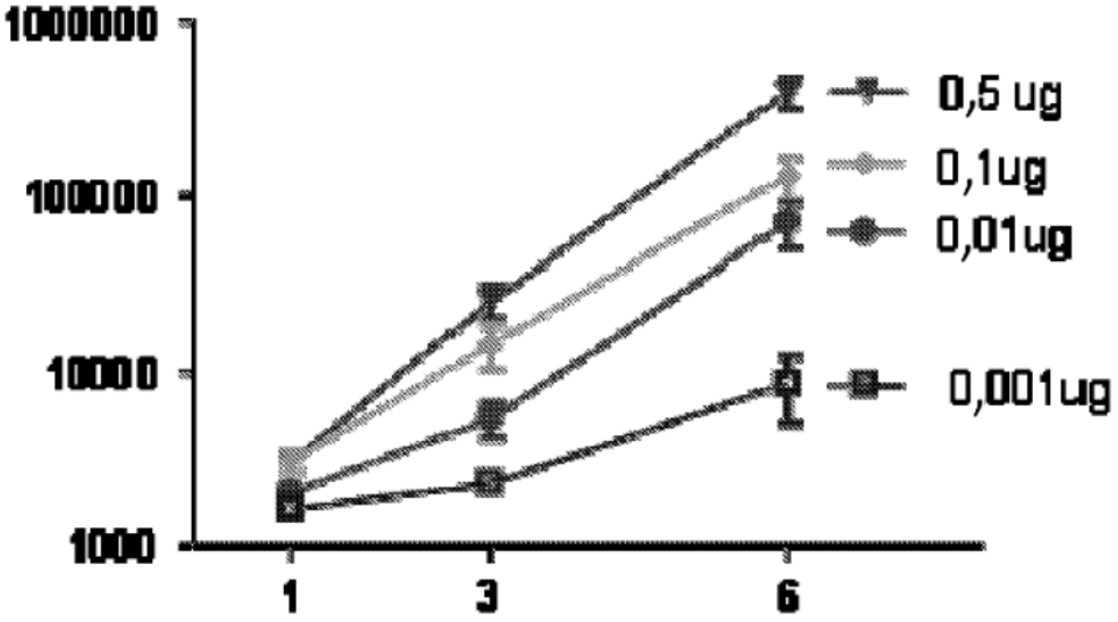

FIGURA 7

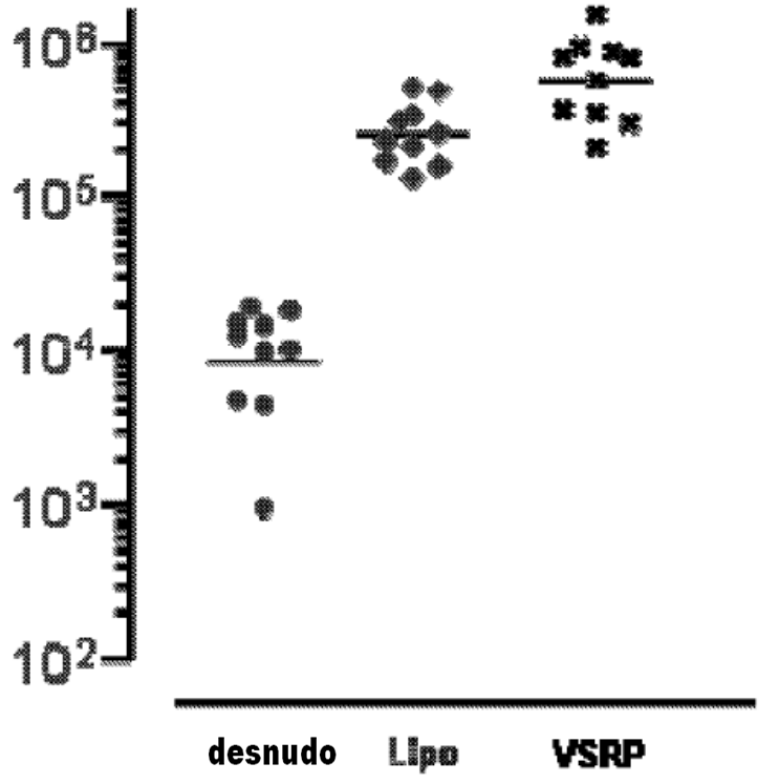

