

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 547**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/US2012/045840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12738311 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2729125**

54 Título: **Emulsiones aceite en agua que contienen ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**06.07.2011 US 201161505091 P**  
**11.01.2012 US 201261585639 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRITO, LUIS;**  
**CHAN, MICHELLE;**  
**GEALL, ANDREW;**  
**O'HAGAN, DEREK y**  
**SINGH, MANMOHAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 657 547 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Emulsiones aceite en agua que contienen ácidos nucleicos

**Antecedentes de la invención**

5 Los productos terapéuticos de ácidos nucleicos son promisorios para tratar enfermedades que varían desde desordenes heredados hasta afecciones adquiridas tal como cáncer, trastornos infecciosos (SIDA), enfermedad cardiaca, artritis y trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, enfermedad de Parkinson y Alzheimer). No solamente se pueden suministrar genes funcionales para reparar una deficiencia genética o inducir la expresión de productos génicos exógenos, sino que el ácido nucleico también se puede administrar para inhibir la expresión génica endógena con el fin de proporcionar un efecto terapéutico. La inhibición de la expresión génica puede estar  
10 mediada mediante, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARN bicatenario (por ejemplo, siARN, miARN), o ribozimas.

Una etapa clave para dicha terapia es administrar moléculas de ácido nucleico en las células in vivo. Sin embargo, la administración in vivo de moléculas de ácido nucleico, en particular moléculas de ARN, enfrenta a una serie de obstáculos técnicos. Primero, debido a las nucleasas de suero y celulares, la vida media del ARN inyectado in vivo es solamente de aproximadamente 70 segundos (véase por ejemplo Kurreck, Eur. J. Bioch. 270:1628-44 (2003)). Se han hecho esfuerzos para incrementar la estabilidad del ARN inyectado mediante el uso de modificaciones químicas; sin embargo, existen varios casos en donde las alteraciones químicas conducen a un aumento de los efectos citotóxicos o pérdida de o reducción de la función. En un ejemplo específico, las células fueron intolerantes a las dosis de un duplex de ARNi en la que cada segundo fosfato se reemplaza por fosforotioato (Harborth, et al, Antisense Nucleic Acid Drug Rev. 13(2): 83-105 (2003)). Como tal, subsiste la necesidad de desarrollar sistemas de administración que pueden suministrar cantidades suficiente de moléculas de ácido nucleico (en particular moléculas de ARN) in vivo para producir una respuesta terapéutica, pero que no son tóxicos para el anfitrión.

Las vacunas basadas en ácido nucleico son un procedimiento atractivo de vacunación. Por ejemplo, inmunización intramuscular (IM) de ADN de plásmido que codifica para un antígeno que puede inducir respuestas inmunitarias humorales y celulares y proteger contra exposición. Las vacunas de ADN ofrecen determinadas ventajas sobre las vacunas tradicionales que utilizan antígenos de proteínas, o patógenos atenuados. Por ejemplo, cuando se compara con vacunas de proteínas, las vacunas de ADN pueden ser más efectivas en producir un antígeno plegado adecuadamente en su conformación natural, y en generar una respuesta inmunitaria celular. Las vacunas de ADN tampoco tienen algunos de los problemas de seguridad asociados con patógenos muertos o atenuados. Por ejemplo, una preparación de virus muertos puede contener virus vivos residuales, y un virus atenuado puede mutar y revertir a un fenotipo patogénico.

Otra limitación de las vacunas basadas en ácidos nucleicos es que las grandes dosis de ácido nucleico se requieren generalmente para obtener respuestas inmunitarias potentes en humanos y primates no humanos. Por lo tanto, se requieren sistemas de administración y adyuvantes para mejorar la potencia de las vacunas basadas en ácido nucleico. Diversos procedimientos se han desarrollado para introducir moléculas de ácido nucleico en las células, tal como transfección de fosfato de calcio, transfección de polipreno, fusión de protoplastos, electroporación, microinyección y lipofección.

Los lípidos catiónicos se han formulado ampliamente como liposomas para administrar genes en las células. Sin embargo, incluso una pequeña cantidad de suero (~10 %) puede reducir dramáticamente la actividad de transfección de complejos liposoma/ADN debido a que el suero contiene materiales aniónicos. Recientemente, se desarrolló una emulsión de lípidos catiónicos para administrar moléculas de ADN en las células. Véase, por ejemplo, Kim, et al., International Journal of Pharmaceutics, 295, 35-45 (2005).

Las Patentes Estadounidenses Nos. 6,753,015 y 6,855,492 describen un procedimiento para suministrar moléculas de ácido nucleico a un sujeto vertebrado que utiliza micropartículas catiónicas. Las micropartículas comprenden un polímero, tal como un poli (ácido  $\alpha$ -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido y similares y se forma utilizando tensioactivos catiónicos. Moléculas de ácido nucleico se adsorben sobre las superficies de las micropartículas.

Kim et al (Pharmaceutical Research, vol. 18, paginas 54-60, 2001) y Chung et al. (Journal of Controlled Release, volumen 71, paginas 339-350, 2001) y describe diversas formulaciones de emulsión aceite en agua que se utilizan para mejorar la eficiencia de trasfeccion in vitro e in vivo de moléculas de ADN.

Ott et al (Journal of Controlled Release, volumen 79, paginas 1-5, 2002) describe un procedimiento que implica una emulsión de submicras catiónica como un sistema de administración/coadyuvante para ADN. El enfoque de emulsión de submicras se basa en MF59, un potente escualeno en adyuvante de agua que ha sido fabricado a gran escala y ha sido utilizado en un producto comercialmente aprobado (Fluad®). Se utiliza 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) para facilitar la administración intracelular de ADN plásmido.

Aunque las vacunas basadas en ADN son bastante promisorias para la prevención y tratamiento de enfermedades, han surgido preocupaciones generales con respecto a su seguridad. Las moléculas de ADN introducidas se pueden

integrar potencialmente en el genoma del anfitrión o, debido a su distribución a diversos tejidos, puede conducir a expresión sostenida e indeseable de antígenos. Adicionalmente, determinados virus de ADN también han sido utilizados como un vehículo para suministrar moléculas de ADN. Debido a sus propiedades infecciosas, dichos virus alcanzan un muy alto índice de transfección. Los virus utilizados se modifican genéticamente en tal forma que no se forman partículas infecciosas funcionales en la célula transfectada. Sin embargo, a pesar de las precauciones, no es posible descartar el riesgo de propagación no controlada del gen introducido y los genes víricos, por ejemplo, debido a eventos de recombinación potenciales. Esto también conlleva el riesgo de que el ADN se inserte en un gen intacto del genoma de la célula anfitriona mediante, por ejemplo, recombinación, con la consecuencia que este gen puede mutar y de esta manera se inactiva parcialmente o completamente o puede dar lugar a información errónea. En otras palabras, la síntesis de un producto génico que es vital para la célula se puede suprimir completamente o, alternativamente, se expresa un producto génico modificado o incorrecto. Adicionalmente, generalmente es difícil escalar la purificación y fabricación de vectores víricos grado clínico.

Se presenta un riesgo particular si el ADN se integra en un gen que está implicado en la regulación del crecimiento celular. En este caso, la célula anfitriona se puede degenerar y conducir a cáncer o formación de tumores. Adicionalmente, si el ADN introducido en la célula que se va a expresar, es necesario para que el vehículo de ADN correspondiente contenga un promotor fuerte, tal como un promotor CMV vírico. La integración de dichos promotores en el genoma de la célula tratada puede resultar en alteraciones indeseadas de la regulación de la expresión génica en la célula. Otro riesgo de utilizar ADN como un agente para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, como una vacuna) es la inducción de anticuerpos anti-ADN patogénicos en el paciente en el que se ha introducido ADN externo, por lo que conlleva a una respuesta inmunitaria indeseada.

Las moléculas de ARN que codifican un antígeno o un derivado del mismo también se pueden utilizar como vacunas. Las vacunas de ARN ofrecen determinadas ventajas como se compara con las vacunas de ADN. Primero, el ARN no se puede integrar en el genoma anfitrión eliminando de esta manera el riesgo de malignidades. Segundo, debido a la rápida degradación del ARN, la expresión del transgén externo tiene frecuentemente corta vida, evitando la expresión a largo plazo incontrolada del antígeno. Tercero, las moléculas de ARN sólo necesitan ser administradas al citoplasma para expresar el antígeno codificado, mientras que las moléculas de ADN deben permear a través de la membrana nuclear.

No obstante, en comparación con las vacunas basadas en ADN, se ha dado relativamente menor atención a las vacunas basadas en ARN. El ARN y los oligonucleótidos son moléculas cargadas negativamente, hidrófilas, que son altamente susceptibles a degradación por las nucleasas cuando se administra como un producto terapéutico o vacuna. Adicionalmente, el ARN y los oligonucleótidos no se transportan activamente en las células. Véase, por ejemplo, Vajdy, M., et al., *Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA -based vaccines*, *Immunol Cell Biol*, 2004. 82(6): p. 617-27

Ying et al (*Nature Medicine*, vol. 5, páginas 823-827, 1999) describe una vacuna de ARN autorreplicante en el que el ARN desnudo que codifica  $\beta$ -galactosidasa se suministra y se reporta la inducción de células CD8+.

Montana et al., (*Bioconjugate Chem.* 2007, 18, paginas 302-308) describe la utilización de nanopartículas solidolípido catiónicas como portadores de ARN para transferencia génica. Se muestra que las nanopartículas de solidolípido protegen la molécula de ARN de la degradación, y la expresión de la proteína indicadora (fluoresceína) se detecta después de microinyección al complejo de partícula de ARN dentro de huevos de erizo de mar.

El documento WO 2010/009277 divulga partículas de péptidos nanolípidos (NLPP) que comprende (a) un péptido anfipático, (b) un lípido y (c) al menos una especie inmunogénica. En determinadas realizaciones, el NLPP también incorpora un "agente de captura," cargado positivamente, tal como un lípido catiónico. El agente de captura se utiliza para anclar especies inmunogénicas cargada negativamente (por ejemplo, una molécula de ADN o una molécula de ARN). La preparación de NLPP requiere péptidos anfipáticos, que se utilizan para solubilizar el componente lípido y para formar nanopartículas.

Por lo tanto, subsiste la necesidad de proporcionar sistemas de suministro para moléculas de ácido nucleico. Los sistemas de suministro son útiles para vacunas basados en ácidos nucleicos, en particular vacunas basadas en ARN.

### Sumario de la invención

Esta divulgación en general se refiere a emulsiones aceite en agua catiónicas en las que una molécula de ácido nucleico forma complejos con las partículas en emulsión. Las emulsiones se pueden utilizar para suministrar moléculas de ácidos nucleicos, tales como una molécula de ARN a células. Las partículas en emulsión comprenden un núcleo de aceite y un lípido catiónico. El lípido catiónico puede interactuar con la molécula cargada negativamente anclando de esta manera la molécula a las partículas en emulsión. Las partículas en emulsión tienen un diámetro promedio de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 180 nm, y la emulsión tiene una relación de N/P de al menos 4:1.

La invención proporciona una emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica que comprende partículas en emulsión que contienen un núcleo de aceite que está en fase líquida a 25° y un lípido catiónico, y una molécula de

ácido nucleico que forma complejos con las partículas en emulsión, en las que el lípido catiónico es DOTAP, DOTMA, DOEPC, DSTAP, DODAC o DODAP, y la concentración del lípido catiónico en la emulsión aceite en agua es desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml, en la que la molécula de ácido nucleico es un ARN autorreplicante que codifica un antígeno, y en el que el diámetro promedio de las partículas en emulsión es desde 80 nm hasta 180 nm y la N/P de la emulsión es al menos 4:1, en la que N/P se refiere a la cantidad en moles de átomos de nitrógeno protonables en el lípido catiónico dividido por la cantidad en moles de fosfato en la molécula de ARN; con la condición de que la molécula de ácido nucleico no codifica fosfatasa alcalina secretada, y la condición adicional de que la molécula de ácido nucleico no es un ARN codificado por el plásmido A317, cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO:1 (Figura 7A de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 61/361,892). En algunas realizaciones, la invención incluye la condición adicional de que la molécula de ácido nucleico no codifica un antígeno no proteína de RSV F, y/o la condición adicional de que la molécula de ácido nucleico no codifica una proteína RSV.

La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica se puede tamponar, (por ejemplo, con un tampón de citrato, un tampón de succinato, un tampón de acetato) y tiene un pH desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0, preferiblemente aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,8. Opcionalmente, la emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica comprende adicionalmente una sal inorgánica, preferiblemente a una concentración no mayor de 30 mM. Alternativamente o además de, la emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica comprende adicionalmente un agente tonificante no iónico, tal como un azúcar, un alcohol de azúcar o combinaciones de los mismos, y o un polímero, tal como un poloxámero, en la fase acuosa. Si está presente, el polímero puede estar presente en aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 20 % (p/v). En algunas realizaciones, la emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica es isotónica. En otras realizaciones, las emulsiones aceite en agua catiónicas inmunogénicas son hipotónicas o hipertónicas.

En algunas realizaciones, el núcleo de aceite de las partes de emulsión comprende un aceite que se selecciona del grupo que consiste de: aceite de Ricino, aceite de Coco, aceite de Maíz, aceite de semilla de Algodón, aceite de Onagra, aceite de Pescado, aceite de Jojoba, aceite de Mantequilla de cerdo, aceite de Linaza, aceite de Oliva, aceite de Cacahuate, aceite de Cártamo, aceite de Sésamo, aceite de Soja, Escualeno, Escualano, aceite de Girasol, aceite de Germen de trigo, y combinaciones de los mismos. En realizaciones particulares, el núcleo de aceite es escualeno. El lípido catiónico se puede seleccionar del grupo que consiste de: 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-Dimetilamino)etano]-carbamoil]Colesterol (Colesterol DC), dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-Dimiristoil-3-TrimetilAmonioPropano (DMTAP), dipalmitoil(C<sub>16:0</sub>)trimetil amonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleil-sn-glicero-3-etilfosfolina (DOEPC), 1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano (DODAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), Lípidos E0001-E0118, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el lípido catiónico es DOTAP.

Las partículas en emulsión pueden comprender adicionalmente un tensioactivo, tal como un tensioactivo no iónico. Preferiblemente, el tensioactivo no es un lípido de Polietilenglicol (PEG). El tensioactivo puede estar presente en una cantidad desde aproximadamente 0,01 % hasta aproximadamente 2,5 % (p/v). En algunas realizaciones, el tensioactivo es SPAN85 (Trioleato de Sorbitán), Tween 80 (polisorbato 80), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la emulsión aceite en agua contiene cantidades iguales de SPAN85 (Trioleato de Sorbitán) y Tween 80 (polisorbato 80), por ejemplo 0,5 % (p/v) de cada partícula comprende adicionalmente un tensioactivo.

La invención también se refiere a un procedimiento para elaborar emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica que comprende partículas en emulsión que contienen un núcleo de aceite que está en fase líquida a 25° y un lípido catiónico, y una molécula de ácido nucleico que forma complejos con las partículas en emulsión, en la que el lípido catiónico es DOTAP, DOTMA, DOEPC, DSTAP, DODAC o DODAP, y la concentración del lípido catiónico en la emulsión aceite en agua es desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml, en la que la molécula de ácido nucleico es un ARN autorreplicante que codifica un antígeno, y en la que el diámetro promedio de las partículas en emulsión es desde 80 nm hasta 180 nm y la N/P de la emulsión es al menos 4:1, en la que N/P se refiere a la cantidad en moles de átomos de nitrógeno protonables en el lípido catiónico dividido por la cantidad en moles de fosfato en la molécula de ARN; con la condición de que la molécula de ácido nucleico no codifica fosfatasa alcalina secretada, y la condición adicional de que la molécula de ácido nucleico no es un ARN codificado por el plásmido A317, cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO:1 (Figura 7A de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 61/361,892). El procedimiento comprende proporcionar (i) una emulsión aceite en agua catiónica que contiene partículas en emulsión que contienen un núcleo de aceite y un lípido catiónico como se describe en la presente memoria, y (ii) una solución acuosa que contiene un ácido nucleico, y combinar (i) y (ii) elaborando de esta manera dicha emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica.

La invención también se refiere a una emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica como se describe en la presente memoria para uso en un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica descrita en la presente memoria.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra los resultados de un ensayo SEAP *in vivo*, que utiliza 1 µg de replicón de ARN vA306 en complejo con CNE17 en relación de N:P 10:1. La Figura 1B muestra los títulos de IgG totales en ratones BALB/c en puntos de tiempo 2wp1 y 2wp2 luego de inmunización con el replicón de ARN A317, que codifica la proteína RSV F, en complejo con CNE17. Estos datos muestran que cuando aumenta el tamaño de partícula, disminuye la expresión de SEAP, y disminuye la respuesta inmunitaria a la proteína RSV F.

Las Figuras 2A-2C muestran los efectos de formación de complejos de ARN y diferentes composiciones tampón sobre el tamaño de partícula. La Figura 2A muestra que la formación de complejos de ARN aumenta el tamaño de partícula en la emulsión de CNE 17, y que el azúcar y/o sal inferior (NaCl, 10 mM) disminuye el tamaño de partícula. La adición de Pluronic F127 reduce el tamaño de partícula a un tamaño de preformación de complejos. La Figura 2B muestra el efecto del tampón de citrato sobre el tamaño de partícula. La Figura 2C muestra el efecto de los polímeros sobre el tamaño de partícula.

## Descripción detallada de la invención

### 1. Visión general

Esta divulgación en general se refiere a emulsiones aceite en agua catiónicas en las que una molécula de ácido nucleico forma complejos con las partículas en emulsión, las partículas en emulsión tienen un diámetro promedio de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 180 nm, y la emulsión tiene una relación de N/P de al menos 4:1. Las partículas en emulsión comprenden un núcleo de aceite y un lípido catiónico. El lípido catiónico puede interactuar con la molécula cargada negativamente anclando de esta manera la molécula a las partículas en emulsión. Las emulsiones se pueden utilizar para suministrar moléculas de ácidos nucleicos, tales como una molécula de ARN a células.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que una respuesta inmunitaria que se levanta contra un antígeno codificado por ARN autorreplicante, cuando una emulsión aceite en agua catiónica que contiene una molécula de ARN autorreplicante que codifica el antígeno se administra a un individuo, es afectada por las propiedades de la emulsión, incluye el diámetro promedio de las partículas en emulsión y la cantidad de ARN que forma complejos con las partículas en emulsión (es decir, relación de N/P). Los inventores determinaron que el diámetro promedio de partículas en emulsión aumenta cuando las moléculas de ARN forma complejos con la emulsión, y esas partículas de diámetro grande resultan en títulos de neutralización inferiores. Las emulsiones en las que el diámetro de partícula promedio está entre 80 nm y 180 nm proporcionan buenos títulos de neutralización. Incluso dentro de este rango, las emulsiones con tamaños de partícula promedio en el extremo alto del rango son menos preferidos, y particularmente se prefiere un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 100 nm. También se prefiere un diámetro de partícula promedio entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 130 nm. Los inventores descubrieron sorprendentemente que la respuesta inmunitaria no tiene una relación lineal directa con la cantidad de ARN que forma complejos con la emulsión. Una relación de N/P de 4:1 produce una buena respuesta inmunitaria al antígeno codificada, pero mayores relaciones de N/P no necesariamente resultan en mayores títulos de neutralización.

El diámetro promedio de partículas en emulsión aceite en agua catiónica aumenta cuando las moléculas de ARN forma complejos con la emulsión. Este efecto se puede reducir por la inclusión de sales inorgánicas en la emulsión. Sin embargo, las sales inorgánicas pueden inhibir la unión de moléculas de ácidos nucleicos a las partículas en emulsión, por lo tanto, la sal inorgánica(s) debe estar presente solo en bajas concentraciones (por ejemplo, no más de aproximadamente 30 mM). Si se desea, se pueden utilizar polímeros hidrófilos para reducir el aumento de tamaño de partícula provocado por la formación de complejos de ácido nucleico. De nuevo, los polímeros hidrófilos pueden inhibir la unión de moléculas de ácidos nucleicos a las partículas en emulsión, por lo tanto, los polímeros hidrófilos deben estar presentes en solo bajas concentraciones (por ejemplo, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 20 % (p/v)).

Las emulsiones aceite en agua catiónicas que contienen una molécula de ARN que codifica el antígeno se pueden administrar a un individuo para inducir una respuesta inmunitaria para el antígeno codificada. Cuando se utilizan emulsiones aceite en agua catiónicas para este propósito, se prefiere que sean isotónicas. Sin embargo, debido a que las sales inorgánicas pueden inhibir la unión de moléculas de ácidos nucleicos a las partículas en emulsión, preferiblemente se ajusta la tonicidad con un agente tonificante no iónico. En realizaciones preferidas, las emulsiones aceite en agua catiónicas que contienen una molécula de ARN se ajustan a 250 mOsm/kg de agua a aproximadamente 320 mOsm/kg utilizando un azúcar, alcohol de azúcar o combinaciones de los mismos.

### 2. Definiciones

Como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares “un,” “una” y “el” incluyen referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.

El término “aproximadamente” como se utiliza en la presente memoria, se refiere a +/-10 % de un valor.

El término “tensioactivo” es un término de la técnica y en general se refiere a cualquier molécula que tiene tanto un grupo hidrófilo (por ejemplo, un grupo polar), que prefiere energéticamente solvatación en agua, y un grupo

hidrófobo que no se solvata bien en agua. El término "tensioactivo no iónico" es un término conocido en la técnica y en general se refiere a una molécula de tensioactivo cuyo grupo hidrófilo (por ejemplo, grupo polar) no se carga electrostáticamente.

5 El término "polímero" se refiere a una molécula que consiste en fracciones químicas individuales, que pueden ser iguales o diferentes, que se unen entre sí. Como se usa en la presente memoria, el término "polímero" se refiere a fracciones químicas individuales que se unen de extremo a extremo para formar una molécula lineal, así como fracciones químicas individuales unidos en forma de una estructura ramificada (por ejemplo, un "brazo múltiple" o "en forma de estrella"). Los polímeros de ejemplo incluyen, por ejemplo, poloxámeros. Los poloxámeros son copolímeros tribloque no iónicos que tienen una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrofílicas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)).

Un "tampón" se refiere a una solución acuosa que resiste los cambios en el pH de la solución

15 Como se utiliza en la presente memoria, "análogo de nucleótido" o "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que contiene una o más modificaciones químicas (por ejemplo, sustituciones) en o sobre la base nitrogenada del nucleósido (por ejemplo, citosina (C), timina (T) o uracilo (U)), adenina (A), o guanina (G)). Un análogo de nucleótido puede contener otras modificaciones químicas en o sobre la unidad estructural de azúcar del nucleósido (por ejemplo, ribosa, desoxirribosa, ribosa modificada, desoxirribosa modificada, análogo de azúcar de seis miembros, o análogo de azúcar de cadena abierta), o el fosfato.

20 Como se utiliza en la presente memoria, "sacárido" abarca monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos en formas cadena lineal o anillo, o una combinación de los mismos para formar una cadena de sacárido. Los oligosacáridos son sacáridos que tienen dos o más residuos de monosacáridos. Ejemplos de sacáridos incluyen glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, sacarosa y trehalosa.

25 Los términos "ARN autorreplicante", "replicón de ARN" o "vector de ARN" son términos de la técnica y generalmente se refieren a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o autorreplicación *in vivo*, normalmente dentro de una célula objetivo. El replicón de ARN se utiliza directamente, sin el requisito para introducción de ADN en una célula y el transporte al núcleo, en el que se produciría la transcripción. Al utilizar el vector de ARN para suministro directo en el citoplasma de la célula anfitriona, replicación y traducción autónoma de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga se produce de manera eficiente. Un ARN autorreplicante derivado de alfavirus puede contener los siguientes elementos en orden secuencial: secuencias virales 5' necesarias en cis para replicación (también denominado como 5' CSE, en el fondo), secuencias que, cuando se expresan, codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), secuencias virales 3' necesarias en cis para replicación (también mencionadas como CSE 3', en el fondo), y un tracto poliadenilado. El ARN autorreplicante derivado de alfavirus también puede contener un promotor de "región de unión" viral subgenómico, las secuencias de uno o más genes de proteínas estructurales o porciones de las mismas, moléculas de ácido nucleico extrañas que son de un tamaño suficiente para permitir la producción de partículas de alfavirus recombinantes, así como la secuencia heteróloga que se va a expresar.

35 El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que ayuda o modifica la acción de un producto farmacéutico, que incluye pero no se limita a adyuvantes inmunológicos, que aumentan y/o diversifican la respuesta inmunitaria a un antígeno. Por lo tanto, los adyuvantes inmunológicos incluyen compuestos que son capaces de potenciar una respuesta inmunitaria a los antígenos. Los adyuvantes inmunológicos pueden potenciar la inmunidad humoral y/o celular. Las sustancias que estimulan una respuesta inmunitaria innata se incluyen dentro de la definición de adyuvantes inmunológicos en la presente memoria. Los adyuvantes inmunológicos también pueden ser referidos como "inmunopotenciadores".

40 Como se utiliza en la presente memoria, un "antígeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítopos (por ejemplo, lineales, conformacionales o ambos). Como se utiliza en la presente memoria, un "epítipo" es esa porción de especies dadas (por ejemplo, una molécula antigénica o complejo antigénico) que determina su especificidad inmunológica. Un epítipo está dentro del alcance de la presente definición de antígeno. El término "antígeno", como se utiliza en la presente memoria incluye subunidades de antígenos, es decir, antígenos que se separan y son discretos a partir de un organismo entero con el que el antígeno está asociado en la naturaleza.