FIGURA 8

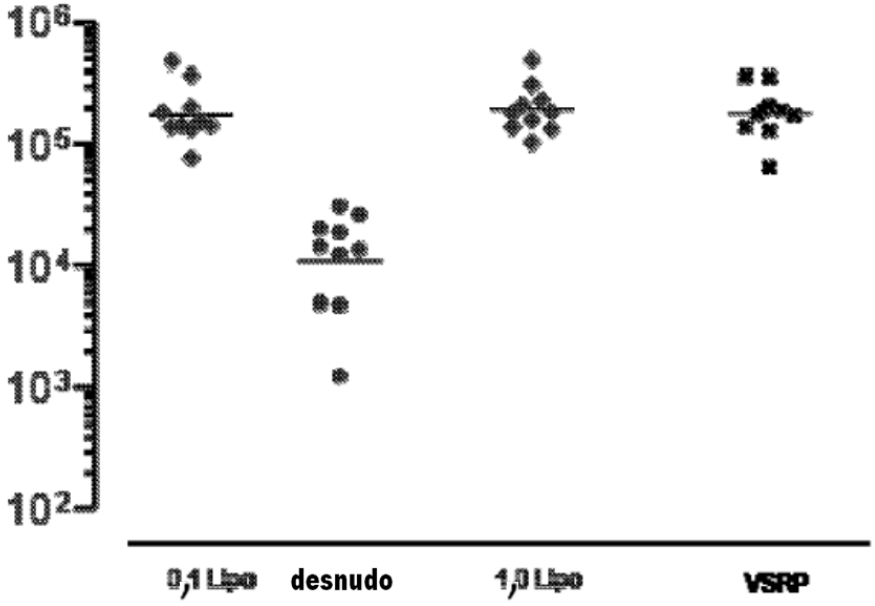

FIGURA 9

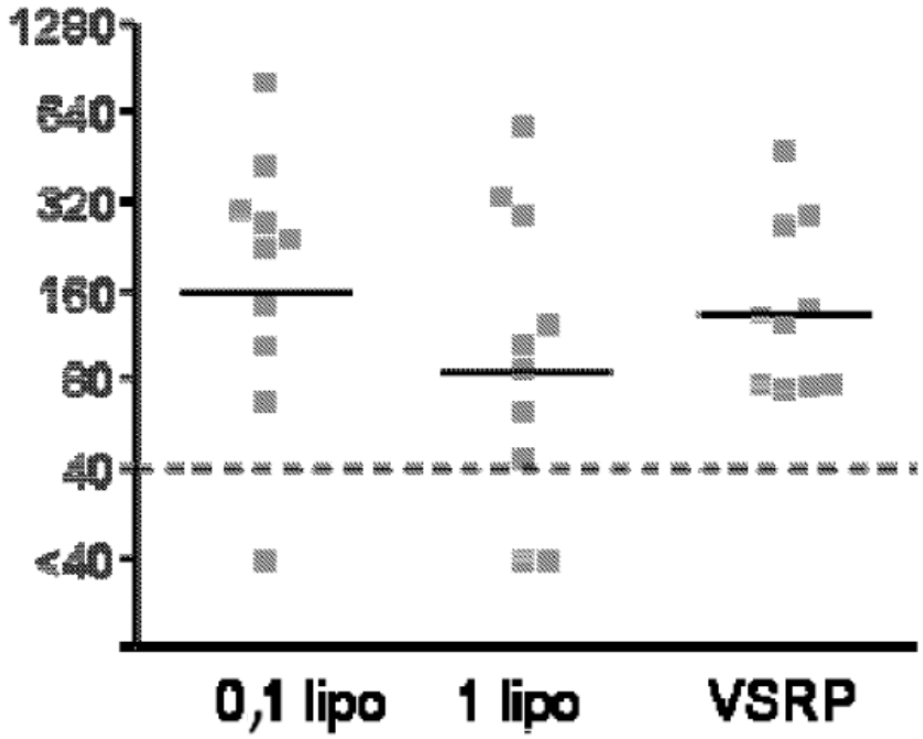