45 Una "respuesta inmunológica" o "respuesta inmunitaria" es el desarrollo en un sujeto de una respuesta humoral y/o una respuesta inmunitaria celular a un antígeno o un adyuvante inmunológico.

50 Las respuestas inmunitarias incluyen las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Las respuestas inmunitarias innatas son las respuestas de acción rápida que proporcionan una primera línea de defensa para el sistema inmunológico. Por el contrario, la inmunidad adaptativa utiliza la selección y expansión clonal de las células inmunitarias que tienen genes de los receptores somáticamente reordenados (por ejemplo, receptores de células T y B) que reconocen antígenos de un patógeno dado o trastorno (por ejemplo, un tumor), proporcionando de este modo la especificidad y memoria inmunológica. Las respuestas inmunitarias innatas, entre sus muchos efectos, conducen a un rápido estallido de citoquinas inflamatorias y la activación de células presentadoras de antígeno (APCs) tales como macrófagos y células dendríticas. Para distinguir los patógenos de los autocomponentes, el sistema

5 inmunitario innato utiliza una variedad de receptores relativamente invariables que detectan las firmas de los agentes patógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos, o PAMP. Se sabe que la adición de componentes microbianos a vacunas experimentales para llevar al desarrollo de robustas y duraderas respuestas inmunitarias adaptativas. Se ha reportado que el mecanismo detrás de esta potenciación de las respuestas
 10 inmunitarias implica los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que se expresan diferencialmente sobre una variedad de células inmunitarias, que incluyen neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos naturales, células B y algunas células no inmunitarias tales como células epiteliales y endoteliales. El acoplamiento de los PRR produce la activación de algunas de estas células y su secreción de citoquinas y quimioquinas, así como la maduración y migración de otras células. A la par, esto crea un entorno inflamatorio que lleva a la creación de la
 15 respuesta inmunitaria adaptativa. Los PRR incluyen receptores no fagocíticos, tales como receptores similares a Toll (TLRs) y proteínas de dominio de oligomerización de unión a nucleótido (NOD), y receptores que inducen fagocitosis, tales como receptores depuradores, receptores de manosa y receptores de  $\beta$ -glucano. Los TLR reportados (junto con ejemplos de algunos ligandos reportados, que se pueden utilizar como molécula inmunogénica en diversas realizaciones de la invención) incluyen los siguientes: TLR1 (lipoproteínas bacterianas de *Mycobacteria*,
 20 *Neisseria*), TLR2 (partículas de levadura zymosan, peptidoglicano, lipoproteínas, lipopéptidos, glicolípidos, lipopolisacáridos), TLR3 (ARN de doble cadena viral, poli: IC), TLR4 (lipopolisacáridos bacterianos, taxol de producto de planta), TLR5 (flagelinas bacterianas), TLR6 (partículas zymosan de levadura, ácido lipoteicoico, lipopéptidos de micoplasma), TLR7 (ARN de cadena sencilla, imiquimod, resiquimod, y otros compuestos sintéticos tales como loxoribina y bropirimina), TLR8 (ARN de cadena sencilla, resiquimod) y TLR9 (oligonucleótidos CpG), entre otros.
 25 Las células dendríticas son reconocidas como algunos de los tipos celulares más importantes para iniciar el cebado de células T auxiliares  $CD4^+$  ingenuas para inducir la diferenciación de células T  $CD8^+$  en células asesinas. Se ha reportado que la señalización de TLR desempeña una función importante en la determinación de la calidad de estas respuestas de células T auxiliares, por ejemplo, con la naturaleza de la señal de TLR determinar el tipo específico de respuesta  $T_H$  que se observa (por ejemplo, respuesta  $T_{H1}$  frente a respuesta  $T_{H2}$ ). Una combinación de anticuerpo (humoral) y la inmunidad celular se producen como parte de una respuesta de tipo  $T_{H1}$ , mientras que una respuesta de tipo  $T_{H2}$  es predominantemente una respuesta de anticuerpos. Diversos ligandos de TLR tales como ADN CpG (TLR9) e imidazoquinolinas (TLR7, TLR8) se han documentado por estimular la producción de citoquinas de las células inmunitarias *in vitro*. Las imidazoquinolinas son los primeros compuestos pequeños, similares a fármaco que muestran ser agonistas de TLR. Para información adicional, véase, por ejemplo, A. Pashine, N. M. Valiante and J. B. Ulmer, *Nature Medicine* 11, S63-S68 (2005), K. S. Rosenthal and D. H. Zimmerman, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(8), 821-829 (2006), y las referencias citadas en la misma.

35 Para los propósitos de la presente invención, una respuesta inmunitaria humoral se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpos, mientras que una respuesta inmunitaria celular es una mediada por linfocitos T y/u otras células blancas de la sangre. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica a antígeno por células T citolíticas (CTL). Las CTL tienen especificidad para antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y expresadas sobre las superficies de células. Las CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la
 40 inmunidad celular implica una respuesta específica a antígeno mediante células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y enfocar la actividad de células efectoras no específicas contra células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas MHC sobre su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras de dichas moléculas producidas por células T activadas y/u otras células blancas de la sangre, que incluyen aquellas derivadas de células T  $CD4^+$ , y  $CD8^+$ .

45 Una composición tal como una composición inmunogénica o una vacuna que provoca una respuesta inmunitaria celular por lo tanto puede servir para sensibilizar un sujeto vertebrado mediante la presentación de antígeno en asociación con moléculas MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por células se dirige a, o cerca de, células que presentan antígeno en su superficie. Adicionalmente, se pueden generar linfocitos T específicos a antígeno para permitir la protección futura de un anfitrión inmunizado. La capacidad de un antígeno o
 50 composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar por un número de ensayos conocidos en la técnica, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, al ensayar para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medición de la producción de citoquinas por las células T en respuesta a reestimulación con el antígeno. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson et al. (1993) *J. Immunol* 151:4189-4199; Doe et al. (1994) *Eur. J. Immunol* 24:2369-2376. Por lo tanto, una respuesta inmunológica como se utiliza en la presente memoria puede ser una que estimula la producción de CTLs y/o la producción o
 55 activación de células T auxiliares. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. Por lo tanto, una respuesta inmunológica puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes efectos, entre otros: la producción de anticuerpos mediante, por ejemplo, las células B; y/o la activación de células T supresoras y/o células T  $\gamma\delta$  dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir, por ejemplo, para neutralizar la infectividad, y/o mediar el anticuerpo-complemento, o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para proporcionar protección a un anfitrión inmunizado. Dichas respuestas se pueden determinar utilizando inmunoensayos estándar y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica.
 60

Las composiciones de acuerdo con la presente divulgación exhiben “inmunogenicidad aumentada” para un antígeno dado cuando poseen una mayor capacidad para provocar una respuesta inmunitaria que la respuesta inmunitaria provocada por una cantidad equivalente del antígeno en una composición diferente (por ejemplo, en la que el antígeno se administra como una proteína soluble). Por lo tanto, una composición puede mostrar inmunogenicidad aumentada, por ejemplo, debido a que la composición genera una respuesta inmunitaria más fuerte, o porque es necesaria una dosis inferior o menos dosis de antígeno para lograr una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra. Dicha inmunogenicidad potenciada se puede determinar, por ejemplo, al administrar una composición de la invención y un control de antígeno a animales y comparar los resultados del ensayo de los dos.

### 3. Emulsiones aceite en agua catiónicas

Las emulsiones aceite en agua catiónicas divulgadas en la presente memoria generalmente se describen de tal manera que son convencionales en la técnica, en concentraciones de componentes que se utilizan para preparar las emulsiones. Se entiende en la técnica que durante el proceso de producción de emulsiones, que incluyen la esterilización y otros procesos de acabado, se pueden perder pequeñas cantidades de aceite (por ejemplo, escualeno), lípido catiónico (por ejemplo, DOTAP), u otros componentes, y las concentraciones reales de estos componentes en el producto final (por ejemplo, una emulsión esterilizada empacada que está lista para administración) puede ser ligeramente inferior a aquellas cantidades de partida, a veces hasta en aproximadamente 10 % o hasta aproximadamente 20 %.

Las partículas en emulsión aceite en agua catiónica comprenden un núcleo de aceite y un lípido catiónico. El lípido catiónico puede interactuar con la molécula de ácido nucleico, por ejemplo a través de fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas/hidrófilas, anclando de este modo la molécula de ácido nucleico a las partículas en emulsión. Las emulsiones catiónicas descritas en la presente memoria son particularmente adecuadas para el suministro de una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ARN que codifica un antígeno o ARN de interferencia pequeño a las células *in vivo*. Por ejemplo, las emulsiones catiónicas descritas en la presente memoria proporcionan ventajas para suministrar ARN que codifica antígenos, que incluye los ARN autorreplicantes, como vacunas.

Las partículas de las emulsiones de aceite en agua probablemente se asemejan a una micela con un núcleo central de aceite. El núcleo de aceite se recubre con el lípido catiónico, que dispersa la gotita de aceite en la fase acuosa (continua) como gotitas de tipo micela. Uno o más componentes opcionales pueden estar presentes en la emulsión, tales como tensioactivos y/o fosfolípidos como se describe a continuación. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o más tensioactivos para promover la formación de partículas y/o para estabilizar las partículas en emulsión. En ese caso, el núcleo de aceite se recubre con el lípido catiónico, así como el tensioactivo(s) para formar gotitas como micelas. Del mismo modo, uno o más lípidos (por ejemplo, lípidos neutros, glicol-lípidos o fosfolípidos) también pueden estar presentes sobre la superficie de las partículas de la emulsión, si se utilizan dichos lípidos como emulsionantes para dispersar las gotitas de aceite.

Las partículas de las emulsiones de aceite en agua tienen un diámetro promedio (es decir, el diámetro promedio en número) de 80 nm a 180 nm, por ejemplo desde aproximadamente 80 nm hasta 150 nm, desde aproximadamente 80 nm hasta 130 nm, o desde aproximadamente 80 nm hasta 120 nm. El diámetro promedio de partícula particularmente o es de aproximadamente 100 nm.

El tamaño de las partículas en emulsión se puede variar al cambiar la relación de tensioactivo a aceite (aumentando la relación disminuye el tamaño de la gotita), presión de operación de homogeneización (aumentando la presión de operación de homogeneización normalmente se reduce el tamaño de la gotita), temperatura (aumentando la temperatura disminuye el tamaño de gotita), cambiando el tipo de aceite, aumentando el número de pasadas a través del microfluidizador, y otros parámetros del proceso, como se describe en la presente memoria. La inclusión de ciertos tipos de tampones en la fase acuosa también puede afectar al tamaño de partícula.

Las partículas de la emulsión descritas en la presente memoria pueden formar complejos con una molécula de ácido nucleico, como se describe en más detalle en la presente memoria. En general, una emulsión aceite en agua catiónica se combina con una solución acuosa que contiene una o más especies de moléculas de ácido nucleico para formar la emulsión que contiene una molécula de ácido nucleico que forma complejos con las partículas en emulsión. La solución acuosa que contiene la molécula(s) de ácido nucleico contiene una concentración de ácidos nucleicos que se traducirá en una emulsión en complejos que tiene una relación de N/P de al menos 4:1, por ejemplo desde 4:1 hasta 20:1 o desde 4:1 hasta 15:1. Esto se puede lograr fácilmente debido a que la cantidad de nitrógeno (N) en la emulsión se puede cuantificar utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como el procedimiento de HPLC utilizado para cuantificar el DOTAP descrito en la presente memoria. Luego, se puede preparar una solución acuosa de moléculas de ácido nucleico que contiene una cantidad de ácido nucleico suficiente para proporcionar la cantidad de fosfatos (P) necesaria para conseguir la relación N/P deseada.

Una emulsión catiónica de ejemplo de la invención se denomina en la presente memoria como “CMF32”. El aceite de CMF32 es escualeno (al 4,3 % p/v) y el lípido catiónico es DOTAP (a 3,2 mg/mL). El CMF32 también incluye los tensioactivos Span85 (trioleato de sorbitán en el 0,5 % v/v) y Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxitilensorbitán; en el 0,5 % v/v). De esta manera, las partículas en emulsión de CMF32 comprenden escualeno,



SPAN85, Tween80, y DOTAP. Las moléculas de ARN se muestran para formar complejos con partículas CMF32 eficientemente a relaciones de N/P de 4:1, 6:1, 8:1, 10:1, 12:1, y 14:1. Otras emulsiones catiónicas de ejemplo incluyen, por ejemplo, las emulsiones que se mencionan en la presente memoria como "CMF34" (4,3 % p/v de escualeno, 0,5 % de Tween 80, 0,5 % de SPAN85, y 4,4 mg/ml de DOTAP), "CMF35" (4,3 % p/v de escualeno, 0,5 % de Tween 80, 0,5 % de SPAN85, 5,0 mg/ml de DOTAP), y otras emulsiones descritas en la presente memoria.

Una emulsión aceite en agua catiónica en particular de la invención comprende DOTAP y escualeno en concentraciones de 2,1 mg/ml a 2,84 mg/ml (preferiblemente 2,23 mg/ml a 2,71 mg/ml), y 30,92 mg/ml a 41,92 mg/ml (preferiblemente 32,82 mg/ml a aproximadamente 40,02 mg/ml), respectivamente, y comprenden además cantidades iguales de SPAN85 y Tween80 (por ejemplo, aproximadamente 0,5 % cada uno). Otra emulsión aceite en agua catiónica en particular de la invención comprende DOTAP y escualeno a concentraciones de 2,78 mg/ml a 3,76 mg/ml (preferiblemente 2,94 mg/ml a 3,6 mg/ml), y 18,6 mg/ml de 25,16 mg/ml (preferiblemente 19,69 mg/ml a aproximadamente 24,07 mg/ml), respectivamente, y comprenden adicionalmente cantidades iguales de SPAN85 y Tween80 (por ejemplo, aproximadamente 0,5 % de cada uno). Las partículas de estas emulsiones tienen un diámetro promedio desde 80 nm hasta 180 nm.

Los componentes individuales de las emulsiones aceite en agua de la presente invención son conocidos en la técnica, aunque dichas composiciones no se han combinado en la forma descrita en la presente memoria. De acuerdo con lo anterior, los componentes individuales, aunque se describen a continuación tanto en general como en algunos detalles para las realizaciones preferidas, son bien conocidos en la técnica, y los términos utilizados en la presente memoria, como núcleo de aceite, agente tensioactivo, fosfolípidos, etc., son suficientemente conocidos por un experto en la materia sin descripción adicional. Adicionalmente, aunque se proporcionan rangos preferidos de la cantidad de los componentes individuales de las emulsiones, las relaciones reales de los componentes de una emulsión particular pueden necesitar ser ajustados de tal manera que se pueden formar adecuadamente partículas en emulsión de tamaño y propiedad física deseada. Por ejemplo, si se utiliza una cantidad particular de aceite (por ejemplo, 5 % de aceite v/v), entonces, la cantidad de tensioactivo debe estar en el nivel que es suficiente para dispersar la gotita de aceite en la fase acuosa para formar una emulsión estable. La cantidad real de agente tensioactivo requerida para dispersar la gotita de aceite en la fase acuosa depende del tipo de agente tensioactivo y el tipo de núcleo de aceite utilizado para la emulsión; y la cantidad de aceite también puede variar de acuerdo con el tamaño de la gotita (ya que esto cambia el área de superficie entre las dos fases). Las cantidades reales y las proporciones relativas de los componentes de una emulsión deseada se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica.

#### A. Núcleo de aceite

Las partículas de las emulsiones aceite en agua catiónicas comprenden un núcleo de aceite.

El aceite está preferiblemente en la fase líquida a 1°C o superior, y es inmiscible al agua.

Preferiblemente, el aceite es un aceite metabolizable, no tóxico; más preferiblemente uno de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 átomos de carbono que incluyen, pero no se limita a, alcanos, alquenos, alquinos, y sus ácidos y alcoholes correspondientes, los éteres y ésteres de los mismos, y mezclas de los mismos. El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite preparado sintéticamente que se puede metabolizar por el cuerpo del sujeto al que se administrará la emulsión, y no será tóxico para el sujeto. El sujeto puede ser un animal, normalmente un mamífero y preferiblemente un humano.

El núcleo de aceite está en fase líquida a 25°C. El núcleo de aceite está en fase líquida a 25°C, cuando se muestra las propiedades de un fluido (que se distingue de sólido y gas; y que tiene un volumen definido pero no forma definida) cuando se almacena a 25°C. Sin embargo, la emulsión, se puede almacenar y utilizar a cualquier temperatura adecuada. Preferiblemente, el núcleo de aceite está en fase líquida a 4°C.

El aceite puede ser cualquier alcano, alqueno o alquino de cadena larga, o un derivado de ácido o alcohol de los mismos ya sea como el ácido libre, su sal o un éster tal como un mono-, o di o triéster, tal como los triglicéridos y ésteres de alcoholes de 1,2-propanodiol o alcoholes poli-hidroxi similares. Los alcoholes se pueden acilar empleando un ácido mono- o poli-funcional, por ejemplo ácido acético, ácido propanoico, ácido cítrico o similares. También se pueden utilizar éteres derivados de alcoholes de cadena larga que son aceites y cumplen los otros criterios establecidos en la presente memoria.

El grupo funcional alcano, alqueno o alquino individual y sus derivados de ácido o alcohol tendrán generalmente desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 30 átomos de carbono. El grupo funcional puede tener una estructura de cadena lineal o ramificada. Puede estar completamente saturado o tener uno o más dobles o triples enlaces. Cuando se emplean aceites a base de mono o poliéster o éter, la limitación de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 carbonos se aplica a los ácidos grasos o grupos funcionales de alcoholes grasos individuales, no el recuento total de carbono.

Es particularmente deseable que el aceite se pueda metabolizar por el anfitrión al que se administra la emulsión.

Se pueden utilizar cualesquier aceites adecuados a partir de un animal, pescado o fuente vegetal. Las fuentes para aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos, y aceites adecuados, tales como, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y aceite de oliva y similares. Otros aceites de semillas adecuados incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, también se pueden utilizar aceite de maíz, y aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticual y similares. La tecnología para la obtención de aceites vegetales está bien desarrollada y es bien conocida. Las composiciones de estos y otros aceites similares se pueden encontrar en, por ejemplo, el Índice Merck, y materiales fuente en los alimentos, nutrición y tecnología de alimentos.

Aproximadamente seis a aproximadamente diez ésteres de ácidos grasos de carbono de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no de origen natural en los aceites de semillas, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados a partir de los aceites de nueces y de semillas. Estos productos están disponibles comercialmente bajo los nombres de NEOBEES de PVO International, Inc., Chemical Specialties Division, 416 Division Street, Boongon, N.J. y otros.

Los aceites animales y grasas están a menudo en fase sólida a temperaturas fisiológicas debido al hecho de que existen como triglicéridos, y tener un mayor grado de saturación que los aceites de pescado o verduras. Sin embargo, los ácidos grasos se pueden obtener a partir de grasas animales mediante saponificación parcial o completa de triglicéridos, que proporciona los ácidos grasos libres. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto se pueden utilizar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica.

La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como esperma de ballena ejemplifican diversos de los aceites de pescado que se pueden utilizar en la presente memoria. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos, y se mencionan generalmente como terpenoides. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno), un terpenoide insaturado ramificado, es particularmente preferido en la presente memoria. Una fuente importante de escualeno es el aceite de hígado de tiburón, aunque los aceites de plantas (principalmente aceites vegetales), que incluyen semilla de amaranto, salvado de arroz, germen de trigo y aceites de oliva, también son fuentes adecuadas. El escualeno también se puede obtener a partir de levadura u otros microbios adecuados. En algunas realizaciones, el escualeno se obtiene preferiblemente de fuentes no animales, tales como a partir de olivas, aceite de oliva o levadura. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también se prefiere. Los aceites de pescado, que incluyen el escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o se pueden obtener por procedimientos conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, el núcleo de aceite comprende un aceite que se selecciona del grupo que consiste de: aceite de Ricino, aceite de Coco, aceite de Maíz, aceite de semilla de Algodón, aceite de Onagra, aceite de Pescado, aceite de Jojoba, aceite de Manteca de cerdo, aceite de Linaza, aceite de Oliva, aceite de Cacahuete, aceite de Cártamo, aceite de Sésamo, aceite de Soja, Escualeno, Escualano, aceite de Girasol, aceite de Germen de trigo, y aceite Mineral. En realizaciones de ejemplo, el núcleo de aceite comprende aceite de Soja, aceite de Girasol, aceite de Oliva, Escualeno, Escualano o una combinación de los mismos. También se puede utilizar escualano como el aceite. En realizaciones de ejemplo, el núcleo de aceite comprende Escualeno, Escualano, o una combinación de los mismos.

El componente de aceite de la emulsión puede estar presente en una cantidad desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 20 % (v/v). Por ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica puede comprender desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 15 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 10 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 9 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 8 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 7 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 6 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 5 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 4,3 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,4 % a aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 3 % hasta aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 4 % hasta aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 4,3 % hasta aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, desde aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % (v/v) de aceite, aproximadamente 0,5 % (v/v) de aceite, aproximadamente 1 % (v/v) de aceite, aproximadamente 1,5 % (v/v) de aceite, aproximadamente 2 % (v/v) de aceite, aproximadamente 2,5 % (v/v) de aceite, aproximadamente 3 % (v/v) de aceite, aproximadamente 3,5 % (v/v) de aceite, aproximadamente 4 % (v/v) de aceite, aproximadamente 4,3 % (v/v) de aceite, aproximadamente 5 % (v/v) de aceite, o aproximadamente 10 % (v/v) de aceite.

Alternativamente, la emulsión aceite en agua catiónica puede comprender desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 10 % (p/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 9 % (p/v) de aceite,

desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 8 % (p/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 7 % (p/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 6 % (p/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 5 % (p/v) de aceite, desde aproximadamente 0,2 % hasta aproximadamente 4,3 % (p/v) de aceite, o aproximadamente 4,3 % (p/v) de aceite.

- 5 En una realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica comprende aproximadamente 0,5 % (v/v) de aceite. En otra realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica comprende aproximadamente 4,3 % (v/v) de aceite. En otra realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica comprende aproximadamente 5 % (v/v) de aceite. En otra realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica comprende aproximadamente 4,3 % (p/v) de escualeno.
- 10 Como se indicó anteriormente, el porcentaje de aceite descrito anteriormente se determina en base a la cantidad inicial del aceite que se utiliza para preparar las emulsiones. Se entiende en la técnica que la concentración real del aceite en el producto final (por ejemplo, una emulsión esterilizada empacada que está lista para administración) podría ser ligeramente menor, a veces de hasta aproximadamente 10 % o aproximadamente 20 %.

### B. Lípidos Catiónicos

- 15 Las partículas en emulsión descritas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico, que puede interactuar con la molécula cargada negativamente anclando de esta manera la molécula a las partículas en emulsión. El lípido catiónico es DOTAP (1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano), DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOEPC (1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina), DSTAP (distearoiltrimetilamonio propano), DODAC (cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio) o DODAP (1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano), y la concentración del lípido catiónico en la emulsión aceite en agua es desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml.

- Los lípidos catiónicos contienen un átomo de nitrógeno que está cargado positivamente en condiciones fisiológicas. Los lípidos catiónicos adecuados incluyen, cloruro de benzalconio (BAK), cloruro de bencetonio, cetrimida (que contiene bromuro de tetradeciltrimetilamonio y posiblemente pequeñas cantidades de bromuro de dodeciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cloruro de cetilpirimidinio (CPC), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, que incluyen pero no se limitan a N,N',N'-polioxi-etileno (10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, otras sales de aminas cuaternarias, que incluyen pero no se limitan a bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de alquil-trimetil-amonio mezclado, cloruro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de bencildimetilhexadecil-amonio, metóxido de benciltrimetilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de dimetildiodecil amonio (DDAB), cloruro de metilbencetonio, cloruro de decametonio, cloruro de metil trialquil amonio mezclado, cloruro de metil trioctilamonio), cloruro de N,N-dimetil-N-[2(2-metil-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxi]-etoxi]etil]-bencenometa-naminio (DEBDA), sales de dialquildimetilamonio, cloruro de [1-(2,3-dioleiloxi)-propil]- N,N,N,trimetilamonio, 1,2-diacil-3-(trimetilamonio) propano (grupo acilo=dimiristoilo, dipalmitoilo, distearoilo, dioleilo), 1,2-diacil-3 (dimetilamonio)propano (grupo acilo=dimiristoilo, dipalmitoilo, distearoilo, dioleilo), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetil-amonio)butanoil-sn-glicerol, éster de 1,2-dioleoil 3-succinil-sn-glicerol colina, colesteril (4'-trimetilamonio) butanoato), sales de N-alquil pirimidinio (por ejemplo bromuro de cetilpirimidinio y cloruro de cetilpirimidinio), sales de N-alquilpiperidinio, electrolitos bolaform dicatiónicos (C<sub>12</sub>Me<sub>6</sub>; C<sub>12</sub>Bu<sub>6</sub>), dialquiliglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L-α dioleoilfosfatidiletanolamina, [éster colina de hemisuccinato de colesterol, lipopoliaminas, que incluyen pero no se limitan a dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS), dipalmitoil fosfatidiletanol-amidoespermina (DPPEs), lipopoli- L (o D)-lisina (LPLL, LPDL), poli (L (o D)-lisina conjugada a N-glutarilfosfatidiletanolamina, éster de glutamato de didodecilo con grupo amino colgante (C<sub>12</sub>GluPhC<sub>n</sub>N<sup>+</sup>), éster de glutamato de ditetradecilo con grupo amino colgante (C<sub>14</sub>GluC<sub>n</sub>N<sup>+</sup>), derivados catiónicos de colesterol, que incluyen pero no se limitan a sal de colesteril-3 β-oxisuccinamidoetilenotrimetilamonio, colesteril-3 β-oxisuccinamidoetilenodimetilamina, sal de colesteril-3 β-carboxiamidoetilenotrimetilamonio, colesteril-3 β-carboxiamidoetilenodimetilamina, y 3i-[N-(N',N-dimetilaminoetanocarbomoil] colesterol) (DC-Colesterol), 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), dimetildiodecilamonio (DDA), 1,2-Dimiristoil-3-TrimetilAmonioPropano (DMTAP), dipalmitoil(C<sub>16:0</sub>)trimetil amonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP), y combinaciones de los mismos.