FIGURA 10

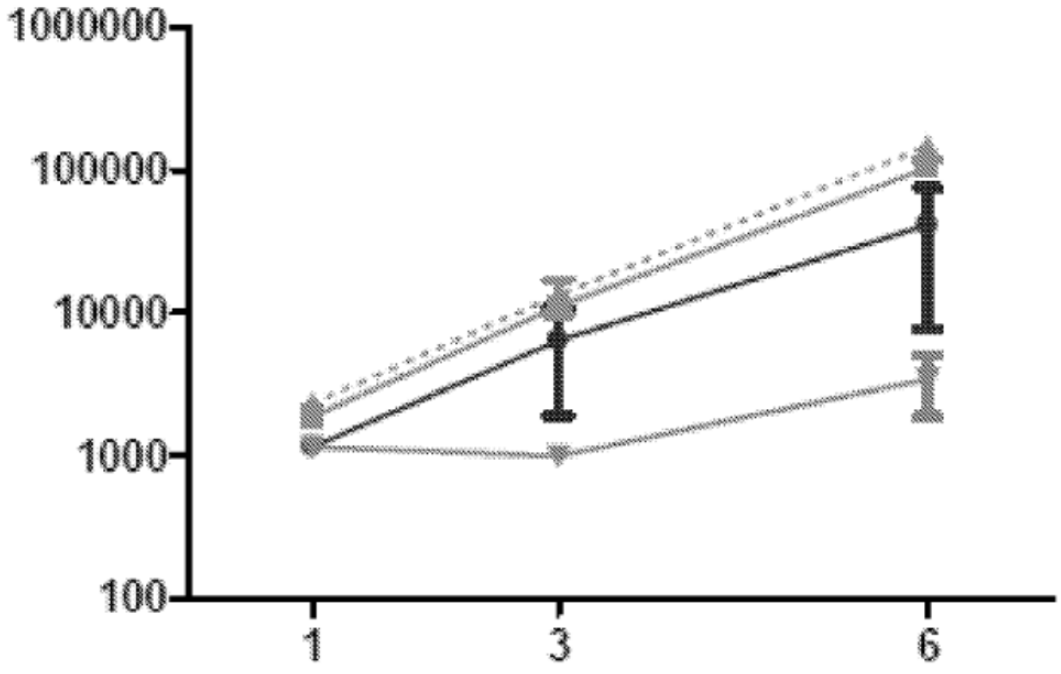

FIGURA 11

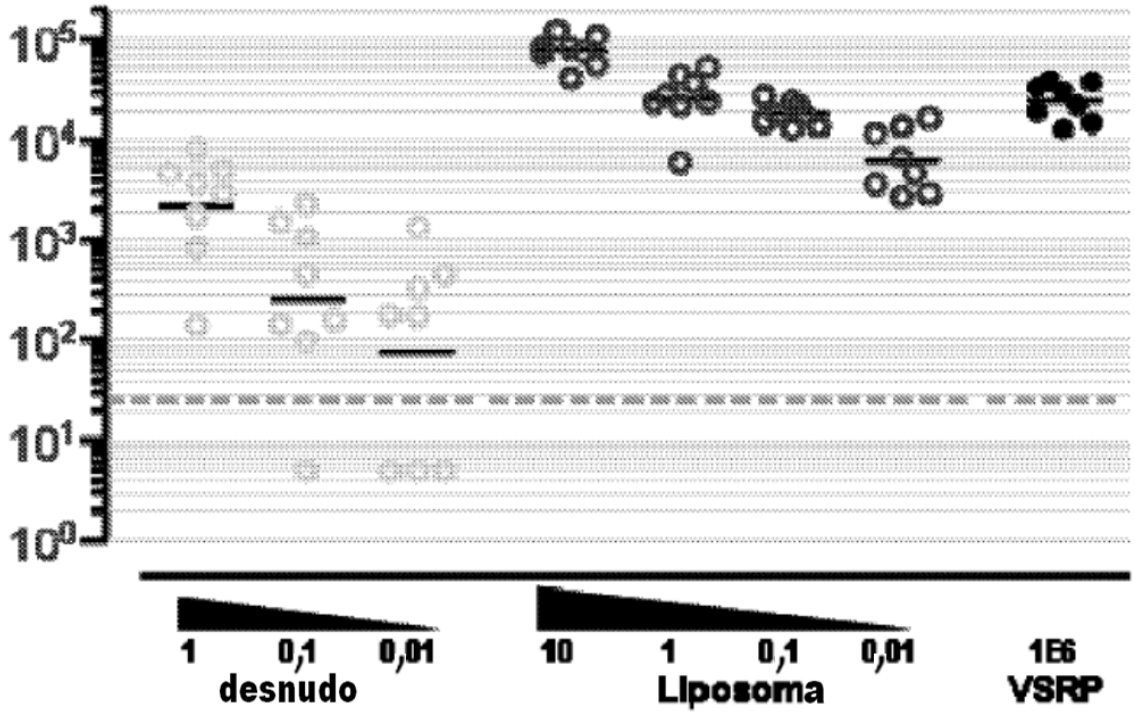