Otros lípidos catiónicos incluyen, por ejemplo, los lípidos catiónicos descritos en las publicaciones de Patentes de los Estados Unidos 2008/0085870 (publicada en abril 10, 2008) y 2008/0057080 (publicada en marzo 6, 2008).

- 50 Otros lípidos catiónicos incluyen, por ejemplo, los Lípidos E0001-E0118 o E0119-E0180 como se divulga en la Tabla 6 (páginas 112-139) del documento WO 2011/076807 (que también divulga procedimientos para elaborar, y procedimiento para utilizar estos lípidos catiónicos). Los lípidos catiónicos adecuados adicionales incluyen cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), 1,2-diinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA).

De acuerdo con la invención, la emulsión contiene DOTAP (1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano), DOTMA (Cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOEPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina), DSTAP (distearoiltrimetilamonio propano), DODAC (cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio ) o DODAP (1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano).

La emulsión puede comprender cualquier combinación de estos lípidos catiónicos con otros lípidos catiónicos descritos en la presente memoria.

5 En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es DOTAP y la emulsión aceite en agua catiónica comprende desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml de DOTAP, por ejemplo desde aproximadamente 1,7 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 1,6 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21,8 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, etc.

10 En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es DOTMA y la emulsión aceite en agua catiónica comprende desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml de DOTMA, por ejemplo desde aproximadamente 1,7 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 1,6 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22,5 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml etc.

15 En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es DOEPC y la emulsión aceite en agua catiónica comprende desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml de DOEPC, por ejemplo desde aproximadamente 1,7 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 1,6 mg/ml, aproximadamente 1,7 mg/ml, aproximadamente 1,8 mg/ml, aproximadamente 1,9 mg/ml, aproximadamente 2,0 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22,5 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml etc.

20 En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es DSTAP y la emulsión aceite en agua catiónica comprende desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml de DSTAP, por ejemplo desde aproximadamente 1,7 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 1,6 mg/ml, aproximadamente 1,7 mg/ml, aproximadamente 1,8 mg/ml, aproximadamente 1,9 mg/ml, aproximadamente 2,0 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22,5 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml etc.

25 En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es DODAC y la emulsión aceite en agua catiónica comprende desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml de DODAC, por ejemplo desde aproximadamente 1,7 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 1,6 mg/ml, aproximadamente 1,7 mg/ml, aproximadamente 1,8 mg/ml, aproximadamente 1,9 mg/ml; aproximadamente 2,0 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22,5 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml etc.

30 En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es DODAP y la emulsión aceite en agua catiónica comprende desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml de DODAP, por ejemplo desde aproximadamente 1,7 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 1,6 mg/ml, aproximadamente 1,7 mg/ml, aproximadamente 1,8 mg/ml, aproximadamente 1,9 mg/ml, aproximadamente 2,0 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22,5 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml etc.

35 En algunos casos, puede ser deseable utilizar un lípido catiónico que es soluble en el núcleo de aceite. Por ejemplo, el DOTAP, DOEPC, DODAC, y DOTMA son solubles en escualeno o escualano. En otros casos, puede ser deseable utilizar un lípido catiónico que no es soluble en el núcleo de aceite. Por ejemplo, el DDA y DSTAP no son solubles en escualeno. Está dentro del conocimiento en la técnica determinar si un lípido particular es soluble o insoluble en aceite y elegir una combinación de aceite y lípido adecuado de acuerdo con lo anterior. Por ejemplo, la solubilidad se puede predecir sobre la base de las estructuras del lípido y aceite (por ejemplo, la solubilidad de un lípido se puede determinar por la estructura de su cola). Por ejemplo, los lípidos que tienen una o dos cadenas de ácido graso insaturado (por ejemplo, colas oleoil), tales como DOTAP, DOEPC, DODAC, DOTMA, son solubles en escualeno o escualano; mientras que los lípidos que tienen cadenas de ácidos grasos saturados (por ejemplo, colas estearoil) no son solubles en escualeno. Alternativamente, la solubilidad se puede determinar de acuerdo con la cantidad de lípido que se disuelve en una cantidad dada del aceite para formar una solución saturada.

45 Como se señaló anteriormente, la concentración de un lípido descrito anteriormente se determina con base en la cantidad inicial del lípido que se utiliza para preparar las emulsiones. Se entiende en la técnica que la concentración real del aceite en el producto final (por ejemplo, una emulsión esterilizada empacada que está lista para la administración) puede ser ligeramente inferior, a veces hasta aproximadamente 20 %.

### C. Componentes Adicionales

50 Las emulsiones aceite en agua catiónicas descritas en la presente memoria pueden comprender además componentes adicionales. Por ejemplo, las emulsiones pueden comprender componentes que pueden promover la formación de partículas, mejorar la formación de complejos entre las moléculas de ácido nucleico y las partículas catiónicas, o aumentar la estabilidad de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, para evitar la degradación de una molécula de ARN). Si se desea, la emulsión aceite en agua catiónica puede contener un antioxidante, tal como citrato, ascorbato o sales de los mismos.

#### *Tensioactivos*

En ciertas realizaciones, las partículas de la emulsión aceite en agua catiónica comprenden además un tensioactivo.

Se ha utilizado una cantidad sustancial de tensioactivos en las ciencias farmacéuticas. Estos incluyen materiales de origen natural tales como gomas de árboles, proteína vegetal, polímeros con base en azúcar, tales como alginatos y celulosa, y similares. Ciertos oxipolímeros o polímeros que tienen un hidróxido u otro sustituyente hidrófilo sobre la estructura principal de carbono tienen actividad tensioactiva, por ejemplo, povidona, alcohol polivinílico, y compuestos mono- y poli-funcionales a base de éter de glicol. Los compuestos derivados de ácidos grasos de cadena larga forman un tercer grupo sustancial de agentes emulsionantes y agentes de suspensión que podría ser utilizado en esta invención.

Ejemplos específicos de tensioactivos adecuados incluyen los siguientes:

1. Jabones solubles en agua, tales como sales de sodio, potasio, amonio y alcanol-amonio de ácidos grasos superiores (C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>), en particular jabones de sodio y potasio de sebo y coco.
  2. Tensioactivos no jabonosos sintéticos aniónicos, que pueden estar representados por las sales solubles en agua de productos de reacción de ácido sulfúrico orgánico que tienen en su estructura molecular un radical alquilo que contiene de aproximadamente 8 a 22 átomos de carbono y un radical seleccionado del grupo que consiste de radicales éster de ácido sulfónico y ácido sulfúrico. Ejemplos de estos son los sulfatos de sodio o potasio de alquilo, derivados de aceite de sebo o de coco; sulfonatos de sodio o potasio de alquil benceno; sulfonatos de sodio alquil gliceril éter; sulfonatos y sulfatos de monoglicéridos de ácido graso de aceite de coco de sodio; sales de sodio o potasio de ésteres de ácido sulfúrico del producto de reacción de un mol de un alcohol graso superior y aproximadamente 1 a 6 moles de óxido de etileno; sulfonatos de éter de sodio o potasio alquil fenol de óxido de etileno, con 1 a 10 unidades de óxido de etileno por molécula y en los que los radicales alquilo contienen de 8 a 12 átomos de carbono; el producto de reacción de ácidos grasos esterificados con ácido isetiónico y neutralizados con hidróxido de sodio; sales de sodio o potasio de amida de ácido graso de un taururo de metilo; y sales de sodio y potasio de  $\alpha$ -olefinas C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub> sulfonadas con SO<sub>3</sub>.
  3. Tensioactivos sintéticos no iónicos elaborados por condensación de grupos de óxido de alquileo con un compuesto hidrófobo orgánico. Los grupos hidrófobos típicos incluyen los productos de condensación de óxido de propileno con propilenglicol, alquilfenoles, producto de condensación de óxido de propileno y etilendiamina, alcoholes alifáticos que tienen de 8 a 22 átomos de carbono, y amidas de ácidos grasos.
  4. Tensioactivos no iónicos, tales como óxidos de amina, óxidos de fosfina y sulfóxidos, que tienen características semipolares. Ejemplos específicos de óxidos de amina terciaria de cadena larga incluyen óxido de dimetildodecilamina y bis-(2-hidroxietil)dodecilamina. Los ejemplos específicos de óxidos de fosfina se encuentran en la Patente de Estados Unidos. No. 3,304,263, emitida el 14 de febrero de 1967, e incluye óxido de dimetildodecilsfosfina y óxido de dimetil-(2hidroxidodecil)fosfina.
  5. Sulfóxidos de cadena larga, que incluyen aquellos correspondientes a la fórmula R<sup>1</sup>-SO-R<sup>2</sup> en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son radicales alquilo sustituidos o no sustituidos, el primero contiene desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 28 átomos de carbono, mientras que R<sup>2</sup> contiene de 1 a 3 átomos de carbono. Ejemplos específicos de estos sulfóxidos incluyen sulfóxido de metil dodecil y sulfóxido de 3-hidroxi tridecilo metilo.
  6. Tensioactivos sintéticos anfólicos, tales como 3-dodecilaminopropionato de sodio y 3-dodecilaminopropano sulfonato de sodio.
  7. Tensioactivos de ión bipolar sintéticos, tales como 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilamonio)propano-1-sulfonato y 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilamonio)-2-hidroxi propano-1-sulfonato.
- Adicionalmente, se pueden utilizar todos los siguientes tipos de tensioactivos en una composición de la presente invención: (a) jabones (es decir, sales alcalinas) de ácidos grasos, ácidos de colofonia, y aceite de resina; (b) sulfonatos de areno alquilo; (c) sulfatos de alquilo, que incluyen tensioactivos con grupos hidrófobos, tanto de cadena ramificada como de cadena lineal, así como grupos sulfato primarios y secundarios; (d) sulfatos y sulfonatos que contienen un enlace intermedio entre los grupos hidrófobos e hidrófilos, tales como las tauridas de metilo aciladas grasas y los monoglicéridos grasos sulfatados; (e) ésteres de ácidos de cadena larga de polietilenglicol, especialmente los ésteres de aceite de resina; (f) éteres de polietilenglicol de alquilfenoles; (g) éteres de polietilenglicol de alcoholes de cadena larga y mercaptanos; y (h) dietanolamidas de acilo graso. Dado que los tensioactivos se pueden clasificar en más de una manera, una serie de clases de tensioactivos se expone en este párrafo se superpone con clases de tensioactivos previamente descritas.
- Existe una serie de tensioactivos diseñados específicamente para y comúnmente utilizados en situaciones biológicas. Dichos tensioactivos se dividen en cuatro tipos básicos: aniónicos, catiónicos, de ión bipolar (anfóteros) y no iónicos. Ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen, por ejemplo, perfluorooctanoato (PFOA o PFO), perfluorooctanosulfonato (PFOS), sales de sulfato de alquilo, tales como dodecil sulfato de sodio (SDS) o lauril sulfato de amonio, lauril sulfato de sodio (también conocido como sulfato de lauril éter de sodio, SLES), sulfonato de alquil benceno, y sales de ácidos grasos. Tensioactivos catiónicos de ejemplo incluyen, por ejemplo, sales de alquiltrimetilamonio tales como bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB, o bromuro de hexadecil trimetil amonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilada (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT). (Anfóteros) Ejemplos de tensioactivos de ión bipolar incluyen, por ejemplo, dodecil betaína,

cocamidopropil betaína, y glicinato de coco anfo. Los tensioactivos no iónicos de ejemplo incluyen, por ejemplo, poli(óxido de etileno) de alquilo, poli(óxido de etileno) de alquilfenol, copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (comercialmente llamados poloxámeros o poloxaminas), poliglucósidos Aayl (por ejemplo, octil glucósido o decil maltósido), alcoholes grasos (por ejemplo, alcohol cetílico o alcohol oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, Pluronic® F-68 (copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno), y polisorbatos, tales como Tween 20 (polisorbato 20), Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxietilensorbitán), óxido de dodecil dimetilamina, y succinato de tocoferol propilenglicol de vitamina E (vitamina E TPGS).

Un grupo particularmente útil de tensioactivos son los tensioactivos no iónicos a base de sorbitán. Estos tensioactivos se preparan por deshidratación del sorbitol para dar 1,4-sorbitán que luego se hace reaccionar con uno o más equivalentes de un ácido graso. El grupo funcional sustituido con ácido graso se puede hacer reaccionar adicionalmente con óxido de etileno para dar un segundo grupo de tensioactivos.

Los tensioactivos de sorbitán sustituidos con ácidos grasos se preparan al hacer reaccionar 1,4-sorbitán con un ácido graso tal como ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, o un ácido graso de cadena larga similar para dar el mono-éster de 1,4-sorbitán, sesquiéster de 1,4-sorbitán o triéster de 1,4-sorbitán. Los nombres comunes para estos tensioactivos incluyen, por ejemplo, monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán, sesquioleato de sorbitán, y trioleato de sorbitán. Estos tensioactivos están disponibles comercialmente bajo el nombre SPAN® o ARLACEL®, usualmente con una letra o un número de designación que lo distingue entre los diversos sorbitanos mono, di y triéster sustituidos.

Los tensioactivos SPAN® y ARLACEL® son hidrófilos y generalmente son solubles o dispersables en aceite. También son solubles en la mayoría de solventes orgánicos. En el agua son generalmente insoluble pero dispersables. Generalmente estos tensioactivos tendrán un número de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) entre 1,8 a 8,6. Dichos tensioactivos se pueden hacer fácilmente por medios conocidos en la técnica o están disponibles comercialmente.

Un grupo de tensioactivos relacionados comprende los monoésteres de polioxietileno sorbitán y triésteres de polioxietileno sorbitán. Estos materiales se preparan mediante adición de óxido de etileno a un monoéster o triéster de 1,4-sorbitán. La adición de polioxietileno convierte el tensioactivo mono- o triéster de sorbitán lipófilo a un tensioactivo hidrófilo generalmente soluble o dispersable en agua y soluble en distintos grados en líquidos orgánicos.

Estos materiales, disponibles comercialmente bajo la marca TWEEN®, son útiles para preparar emulsiones y dispersiones aceite en agua, o para la solubilización de aceites y elaboración de pomadas anhidras solubles en agua o lavables. Los tensioactivos TWEEN® se pueden combinar con tensioactivos relacionados con monoéster o triéster de sorbitán para promover la estabilidad de la emulsión. Los tensioactivos TWEEN® tienen por lo general un valor HLB que cae entre 9,6 a 16,7. Los tensioactivos TWEEN® están disponibles comercialmente.

Un tercer grupo de tensioactivos no iónicos que se pueden utilizar solos o en conjunto con tensioactivos SPAN®, ARLACEL® y TWEEN® son los ácidos grasos de polioxietileno preparados mediante la reacción de óxido de etileno con un ácido graso de cadena larga. El tensioactivo más comúnmente disponible de este tipo es sólido bajo el nombre MYRJ® y es un derivado de polioxietileno del ácido esteárico. Los tensioactivos MYRJ® son hidrófilos y solubles o dispersables en agua como los tensioactivos TWEEN®. Los tensioactivos MYRJ® se pueden mezclar con tensioactivos TWEEN®, o con mezclas de tensioactivos TWEEN®/SPAN® o ARLACEL® para su uso en la formación de emulsiones. Los tensioactivos MYRJ® se pueden elaborar por procedimientos conocidos en la técnica o están disponibles comercialmente.

Un cuarto grupo de tensioactivos no iónicos a base de polioxietileno son los éteres de ácidos grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, acetilo, estearilo y oleilo. Estos materiales se preparan como anteriormente mediante la adición de óxido de etileno a un alcohol graso. El nombre comercial para estos tensioactivos es BRIJ®. Los tensioactivos BRIJ® pueden ser hidrófilos o lipófilos dependiendo del tamaño del grupo funcional de polioxietileno en el tensioactivo. Mientras que la preparación de estos compuestos está disponible en la técnica, también son fácilmente disponibles de fuentes comerciales.

Otros tensioactivos no iónicos que potencialmente se pueden utilizar son, por ejemplo, polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioliol, éter de polioxietileno, éteres grasos de polioxipropileno, derivados de cera de abejas que contienen polioxietileno, derivado de polioxietileno lanolina, glicéridos grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de glicerol u otro alcohol ácido polioxietileno o derivados de éter de ácidos grasos de cadena larga de 12-22 átomos de carbono.

Como las emulsiones y formulaciones de la invención están destinados a ser sistemas multifásicos, es preferible elegir un tensioactivo no iónico que forme una emulsión que tenga un valor HLB en el rango de aproximadamente 7 a 16. Este valor se puede obtener mediante el uso de un tensioactivo no iónico único tal como un tensioactivo TWEEN® o se puede conseguir mediante el uso de una mezcla de tensioactivos tales como con un tensioactivo a base de mono, di- o triéster de sorbitán; un ácido graso de polioxietileno de éster de sorbitán; un éster de sorbitán en combinación con un tensioactivo derivado de polioxietileno lanolina; un tensioactivo de éster de sorbitán en

combinación con un agente tensioactivo de éter graso de polioxietileno de alto HLB; o un tensioactivo de éter graso de polietileno o ácido graso de sorbitán de polioxietileno.

5 En ciertas realizaciones, la emulsión comprende un tensioactivo no iónico único, aún más particularmente un tensioactivo TWEEN®, como el tensioactivo no iónico que estabiliza la emulsión iónica. En una realización de ejemplo, la emulsión comprende TWEEN® 80, conocido de otra forma como monooleato de sorbitán de polisorbato 80 o polioxietileno 20. En otras realizaciones, la emulsión comprende dos o más tensioactivos no iónicos, en particular un tensioactivo TWEEN® y un tensioactivo SPAN®. En una realización de ejemplo, la emulsión comprende TWEEN® 80 y SPAN®85.

10 Las emulsiones aceite en agua pueden contener desde aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2,5 % de tensioactivo (v/v o p/v), aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 % de tensioactivo, 0,01 % a aproximadamente 1,5 % de tensioactivo, 0,01 % a aproximadamente 1 % de tensioactivo, 0,01 % a aproximadamente 0,5 % de tensioactivo, 0,05 % a aproximadamente 0,5 % de tensioactivo, 0,08 % a aproximadamente 0,5 % de tensioactivo, aproximadamente 0,08 % de tensioactivo, aproximadamente 0,1 % de tensioactivo, aproximadamente 0,2 % de tensioactivo, aproximadamente 0,3 % de tensioactivo, aproximadamente 0,4 % de tensioactivo, aproximadamente 0,5 % de tensioactivo, aproximadamente 0,6 % de tensioactivo, aproximadamente 0,7 % de tensioactivo, aproximadamente 0,8 % de tensioactivo, aproximadamente 0,9 % de tensioactivo, o aproximadamente 1 % de tensioactivo.

20 Alternativamente o además de, las emulsiones aceite en agua pueden contener 0,05 % a aproximadamente 1 %, 0,05 % a aproximadamente 0,9 %, 0,05 % a aproximadamente 0,8 %, 0,05 % a aproximadamente 0,7 %, 0,05 % a aproximadamente 0,6 %, 0,05 % a aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,08 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, o aproximadamente 1 % de Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxietileno sorbitán).

En una realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua contiene 0,08 % de Tween 80.

25 Alternativamente o además de, las emulsiones aceite en agua pueden contener 0,05 % a aproximadamente 1 %, 0,05 % a aproximadamente 0,9 %, 0,05 % a aproximadamente 0,8 %, 0,05 % a aproximadamente 0,7 %, 0,05 % a aproximadamente 0,6 %, 0,05 % a aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,08 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, o aproximadamente 1 % de SPAN85 (trioleato de sorbitán).

30 Alternativamente o además de, las emulsiones aceite en agua pueden contener una combinación de tensioactivos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede utilizar una combinación de Tween 80 (polisorbato 80; monooleato de polioxietileno sorbitán) y SPAN85 (trioleato de sorbitán). Las emulsiones pueden contener diversas cantidades de Tween® 80 y SPAN85 (por ejemplo, aquellas ejemplificadas anteriormente), que incluyen cantidades iguales de estos tensioactivos. Por ejemplo, las emulsiones aceite en agua pueden contener aproximadamente 0,05 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,05 % de SPAN®85, aproximadamente 0,1 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,1 % de SPAN®85, aproximadamente 0,2 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,2 % de SPAN®85, aproximadamente 0,3 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,3 % de SPAN®85, aproximadamente 0,4 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,4 % de SPAN®85, aproximadamente 0,5 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,5 % de SPAN®85, aproximadamente 0,6 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,6 % de SPAN®85, aproximadamente 0,7 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,7 % de SPAN®85, aproximadamente 0,8 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,8 % de SPAN®85, aproximadamente 0,9 % de Tween® 80 y aproximadamente 0,9 % de SPAN®85, o aproximadamente 1 % de Tween® 80 y aproximadamente 1,0 % de SPAN®85.

45 Los lípidos de olietilenglicol (PEG), tales como PEG acoplado a dialquilohipropils (PEG-DAA), PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG), PEG acoplado a fosfatidiletanolamina (PE) (PEG-PE) o algunos otros fosfolípidos (PEG-fosfolípidos), PEG conjugados a ceramidas (PEG-Cer), o una combinación de los mismos, también se pueden utilizar como tensioactivos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 5,885,613; publicación de solicitud de Patentes de Estados Unidos Nos. 2003/0077829, 2005/0175682 y 2006/0025366). Otros PEG-lípidos adecuados incluyen, por ejemplo, lípidos de PEG-dialquilohipropilo (DAA) o lípidos de PEG-diacilglicerol (DAG). Lípidos PEG-DAG de ejemplo incluyen, por ejemplo, lípidos de PEG-dilauroilglicerol (C<sub>12</sub>), lípidos de PEG-dimiristoilglicerol (C<sub>14</sub>), lípidos de PEG-dipalmitoilglicerol (C<sub>16</sub>), o lípidos de PEG-distearoilglicerol (C<sub>18</sub>). Lípidos PEG-DAA de ejemplo incluyen, por ejemplo, lípidos de PEG-dilaurilohipropil (C<sub>12</sub>), lípidos de PEG-dimiristilohipropil (C<sub>14</sub>), lípidos PEG-dipalmitilohipropil (C<sub>16</sub>), o lípidos PEG-distearilohipropil (C<sub>18</sub>).

55 Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2,000 daltons, y PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5,000 daltons. Los PEG están disponibles comercialmente de Sigma Chemical Co. y en otras compañías e incluyen, por ejemplo, los siguientes: monometoxipoli(etilenglicol) (MePEG-OH), glicol-succinato de monometoxipoli(etileno) (MePEG-S), glicol-succinimidil succinato de monometoxipoli(etileno) (MePEG-S-NHS), monometoxipoli(etileno) glicol-amina

(MePEG-NH<sub>2</sub>), glicol-tresilato de monometoxipoliétileno (MePEG-TRES), y monometoxipoliétileno glicol-imidazolil-carbonil (MePEG-IM). Adicionalmente, el ácido monometoxipoliétilenoglicol-acético (MePEG-CH<sub>2</sub>COOH), es particularmente útil para preparar los conjugados de PEG-lípido que incluyen, por ejemplo, conjugados de PEG-DAA.

- 5 Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 daltons (por ejemplo, PEG<sub>1000</sub>, PEG<sub>2000</sub>, PEG<sub>3000</sub>, PEG<sub>4000</sub>, PEG<sub>5000</sub>). El PEG se puede sustituir opcionalmente con un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. El PEG se puede conjugar directamente con el lípido o se puede unir al lípido mediante un grupo funcional de unión. Se puede utilizar cualquier grupo funcional de unión adecuado para acoplar el PEG a un lípido que incluye, por ejemplo, grupos funcionales de unión que no contienen éster y grupos funcionales de unión que contienen éster.

10 En realizaciones de ejemplo, los PEG<sub>2000</sub>PE, PEG<sub>5000</sub>PE, PEG<sub>1000</sub>DMG, PEG<sub>2000</sub>DMG, PEG<sub>3000</sub>DMG, o una combinación de los mismos, se utiliza como un tensioactivo. En ciertas realizaciones de ejemplo, la emulsión aceite en agua contiene desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 80 mg/ml de PEG<sub>2000</sub>PE, PEG<sub>5000</sub>PE, PEG<sub>1000</sub>DMG, PEG<sub>2000</sub>DMG, o PEG<sub>3000</sub>DMG.

15 *Fosfolípidos*

En ciertas realizaciones, las partículas de la emulsión aceite en agua catiónica comprende adicionalmente un fosfolípido.

- 20 Los fosfolípidos son ésteres de ácidos grasos en los que el componente alcohólico de la molécula contiene un grupo fosfato. Los fosfolípidos incluyen glicerofosfatidas (que contienen glicerol) y las esfingomielinas (que contienen esfingosina). Fosfolípidos de ejemplo incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomielina; y fosfolípidos sintéticos que comprenden dimiristoil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, distearoil fosfatidilcolina, distearoil fosfatidilglicerol, dipalmitoil fosfatidilglicerol, dimiristoil fosfatidilserina, distearoil fosfatidilserina, y dipalmitoil serina.

Se pueden utilizar los siguientes fosfolípidos de ejemplo.

DDPC	1,2-Didecanoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA-NA	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal de Sodio)
DEPC	1,2-Erucoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG-NA	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA-NA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal de Sodio)
DLPC	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG-NA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)] (Sal de Sodio)
DLPG-NH4	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS-NA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina(Sal de Sodio)
DMPA-NA	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal de Sodio)
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG-NA	1,2-Miristoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPG-NH4	1,2-Miristoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPG-NH4/NA	1,2-Miristoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]



ES 2 657 547 T3

DMPS-NA	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina(Sal de Sodio)
DOPA-NA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal de Sodio)
DOPC	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG-NA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOPS-NA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina(Sal de Sodio)
DPPA-NA	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal de Sodio)
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG-NA	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPG-NH4	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPS-NA	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina(Sal de Sodio)
DPyPE	1,2-diFltanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA-NA	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal de Sodio)
DSPC	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diostearoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG-NA	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPG-NH4	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPS-NA	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina(Sal de Sodio)
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenado
HSPC	Soy PC hidrogenado de alta pureza
HSPC	Soy PC hidrogenado
LYSOPC MIRÍSTICO	1-Miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMÍTICO	1-Pahnitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC ESTEÁRICO	1-Stearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
Leche de Esfingomielina MPPC	1-Miristoilo,2-palmitoil-sn-Glicero 3-fosfatidilcolina
MSPC	1-Miristoilo,2-stearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
PMPC	1-Palmitoilo,2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-Palmitoilo,2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG-NA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)](Sal de Sodio)
PSPC	1-Palmitoilo,2-stearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-Stearoilo,2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-Stearoilo,2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

SPPC	1-Stearoilo,2-palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
------	---

En ciertas realizaciones, puede ser ventajoso utilizar un lípido neutro. También puede ser ventajoso utilizar fosfolípido, que incluye un fosfolípido de ión bipolar, por ejemplo, un fosfolípido que contiene uno o más radicales alquilo o alquenilo de aproximadamente 12 a aproximadamente 22 carbonos en longitud (por ejemplo, 5 aproximadamente 12 a aproximadamente 14, a aproximadamente 16, a aproximadamente 18, a aproximadamente 20, a aproximadamente 22 carbonos), cuyos radicales pueden contener, por ejemplo, desde 0 hasta 1 hasta 2 hasta 3 enlaces dobles. Puede ser ventajoso utilizar un fosfolípido de ión bipolar.

Los fosfolípidos preferidos incluyen, por ejemplo, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina de huevo (PC de huevo), palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC), dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), DPPC, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), palmitoil linoleil fosfatidilcolina (PLPC), DPyPE, o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el fosfolípido es DOPE. La emulsión aceite en agua catiónica puede comprender desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 20 mg/ml de DOPE. Por ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica puede comprender DOPE desde aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, desde 15 aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml, o desde aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 7,5 mg/ml de DOPE.

En una realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica comprende aproximadamente 1,5 mg/ml de DOPE.

En ciertas realizaciones, el fosfolípido es PC de huevo. La emulsión aceite en agua catiónica puede comprender desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 20 mg/ml de PC de huevo. Por ejemplo, la emulsión 20 aceite en agua catiónica puede comprender PC de huevo desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml, desde aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o desde aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 3,5 mg/ml de PC de huevo.

En una realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica comprende aproximadamente 1,55 mg/ml de PC 25 de huevo.

En ciertas realizaciones, el fosfolípido es DPyPE. La emulsión aceite en agua catiónica puede comprender desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 20 mg/ml de DPyPE. Por ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica puede comprender DPyPE desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml, desde 30 aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o desde aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de DPyPE.

En una realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica comprende aproximadamente 1,6 mg/ml de DPyPE.

En ciertas realizaciones, las partículas en emulsión pueden comprender una combinación de un tensioactivo y un fosfolípido descrito en la presente memoria.

#### 35 **D. Fase acuosa (fase Continua)**

La fase acuosa (fase continua) de las emulsiones aceite en agua es una solución de sal regulada (por ejemplo, solución salina) o agua. La solución de sal regulada es una solución acuosa que comprende una sal (por ejemplo, NaCl), un tampón (por ejemplo, un tampón de citrato), y puede comprender adicionalmente un agente de ajuste de osmolalidad (por ejemplo, un sacárido), un polímero, un tensioactivo, o una combinación de los mismos. La fase 40 acuosa puede contener un antioxidante, tal como citrato, ascorbato o sales de los mismos. Si las emulsiones se formulan para administración parenteral, es preferible compensar soluciones reguladas finales de tal manera que la tonicidad, es decir, la osmolalidad, es esencialmente la misma que los fluidos fisiológicos normales con el fin de evitar consecuencias posteriores a administración no deseadas, tales como la inflamación posterior a administración o una rápida absorción de la composición. También es preferible regular la fase acuosa con el fin de mantener un pH 45 compatible con las condiciones fisiológicas normales. También, en ciertos casos, puede ser deseable mantener el pH a un nivel particular con el fin de asegurar la estabilidad de determinados componentes de la emulsión.

Por ejemplo, puede ser deseable preparar una emulsión que es isotónica (es decir, la misma concentración de soluto permeable (por ejemplo, sal) medida como las células normales del cuerpo y la sangre) y isosmótica. Para controlar la tonicidad, la emulsión puede comprender una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. El cloruro de sodio (NaCl), por ejemplo, se puede utilizar a aproximadamente 0,9 % (p/v) (solución salina fisiológica). Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc. Los agentes de tonicidad no iónicos también se pueden utilizar para controlar la tonicidad. Una serie de agentes modificadores de la tonicidad no iónicos normalmente se conocen en la técnica. Por 50 lo general son carbohidratos de varias clasificaciones (véase, por ejemplo, Voet and Voet (1990) Biochemistry (John

Wiley & Sons, New York). Los monosacáridos clasificados como aldosas tales como glucosa, manosa, arabinosa y ribosa, así como los clasificados como cetosas tales como fructosa, sorbosa, y xilulosa se pueden utilizar como agentes de tonicidad no iónicos en la presente invención. También se puede utilizar disacáridos tales como sacarosa, maltosa, trehalosa y lactosa. Adicionalmente, los alditoles (alcoholes polihidroxí acíclico, también denominados alcoholes de azúcar), tales como glicerol, manitol, xilitol y sorbitol son agentes de tonicidad no iónicos útiles en la presente invención. Los agentes que modifican tonicidad no iónicos pueden estar presentes en una concentración de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % o aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %, dependiendo del agente que se utilice.

Se puede regular la fase acuosa. Se puede utilizar en la presente memoria cualquier tampón fisiológicamente aceptable, tal como agua, tampones de citrato, tampones de fosfato, tampones de acetato, tampones de tris, tampones de bicarbonato, tampones de carbonato, tampones de succinato, o similares. El pH del componente acuoso preferiblemente estará entre 6,0-8,0, preferiblemente aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,8. En una realización de ejemplo, el tampón es tampón de citrato 10 mM con un pH a 6,5. En otra realización de ejemplo, la fase acuosa es, o el tampón se prepara utilizando, agua libre de RNasa o agua tratada con DEPC. En algunos casos, la mucha sal en el tampón podría interferir con la formación de complejos de molécula de ácido nucleico en la partícula de emulsión por lo tanto se evita. En otros casos, se puede incluir cierta cantidad de sal en el tampón.

En una realización de ejemplo, el tampón es tampón de citrato 10 mM con un pH a 6,5. En otra realización de ejemplo, la fase acuosa, o el tampón se prepara utilizando agua libre de RNasa o agua tratada con DEPC.

La fase acuosa también puede comprender componentes adicionales tales como moléculas que cambia la osmolaridad de la fase acuosa o moléculas que estabilizan la molécula de ácido nucleico después de la formación de complejos. Preferiblemente, la osmolaridad de la fase acuosa se ajusta con un agente de tonicidad no iónico, tal como un azúcar (por ejemplo, trehalosa, sacarosa, fructosa, palatinosa reducida, etc.), un alcohol de azúcar (tal como manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, maltitol, glicerol, etc.), o combinaciones de los mismos. Si se desea, se puede utilizar un polímero no iónico (por ejemplo, un poli (alquil glicol), tal como polietilenglicol, polipropilenglicol, o polibutilenglicol) o tensioactivo no iónico.

En algunos casos, el agua sin adulterar puede ser preferida como la fase acuosa de la emulsión cuando la emulsión se prepara inicialmente. Por ejemplo, el aumento de la concentración de sal o concentración de azúcar puede hacer que sea más difícil lograr el tamaño de partícula deseable (por ejemplo, menos de aproximadamente 200 nm).

En ciertas realizaciones, la fase acuosa de la emulsión aceite en agua catiónica puede comprender adicionalmente un polímero o un tensioactivo, o una combinación de los mismos. En una realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua contiene un poloxámero. Los poloxámeros son copolímeros de tres bloques no iónicos que tienen una cadena central hidrófoba de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas de polioxietileno hidrófilo (poli(óxido de etileno)). Los poloxámeros también se conocen por el nombre comercial polímeros de Pluronic®. Los polímeros de poloxámero pueden conducir a una mayor estabilidad y mayor resistencia a la RNasa de la molécula de ARN después de formación de complejos de ARN.

Alternativamente o además de, la emulsión aceite en agua catiónica puede comprender desde aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 20 % (p/v) de polímero, o desde aproximadamente 0,05 % hasta aproximadamente 10 % (p/v) de polímero. Por ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica puede comprender un polímero (por ejemplo, un poloxámero tal como Pluronic® F127) desde aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 20 % (p/v), desde aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 10 % (p/v), desde aproximadamente 0,05 % hasta aproximadamente 10 % (p/v), o desde aproximadamente 0,05 % hasta aproximadamente 5 % (p/v).

En una realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua comprende aproximadamente 4 % (p/v), o aproximadamente 8 % (p/v) de Pluronic® F127.

La cantidad del componente acuoso empleado en estas composiciones será aquella cantidad necesaria para llevar el valor de la composición a la unidad. Es decir, una cantidad de componente acuoso suficiente para hacer que el 100 % se mezcle, con los otros componentes enumerados anteriormente con el fin de llevar las composiciones hasta el volumen.

#### 4. Moléculas de ácido nucleico

Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría particular, se considera que las moléculas de ácido nucleico interactúan con el lípido catiónico a través de interacciones de carga iónica no covalentes, (fuerzas electrostáticas), y la fuerza del complejo, así como la cantidad de molécula de ácido nucleico que puede ser un complejo con una partícula se relacionan con la cantidad de lípido catiónico en la partícula. Adicionalmente, las interacciones hidrófobas/hidrófilas entre la molécula de ácido nucleico y la superficie de las partículas también pueden desempeñar una función.

La molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN autorreplicante que codifica un antígeno, tal como un ARN que codifica un péptido, polipéptido o proteína.

El complejo se puede formar al utilizar técnicas conocidas en el arte, cuyos ejemplos se describen en la presente memoria. Por ejemplo, un complejo de ácido nucleico-partícula se puede formar al mezclar una emulsión catiónica con la molécula de ácido nucleico, por ejemplo al agitar con vórtex. La cantidad de molécula de ácido nucleico y de lípido catiónico en las emulsiones se puede ajustar u optimizar para proporcionar la resistencia deseada de unión y capacidad de unión.

Por ejemplo, como se describe y ejemplifica en la presente memoria, los complejos de ARN-partículas de ejemplo se produjeron al variar las relaciones de ARN: lípidos catiónicos (según se mide por la "relación de N/P "). El término relación de N/P se refiere a la cantidad (moles) de átomos de nitrógeno protonables en el lípido catiónico dividido por la cantidad (moles) de fosfatos sobre el ARN. La relación de N/P es al menos 4:1, por ejemplo desde 4:1 hasta 20:1 o desde 4:1 hasta 15:1.

Las emulsiones aceite en agua catiónicas descritas en la presente memoria son especialmente adecuadas para la formulación de vacunas basadas en ácidos nucleicos (vacunas de ARN). La formación de un complejo de partículas en emulsión/ácido nucleico facilita la absorción del ácido nucleico en las células anfitrionas, y protege la molécula de ácido nucleico de la degradación de nucleasa. Las células transfectadas luego pueden expresar el antígeno codificado por la molécula de ácido nucleico, que puede producir una respuesta inmunitaria al antígeno. Como los virus vivos o atenuados, las vacunas basadas en ácidos nucleicos pueden participar de manera efectiva en las dos rutas MHC-I y MHC-II lo que permite la inducción de respuestas de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, mientras que el antígeno presente en forma soluble, tal como la proteína recombinante, generalmente induce solamente respuestas de anticuerpos.

La secuencia de la molécula de ácido nucleico (molécula de ARN) se puede optimizar en codones o desoptimizar para la expresión en un anfitrión deseado, tal como una célula humana.

La molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN autorreplicante que codifica un antígeno (péptido, polipéptido o proteína) y el aceite catiónico en emulsión de agua es adecuado para uso como una vacuna basada en ARN. La composición puede contener más de una molécula de ARN que codifica un antígeno, por ejemplo, dos, tres, cinco, o diez moléculas de ARN que forman complejos con las partículas en emulsión. Es decir, la composición puede contener una o más especies diferentes de moléculas de ARN, cada una codifica un antígeno diferente. Alternativamente, o adicionalmente, una molécula de ARN también puede codificar más de un antígeno, por ejemplo, una molécula de ARN bicistrónica, o tricistrónica que codifica antígenos diferentes o idénticos. De acuerdo con lo anterior, el aceite catiónico en emulsión de agua es adecuado para uso como una vacuna basada en ARN, que es monovalente o multivalente.

La secuencia de la molécula de ARN puede ser modificada si se desea, por ejemplo para aumentar la eficacia de la expresión o replicación del ARN, o para proporcionar estabilidad o resistencia adicional a degradación. Por ejemplo, la secuencia de ARN puede ser modificada con respecto a su uso de codones, por ejemplo, para aumentar la eficacia de traducción y la vida media del ARN. Una cola de poli A (por ejemplo, de alrededor de 30 residuos de adenosina o más (SEQ ID NO: 3)) puede estar unida al extremo 3' del ARN para aumentar su vida media. El extremo 5' del ARN puede estar cubierto con un ribonucleótido modificado con la estructura m7G (5') ppp (5') N (estructura de cápsula 0) o un derivado del mismo, que se puede incorporar durante la síntesis de ARN o se puede diseñar enzimáticamente después de la transcripción de ARN (por ejemplo, al utilizar la Enzima que Encapsula el Virus Vaccinia (VCE) que consiste trifosfatasa de ARNm, guanilil-transferasa y guanina-7-methyltransferase, que cataliza la construcción de las estructuras 0 de cápsula monometilada N7). La estructura 0 de cápsula desempeña una función importante en el mantenimiento de la eficacia y estabilidad de la traducción de la molécula de ARN. La cápsula 5' de la molécula de ARN se puede modificar adicionalmente por un 2'-O-metiltransferasa que resulta en la generación de una estructura 1 de cápsula (m7Gppp [m2'-O]N), que puede aumentar aún más la eficacia de traducción.

Si se desea, la molécula de ARN puede comprender uno o más nucleótidos modificados, además de cualquier estructura de cápsula 5'. Existen más de 96 modificaciones de nucleósidos de origen natural que se encuentran en el ARN de mamífero. Véase, por ejemplo, Limbach et al., *Nucleic Acids Research*, 22(12):2183-2196 (1994). La preparación de los nucleótidos y nucleótidos modificados y nucleósidos es bien conocida en la técnica, por ejemplo, a partir de las patentes de los Estados Unidos números 4373071, 4458066, 4500707, 4668777, 4973679, 5047524, 5132418, 5153319, 5262530, 5700642, y muchos nucleósidos modificados y nucleótidos modificados están comercialmente disponibles.

Las nucleobases modificadas que se pueden incorporar en los nucleósidos y nucleótidos modificados y que están presentes en las moléculas de ARN incluyen: m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina); m2A (2-metiladenosina); Am (2-1-O-metiladenosina); ms2m6A (2-metiltio-N6-metiladenosina); i6A (N6-isopenteniladenosina); ms2i6A (2-metiltio-N6-isopenteniladenosina); io6A (N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms2io6A (2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina); t6A (N6-treonil carbamoiladenosina); ms2t6A (2-metiltio- N6-treonil carbamoiladenosina); m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina); hn6A(N6-hidroxinorvalilcarbamoil adenosina); ms2hn6A (2-metiltio-N6-hidroxinorvalil carbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m1I (1-metilinosina); m'Im (1,2'-O-dimetilinosina); m3C (3-metilcitidina); Cm (2TO- metilcitidina); s2C (2-tiocitidina); ac4C

(N4-acetilcitidina); f5C (5-fonnilcitidina); m5Cm (5,2-O-dimetilcitidina); ac4Cm (N4acetil2TOMETILcitidina); k2C (lisidina); m1G (1-metilguanosina); m2G (N2-metilguanosina); m7G (7- metilguanosina); Gm (2'-O-metilguanosina); m22G (N2,N2-dimetilguanosina); m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanosina); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosina); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)); yW (wibutosina); o2yW (peroxiwibutosina); OHyW (hidroxiwibutosina); OHyW\* (hidroxiwibutosina modificada); imG (wiosina); mimG (metilguanosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galtactosil-queuosina); manQ (mannosil-queuosina); preQo (7-ciano-7-deazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-deazaguanosina); G\* (arcaeosina); D (dihidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp3U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho5U (5-hidroxiuridina); mo5U (5-metoxiuridina); cmo5U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo5U (éster de metilo de ácido uridina 5-oxiacético); chm5U (5-(carboxihidroximetil)uridina); mchm5U (éster de metilo de 5-(carboxihidroximetil) uridina); mcm5U (5-metoxycarbonil metiluridina); mcm5Um (S-metoxycarbonilmetil- 2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm5U (5-metilaminometiluridina); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metilaminometil- 2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetil uridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmn5U (5-carboximetilaminometiluridina); cnmm5Um (5-carboximetilaminometil-2-L-OMETILuridina); cmnm5s2U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m62A (N6,N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitidina); m4Cm (N4,2-O-dimetilcitidina); hm5C (5-hidroximetilcitidina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carboximetiluridina); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosina); rn62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosina); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosina); m3Um (3,2T-O-dimetiluridina); m5D (5-metildihidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m'Am (1,2-O-dimetil adenosina) irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina)); imG-14 (4-demetil guanosina); imG2 (isoguanosina); ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7 sustituidos de los mismos, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), 5-metiluracilo, 5-alqueniluracilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alquiniluracilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquilocitosina (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), 5-metilcitosina, 5-alquenilcitosina (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alquinilcitosina (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-clorocitosina, 5- fluorocitosina, 5-bromocitosina, N<sup>2</sup>-dimetilguanina, 7-deazaguanina, 8-azaguanina, 7-deaza- guanina 7 sustituida, 7-deaza-7-alquinilguanina (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 7-deaza-guanina 8 sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2- aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, deazapurina 7 sustituida, 7-deaza-purina 7 sustituida, 7-deaza-purina 8 sustituida, hidrógeno (residuo abásico), m5C, m5U, m6A, s2U, W, o 2'-O-metil-U. Muchas de estas nucleobases modificadas y sus correspondientes ribonucleósidos están disponibles de proveedores comerciales. Véase, por ejemplo, documento WO 2011/005799.

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

En algunas realizaciones, la molécula de ARN no incluye nucleótidos modificados, por ejemplo, no incluye nucleobases modificadas, y todos los nucleótidos en la molécula de ARN son ribonucleótidos estándar convencionales A, U, G y C, con la excepción de una cap 5' que puede incluir, por ejemplo, 7-metilguanosina. En otras realizaciones, el ARN puede incluir una cap 5' con una 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' que pueden ser metilados en la posición 2' de la ribosa.

#### A. ARN autorreplicante

La emulsión aceite en agua catiónica contiene una molécula de ARN autorreplicante. En determinadas realizaciones, la molécula de ARN autorreplicante se deriva de o se basa en un alfavirus.

Las moléculas de ARN autorreplicante son bien conocidas en la técnica y se pueden producir al utilizar elementos de replicación derivados de, por ejemplo, alfavirus, y sustituyen las proteínas víricas estructurales con una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína de interés. Una molécula de ARN autorreplicante normalmente es una molécula de cadena (+) que puede ser traducida directamente después de suministro a una célula y esta traducción proporciona una polimerasa de ARN dependiente de ARN que luego produce tanto transcritos codificantes como anticodificantes del ARN suministrado. De esta manera el ARN suministrado conduce a la producción de múltiples ARN hijas. Estos ARN hija, así como las transcripciones subgenómicas colineales, se pueden traducir ellas mismas para proporcionar expresión in situ de un antígeno codificado, o se pueden transcribir para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que se traduce para proporcionar expresión in situ del antígeno. El resultado general de esta secuencia de transcripciones es una amplia amplificación en el número de ARN replicón introducidos y de esta manera el antígeno codificado se hace un producto de polipéptido principal de las células. Las células transfectadas con ARN autorreplicante producen brevemente antígeno antes de experimentar muerte apoptótica. Esta muerte probablemente es un resultado de intermedios de ARN de doble cadena (ds) de requisito, que también han mostrado súper activación de células dendríticas. De esta manera, la inmunogenicidad mejorada del ARN autorreplicante puede ser un resultado de la producción de dsARN antiinflamatorio, que imita una infección por virus ARN de células anfitrionas.

Ventajosamente, se utiliza la maquinaria de la célula mediante moléculas de ARN autorreplicante para generar un aumento exponencial de los productos génicos codificados, tal como proteínas o antígenos, que se pueden acumular en las células o ser secretados de las células. La sobreexpresión de las proteínas mediante moléculas de ARN autorreplicante toma ventaja de los efectos adyuvantes inmunoestimuladores, que incluyen estimulación de

receptores tipo Toll (TLR) 3, 7 y 8 y rutas no TLR (por ejemplo, RIG-1, MD-5) mediante los productos de replicación de ARN y amplificación y traducción que induce apoptosis de las células transfectadas.

El ARN autorreplicante contiene en general al menos uno o más genes seleccionados del grupo que consiste de replicasas víricas, proteasas víricas, helicasas víricas y otras proteínas víricas no estructurales, y también comprende secuencias de replicación CIS de extremo 5' y 3', y una secuencia heteróloga que codifica una secuencia de aminoácidos deseada (un antígeno de interés). Un promotor subgenómico que dirige la expresión de la secuencia heteróloga se puede incluir en el ARN autorreplicante. Si se desea, la secuencia heteróloga (un antígeno de interés) se puede fusionar en marco con otras regiones de codificación en el ARN autorreplicante y/o puede estar bajo el control de un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES).

En determinadas realizaciones, la molécula de ARN autorreplicante no se encapsula en una partícula tipo virus. Las moléculas de ARN autorreplicante de la invención se pueden diseñar de tal manera que la molécula de ARN autorreplicante no puede inducir la producción de partículas víricas infecciosas. Esto se puede lograr, por ejemplo, al omitir uno o más genes víricos que codifican proteínas estructurales que son necesarias para la producción de partículas víricas en el ARN autorreplicante. Por ejemplo, cuando la molécula de ARN autorreplicante se basa en un virus alfa, tal como el virus de Sinebis (SIN), virus del bosque Semliki y virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), uno o más genes que codifican las proteínas estructurales víricas, tal como glicoproteínas de envoltura y/o cápside, se pueden omitir.

Si se desea, las moléculas de ARN autorreplicante de la invención también se pueden diseñar para inducir la producción de partículas víricas infecciosas que son atenuadas o virulentas, o para producir partículas víricas que son capaces de una única ronda de infección posterior.

Un sistema adecuado para alcanzar auto replicación en esta forma es utilizar un replicón basado en alfavirus. Los alfavirus comprenden un grupo de virus de origen de artrópodos genéticamente, estructuralmente y serológicamente relacionados de la familia *Togaviridae*. Veintiséis virus conocidos y subtipos de virus se han clasificado dentro del género alfavirus, que incluyen virus Sindbis, virus del bosque Semliki, virus del río Ross, y virus de la encefalitis equina venezolana. Como tal, el ARN autorreplicante de la invención puede incorporar un ARN replicasa derivado del virus del bosque semliki (SFV), virus sindbis (pecado), virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), virus del río Ross (RRV), virus de la encefalitis equina oriental, u otros virus que pertenecen a la familia alfavirus.