FIGURA 12

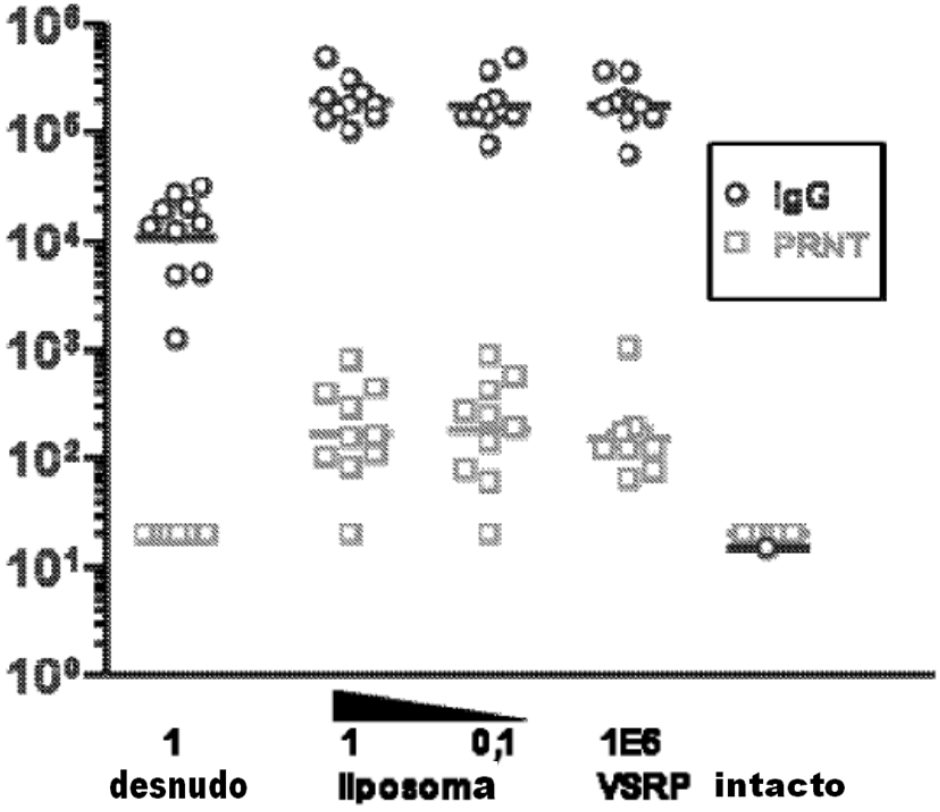

FIGURA 13