Se puede utilizar un vector de expresión "replicón" basado en alfavirus en la invención. Los vectores replicón se pueden utilizar en diversos formatos, que incluyen ADN, ARN, y partículas de replicón recombinantes. Dichos vectores replicón se han derivado del alfavirus que incluyen, por ejemplo, virus Sindbis (Xiong et al. (1989) *Science* 243:1188-1191; Dubensky et al., (1996) *J. Virol.* 70:508-519; Hariharan et al. (1998) *J. Virol.* 72:950-958; Polo et al. (1999) *PNAS* 96:4598-4603), Semliki Forest virus (Liljestrom (1991) *Bio/Technology* 9:1356-1361; Berglund et al. (1998) *Nat. Biotech.* 16:562-565), and Venezuelan equine encephalitis virus (Pushko et al. (1997) *Virology* 239:389-401). Los replicones derivados de alfavirus son en general bastante similares en características principales (por ejemplo, estructura, replicación), los alfavirus individuales pueden exhibir alguna propiedad particular (por ejemplo, unión de receptor, sensibilidad de interferón, y perfil de enfermedad) que es único. Por lo tanto, los replicones alfavirus quiméricos hechos de familias de virus divergentes también pueden ser útiles.

Los replicones ARN basados en alfavirus normalmente son ARN de cadena (+) que conducen a la traducción de una replicasa (o replicasa-transcriptasa) después de administración a una célula. La replicasa se traduce como una poliproteína que se autodivide para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de cadenas (-) genómicas del ARN administrado de cadena (+). Estas transcripciones de cadena (-) pueden ellas mismas ser transcritas para dar copias adicionales del ARN pariente de cadena (+) y también da una transcripción subgenómico que codifica el antígeno. La traducción de la transcripción subgenómica conduce de esta manera a expresión in situ del antígeno mediante la célula infectada. Los replicones alfavirus adecuados pueden utilizar una replicasa de un virus Sindbis, un virus del bosque Semliki, un virus de la encefalitis equina oriental, un virus de la encefalitis equina venezolana, etcétera.

Un ARN replicón comprende preferiblemente un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de la fiebre amarilla o alfavirus (por ejemplo, virus Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana y Virus del río Ross), que se ha modificado mediante el reemplazo de uno o más genes de proteína estructural con una secuencia de ácido nucleico heteróloga seleccionada que codifica un producto de interés.

Un replicón preferido codifica (i) una polimerasa de ARN dependiente de ARN que puede transcribir ARN desde el replicón y (ii) un antígeno. La polimerasa puede ser una replicasa alfavirus, por ejemplo, que comprende una o más proteínas alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. Mientras que los genomas alfavirus naturales codifican proteínas de virión estructurales en adición a la poliproteína replicasano estructural, se prefiere que el replicón no codifique las proteínas estructurales alfavirus. De esta manera un replicón preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómicas de sí mismo en una célula, pero no para la producción de viriones que contienen ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus tipo natural, el replicón preferido no se puede perpetuar en sí mismo en forma infecciosa. Las proteínas estructurales alfavirus que son necesarias

para la perpetuación de los virus tipo natural están ausentes del replicón preferido y su lugar es tomado por los genes que codifican el antígeno de interés, que la transcripción subgenómico codifica el antígeno en lugar de las proteínas de virión alfavirus estructurales.

5 Un replicón útil con la invención puede tener dos marcos de lectura abiertos. El primer marco de lectura abierto (5') codifica una replicasa; el segundo marco de lectura abierto (3') codifica un antígeno. En algunas realizaciones el ARN puede tener marcos de lectura abiertos adicionales (por ejemplo, en la dirección 3'), por ejemplo, para codificar antígenos adicionales o para codificar polipéptidos accesorios.

10 Un replicón preferido tiene una cap 5' (por ejemplo, una 7-metilguanosina), que frecuentemente puede mejorar la traducción in vivo del ARN. En algunas realizaciones la secuencia 5' del replicón puede necesitar ser seleccionado para asegurar compatibilidad con la replicasa codificada.

Un replicón puede tener una cola poli-A 3'. También puede incluir una secuencia de reconocimiento de polimerasa poli-A (por ejemplo, AAUAAA) cerca de su extremo 3'.

Los replicones pueden tener diversas longitudes, pero normalmente son 5000-25000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 8000-15000 nucleótidos, o 9000-12000 nucleótidos.

15 El replicón se puede preparar convenientemente mediante transcripción in vitro (IVT). El IVT puede utilizar una plantilla de (cADN) creada y propagada en forma de plásmido en bacterias, o creada sintéticamente (por ejemplo, mediante procedimientos de ingeniería de reacción de cadena de polimerasa (PCR) y/o síntesis génica). Por ejemplo, una polimerasa de ARN dependiente de ADN (tal como el bacteriófago T7, T3 o las polimerasas de ARN SP6) se pueden utilizar para transcribir el replicón a partir de una plantilla de ADN. Se puede utilizar reacciones de adición poli-A y de recubrimiento adecuadas según se requiera (aunque el poli-A del replicón se codifica habitualmente dentro de la plantilla de ADN). Estas polimerasas de ARN pueden tener requisitos estrictos para los nucleótidos 5' nucleótido transcritos y en algunas realizaciones estos requerimientos se deben hacer coincidir con los requerimientos de la replicasa codificada, para asegurar que el ARN transcrito IVT puede funcionar eficientemente como un sustrato para su uno replicasa autocodificada. Ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en virus Sindbis (pSIN) tal como pSINCP, descrito, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,814,482 y 6,015,686, así como las publicaciones internacionales Nos. WO 97/38087 y WO 99/18226 WO 02/26209. Las construcciones de dichos replicones, en general, se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,814,482 y 6,015,686.

30 En otros aspectos, la molécula de ARN autorreplicante se deriva de o se basa en un virus diferente de un alfavirus, preferiblemente, un virus ARN de cadena positiva y más preferiblemente un picornavirus flavivirus, rubivirus, pestivirus, hepacivirus, calicivirus, o coronavirus. Las secuencias alfavirus tipo natural adecuadas son bien conocidas y están disponibles de los depositantes de secuencias, tal como el American Type Culture Collection, Rockville, Md. Ejemplo representativos de alfavirus adecuados incluyen (ATCC VR-368), virus Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), virus chikunguña (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), Virus de la encefalomieltis equina oriental (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), Virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylgach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), virus Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), virus Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), virus del río Ross (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Bosque Semliki (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinita (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), Encefalomieltis equina venezolana (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), Encefalomieltis equina occidental (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926), y Y-62-33 (ATCC VR-375).

45 Las moléculas de ARN autorreplicante de la invención son mayores que otros tipos de ARN (por ejemplo, mARN) que se han preparado utilizando nucleótidos modificados. Normalmente, las moléculas de ARN autorreplicante de la invención contienen al menos aproximadamente 4 kb. Por ejemplo, el ARN autorreplicante puede contener al menos aproximadamente 5 kb, al menos aproximadamente 6 kb, al menos aproximadamente 7 kb, al menos aproximadamente 8 kb, al menos aproximadamente 9 kb, al menos aproximadamente 10 kb, al menos aproximadamente 11 kb, al menos aproximadamente 12 kb o más de aproximadamente 12 kb. En determinados ejemplos, el ARN autorreplicante es de aproximadamente 4kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 5kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 6kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 7kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 8kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 9kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 10kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 11kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 5kb hasta aproximadamente 11kb, aproximadamente 5kb hasta aproximadamente 10kb, aproximadamente 5kb hasta aproximadamente 9kb, aproximadamente 5kb hasta aproximadamente 8kb, aproximadamente 5kb hasta aproximadamente 7kb, aproximadamente 5kb hasta aproximadamente 6kb, aproximadamente 6kb hasta aproximadamente 12kb, aproximadamente 6kb hasta aproximadamente 11kb, aproximadamente 6kb hasta aproximadamente 10kb, aproximadamente 6kb hasta aproximadamente 9kb, aproximadamente 6kb hasta aproximadamente 8kb, aproximadamente 6kb hasta aproximadamente 7kb, aproximadamente 7kb hasta aproximadamente 11kb, aproximadamente 7kb hasta aproximadamente 10kb, aproximadamente 7kb hasta aproximadamente 9kb, aproximadamente 7kb hasta

aproximadamente 8kb, aproximadamente 8kb hasta aproximadamente 11kb, aproximadamente 8kb hasta aproximadamente 10kb, aproximadamente 8kb hasta aproximadamente 9kb, aproximadamente 9kb hasta aproximadamente 11kb, aproximadamente 9kb hasta aproximadamente 10kb, o aproximadamente 10kb hasta aproximadamente 11kb.

- 5 Las moléculas de ARN autorreplicante de la invención pueden comprender uno o más tipos de nucleótidos modificados (por ejemplo, pseudouridina, N6-metiladenosina, 5 metilcitosina, 5-metiluridina).

La molécula del ARN autorreplicante puede codificar un único polipéptido heterólogo u, opcionalmente, dos o más antígenos de polipéptidos heterólogos ligados juntos en una forma que cada una de las secuencias retiene su identidad (por ejemplo, ligado en serie) cuando se expresa como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos heterólogos generados a partir del ARN autorreplicante se pueden producir luego como un polipéptido de fusión o diseñar con ingeniería en tal forma que resulta en secuencias de péptidos o polipéptidos separadas.

El ARN autorreplicante de la invención puede codificar uno o más antígenos de polipéptidos que contienen un rango de epítopos. Preferiblemente los epítopos capaces de provocar una respuesta de células T auxiliares o una respuesta de células T citotóxicas o ambas.

15 Las moléculas de ARN autorreplicante descritas en la presente memoria se pueden diseñar con ingeniería para expresar múltiples secuencias de nucleótidos, de dos o más marcos de lectura abierto, permitiendo por lo tanto la coexpresión de proteína, tal como dos o más antígenos junto con citoquinas u otros inmunomoduladores, que pueden mejorar la generación de una respuesta inmunitaria. Dicha molécula de ARN autorreplicante puede ser particularmente útil, por ejemplo, en la producción de diversos productos génicos (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo, por ejemplo, como una vacuna bivalente o multivalente.

Las moléculas de ARN autorreplicante de la invención se pueden preparar utilizando cualesquiera procedimientos adecuados. Se conocen diversos procedimientos adecuados en la técnica para producir moléculas de ARN que contienen nucleótidos modificados. Por ejemplo, una molécula de ARN autorreplicante que contiene nucleótidos modificados se puede preparar al transcribir (por ejemplo, en transcripción in vitro) un ADN que codifica la molécula de ARN autorreplicante que utiliza una polimerasa de ARN dependiente de ADN adecuada, tal como polimerasa de ADN fago T7, polimerasa de ARN fago SP6, polimerasa de ARN fago T3 y similares, o mutantes de estas polimerasas que permiten la incorporación eficiente de nucleótidos modificados en moléculas de ARN. La reacción de transcripción contendrá nucleótidos y nucleótidos modificados y otros componentes que soportan la actividad de la polimerasa seleccionada, tal como un tampón adecuado y sales adecuadas. La incorporación de análogos de nucleótidos en un ARN autorreplicante se puede diseñar por ingeniería, por ejemplo, para alterar la estabilidad de dichas moléculas de ARN, para aumentar la resistencia contra RNasas, para establecer la replicación después de introducción en células anfitrionas adecuadas ("infectividad" del ARN), y/o para inducir o reducir respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.

Los procedimientos sintéticos adecuados se pueden utilizar solo o en combinación con uno o más procedimientos (por ejemplo, tecnología de ADN o ARN recombinante), para producir una molécula de ARN autorreplicante de la invención. Los procedimientos adecuados para la síntesis de novo son bien conocidos en la técnica y se pueden adaptar para aplicaciones particulares. Los procedimientos de ejemplo incluyen, por ejemplo, síntesis química, que utilizan grupos de protección adecuados tal como CEM (Masuda et al., (2007) *Nucleic Acids Symposium Series* 51:3-4), the  $\beta$ -cyanoethyl phosphoramidite method (Beaucage S L et al. (1981) *Tetrahedron Lett* 22:1859); nucleoside H-phosphonate method (Garegg P et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehler B C et al. (1986) *Nucl Acid Res* 14:5399-407; Garegg P et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney B L et al. (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22). Estas químicas se pueden realizar o adaptar para uso con sintetizadores automatizados de ácidos nucleicos que están disponibles comercialmente. Se divulgan procedimientos sintéticos adicionales en Uhlmann et al. (1990) *Chem Rev* 90:544-84, and Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165. La síntesis de ácidos nucleicos también se puede realizar utilizando procedimientos recombinantes adecuados que son bien conocidos y convencionales en la técnica, que incluyen clonación, procesamiento y/o expresión de polinucleótidos y productos génicos codificados mediante dichos polinucleótidos. La mezcla de ADN mediante fragmentación aleatoria y reensamble PCR de fragmentos génicos y polinucleótidos sintéticos son ejemplos de técnicas conocidas que se pueden utilizar para diseñar y producir por ingeniería secuencia de polinucleótidos. Se puede utilizar mutagénesis dirigida al sitio para alterar los ácidos nucleicos y las proteínas codificadas, por ejemplo, para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar preferencia de codones, producir variantes de corte y empalme, introducir mutaciones y similares. Los procedimientos adecuados para transcripción, traducción y expresión de secuencias de ácidos nucleicos son conocidos y convencionales en la técnica. (Véase en general, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Ed. Ausubel, et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13, 1988; Glover, *DNA Cloning*, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3, 1986; Bitter, et al., in *Methods in Enzymology* 153:516-544 (1987); *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II, 1982; and Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1989)

La presencia y/o la cantidad de uno o más nucleótidos modificados en una molécula de ARN autorreplicante se pueden determinar utilizando cualesquiera procedimientos adecuados. Por ejemplo, un ARN autorreplicante se



puede digerir a monofosfatos (por ejemplo, utilizando nucleasa P1) y desfosforilar (por ejemplo, utilizando una fosfatasa adecuada tal como CIAP) y nucleósidos resultantes analizados mediante HPLC de fase reversa (por ejemplo, utilizando una columna YMC Pack ODS-AQ (5 micras, 4,6 X 250 mm) y eluye utilizando un gradiente, 30 % B (0-5 min) a 100 % B (5-13 min) y en 100 % B (13-40) min, índice de fluidez (0,7 ml/min), detección UV (longitud de onda: 260 nm), temperatura de columna (30°C). Tampón A (ácido acético 20 mM - acetato de amonio pH 3,5), tampón B (20 mM ácido acético - acetato de amonio pH 3,5/metanol [90/10])).

Opcionalmente, las moléculas de ARN autorreplicante de la invención pueden incluir uno o más nucleótidos modificados de tal manera que la molécula luego de la introducción o entrada en una célula anfitriona (por ejemplo, una célula humana) en comparación con la molécula de ARN autorreplicante correspondiente que no contiene nucleótidos modificados.

Si se desea, las moléculas de ARN autorreplicante se pueden seleccionar o analizar para confirmar sus propiedades terapéuticas y profilácticas utilizando diversos procedimientos de prueba in vitro o in vivo que son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las vacunas que comprende la molécula del ARN autorreplicante se pueden probar por su efecto en la inducción de la proliferación o función efectora del tipo de linfocito particular de interés, por ejemplo, células B, células T, estirpes de células T y clones de células T. Por ejemplo, las células de bazo de ratones inmunizados se pueden aislar y la capacidad de los linfocitos citotóxicos T para lisar células objetivo autóloga que contienen una molécula de ARN autorreplicante que codifica un antígeno de polipéptido. Adicionalmente, la diferenciación de células auxiliares T se puede analizar al medir la proliferación o producción de citoquinas TH1 (IL-2 y IFN- $\gamma$ ) y/o TH2 (IL-4 e IL-5) mediante ELISA o directamente en células T CD4+ mediante tinción de citoquinas citoplásmica y citometría de flujo.

Las moléculas de ARN autorreplicante que codifican un antígeno de polipéptido también se pueden probar para determinar la capacidad para inducir respuesta inmunitaria humoral, como se evidencia, por ejemplo, mediante inducción de producción de células B de anticuerpos específicos para un antígeno de interés. Estos ensayos se pueden realizar utilizando, por ejemplo, linfocitos B periféricos de individuos inmunizados. Dichos procedimientos de ensayo son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Se pueden utilizar otros ensayos para caracterizar las moléculas de ARN autorreplicante de la invención que pueden implicar detectar la expresión del antígeno codificado mediante células objetivo. Por ejemplo, los FACS se pueden utilizar para detectar la expresión de antígeno en la superficie celular o intracelularmente. Otra ventaja de la selección FACS es que uno puede clasificar para diferentes niveles de expresión; en ocasiones se puede desear menor expresión. Otro procedimiento adecuado para identificar células que expresan un antígeno particular implican barrido utilizando anticuerpos monoclonales sobre una placa o captura utilizando globos magnéticos recubiertas con anticuerpos monoclonales.

## B. Antígenos

La molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria es una molécula de ácido nucleico (una molécula de ARN autorreplicante) que codifica un antígeno. Los antígenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un antígeno bacteriano, un antígeno vírico, un antígeno fúngico, un antígeno de protozooario, un antígeno de planta, un antígeno contra el cáncer o una combinación de los mismos.

Los antígenos adecuados incluyen proteínas y péptidos de un patógeno tal como un virus, bacteria, hongo, protozooario, vegetal, o de un tumor. Los antígenos víricos e inmunógenos que se pueden codificar mediante la molécula del ARN autorreplicante incluyen, pero no se limitan a, proteínas y péptidos de un ortomixovirus, tal como influenza A, B y C; virus Paramixoviridae, tal como Pneumovirus (RSV), Paramixovirus (PIV), Metapneumovirus y Morbillivirus (por ejemplo, sarampión); Pneumovirus, tal como virus sincitial respiratorio (SRV), virus sincitial respiratorio de bovinos, virus de neumonía de ratones y virus de rinotraqueítis de Turkey; Paramixovirus tal como virus de parainfluenza tipo 1-4 (PIV), virus de paperas, virus Sendai, virus 5 del simio, virus de parainfluenza de bovino, Nipahvirus, Henipavirus y virus de enfermedad de Newcastle; Poxviridae, que incluye Ortopoxvirus tal como Variola vera (que incluye pero no se limita a, la Variola mayor y Variola menor); Pneumovirus, como el metapneumovirus humano (hMPV) y metapneumovirus aviar (aMPV); Morbillivirus, tal como sarampión; Picornavirus, tal como enterovirus, rinovirus, Heparnavirus, Parecovirus, Cardiovirus y Aftovirus; Enterovirus, tal como Poliovirus tipo 1, 2 o 3, virus Coxsackie A tipos 1 a 22 y 24, virus Coxsackie B tipos 1 a 6, virus ecovirus (echo) tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 y Enterovirus 68 a 71, Bunyavirus, que incluye Ortobunyavirus tal como virus de la encefalitis de California; un Flenobovirus, tal como virus de la fiebre del Valle del Rift; un Nairovirus, tal como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; Heparnavirus, tal como virus de la Hepatitis A (HAV); Togavirus (rubéola), tal como un Rubivirus, un Arterivirus; Flavivirus, tal como virus de la encefalitis de la garrapata (TBE), virus del Dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis del Japón, virus del bosque Kyasanur, virus de la encefalitis del Nilo Occidental, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis de la primera-verano Ruso, virus de la encefalitis de Powassan; Pestivirus, tal como diarrea vírica bovina (BVDV), fiebre clásica del cerdo (VFPC) o enfermedad de border (BDV); Hepadnavirus, tal como virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C; Rabdovirus, tal como Lissavirus (virus de rabia) y Vesiculovirus (VSV), Calciviridae, tal como virus de Norwalk y virus del tipo Norwalk, tal como virus de Hawái y Virus Snow Mountain; Coronavirus, tal como SARS, coronavirus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis del ratón (MHV) y virus de la gastroenteritis transmisible por porcinos (TGEV); Retrovirus tal como un Oncovirus, un Lentivirus o un Spumavirus; Reovirus, tal como un Ortoreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus y Coltivirus; Parvovirus, tal como el

Parvovirus B19; Virus de la hepatitis Delta (HDV); Virus de la hepatitis E (HEV); Virus de la hepatitis G (HGV); virus del herpes humano, tal como, por la forma de vía de virus Herpes Simplex (HSV), virus varicela-zóster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), Herpesvirus 6 (humano HHV6), Herpesvirus 7 humano (HHV7) y Herpesvirus 8 humano (HHV8); Papovavirus, tal como papiloma virus y Polioma virus, Adenovirus y arenavirus.

- 5 En algunas realizaciones, el antígeno provoca una respuesta inmunitaria contra un virus que infecta peces, tal como: el virus de anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus de la enfermedad pancreática de salmón (SPDV), virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus del bagre del canal (CCV), virus de enfermedad limpoquística de los peces (FLDV), virus de necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), virus Herpes de Koi, virus del tipo picorna del salmón (también conocido como virus del tipo picorna del salmón del Atlántico), virus de salmón sin litoral (LSV),  
 10 rotavirus de del Salmón Atlántico (ASR), virus de enfermedad de fresa de la trucha (TSD), virus del tumor del salmón Coho (CSTV), o virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV).

- En algunas realizaciones el antígeno provoca una respuesta inmunitaria contra un parásito del género Plasmodium, tal como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. De esta manera la invención se puede utilizar para inmunizar contra malaria. En algunas realizaciones el antígeno provoca una respuesta inmunitaria contra un parásito de la familia Caligidae, particularmente aquellas del género de *Lepeophtheirus* y de *Caligus* por ejemplo, piojos del mar *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*  
 15

- Antígenos bacterianos e inmunógenos que se pueden codificar mediante moléculas de ARN autorreplicante incluyen, pero no se limitan a, proteínas y péptidos de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia* sp. (por ejemplo, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia cepacia*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Clostridium tetani* (Tetanus), *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* (Botulism), *Corynebacterium diphtheriae* (Diphtheria), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* sp. (por ejemplo, *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. pinnipediae*.), *Francisella* sp. (por ejemplo, *F. novicida*, *F. philomiragia* y *F. tularensis*), *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* (Syphilis), *Haemophilus ducreyi*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* (tal como *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), *E. coli* enteropatogenico (EPEC), *E. coli* patogenico extraintestinal (ExPEC; tal como *E. coli* uropatogenico (UPEC) y *E. coli* asociado a meningitis/sepsis (MNEC)), y/o *E. coli* enterohemorragico (EHEC), *Bacillus anthracis* (anthrax), *Yersinia pestis* (plague), *Mycobacterium tuberculosis*, *Rickettsia*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), *Borrelia burgdorferi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Klebsiella*, *Mycoplasma pneumoniae*, etcétera.  
 20  
 25  
 30

- Antígenos fúngico e inmunógenos que se pueden codificar mediante la molécula de ARN autorreplicante incluyen, pero no se limitan a, proteínas y péptidos de *Dermatophytes*, que incluyen: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. *album*, var. *discoides*, var. *ochraceum*, *Trichophyton violaceum*, y/o *Trichophyton faviforme*; o de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporidia*, *Encephalitozoon* spp., *Septata intestinalis* y *Enterocytozoon bienewisi*; los menos comunes son *Brachiola* spp, *Microsporidium* spp., *Nosema* spp., *Pleistophora* spp., *Trachipleistophora* spp., *Vittaforma* spp *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium* *insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffe*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Mortierella* spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp, y *Cladosporium* spp.  
 35  
 40  
 45  
 50

- Antígenos de protozoarios e inmunógenos que se pueden codificar mediante la molécula de ARN autorreplicante incluyen, pero no se limitan a, proteínas y péptidos de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayatanensis* y *Toxoplasma*.  
 55

- Antígenos de plantas e inmunógenos que se pueden codificar mediante la molécula de ARN autorreplicante incluyen, pero no se limitan a, proteínas y péptidos de *Ricinus communis*.  
 60

- Antígenos adecuados incluyen las proteínas y péptidos de un virus tal como, por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus A de la hepatitis (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C  
 60

- (HCV), virus herpes simplex (HSV), citomegalovirus (CMV), virus de la influenza (flu), virus sincitial respiratorio (RSV), parvo virus, norovirus, virus del papiloma humano (HPV), rinovirus, virus de la fiebre amarilla, virus de rabia, virus de fiebre del dengue, virus del sarampión, virus de paperas, virus de rubéola, virus de varicela zoster, enterovirus Enterovirus 71), virus de Ébola, y virus de la diarrea de bovinos. Preferiblemente, la sustancia antigénica se selecciona del grupo que consiste de GD de glicoproteína de HSV, gp120 de glicoproteína del VIH, GP 40 de glicoproteína de VIH, P55 GAG VIH, y polipéptidos de las regiones de Pol y de TAT. En otras realizaciones preferidas de la invención, el antígeno es una proteína o péptido derivado de una bacteria tal como, para ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenza*, *Vibrio cholerae* (cólera), *C. diphtheriae* (difteria), *C. tetani* (tétano), *Neisseria meningitidis*, *B. pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, y similares.
- 5 Los antígenos del VIH que se pueden codificar mediante moléculas de ARN autorreplicante de la invención se describen en la Solicitud Estadounidense No. De Serie 490,858, presentada el 9 de marzo, 1990, y solicitud Europea publicada No. 181150 (14 de mayo de 1986), así como las Solicitudes Estadounidenses Nos. De series 60/168471; 09/475,515; 09/475,504; y 09/610,313.
- 10 Los antígenos de citomegalovirus que se pueden codificar mediante las moléculas de ARN autorreplicante de la invención se describen en la Patente Estadounidense No. 4,689,225, Solicitud Estadounidense No. De serie 367,363, presentada el 16 de junio de 1989 y la publicación PCT WO 89/07143.
- 15 Los antígenos de la hepatitis C que se pueden codificar mediante moléculas de ARN autorreplicante de la invención se describen en el documento PCT/US88/04125, Solicitud Europea Publicada No. 318216 (31 de mayo de 1989), Solicitud Japonesa Publicada No. 1-500565 presentada el 18 de noviembre, 1988, solicitud canadiense 583,561, y EPO 388.232. Un grupo diferente de antígenos HCV se describe en la solicitud de patente Europea 90/302866.0, presentada el 16 de marzo, 1990, y la Solicitud estadounidense No. De serie 456.637, presentada el 21 de diciembre de 1989 y el documento PCT/US90/01348.
- 20 En algunas realizaciones, el antígeno se deriva de un alérgeno, tal como alérgenos de polen (alérgenos de polen, arboles, hierbas, malezas y césped); alérgenos de arácnidos o insectos (inhalantes, alérgenos veneno y saliva, por ejemplo, alérgenos de ácaros, alérgenos de cucarachas y jejenes, alérgenos de venenos de himenópteros; alérgenos de caspa y pelos de animales (de, por ejemplo, perro, gato, caballo, rata, ratón, etcétera); y alérgenos de alimentos (por ejemplo, una gliadina). Alérgenos de polen importante de árboles, césped y hierbales son aquellos que se originan del orden taxonómico de fagales, oleales, pinales y Platanaceae que incluyen, pero no se limitan a, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), Carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), platano (*Platanus*), el orden de Poales que incluyen grasas del géneros *Lolium*, *Phleum*, *POA*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale*, y sorgo, las órdenes de Asterales y Urticales que incluyen hierbas del género *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros alérgenos de inhalación importantes son aquellos de los ácaros del polvo domestico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento, por ejemplo, *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, aquellos de cucarachas, jejenes y pulgas, por ejemplo, *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, y aquellos de mamíferos tales como gato, perros y caballos, alérgenos de venenos que incluyen insectos ponzoñosos que orbitan tales como aquellos del orden taxonómico de Hymenoptera que incluyen abejas (*Apidae*), avispas (*Vespidae*), y hormigas (*Formicoidae*).
- 25 En determinadas realizaciones, un antígeno o inmunógeno de tumor, o antígeno o inmunógeno de cáncer, se puede codificar mediante la molécula de ARN autorreplicante. En determinadas realizaciones, los antígenos e inmunógenos de tumor son antígenos de tumor que contienen péptidos, tal como un antígeno tumoral polipéptido o antígenos tumorales glicoproteicos.
- 30 Los antígenos e inmunógenos tumorales adecuados para el uso en la presente memoria abarcan una amplia variedad de moléculas, tal como (a) antígenos tumorales que contienen polipéptidos, que incluyen polipéptidos (que pueden variar, por ejemplo, de 8-20 aminoácidos en longitud, aunque longitudes fuera de este rango también son comunes), lipopolipéptidos y glicoproteinas.
- 35 En determinadas realizaciones, los inmunógenos de tumor son, por ejemplo, (a) moléculas de longitud completa asociadas con células de cáncer, (b) homólogos de formas modificadas de la misma, que incluyen moléculas con partes eliminadas, añadidas y/o sustituidas, y (c) fragmentos de la misma. Los inmunógenos tumorales incluyen, por ejemplo, antígenos restringidos clase I reconocidos por linfocitos CD8+ o antígenos restringidos clase II reconocidos por linfocitos CD4+.
- 40 En determinadas realizaciones, los inmunógenos tumorales incluyen, pero no se limitan a, (a) antígenos del cáncer testicular tal como NY-ESO-1, SSX2, SCP1 así como polipéptidos de la familia RAGE, BAGE, GAGE, y MAGE por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, y MAGE-12 (que se pueden utilizar, por ejemplo, para superar melanoma, tumores de pulmón, cabeza y el cuello, NSCLC, mama, gastrointestinal, y de vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con diversos tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón, cabeza y cuello), p21/ras (asociada con, por ejemplo, melanoma, cáncer pancreático y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, melanoma), caspasa-8 (asociada con, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina (asociada con, por ejemplo, melanoma), TCR (asociado
- 45
- 50
- 55

con, por ejemplo, linfoma no Hodgkins de células T), BCR-abl (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), isomerasa Triocefosfato, KIA 0205, CDC-27, y LDLR-FUT, (c) antígenos sobre expresados, por ejemplo, Galectina 4 (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), Galectina 9 (asociado con, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociado con, por ejemplo, diversas leucemias), anhidrasa carbónica (asociada con, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociada con, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociado con, por ejemplo, melanoma), HER-2/Neu (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), alfa-fetoproteína (asociada con, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada con, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica telomerasa, MUC-1 (asociada con, por ejemplo, cáncer de mama y de ovarios), G-250 (asociado con, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, cáncer de colon, mama) y antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, y cánceres del tubo gastrointestinal tal como el cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanomas-melanocitos tal como MART-1/Melan A, GP100, MC1R, receptor de hormona estimuladora de melanocitos, tirosinasa, proteína-1/TRP1 relacionada con tirosinasa y proteína-2/TRP2 relacionada con tirosinasa (asociado con, por ejemplo, melanoma), (e) antígenos asociados a próstata, tal como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P 1, PSM-P2, asociados con por ejemplo, cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociada con el mieloma y linfomas de células B, por ejemplo).

En determinadas realizaciones, los inmunógenos tumorales incluyen, pero no se limitan a, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2APRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus Epstein Barr, EBNA, antígenos del papilomavirus humanos (HPV), que incluyen E6 y E7, antígenos del virus de hepatitis B y C, antígenos del virus del limfotrópico de células T humanas, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de Unión Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, y similares.

### C. Solución acuosa para la molécula de ácido nucleico

La molécula de ácido nucleico (ARN) se proporciona en general en la forma de solución acuosa, o en la forma que se puede disolver fácilmente en una solución acuosa (por ejemplo, liofilizado). La solución acuosa puede estar en agua, o una solución acuosa que comprende una sal (por ejemplo, NaCl), un tampón (por ejemplo, un tampón de citrato), un agente de tonificación no iónico (por ejemplo, un sacárido), un polímero, un tensioactivo o una combinación de los mismos. Si la formulación se pretende para administración in vivo, es preferible que la solución acuosa sea un tampón fisiológicamente aceptable que conserva un pH que es compatible con condiciones fisiológicas normales. También, en determinados casos, puede ser deseable conservar el pH a un nivel determinado con el fin de asegurar la estabilidad de determinados componentes de la formulación.

Por ejemplo, puede ser deseable preparar una solución acuosa que sea isotónica y/o isosmótica. En ocasiones las soluciones hipertónicas e hipotónicas pueden provocar complicaciones y efectos indeseados cuando se inyectan, tal inflamación posterior a la administración o absorción rápida de la composición debido a concentraciones iónicas diferenciales entre la composición y los fluidos fisiológicos. Para controlar la tonicidad, la emulsión puede comprender una sal fisiológica, tal como sal de sodio. Cloruro de sodio (NaCl), por ejemplo, se puede utilizar en aproximadamente 0,9 % (p/v) (solución salina fisiológica). Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, deshidrato fosfato de disodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etcétera. En una realización de ejemplo, la solución acuosa comprende 10 mM de NaCl y otras sales o agentes de tonificación no iónicos. Como se describe en la presente memoria, los agentes de tonificación no iónicos también se pueden utilizar para controlar la tonicidad. En una realización, las soluciones hipertónicas e hipotónicas se mezclan (por ejemplo, ARN hipertónico una emulsión hipotónica; ARN hipotónico y emulsión hipertónica) de tal manera que una vez mezclados forman una solución isotónica.

La solución acuosa puede ser regulada. Cualquier tampón fisiológicamente aceptable se puede utilizar en la presente memoria, tal como tampones de citrato, tampones de fosfato, tampones de acetato, tampón de succinato, tampones Tris, tampones de bicarbonato, tampones de carbonatos, o similares. El pH de la solución acuosa estará preferiblemente entre 6,0-8,0, preferiblemente aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,8. En algunos casos, determinada cantidad de sales se puede incluir en el tampón. En otros casos, la sal en el tampón puede interferir con la formación de complejos de moléculas de ácido nucleico para la partícula de emulsión, por lo tanto, se evita.

La solución acuosa también puede comprender componentes adicionales tal como moléculas que pueden cambiar la osmolaridad de la solución acuosa o moléculas que estabilizan la molécula de ácido nucleico después de formación de complejos. Por ejemplo, la osmolalidad se puede ajustar utilizando un agente tonificación no iónico, que generalmente son carbohidratos, pero que también pueden ser polímeros. (véase, por ejemplo, Voet and Voet (1990) Biochemistry (John Wiley & Sons, New York.). Ejemplos de agentes de tonificación no iónicos adecuados incluyen azúcares (por ejemplo, trehalosa, sucrosa, dextrosa, fructosa, palatinasa reducida, etcétera), alcoholes de azúcar (tal como manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, maltitol, glicerol, etcétera), y combinaciones de los mismos. Si se desea se puede utilizar un polímero no iónico (por ejemplo, poli (alquil glicol) tal como polietileno glicol, polipropileno glicol o polibutileno glicol) o tensoactivos no iónicos. Estos tipos de agentes, en particular azúcar y

alcoholes de azúcar, también son crioprotectores que pueden proteger el ARN, y otras moléculas de ácido nucleico, cuando se liofilizan. En realizaciones de ejemplo, el tampón comprende de aproximadamente 560 nm a 600 nm de trehalosa, sacarosa, sorbitol, o dextrosa.

5 En algunos casos, puede ser preferible preparar una solución acuosa que comprende la molécula de ácido nucleico como solución hipertónica, y preparar la emulsión catiónica utilizando agua no adulterada o un tampón hipotónico. Cuando la emulsión y la molécula de ácido nucleico se combinan, la mezcla se vuelve isotónica. Por ejemplo, una solución acuosa que comprende ARN puede ser una solución hipertónica 2X, y una emulsión catiónica se puede preparar utilizando un tampón de citrato de 10 mM. Cuando una solución de ARN y la emulsión se mezclan en una relación 1:1 (v/v), la composición se vuelve isotónica. Con base en las cantidades relativas deseadas de la emulsión para la solución acuosa que comprende la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, mezcla 1:1 (v/v), mezcla 2:1 (v/v), mezcla 1:2 (v/v), etcétera), uno puede determinar fácilmente la tonicidad de la solución acuosa que se requiere con el fin de alcanzar una mezcla isotónica.

10 Del mismo modo, las composiciones que tienen osmolalidad fisiológica pueden ser deseables para administración in vivo. La osmolalidad fisiológica es de aproximadamente 255 mOsm/kg de agua hasta aproximadamente 315 mOsm/kg de agua. En ocasiones, puede ser preferible preparar una solución acuosa que comprende una molécula de ácido nucleico como una solución hiperosmolar, y preparar la emulsión catiónica utilizando agua no adulterada o un tampón hipoosmolar. Cuando la emulsión y la molécula de ácido nucleico se combinan, se alcanza la osmolalidad fisiológica. Por supuesto, esto se puede lograr utilizando solución de ácido nucleico hipoosmolar y un tampón hiperosmolar. Con base en las cantidades relativas deseadas de la emulsión para la solución acuosa que comprende la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, mezcla 1:1 (v/v), mezcla 2:1 (v/v), mezcla 1:2 (v/v), etcétera), uno puede determinar fácilmente la osmolalidad de la solución acuosa que se requiere con el fin de alcanzar una mezcla iso-osmolar.

15 En determinadas realizaciones, la solución acuosa que comprende la molécula de ácido nucleico puede comprender adicionalmente un polímero o un tensioactivo, o una combinación de los mismos. En una realización de ejemplo, la emulsión aceite en agua contiene un poloxámero. En particular, los inventores han observado que agregar Pluronic® F127 a la solución acuosa de ARN antes de formación de complejos para partículas en emulsión catiónica conduce a mayor estabilidad y aumento de resistencia Rnasa de la molécula de ARN. Además del F127 pluronic para la solución acuosa del ARN también se encontró que reduce el tamaño de partícula del complejo ARN/CNE. Los polímeros de poloxámero también pueden facilitar la descomplejación/liberación adecuada de la molécula del ARN, evita la agregación de las partículas en emulsión, y tiene efecto inmunomodulador. Otros polímeros que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, Pluronic® F68 o PEG300.

20 Alternativamente o adicionalmente, la solución acuosa que comprende la molécula de ácido nucleico puede comprender de aproximadamente 0,05 % hasta aproximadamente 20 % (p/v) de polímero. Por ejemplo, la emulsión aceite en agua catiónica puede comprender un polímero (por ejemplo, un poloxámero tal como Pluronic® F127, Pluronic® F68, o PEG300) de aproximadamente 0,05 % hasta aproximadamente de 10 % (p/v), tal como 0,05 %, 0,5 %, 1 %, o el 5 %.

25 El sistema de tampón puede comprender cualquier combinación de dos o más moléculas descritas anteriormente (sal, tampón, sacarida, polímero, etcétera). En una realización preferida, el tampón comprende 560 mM de sacarido, 20 mM de NaCl, y 2 mM de citrato, que se puede mezclar con una emulsión aceite en agua catiónica descrita en la presente memoria para producir una fase acuosa final que comprende 280 mM de sacarosa, 10 mM de NaCl y 1 mM de citrato. En otras realizaciones, el tampón comprende aproximadamente 2-20 mM de citrato, que se puede mezclar con un aceite catiónico en una emulsión de agua descrita en la presente memoria para producir una fase acuosa final que comprende aproximadamente 1-10 mM de citrato.

## 5. Procedimientos de preparación

30 Un procedimiento para preparar una composición que comprende una molécula de ácido nucleico en complejo con una partícula de una emulsión de aceite en agua catiónica en una relación N/P de al menos 4:1 y con un diámetro de partícula promedio de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 180 nm que comprende: preparar una emulsión aceite en agua catiónica en el que la comprende: (1) de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 20 % (v/v) aceite, (2) de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2,5 % (v/v) tensioactivo, y (3) un lípido catiónico; y agregar la molécula de ácido nucleico a la emulsión de aceite en agua catiónica de tal manera que la molécula de ácido nucleico forma complejos con la partícula de la emulsión.

35 Un enfoque de ejemplo para generar la emulsión aceite en agua catiónica es mediante un proceso que comprende: (1) combinar el aceite y el lípido catiónico para formar la fase del aceite de la emulsión; (2) proporcionar una solución acuosa para formar la fase acuosa de la emulsión; y (3) dispersar la fase de aceite en la fase acuosa, por ejemplo, mediante homogeneización. La homogeneización se puede alcanzar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, utilizando un homogeneizador comercial (por ejemplo, homogeneizador IKA T25, disponible en VWR International (West Chester, PA)).

El lípido catiónico se puede disolver en un disolvente adecuado, tal como cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), diclorometano (DCM), etanol, acetona, tetrahidrofurano (THF), 2,2,2 trifluoroetanol, acetonitrilo, acetato de etilo, hexano, dimetilformamida (DMF), dimetil sulfóxido (DMSO), etcétera, y se agrega directamente al componente de aceite de la emulsión. Alternativamente, el lípido catiónico se puede agregar a un disolvente adecuado para formar una suspensión de liposoma; luego, se puede agregar al componente de aceite de la emulsión. El lípido catiónico también se puede disolver directamente en el aceite.

Puede ser deseable calentar el aceite a una temperatura entre aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 65°C para facilitar la disolución del lípido.

La cantidad deseada del lípido catiónico (por ejemplo, DOTAP) se puede medir y disolver en un disolvente, en agua, o directamente en aceite para alcanzar la concentración final deseada como se describe y ejemplifica en la presente memoria.

Los disolventes tal como cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) o diclorometano (DCM) se pueden retirar de la fase aceitosa, por ejemplo, mediante evaporación, antes de combinar la fase acuosa y la fase de aceite o antes de homogeneización. Alternativamente, en casos en el que la solubilidad de los lípidos puede ser un problema, la emulsión primaria se puede hacer con el disolvente (por ejemplo, DCM) aun en la fase aceitosa. En dichos casos, se puede retirar el disolvente (por ejemplo, se deja evaporar) de la emulsión primaria antes de una homogeneización secundaria.

Si la emulsión comprende uno o más tensioactivos, los tensioactivos se pueden incluir en la fase aceitosa o la fase acuosa de acuerdo con la práctica convencional en la técnica. Por ejemplo, SPAN®85 se puede disolver en la fase de aceite (por ejemplo, escualeno), y Tween® 80 se puede disolver en la fase acuosa (por ejemplo, en un tampón de citrato).

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende una molécula de ácido nucleico (ARN) en complejos con una partícula de una emulsión aceite en agua catiónica, que comprende: (i) proporcionar una emulsión aceite en agua catiónica como se describe en la presente memoria; (ii) proporcionar una solución acuosa que comprenda la molécula de ácido nucleico (ARN); y (iii) combinar la emulsión aceite en agua de (i) una solución acuosa de (iii), de tal manera que la molécula de ácido nucleico forma complejos con la partícula de la emulsión. Por ejemplo, una emulsión aceite en agua catiónica se puede combinar con una solución acuosa que comprenda una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una solución ARN acuosa) en cualesquier cantidad relativa deseada, por ejemplo, aproximadamente 1:1 (v/v), aproximadamente 1,5:1 (v/v), aproximadamente 2:1 (v/v), aproximadamente 2,5:1 (v/v), aproximadamente 3:1 (v/v), aproximadamente 3,5:1 (v/v), aproximadamente 4:1 (v/v), aproximadamente 5:1 (v/v), aproximadamente 10:1 (v/v), aproximadamente 1:1,5 (v/v), aproximadamente 1:2 (v/v), aproximadamente 1:2,5 (v/v), aproximadamente 1:3 (v/v), aproximadamente 1:3,5 (v/v), aproximadamente 1:4 (v/v), aproximadamente 1:1,5 (v/v), o aproximadamente 1:1,10 (v/v), etcétera.

La concentración de cada componente en la composición posterior al complejo (por ejemplo, complejo de la emulsión de ARN) se puede determinar fácilmente de acuerdo con las cantidades relativas de la emulsión aceite en agua pre complejo y la solución acuosa que comprende la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una solución de ARN acuoso) que se utiliza. Por ejemplo, cuando se combina una emulsión aceite en agua catiónica con una solución acuosa que comprende una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una solución de ARN acuoso) en una relación 1:1 (v:v), las concentraciones del lípido catiónico y aceite se hacen 1/2 de aquella de la emulsión precomplejo. Por lo tanto, si una emulsión que comprende 4,3 % (p/v) de escualeno, se combina 1,4 mg/ml DOTAP, 0,5 % v/v SPAN® 85 y 0,5 % v/v Tween®80 (denominado en la presente memoria como "CNE17") con una solución de ARN acuosa que comprende 560 mM sacarosa, 20 mM NaCl, 2 mM citrato, y el 1 % (w/v) Pluronic F127 en 1:1 (v:v), la composición posterior a complejo comprende 2,15 % (p/v) de escualeno, 0,7 mg/ml DOTAP, 0,25 % v/v SPAN®85, 0,25 % v/v Tween®80, 280 mM sacarosa, 10 mM NaCl, 1mM citrato, y 0,5 % (p/v) Pluronic F127.

Etapas opcionales adicionales para promover la formación de partículas, para mejorar la formación de complejos entre moléculas de ácido nucleico y partículas catiónicas, para aumentar la estabilidad de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, para evitar la degradación de una molécula de ARN), para facilitar la decomplejación/liberación adecuada de las moléculas de ácido nucleico (tal como una molécula de ARN), o para evitar la agregación de las partículas en emulsión se puede incluir. Por ejemplo, un polímero (por ejemplo, Pluronic® F127) o un tensioactivo s pueden agregar a la solución acuosa que comprende la molécula de ácido nucleico (tal como ARN). En una realización de ejemplo, se agrega Pluronic® F127 a la molécula de ARN para formación de complejos para la partícula de la emulsión.

El tamaño de las partículas en emulsión puede variar al cambiar la relación de tensioactivo a aceite (aumentando la relación se reduce el tamaño de la gota), presión de funcionamiento (aumentando la presión de funcionamiento se reduce el tamaño de gota), temperatura (aumentando la temperatura se reduce el tamaño de la gota) y otros parámetros de proceso. El tamaño de partícula actual también variará con un tensioactivo particular, aceite, y lípido catiónico utilizado, y con las condiciones de funcionamiento particular seleccionadas. El tamaño de partícula de emulsión se puede verificar mediante el uso de instrumentos de medición del tamaño, tal como el analizador de partículas de submicras comercial (Modelo N4MD) fabricado por Coulter Corporation, y los parámetros se pueden

variar utilizando las directrices establecidas anteriormente hasta que el promedio el diámetro de las partículas sea de 80 nm a 180 Nm.

5 Procesos opcionales para preparar la emulsión aceite en agua catiónica (emulsión precomplejo), o el complejo de molécula-emulsión de ácido nucleico, incluyen, por ejemplo, esterilización, selección de tamaño de partícula (por ejemplo, eliminación de partículas grandes), llenado, empaque, etiquetado, etcétera.

Por ejemplo, si la emulsión precomplejo, o el complejo de molécula-emulsión de ácido nucleico, se formula para administración in vivo, se puede esterilizar, por ejemplo, al filtrar a través de un filtro de grado de esterilización (por ejemplo, a través de un filtro de 0,22 micras). Otras técnicas de esterilización incluyen un proceso térmico, o un proceso de esterilización por radiación, o se utiliza una luz de pulso para producir una composición estéril.

10 La emulsión aceite en agua catiónica descrita en la presente memoria se puede utilizar para fabricar vacunas. Las emulsiones aceite en agua catiónicas grado clínico y/o estériles se pueden preparar utilizando procedimientos similares como se describe para MF59. Véase, por ejemplo, Ott et al., *Methods in Molecular Medicine*, 2000, Volume 42, 211-228, in *VACCINE ADJUVANTS* (O'Hagan ed.), Humana Press. Por ejemplo, similar a los procesos de fabricación de MF59, la fase aceitosa y la fase acuosa de la invención se pueden combinar y procesar en un  
15 homogeneizador en línea para producir una emulsión áspera. La emulsión áspera se puede cargar posteriormente en un microfluidizador, en el que se puede procesar adicionalmente para obtener una emulsión de submicras estable. La emulsión áspera se puede pasar a través de una cámara de interacción del microfluidizador repetidamente hasta que se obtiene el tamaño de partícula deseado. La emulsión de volumen se puede filtrar  
20 posteriormente (por ejemplo, a través de un filtro de 0,22- $\mu\text{m}$  bajo nitrógeno) para eliminar partículas grandes, produciendo un volumen de emulsión que se puede cargar en contenedores adecuados (por ejemplo, botellas de vidrio). Para antígenos de vacunas que han demostrado estabilidad a largo plazo en la presencia de emulsión aceite en agua para auto almacenamiento, el antígeno y la emulsión se pueden combinar y filtrar-esterilizar (por ejemplo, a través de una membrana de filtro de 0,22- $\mu\text{m}$ ). La vacuna de frasco individual combinado se puede cargar en recipientes de una dosis. Para antígenos de vacunas en donde la estabilidad a largo plazo no se ha demostrado, la  
25 emulsión se puede suministrar como un frasco separado. En dichos casos, el volumen de la emulsión se puede filtrar-esterilizar (por ejemplo, a través de una membrana de filtro de 0,22- $\mu\text{m}$ ), cargar, y empaquetar en frascos de una dosis final.

El control de calidad se puede realizar opcionalmente sobre una muestra pequeña de la vacuna mezclada o emulsión en volumen, y la vacuna en volumen o mezclada se empaquetará en dosis solamente si la muestra pasa la  
30 prueba del control de calidad.

## 6. Composiciones farmacéuticas y administración

La emulsión aceite en agua catiónica de la invención se puede utilizar en una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácidos nucleicos en complejos con una partícula de una emulsión aceite en agua catiónica, como se describe en la presente memoria, y puede comprender adicionalmente uno o más portadores,  
35 farmacéuticamente aceptables diluyentes o excipientes. En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica es una composición inmunogénica, que se utilizara como una vacuna.

Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden utilizar para suministrar una molécula de ácido nucleico a células. Por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN) se pueden suministrar a las células para una variedad de propósitos, tales como para inducir la producción de un producto génico deseado  
40 (por ejemplo, proteína), para regular la expresión de un gen, para terapia de gen y similares. Las composiciones descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para suministrar una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) a células para propósitos terapéuticos, tales como para tratar una enfermedad tal como cánceres o trastornos proliferativos, enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, infecciones, alergias, para inducir una respuesta inmunitaria y similares. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico se pueden  
45 suministrar a las células para inhibir la expresión de un gen objetivo. Dichas moléculas de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARN de doble cadena, tales como ARN de interferencia pequeños y similares. Las moléculas de ARN de doble cadena, tales como pequeños ARN de interferencia, pueden desencadenar la interferencia de ARN, que silencia específicamente el gen objetivo correspondiente (atenuación de genes). Los oligonucleótidos antisentido son cadenas simples de ADN o ARN que son complementarias a una  
50 secuencia elegida. En general, el ARN antisentido puede evitar la traducción de proteínas de ciertas cadenas de ARN mensajero al unirse a ellos. El ADN antisentido se puede utilizar para dirigirse a un ARN específico, complementario (de codificación o de no codificación). Por lo tanto, las emulsiones catiónicas descritas en la presente memoria son útiles para el suministro de oligonucleótidos antisentido o ARN de doble cadena para el tratamiento de, por ejemplo, cáncer al inhibir la producción de un objetivo de oncología.