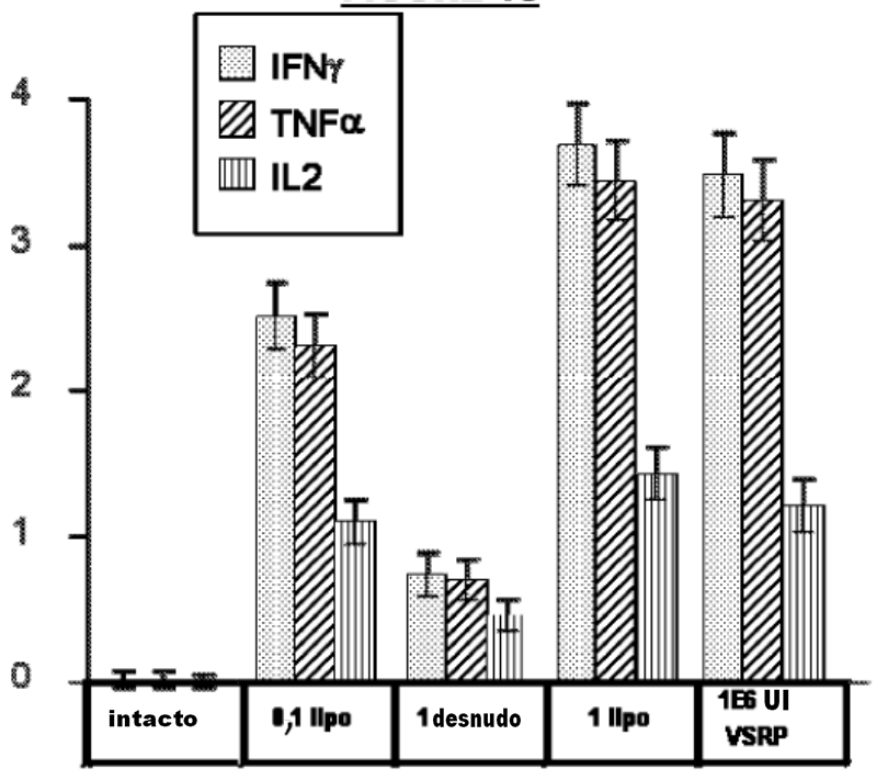

FIGURA 14

FIGURA 14A

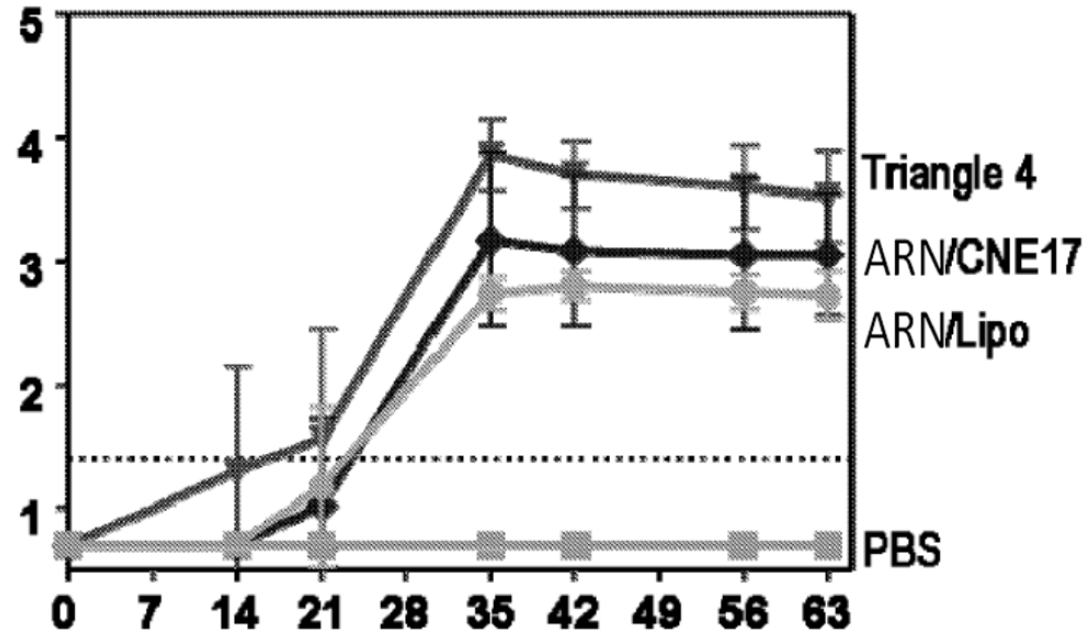

FIGURA 14B

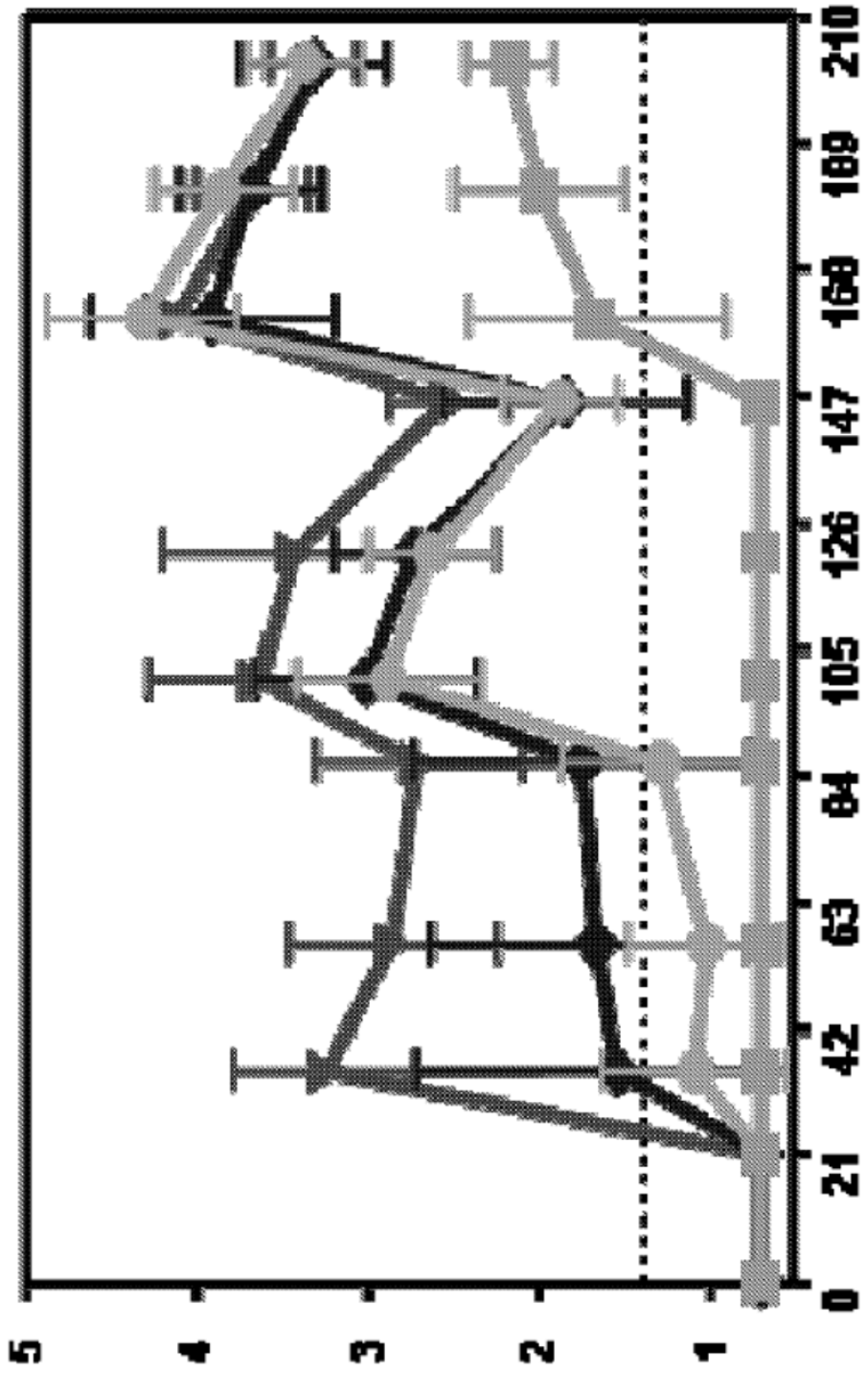

FIGURA 15

FIGURA 15A