55 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se pueden administrar solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los procedimientos de administración incluyen, pero no se limitan a, administración oral, administración rectal, administración parenteral, administración subcutánea, administración intravenosa, administración intravítrea, administración intramuscular, inhalación, administración intranasal, administración tópica, administración oftálmica, y administración ótica.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones descritas en la presente memoria variará dependiendo de, entre otros, la enfermedad indicada, la gravedad de la enfermedad, la edad y salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto administrado, el modo de administración y el tratamiento deseado.

5 En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adicionales pueden incluir, pero no se limitan a antibióticos, agentes antibacterianos, agentes antieméticos, agentes antifúngicos, agentes antiinflamatorios, agentes antivirales, agentes inmunomoduladores, citoquinas, antidepresivos, hormonas, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, agentes antimitóticos, inhibidores de la topoisomerasa, agentes citostáticos, agentes anti-invasión, agentes antiangiogénicos, inhibidores de inhibidores del factor de crecimiento de la función de la replicación viral, inhibidores de enzimas virales, agentes anticancerígenos,  $\alpha$ -interferones,  $\beta$ -interferón, ribavirina, hormonas, otros moduladores de los receptores de tipo toll, inmunoglobulinas (Igs), y anticuerpos que modulan la función de Ig (tales como anti-IgE (omalizumab)).

15 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se utilizan en el tratamiento de enfermedades infecciosas, que incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad provocada por los patógenos divulgados en la presente memoria, que incluyen enfermedades virales tales como verrugas genitales, verrugas comunes, verrugas plantares, rabia, virus sincitial respiratorio (RSV), hepatitis B, hepatitis C, virus del dengue, fiebre amarilla, virus del herpes simple (solo a modo de ejemplo, HSV-I, HSV-II, CMV, o VZV), molluscum contagiosum, vaccinia, viruela, lentivirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis (virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, virus de hepatitis A), citomegalovirus (CMV), virus de la varicela zoster (VZV), rinovirus, enterovirus (por ejemplo, EV71), adenovirus, coronavirus (por ejemplo, SARS), influenza, para-influenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, papovavirus, hepadnavirus, flavivirus, retrovirus, arenavirus (solo a modo de ejemplo, LCM, virus Junin, virus Machupo, virus Guanarito y Fiebre de Lassa) y filovirus (solo a modo de ejemplo, virus Ébola o el virus de Marburg).

25 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se utilizan en el tratamiento de infecciones por bacterias, hongos, y protozoos que incluyen, pero no se limitan a, malaria, tuberculosis y *Mycobacterium avium*, lepra; *Carni pneumocystis*, criptosporidiosis, histoplasmosis, toxoplasmosis, infección por tripanosoma, leishmaniasis, infecciones provocadas por bacterias del género *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, y *Chlamydia*, e infecciones fúngicas tales como candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis y meningitis criptocócica.

30 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se utilizan en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos respiratorios, trastornos dermatológicos, enfermedades y/o trastornos oculares, enfermedades y/o trastornos genitourinarios que incluyen, rechazo de aloinjertos, cáncer autoinmunitario y alérgico o piel dañada o envejecida, tales como cicatrices y arrugas.

35 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para generar o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto en necesidad del mismo, tal como un mamífero, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición como se divulga en la presente memoria. La respuesta inmunitaria es preferiblemente protectora y preferiblemente implica anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. El procedimiento puede usarse para inducir una respuesta inmunitaria primaria y/o para reforzar una respuesta inmunitaria.

40 En ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas se pueden utilizar como un medicamento, por ejemplo, para uso en el aumento o mejora de una respuesta inmunitaria en un sujeto en necesidad del mismo, tal como un mamífero.

En ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas en la presente memoria se pueden utilizar en la fabricación de un medicamento para generar o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto en necesidad del mismo, tal como un mamífero.

45 La divulgación también proporciona un dispositivo de suministro pre-llenado con una composición o una vacuna divulgada en la presente memoria.

50 El mamífero es preferiblemente un humano, pero puede ser, por ejemplo, una vaca, un cerdo, un pollo, un gato o un perro, ya que los patógenos cubiertos en la presente memoria pueden una problemática a través de un amplio rango de especies. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferiblemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o bebé), un adolescente o un adulto; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es, preferiblemente, un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

55 Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por patógenos después de la administración de las composiciones o vacunas divulgadas en la presente memoria. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunitarias, sistémicamente (tal como monitorizar el nivel de producción de IgG1 e IgG2a) y/o por vía de mucosa (tal como monitorizar el nivel de producción de IgA), contra el antígeno. Normalmente, las respuestas de anticuerpos de suero específicos de antígeno se determinan después de inmunización, pero antes de inoculación, mientras que las respuestas de



anticuerpos de la mucosa específicas de antígeno se determinan después de la inmunización y después de la inoculación.

5 Otra forma de evaluar la inmunogenicidad de las composiciones o vacunas divulgadas en la presente memoria en las que la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, el ARN) codifica un antígeno de proteína es expresar el antígeno de proteína de forma recombinante para el cribado de sueros de pacientes o secreciones mucosas mediante inmunotransferencia y/o micromatrices. Una reacción positiva entre la proteína y la muestra del paciente indica que el paciente ha montado una respuesta inmunitaria a la proteína en cuestión. Este procedimiento también se puede utilizar para identificar antígenos y/o epítomos inmunodominantes dentro de antígenos de proteína.

10 La eficacia de las composiciones también se puede determinar *in vivo*, al inocular modelos animales apropiados del patógeno de infección de interés.

15 La dosificación puede ser mediante un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples se pueden utilizar en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de dosis múltiples las diversas dosis se pueden administrar por la misma o diferentes rutas, por ejemplo, una sensibilización parenteral y refuerzo de mucosa, una sensibilización y refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples se administrarán normalmente al menos 1 semana aparte (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.).

20 Las composiciones divulgadas en la presente memoria que incluyen uno o más antígenos o se utilizan en conjunto con uno o más antígenos se pueden utilizar para tratar tanto niños como adultos. Por lo tanto, un sujeto humano puede ser menor de 1 año de edad, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años, o al menos 55 años de edad. Los sujetos preferidos para recibir las composiciones son los ancianos (por ejemplo, >50 años, >60 años de edad, y preferiblemente >65 años), los jóvenes (por ejemplo, <5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, pacientes con enfermedades crónicas o inmunodeficientes. Las composiciones no son adecuadas solo para estos grupos, sin embargo, y se pueden utilizar más en general en una población.

30 Las composiciones divulgadas en la presente memoria que incluyen uno o más antígenos o se utilizan en conjunto con uno o más antígenos se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional de salud o centro de vacunación) otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra rubéola, una vacuna MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra la tos ferina, una vacuna DTP, una vacuna b del tipo *H. influenzae* conjugada, una vacuna de poliovirus inactivado, una vacuna de virus de hepatitis B, una vacuna conjugada meningocócica (tal como una vacuna AC W135 Y tetravalente), una vacuna de virus respiratorio sincitial, etc.

35 En ciertas realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente memoria incluyen u opcionalmente incluyen uno o más agentes inmunorreguladores tales como adyuvantes. Los adyuvantes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un adyuvante TH1 y/o un adyuvante de TH2, discute adicionalmente más adelante. En ciertas realizaciones, los adyuvantes usados en las composiciones inmunogénicas proporcionan en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a:

1. Composiciones que contienen minerales;
2. Emulsiones en aceite;
3. Formulaciones de saponina;
4. Virusomas y partículas semejantes al virus;
- 45 5. Derivados bacterianos o microbianos;
6. Bioadhesivos y mucoadhesivos;
7. Liposomas;
8. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno;
9. Polifosfaceno (PCPP);
- 50 10. Péptidos de muramilo;
11. Compuestos de imidazoquinolona;

12. Compuestos de tiosemicarbazona
13. Compuestos de triptantrina;
14. Inmunomoduladores humanos;
15. Lipopéptidos;
- 5 16. Benzonaftiridinas;
17. Micropartículas
18. Polinucleótido inmunoestimulante (tal como ARN o ADN, por ejemplo, oligonucleótidos que contienen CpG)

### Ejemplificación

10 La invención ahora descrita de forma general, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solo para fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

#### Ejemplo 1: emulsiones aceite en agua catiónicas

15 El escualeno, trioleato de sorbitán (Span 85), monololeato de polioxi-etileno sorbitán (Tween 80) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) se adquirió de Lipoid (Ludwigshafen Alemania).

Los componentes de las emulsiones utilizadas en estos estudios se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

CNE	Lípido catiónico (+)	mg/ml +Lípido	Tensioactivo	Escualeno	Tampón/agua
CNE17	DOTAP (en DCM)	1,40	0,5 % de SPAN 85 0,5 % de Tween 80	4,3 %	tampón de citrato 10 mM pH 6,5
CMF32	DOTAP	3,2	0,5 % de SPAN 85 0,5 % de Tween 80	4,3 %	tampón de citrato 10 mM pH 6,5
CMF34	DOTAP	4,4	0,5 % de SPAN 85 0,5 % de Tween 80	4,3 %	tampón de citrato 10 mM pH 6,5
CMF35	DOTAP	5,0	0,5 % de SPAN 85 0,5 % de Tween 80	4,3 %	tampón de citrato 10 mM pH 6,5

20 Los CNE se prepararon similar a MF59 cargadoa como se describió previamente Ott et al., Journal of Controlled Release, volumen 79, páginas 1-5, 2002). Los CMF 32, 34 y 35 se prepararon con una modificación importante de ese proceso. El DOTAP se disolvió en escualeno directamente, y no se utilizó ningún solvente orgánico. Se descubrió que la inclusión de un solvente en emulsiones que contenían más de 1,6 mg/ml de DOTAP produce una materia prima de espuma que no se pudo microfluidizar para producir una emulsión. El escualeno calentado a 37°C permitió al DOTAP ser disuelto directamente en escualeno, y luego la fase de aceite se pudo dispersar con éxito en la fase acuosa (por ejemplo, por homogeneización) para producir una emulsión. El DOTAP es soluble en escualeno y se pueden lograr concentraciones más altas de DOTAP en escualeno que aquellas enumeradas en la Tabla 1 se. Sin embargo, se ha reportado que la alta dosis de DOTAP puede tener efectos tóxicos. Véase, por ejemplo, Lappalainen et al., Pharm. Res., vol. 11(8):1127-31 (1994).

30 Brevemente, el escualeno se calentó a 37°C, y el DOTAP se disolvió directamente en escualeno en presencia de SPAN 85. A continuación, la fase de aceite resultante luego se combinó con la fase acuosa (Tween 80 en tampón de citrato) e inmediatamente se homogeneizaron durante 2 min utilizando un homogeneizador IKA T25 a 24K rpm para producir una materia prima homogénea (emulsiones primarias). Las emulsiones primarias se pasaron tres a cinco veces a través de un microfluidizador 10S M-1 o un microfluidizador M-110P (Microfluidics, Newton, MA) con una bobina de enfriamiento en baño de hielo a una presión de homogeneización de aproximadamente 15K-20K PSI. Las muestras de tandas de 20 ml se retiraron de la unidad y se almacenaron a 4°C.

35 Cabe señalar que las concentraciones de los componentes de CNE, como se describe en la Tabla 1, son concentraciones calculadas de acuerdo con las cantidades iniciales de estos componentes que se utilizan para preparar las emulsiones. Se entiende que durante el proceso de producción de emulsiones, o durante el proceso de

esterilización mediante filtración, pequeñas cantidades de escualeno, DOTAP, u otros componentes se pueden perder, y las concentraciones reales de estos componentes en el producto final (por ejemplo, en un 20 % aproximadamente. A veces, las concentraciones reales de los componentes en el producto final pueden ser ligeramente inferiores en hasta aproximadamente 25 %, o hasta aproximadamente 35 %. Sin embargo, la práctica convencional en la técnica es describir la concentración de un componente particular con base en la cantidad inicial que se utiliza para preparar la emulsión, en lugar de la concentración real en el producto final.

#### *Síntesis de ARN*

El ADN de plásmido que codifica un replicón de alfavirus (ARN autorreplicante) se utilizó como una plantilla para la síntesis de ARN *in vitro*. Cada replicón contiene los elementos genéticos necesarios para la replicación del ARN, pero carece de secuencias que codifican productos de genes que son necesarios para el ensamblaje de partículas. Los genes estructurales del genoma de alfavirus se reemplazaron por secuencias que codifican una proteína heteróloga (cuya expresión es impulsada por el promotor subgenómico de alfavirus). Luego del suministro de los replicones a las células eucariotas, el ARN de cadena positiva se traduce para producir cuatro proteínas no estructurales, que en conjunto se replica el ARN genómico y transcriben los ARNm subgenómicos abundantes que codifican la proteína heteróloga. Debido a la falta de expresión de las proteínas estructurales de alfavirus, replicones son incapaces de generar partículas infecciosas. Un promotor del bacteriófago T7 se encuentra en dirección 5' del ADNc de alfavirus para facilitar la síntesis del ARN sw replicón *in vitro*, y la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) situada inmediatamente en dirección 3' de la cola poli(A) genera el extremo 3' correcto a través su actividad de autodivisión.

Luego de la linealización del ADN de plásmido de dirección 3' de la ribozima HDV con una endonucleasa de restricción adecuada, las transcripciones extraídas y descartadas se sintetizaron *in vitro* utilizando bacteriófago T7 o SP6 derivado de ADN-polimerasa dependiente de ARN. Las transcripciones se realizaron durante 2 horas a 37°C en presencia de concentración final 7,5 mM (polimerasa de ARN T7) o 5 mM (polimerasa de ARN SP6) de cada uno de los trifosfatos de nucleósidos (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion, Austin, TX). Después de la transcripción, la plantilla de ADN se digirió con TURBO DNasa (Ambion, Austin, TX). El replicón de ARN se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. El ARN no encapsulado se cubrió post-transcripcionalmente con Enzima de Encapsulamiento de Vaccinia (VCE) utilizando el Sistema de encapsulamiento ScriptCap m<sup>7</sup>G Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) como se indica en el manual del usuario. El ARN encapsulado posttranscripcionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. Alternativamente, los replicones pueden ser limitados por que se completan las reacciones de transcripción con m<sup>7</sup>G (5')ppp(5')G 6 mM (para polimerasa de ARN T7) o 4 mM (para polimerasa de ARN SP6), un análogo de estructura de cápsula no reversible (New England Biolabs, Beverly, MA) y la reducción de la concentración de trifosfato de guanosina a 1,5 mM (para polimerasa de ARN T7) o 1 mM (para polimerasa de ARN SP6). Las transcripciones se pueden purificar luego por digestión TURBO DNasa (Ambion, Austin, TX) seguido por precipitación con LiCl y un lavado en etanol al 75 %.

La concentración de las muestras de ARN se determinó al medir la densidad óptica a 260 nm. Integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante para la presencia de la construcción de longitud completa.

#### *Formación de complejos de ARN*

El número de nitrógenos en solución se calcula a partir de la concentración de lípido catiónico, el DOTAP por ejemplo, tiene 1 nitrógeno que se puede protonar por molécula. La concentración de ARN se utilizó para calcular la cantidad de fosfato en solución utilizando una estimación de 3 nmoles de fosfato por microgramo de ARN. Mediante la variación de la cantidad de ARN: lípido, se puede modificar la relación de N/P. El ARN formó complejo con el CNE en un rango de relaciones de fosfato de nitrógeno/(N/P). El cálculo de la relación de N/P se llevó a cabo mediante el cálculo del número de moles de átomos de nitrógeno protonizables en la emulsión por mililitro. Para calcular el número de fosfatos, se utilizó una constante de 3 nmoles de fosfato por microgramo de ARN. Después se determinaron los valores, se agregó la proporción adecuada de la emulsión a la ARN. Utilizando estos valores, el ARN se diluyó hasta la concentración apropiada y se agregó directamente en un volumen igual de la emulsión mientras se agitaba en vórtex ligeramente. La solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Una vez formó complejo la solución resultante se diluyó hasta la concentración apropiada y se utilizó en 1 hora.

#### *Ensayo de tamaño de partículas*

El tamaño de partícula de la emulsión se midió utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los tamaños de partícula se presentan como el promedio Z (Z<sub>Ave</sub>) con el índice de polidispersidad (pdi). Todas las muestras se diluyeron en agua antes de las mediciones. Adicionalmente, el tamaño de partícula de la emulsión se midió utilizando el medidor de partículas Horiba LA-930 (Horiba Scientific, EE.UU.). Las muestras se diluyeron en agua antes de las mediciones. El potencial zeta se midió utilizando Zetasizer Nano ZS que utiliza muestras diluidas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Ensayo de fosfatasa alcalina secretada (SEAP)**

Para evaluar la cinética y la cantidad de producción de antígeno, un replicón de ARN que codifica SEAP se administró con y sin formulación a ratones por vía intramuscular. Grupos de 3 o 5 ratones Balb/C hembra de edades de 8-10 semanas y un peso de aproximadamente 20 g se inmunizaron con CNES en complejo con replicón de ARN que codifica para SEAP. El ARN desnudo se formuló en RNasa libre de 1X PBS. Una dosis de 100 µl se administró a cada ratón (50 µl por sitio) en el músculo cuádriceps. Se tomaron muestras de sangre 1, 3, y 6 días después de inyección. Se separó el suero de la sangre inmediatamente después de recolección, y se almacenó a -30°C hasta uso.

Un ensayo de SEAP quimioluminiscente Phospha-Light System (Applied Biosystems, Bedford, MA) se utilizó para analizar el suero. Los sueros de ratón se diluyeron 1:4 en tampón de dilución 1X Phospha-Light. Las muestras se colocaron en un baño de agua sellado con una lámina de sellado de aluminio y se inactivaron con calor durante 30 minutos a 65°C. Después de enfriar en hielo durante 3 minutos, y equilibrarla a la temperatura ambiente, se agregaron 50 uL de tampón de ensayo Phospha-Light a los pozos y las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se agregaron 50 uL de tampón de reacción que contiene sustrato CSPD® 1:20 (sustrato de fosfato alcalino quimioluminiscente), y se midió la luminiscencia después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió en un luminómetro Berthold Centro LB 960 (Oak Ridge, TN) con una integración de 1 segundo por pozo. La actividad de SEAP en cada muestra se midió por duplicado y se muestra la media de estas dos mediciones.

**Ejemplo 2: efecto del tamaño de partícula sobre la inmunogenicidad**

Este ejemplo muestra que el tamaño de partícula afecta a la inmunogenicidad de las formulaciones CNE/ARN.

A. Los protocolos para el ensayo de tamaño de partícula y ensayo de SEAP *in vivo* se describen en el Ejemplo 1. Los protocolos para estudios de inmunogenicidad en murinos se describen en el Ejemplo 3. La Figura 1A muestra los resultados (media aritmética) del ensayo de SEAP *in vivo*. La Figura 1B muestra los títulos totales de IgG de los animales individuales en los ratones BALB/C en puntos de tiempo 2wp1 y 2wp2.

La formación de complejos de ARN con CNE 17 aumentó el tamaño de las partículas de la emulsión desde aproximadamente 220 nm hasta aproximadamente 300 nm. Como se muestra en la Figura 1A y la Figura 1B, cuando aumentó el tamaño de partícula, se redujeron los niveles de expresión de SEAP, y también se redujeron las respuestas inmunitarias del anfitrión.

B. El CMF34 preparado en diferentes tamaños formó complejo con el ARN que codifica RSV-F en una relación de N/P teórica de 7:1 y se inyectó en el músculo cuádriceps de ratones Balb/C bilateralmente (0,05 ml/sitio). Los tamaños de partícula de emulsión se modularon por el aumento de la presión de procesamiento del microfluidizador. Los datos (Tabla 2) muestran que los títulos anti-RSV F más altos se generaron cuando el tamaño de partícula de la emulsión era más pequeño (véase partículas de 120 nm y 90 nm) a las dos semanas después de la primera inmunización.

**Tabla 2**

Formulación	Dosis de ARN	Relación de N/P	2wp1 GMT	2wp2 GMT
1 ug de tanda vA375 1	1 ug	7:1	16	151
1 ug de tanda vA375 1 + CMF34 (5k de procesamiento de PSI -200 nm de tamaño )	1 ug	7:1	162	1644
1 ug de tanda vA375 1 + CMF34 (7k de procesamiento de PSI -150 nm de tamaño)	1 ug	7:1	183	2540
1 ug de tanda vA375 1 + CMF34 (12k de procesamiento de PSI -120 nm de tamaño)	1 ug	7:1	465	3563
1 ug de tanda vA375 1 + CMF34 (20k de procesamiento de PSI-90 nm de tamaño)	1 ug	7:1	548	2542

**Ejemplo 3: efectos de composiciones reguladoras sobre la inmunogenicidad y el tamaño de partícula**

En este ejemplo, se prepararon diversas emulsiones con base en CNE17 pero con diferentes componentes reguladores. La Tabla 3 muestra las composiciones de las emulsiones modificadas con tampón.

Tabla 3

Emulsión Base	Tampón/agua
CNE17: 4,3 % de Escualeno, 0,5 % de SPAN 85, 0,5 % de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	tampón de citrato 0 mM (en dH <sub>2</sub> O libre de RNasa, no DCM)
CNE17: 4,3 % de Escualeno, 0,5 % de SPAN 85, 0,5 % de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	tampón de citrato 1 mM (en dH <sub>2</sub> O libre de RNasa, no DCM)
CNE17: 4,3 % de Escualeno, 0,5 % de SPAN 85, 0,5 % de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	tampón de citrato 5 mM (en dH <sub>2</sub> O libre de RNasa, no DCM)
CNE17: 4,3 % de Escualeno, 0,5 % de SPAN 85, 0,5 % de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	tampón de citrato 10 mM pH 6,5 Trehalosa 300 mM
CNE17: 4,3 % de Escualeno, 0,5 % de SPAN 85, 0,5 % de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	tampón de citrato 10 mM pH 6,5 Sacarosa 300 mM
CNE17: 4,3 % de Escualeno, 0,5 % de SPAN 85, 0,5 % de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	tampón de citrato 10 mM pH 6,5 Sorbitol 300 mM
CNE17: 4,3 % de Escualeno, 0,5 % de SPAN 85, 0,5 % de Tween 80, 1,4 mg/ml de DOTAP	tampón de citrato 10 mM pH 6,5 Dextrosa 300 mM

El ensayo de unión *in vitro* mostró que reducir la concentración de tampón de citrato provoca que el ARN se una con más fuerza.

- 5 Los resultados de los estudios de inmunogenicidad murinos mostraron que la adición de azúcares a CNE17 no impactó significativamente la inmunogenicidad del ARN formulado con CNE17 (Tabla 4, grupos de 9-12)). Se observaron aumentos leves en los títulos de IgG con la adición de sorbitol y dextrosa.

Tabla 4

Grupo #	Descripción		2wpl	2wp2	Relación 2wp2/2wpl
	Emulsión	Relación de N:P			
1	1ugvA317	-	77	1.710	22,2
2	RV01(15)	-	3.441	59.557	17,3
3	CNE17 DOTAP	10:1	1.474	6.512	4,4
4	CNE13 DDA	18:1	482	8.385	17,4
5	CMF37 DOTMA	10:1	474	6.556	13,8
6	CNE16 DOEPC	12:1	1.145	9.673	8,4
7	CMF42 DSTAP	10:1	22	148	6,7
8	Liposomas DDA	18:1	898	5.333	5,9
9	CNE17 con Trehalosa 300 mM	10:1	1.807	6.445	3,6
10	CNE17 con Sacarosa 300 mM	10:1	1.042	5.515	5,3
11	CNE17 con Sorbitol 300 mM	10:1	1.209	8.874	7,3
12	CNE17 con Dextrosa 300 mM	10:1	1.247	7.956	6,4

- 10 Los grupos 1-8 tenían 5 animales/grupo, y los grupos de 9-12 tuvieron 10 animales/grupo.

La Tabla 5 resume los resultados de los estudios de inmunogenicidad en murinos cuando los ARN formulados con CNE17 se prepararon utilizando diferentes sistemas reguladores.

Tabla 5

Grupo #	Descripción			2wp1	2wp2	Relación 2wp2/2wpl 1
	ARN	Emulsión	Relación de N:P			
1	1 µg de RSV- F*	PBS	-	100	2269	23
2	RV01 (15)	PBS	-	8388	105949	13
3	1 µg de RSV- F*	CNE17 con Sacarosa 280 mM	10:1	898	9384	10
4	1 µg de RSV-F**	CNE17 con Sacarosa 280 mM, 10 mM NaCl, Citrato 1 mM,	10:1	1032	3184	3,1
5		CNE17 con Sacarosa 280 mM, 10 mM NaCl, Citrato 1 mM, 0,5 % (p/v) y Pluronic F127	10:1	79	895	11,3

\* Replicón vA375, \*\* replicón vA317. Los replicones se transcribieron Ambion en tampón de HEPES, luego (i) se precipitó LiCl, (ii) se encapsularon en tampón Tris y (iii) se precipitó LiCl. Todos los grupos tenían 8 animales/grupo.

5 Las diferentes composiciones de tampón también afectaron el tamaño de partícula. Como se muestra en la Figura 2A, la adición de azúcar (sacarosa) disminuyó el tamaño de partícula del complejo de ARN/CNE; la adición de bajas concentraciones de NaCl (a 10 mM) también redujo el tamaño de partícula del complejo de ARN/CNE (Figura 2A). El tampón de citrato no afectó el tamaño de partícula del complejo de ARN/CNE (Figura 2B).