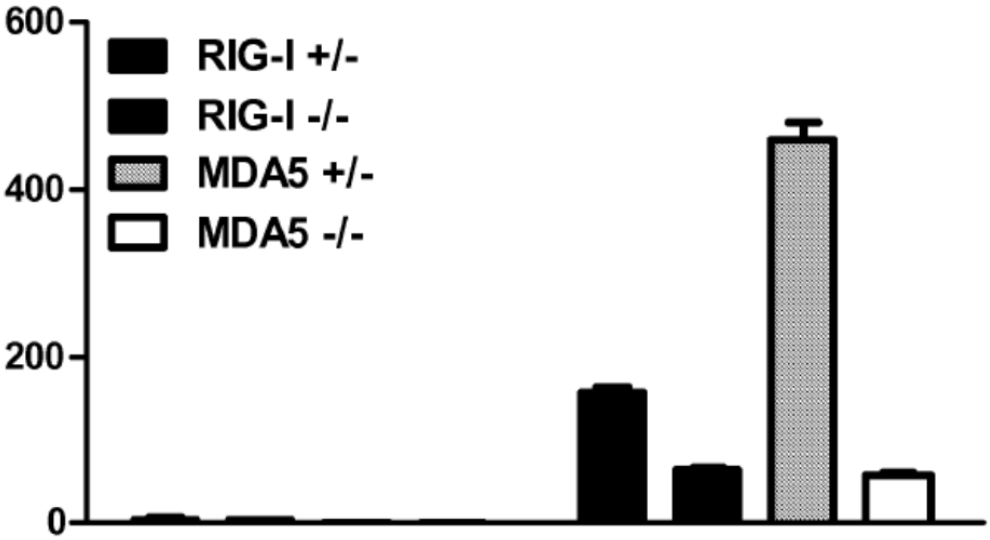

FIGURA 15B

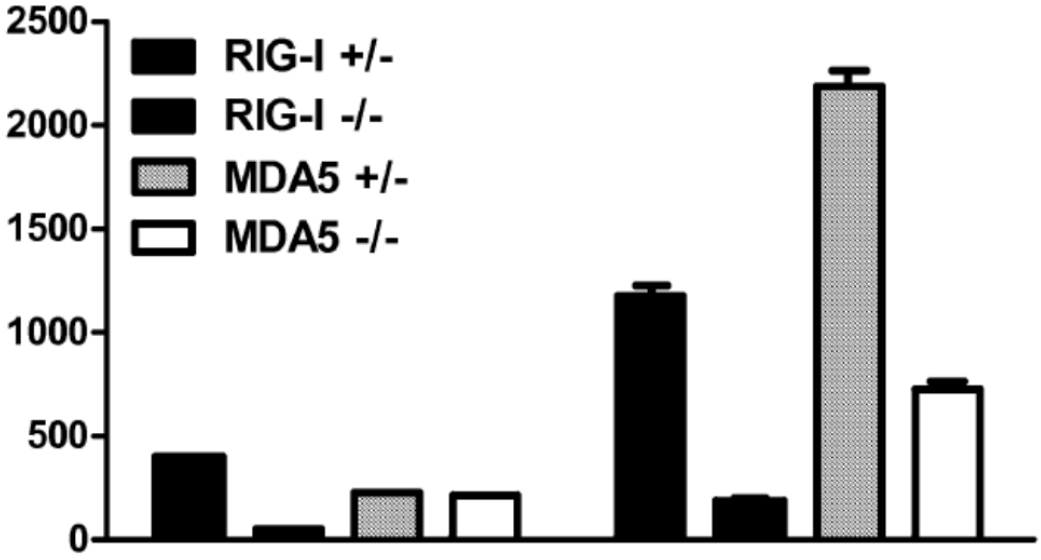

FIGURA 16

FIGURA 16A

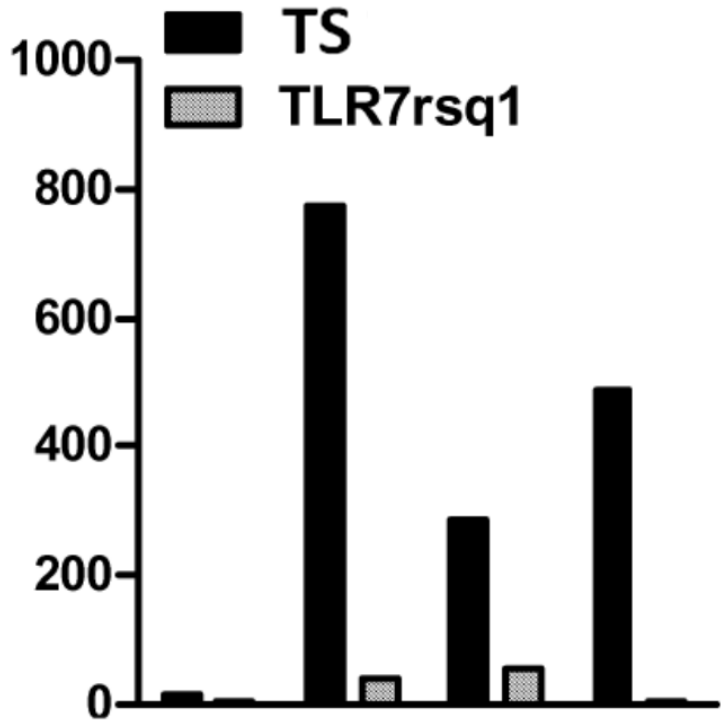
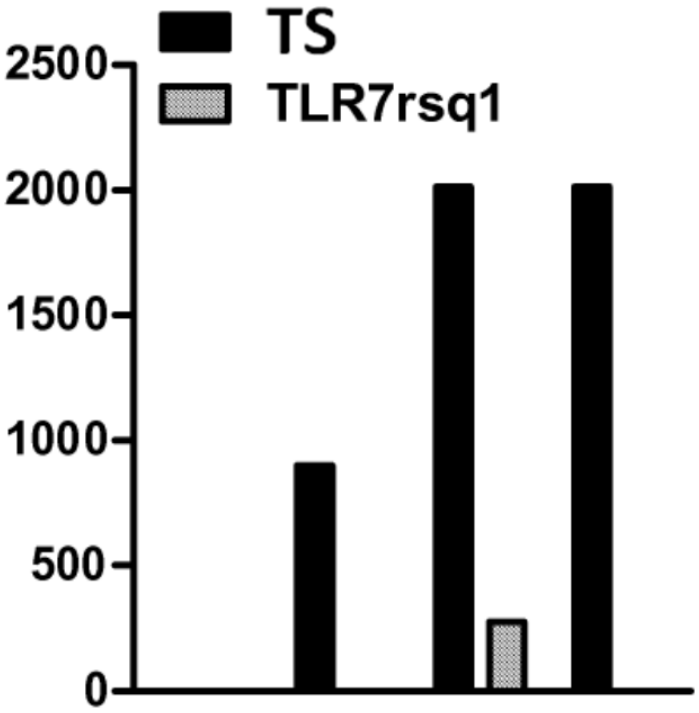
FIGURA 16B