Los efectos de los polímeros sobre el tamaño de partícula se muestran en la Figura 2C. En particular, la adición de 0,5 % de pleuronic F127 a un tampón de ARN redujo el tamaño de partícula del complejo de ARN/CNE al tamaño anterior a la formación de complejos (partículas CNE sin ARN).

10 Los títulos de anticuerpos totales y los títulos de anticuerpos neutralizantes de CNE 17 en sistemas reguladores preferidos, sacarosa 280 mM, NaCl 10 mM, y citrato 1 mM; o sacarosa 280 mM, NaCl 10 mM, citrato 1 mM y 0,5 % (p/v) de Pluronic F127, se muestran en la Tabla 5 (grupos 4 y 5).

#### Ejemplo 4: efectos de la relación de n/p sobre la inmunogenicidad

15 En este ejemplo, el replicón de ARN vA375, que codifica un antígeno F de RSV, se formuló como liposoma (RV01), en complejo con CNE 17 en N/P de 10:1, y con CMF32 o CMF34 en N/P teórica de 12:1, 10:1, 8:1, 6:1, y 4:1. Las relaciones de N/P teóricas reflejan las relaciones de N/P calculadas de acuerdo con las cantidades iniciales de DOTAP y el ARN que se utilizaron para preparar las formulaciones. Las relaciones de N/P reales fueron ligeramente menores que las relaciones de N/P teóricas debido a que pequeñas cantidades de DOTAP se perdieron durante la preparación de las emulsiones. Los datos GMT reflejan la media  $\log_{10}$  del título de ratones individuales en cada grupo (8 ratones/grupo). Todas las formulaciones se ajustaron a 300 mOsm/kg con sacarosa antes de inmunización. No hubo problemas de tolerabilidad obvios observados (por ejemplo, el peso corporal, las primeras citoquinas en suero), con cualquiera de las formulaciones CMF32 o CMF34.

25 Las relaciones de N/P reales se determinaron al cuantificar el contenido DOTAP en tandas de CNE o CMF utilizando HPLC con un detector de aerosol cargado (Corona Ultra, Chelmsford, MA). Las muestras de CNE y CMF se diluyeron en isopropanol y se inyectaron en una columna XTerä C18 4,6 x 150 mm 3,5 (Waters, Milford, MA). El área bajo la curva se tomó desde el pico de DOTAP en el cromatograma y la concentración se interpoló de una curva estándar DOTAP. Utilizando la concentración DOTAP real, se puede calcular una relación de N/P real.

Los datos de inmunogenicidad de la Tabla 6 muestran que se obtuvieron buenos títulos cuando la relación de N/P real fue de al menos 4:1.

Tabla 6

Formulación	ARN (µg/dosis)	Relación teórica de N/P	Relación real de N/P	2wp1 GMT	2wp2 GMT	2wp2/2wp1 (refuerzo)
Desnudo	1	--	--	68	1019	15
RV01	1	--	--	9883	68116	7
CNE17	1	10:1	--	1496	6422	4
CMF32	1	12:1	9,4:1	2617	14246	5
	1	10:1 (tanda 1)	6,0:1	1537	10575	7
	1	10:1 (tanda 2)	8,0:1	2047	16244	8
	1	8:1	6,3:1	2669	7656	3
	1	6:1	4,7:1	1713	4715	3
	1	4:1	3,1:1	872	3773	4
CMF34	1	12:1	7,4:1	3141	10134	3
	1	10:1 (tanda 1)	6,1:1	1906	11081	6
	1	10:1 (tanda 2)	7,0:1	2388	9857	4
	1	8:1	5:1	1913	8180	4
	1	6:1	3,7:1	1764	6209	4
	1	4:1	2,5:1	1148	4936	4

SECUENCIAS

A317 (SEQ ID NO:1)

5 A375 (SEQ ID NO:2)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

<120> EMULSIONES ACEITE EN AGUA QUE CONTIENEN ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> PAT054719-WO-PCT

10 <140>

<141>

<150> 61/585,639

<151> 2012-01-11

<150> 61/505,091

15 <151> 2011-07-06

<160> 3

<170> PatentIn version 3,5

<210> 1

<211> 12463

ES 2 657 547 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> FUENTE

5 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 1

<b>ataggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg</b>	<b>60</b>
<b>ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gggagcttc ccgcagtttg</b>	<b>120</b>
<b>aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc</b>	<b>180</b>
<b>tggttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa</b>	<b>240</b>
<b>gtgccccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat</b>	<b>300</b>
<b>gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg</b>	<b>360</b>
<b>aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc</b>	<b>420</b>
<b>ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc</b>	<b>480</b>
<b>aagtcgctgt ttaccaggat gtatacgcgg ttgacggacc gacaagtctc tatcaccaag</b>	<b>540</b>
<b>ccaataaggg agttagagtc gcctactgga taggctttga caccaccctt tttatgttta</b>	<b>600</b>
<b>agaacttggc tggagcatat ccatcatact ctaccaactg ggccgacgaa accgtgttaa</b>	<b>660</b>
<b>cggctcgtaa cataggccta tgcagctctg acgttatgga gcggtcacgt agagggatgt</b>	<b>720</b>
<b>ccattcttag aaagaagtat ttgaaacat ccaacaatgt tctattctct gttggctcga</b>	<b>780</b>
<b>ccatctacca cgagaagagg gacttactga ggagctggca cctgccgtct gtatttcaact</b>	<b>840</b>
<b>tacgtggcaa gcaaaattac acatgtcggg gtgagactat agttaagttgc gacgggtacg</b>	<b>900</b>
<b>tcgttaaaag aatagctatc agtccaggcc tgtatgggaa gccttcaggc tatgctgcta</b>	<b>960</b>



ES 2 657 547 T3

cgatgcaccg cgagggattc ttgtgctgca aagtgcaga cacattgaac ggggagaggg 1020  
 tctcttttcc cgtgtgcacg tatgtgccag ctacattgtg tgaccaaagtg actggcatac 1080  
 tggcaacaga tgtcagtgcg gacgacgcmc aaaaactgct ggttgggctc aaccagcgta 1140  
 tagtctgcaa cggtcgcacc cagagaaaca ccaataccat gaaaaattac cttttgccccg 1200  
 tagtggccca ggcatttgct aggtgggcaa aggaatataa ggaagatcaa gaagatgaaa 1260  
 ggccactagg actacgagat agacagttag tcatgggggtg ttgttgggct tttagaaggc 1320  
 acaagataac atctatttat aagcgcggc ataccxaaac catcatcaaa gtgaacagcg 1380  
 atttccactc attcgtgctg cccaggatag gcagtaacac attggagatc gggctgagaa 1440  
 caagaatcag gaaaatgta gaggagcaca aggagccgct acctctcatt accgccgagg 1500  
 acgtacaaga agctaagtgc gcagccgatg aggctaagga ggtgcgtgaa gccgaggagt 1560  
 tgccgcgagc tctaccacct ttggcagctg atgttgagga gccactctg gaagccgatg 1620  
 tagacttgat gttacaagag gctggggccg gctcagtgga gacacctcgt ggcttgataa 1680  
 aggttaccag ctacgatggc gaggacaaga tcggtctta cgctgtgctt tctccgcagg 1740  
 ctgtactcaa gagtgaaaaa ttatcttgca tccaccctct cgctgaacaa gtcatagtga 1800  
 taacacactc tggccgaaaa gggcgttatg ccgtggaacc ataccatggt aaagtagtgg 1860  
 tgccagaggg acatgcaata cccgtccagg actttcaagc tctgagtga agtgccacca 1920  
 ttgtgtacaa cgaacgtgag ttcgtaacaa ggtacctgca ccatattgcc acacatggag 1980  
 gagcgtgaa cactgatgaa gaatattaca aaactgtcaa gccagcgag cacgacggcg 2040  
 aatacctgta cgacatcgac aggaaacagt gcgtcaagaa agaactagtc actgggctag 2100  
 ggctcacagg cgagctgggt gatcctccct tccatgaatt cgctacgag agtctgagaa 2160  
 cacgaccagc cgctccttac caagtaccaa ccataggggt gtatggcgtg ccaggatcag 2220  
 gcaagtctgg catcattaaa agcgcagtca ccaaaaaaga tctagtgggt agcgccaaga 2280  
 aagaaaactg tgcagaaatt ataagggacg tcaagaaaat gaaagggctg gacgtcaatg 2340  
 ccagaactgt ggactcagtg ctcttgaatg gatgcaaaca ccccgtagag accctgtata 2400  
 ttgacgaagc ttttgcttgt catgcaggta ctctcagagc gctcatagcc attataagac 2460  
 ctaaaaaggc agtgcctctg ggggatccca aacagtgcgg ttttttaac atgatgtgcc 2520  
 tgaaagtgca ttttaaccac gagatttgca cacaagtctt ccacaaaagc atctctcgcc 2580  
 gttgcactaa atctgtgact tcggtcgtct caaccttgtt ttacgacaaa aaaatgagaa 2640  
 cgacgaatcc gaaagagact aagattgtga ttgacactac cggcagtagc aaacctaagc 2700  
 aggacgatct cattctcact tgtttcagag ggtgggtgaa gcagttgcaa atagattaca 2760  
 aaggcaacga aataatgacg gcagctgcct ctcaagggtc gaccgtaaa ggtgtgtatg 2820

ccgttcggta caaggtgaat gaaaatcctc tgtacgcacc cacctcagaa catgtgaacg 2880  
 tcctactgac ccgcaecggag gaccgcatcg tgtggaaaac actagccggc gacccatgga 2940  
 taaaaaact gactgccaag taccctggga atttactgac cacgatagag gagtggcaag 3000  
 cagagcatga tgccatcatg aggcacatct tggagagacc ggaccctacc gacgtcttcc 3060  
 agaataaggc aaacgtgtgt tgggccaagg ctttagtgcc ggtgctgaag accgctggca 3120  
 tagacatgac cactgaacaa tggaaactg tggattatct tgaaacggac aaagctcact 3180  
 cagcagagat agtattgaac caactatgag tgaggctctt tggactcgat ctggactccg 3240  
 gtctattttc tgcacccact gttccgttat ccattaggaa taactactgg gataactccc 3300  
 cgtcgcctaa catgtacggg ctgaataaag aagtggctcg tcagctctct cgcaggtacc 3360  
 cacaactgcc tcgggcagtt gccactggaa gagtctatga catgaacact ggtacactgc 3420  
 gcaattatga tccgcgcata aacctagtag ctgtaaacag aagactgcct catgctttag 3480  
 tcctccacca taatgaacac ccacagagtg acttttcttc attcgtcagc aaattgaagg 3540  
 gcagaactgt cctggtggc ggggaaaagt tgtccgtccc aggcaaatg gttgactggt 3600  
 tgtcagaccg gcctgaggct accttcagag ctccgctgga tttaggcatc ccagggtgatg 3660  
 tgcccaaata tgacataata tttgttaatg tgaggacccc atataaatac catcactatc 3720  
 agcagtgtga agaccatgcc attaagctta gcatgttgac caagaaagct tgtctgcatc 3780  
 tgaatcccgg cggaacctgt gtcagcatag gttatggta cgctgacagg gccagcgaaa 3840  
 gcatcattgg tgctatagcg cggcagttca agttttccc ggtatgcaa ccgaaatcct 3900  
 cacttgaaga gacggaagtt ctgtttgtat tcattgggta cgatcgcaag gcccgtagc 3960  
 acaatcctta caagctttca tcaacctga ccaacattta tacaggttcc agactccacg 4020  
 aagccggatg tgcacctca tatcatgtgg tgcgagggga tattgccacg gccaccgaag 4080  
 gagtgattat aaatgctgct aacagcaaag gacaacctgg cggaggggtg tgcggagcgc 4140  
 tgtataagaa attcccggaa agcttcgatt tacagccgat cgaagtagga aaagcgcgac 4200  
 tggccaaagg tgcagctaaa catatcattc atgccgtagg accaaacttc acaaaagttt 4260  
 cggaggttga aggtgacaaa cagttggcag aggcttatga gtccatcgct aagattgtca 4320  
 acgataacaa ttacaagtca gtacgattc cactgttgtc caccggcatc tttccggga 4380  
 acaaagatcg actaaccocaa tcattgaacc atttgctgac agcttttagac accactgatg 4440  
 cagatgtagc catatactgc agggacaaga aatgggaaat gactctcaag gaagcagtgg 4500  
 ctaggagaga agcagtggag gagatatgca tatccgacga ctcttcagtg acagaacctg 4560  
 atgcagagct ggtgaggggtg catccgaaga gttctttggc tggaaaggaag ggctacagca 4620  
 caagcgatgg caaaactttc tcatatttgg aagggaccaa gtttcaccag gcggccaagg 4680  
 atatagcaga aattaatgcc atgtggcccg ttgcaacgga ggccaatgag caggtatgca 4740

tgtatatcct	oggagaaagc	atgagcagta	ttaggtcgaa	atgccccgtc	gaagagtcgg	4800
aagcctccac	accacctagc	acgctgcctt	gcttgtgcat	ccatgccatg	actccagaaa	4860
gagtacagcg	cctaaaagcc	tcacgtccag	aacaaattac	tgtgtgctca	tcctttccat	4920
tgccgaagta	tagaatcact	ggtgtgcaga	agatccaatg	ctcccagcct	atattgttct	4980
caccgaaagt	gcctgcgtat	attcatccaa	ggaagtatct	cgtggaaaca	ccaccggtag	5040
acgagactcc	ggagccatcg	gcagagaacc	aatccacaga	ggggacacct	gaacaaccac	5100
cacttataac	cgaggatgag	accaggacta	gaacgcctga	gccgatcatc	atcgaagagg	5160
aagaagagga	tagcataagt	ttgctgtcag	atggccccgac	ccaccaggtg	ctgcaagtcg	5220
aggcagacat	tcacgggccg	ccctctgtat	ctagctcatc	ctggtccatt	cctcatgcat	5280
ccgactttga	tgtggacagt	ttatccatac	ttgacaccct	ggaggagct	agcgtgacca	5340
gcggggcaac	gtcagccgag	actaactctt	acttcgcaaa	gagtatggag	tttctggcgc	5400
gaccggtgcc	tgcgcctcga	acagtattca	ggaaccctcc	acatcccgtc	ccgcgcacaa	5460
gaacaccgtc	acttgcaccc	agcagggcct	gctcagagaac	cagcctagtt	tccacccccg	5520
caggcgtgaa	tagggtgatc	actagagagg	agctcagagg	gcttaccocg	tcacgcactc	5580
ctagcaggtc	ggtctcagaga	accagcctgg	tctccaacc	gccaggcgta	aatagggtga	5640
ttacaagaga	ggagtttgag	gcgctcgtag	cacaacaaca	atgacggttt	gatgcgggtg	5700
catacatctt	ttcctccgac	accggtcaag	ggcatttaca	acaaaaatca	gtaaggcaaa	5760
cggtgctatc	cgaagtgggtg	ttggagagga	ccgaattgga	gatttcgtat	gccccgcgcc	5820
tcgaccaaga	aaaagaagaa	ttactacgca	agaaattaca	gttaaatccc	acacctgcta	5880
acagaagcag	ataccagtcc	aggaaggtgg	agaacatgaa	agccataaca	gctagacgta	5940
ttctgcaagg	cctagggcat	tatttgaagg	cagaaggaaa	agtggagtgc	taccgaaccc	6000
tgcatcctgt	tcctttgtat	tcactctagt	tgaaccgtgc	cttttcaagc	cccaaggtcg	6060
cagtggaagc	ctgtaacgcc	atggtgaaag	agaactttcc	gactgtggct	tcttactgta	6120
ttattccaga	gtacgatgcc	tatttggaca	tggttgacgg	agcttcatgc	tgcttagaca	6180
ctgccagttt	ttgccctgca	aagctgcgca	gctttccaaa	gaaacactcc	tatttggaac	6240
ccacaatacg	atcggcagtg	ccttcagcga	tccagaacac	gctccagaac	gtcctggcag	6300
ctgccacaaa	aagaaattgc	aatgtcacgc	aatgagaga	attgcccgtc	ttggattcgg	6360
cggcctttaa	tgtggaatgc	ttcaagaaat	atgcgtgtaa	taatgaatat	tgggaaacgt	6420
ttaaagaaaa	ccccatcagg	cttactgaag	aaaacgtggt	aaattacatt	accaaattaa	6480
aaggaccaa	agctgctgct	ctttttgcga	agacacataa	tttgaatatg	ttgcaggaca	6540
taccaatgga	caggtttgta	atggacttaa	agagagacgt	gaaagtgact	ccaggaacaa	6600

ES 2 657 547 T3

aacatactga	agaacggccc	aaggtacagg	tgatccaggc	tgccgatccg	ctagcaacag	6660
cgtatctgtg	cggaatccac	cgagagctgg	ttaggagatt	aatgcggtc	ctgcttccga	6720
acattcatac	actgtttgat	atgtcggctg	aagactttga	cgctattata	gccgagcact	6780
tccagcctgg	ggatttgtgt	ctggaaactg	acatcgcgtc	gtttgataaa	agtgaggacg	6840
acgccatggc	tctgaccgcg	ttaatgattc	tggaagactt	aggtgtggac	gcagagctgt	6900
tgacgctgat	tgaggcggct	ttcggcgaaa	tttcatcaat	acatttgccc	actaaaacta	6960
aatttaaatt	cggagccatg	atgaaatctg	gaatgttcct	cacactgttt	gtgaacacag	7020
tcattaacat	tgtaatcgca	agcagagtgt	tgagagaacg	gctaaccgga	tcaccatgtg	7080
cagcattcat	tggagatgac	aatatcgtga	aaggagtcaa	atcggacaaa	ttaatggcag	7140
acaggtgcgc	cacctggttg	aatatggaag	tcaagattat	agatgctgtg	gtgggcgaga	7200
aagcgcctta	tttctgtgga	gggtttatth	tgtgtgactc	cgtgaccggc	acagcgtgcc	7260
gtgtggcaga	cccctaata	aggctgttta	agcttgga	acctctggca	gcagacgatg	7320
aacatgatga	tgacaggaga	agggcattgc	atgaagagtc	aacacgctgg	aaccgagtgg	7380
gtattctttc	agagctgtgc	aaggcagtag	aatcaaggta	tgaaaccgta	ggaacttcca	7440
tcatagttat	ggccatgact	actctagcta	gcagtgttaa	atcattcagc	tacctgagag	7500
gggcccctat	aactctctac	ggctaacctg	aatggactac	gacatagtct	agtcgacgcc	7560
accatggaac	tgctgatcct	gaaggccaac	gccatcacca	ccatcctgac	cgccgtgacc	7620
ttctgcttcg	ccagcggcca	gaacatcacc	gaggaattct	accagagcac	ctgcagcgcc	7680
gtgagcaagg	gctacctgag	cgccctgctg	accggctggt	acaccagcgt	gatcaccatc	7740
gagctgtcca	acatcaaaga	aaacaagtgc	aacggcaccg	acgccaaggt	gaaactgatc	7800
aagcaggaac	tgacaagta	caagaacgcc	gtgaccgagc	tgacagctgt	gatgcagagc	7860
acccccgcca	ccaacaaccg	ggccagaaga	gagctgcccc	ggttcatgaa	ctacaccctg	7920
aacaacgcca	agaaaaccaa	cgtgaccctg	agcaagaagc	ggaagcggcg	gttctctggc	7980
ttctgctgctg	gcgtgggcag	cgccatcgcc	agcggggtgg	ccgtgtccaa	ggtgctgcac	8040
ctggaaggcg	aggtgaacaa	gatcaagtcc	gccctgctgt	ccaccaacaa	ggccgtggtg	8100
tcctgagca	acggcgtgag	cgtgctgacc	agcaaggtgc	tggatctgaa	gaactacatc	8160
gacaagcagc	tgctgcccac	cgtgaacaag	cagagctgca	gcatcagcaa	catcgagacc	8220
gtgatcgagt	tccagcagaa	gaacaaccgg	ctgctggaaa	tcaccgggga	gttcagcgtg	8280
aacgcccggcg	tgaccacccc	cgtgagcacc	tacatgctga	ccaacagcga	gctgctgtcc	8340
ctgatcaatg	acatgcccac	caccaacgac	cagaaaaagc	tgatgagcaa	caacgtgcag	8400
atcgtgcggc	agcagagcta	ctccatcatg	agcatcatca	aagaagaggt	gctggcctac	8460
gtggtgcagc	tgcccctgta	cggcgtgatc	gacaccccct	gctggaagct	gcacaccagc	8520

cccctgtgca ccaccaaacac caaagagggc agcaacatct gcctgaccog gaccgaccgg 8580  
 ggctggtagt gcgacaacgc cggcagcgtg agcttcttcc cccaagccga gacctgcaag 8640  
 gtgcagagca accgggtggt ctgcgacacc atgaacagcc tgaccctgcc ctccgaggtg 8700  
 aacctgtgca acgtggacat cttcaacccc aagtacgact gcaagatcat gacctccaag 8760  
 accgacgtga gcagctccgt gatcacctcc ctggggcgca tcgtgagctg ctacggcaag 8820  
 accaagtgca ccgccagcaa caagaaccgg ggcatcatca agaccttcag caacggctgc 8880  
 gactacgtga gcaacaaggg cgtggacacc gtgagcgtgg gcaacacact gtactacgtg 8940  
 aataagcagg aaggcaagag cctgtacgtg aagggcgagc ccatcatcaa cttctacgac 9000  
 cccctggtgt tccccagcga cgagttcgac gccagcatca gccaggtaa cgagaagatc 9060  
 aaccagagcc tggccttcat ccggaagagc gacgagctgc tgacacaatgt gaatgcgggc 9120  
 aagagcacca ccaatatcat gatcaccaca atcatcatcg tgatcattgt gatcctgctg 9180  
 tctctgattg ccgtgggcct gctgctgtac tgcaaggccc gcagcaccoc tgtgaccctg 9240  
 tccaaggacc agctgtccgg catcaacaat atcgcccttc ccaactgaag tctagacggc 9300  
 gcgcccaccc agcggccgca tacagcagca attggcaagc tgcttacata gaactcgcgg 9360  
 cgattggcat gccgccttaa aatTTTTatt ttatTTTTct tttcttttcc gaatcggatt 9420  
 ttgtttttaa tatttcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agggtcggca 9480  
 tggcatctcc acctcctcgc ggtccgacct gggcatccga aggaggacgc acgtccactc 9540  
 ggatggctaa gggagagcca cgttttaacc agctccaatt cgcctatag tgagtcgtat 9600  
 tacgcgcgct cactggccgt cgttttacia cgtcgtgact gggaaaacc tggogttacc 9660  
 caacttaatc gccttgacgc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc 9720  
 cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt 9780  
 agcggcgcat taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc 9840  
 agcgccttag cgcgccctcc tttcgcttcc ttccttccct ttctcgccac gttcgccggc 9900  
 tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg 9960  
 cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggoc atcgccctga 10020  
 tagacggttt ttcgcccttt gacgttgag tccacgttct ttaatagtgg actcttgctc 10080  
 caaactggaa caaactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg 10140  
 ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt 10200  
 aacaaaatat taacgcttac aatttaggtg gcacttttcc gggaaatgtg cgcggaacc 10260  
 ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gtcctatgaga caataaccct 10320  
 gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 10380

ES 2 657 547 T3

cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg 10440  
 tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 10500  
 tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca 10560  
 cttttaaagt tctgctatgt gggcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac 10620  
 tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa 10680  
 agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 10740  
 ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 10800  
 ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 10860  
 aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 10920  
 gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 10980  
 tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta 11040  
 ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcaactgggc 11100  
 cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 11160  
 atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt 11220  
 cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 11280  
 ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 11340  
 cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 11400  
 ttctgocggt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt 11460  
 tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 11520  
 taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccaactcaag aactctgtag 11580  
 caccgcctac atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 11640  
 agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaaggcg cagcggtcgg 11700  
 gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac accgaactga 11760  
 gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 11820  
 ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 11880  
 acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttccccacct ctgacttgag cgtcgatttt 11940  
 tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 12000  
 ggttcctggc cttttgctgg cttttgctc acatgttctt tctgctgta tcccctgatt 12060  
 ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc agccgaacga 12120  
 ccgagcgcag cgagtcagtg agcaggaag cggaaagcgc cccaatacgc aaaccgcctc 12180  
 tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag 12240  
 cgggcagtga gcgcaacgca attaagtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt 12300

ES 2 657 547 T3

tacactttat gctcccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 12360  
 caggaaacag ctatgaccat gattacgcca agcgcgcaat taaccctcac taaagggaac 12420  
 aaaagctggg taccgggccc acgcgtaata cgactcaeta tag 12463

<210> 2

<211> 11702

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 2

gcagtcacca aaaaagatct agtgggtgagc gccaaagaaag aaaactgtgc agaaattata 60  
 agggacgtca agaaaatgaa agggctggac gtcaatgccga gaactgtgga ctcaagtctc 120  
 ttgaatggat gcaaacacccc cgtagagacc ctgtatattg acgaagcttt tgcttgtcat 180  
 gcaggtactc tcagagcgct catagccatt ataagaccta aaaaggcagt gctctgcggg 240  
 gatcccaaac agtgccggtt ttttaacatg atgtgcctga aagtgcattt taaccacgag 300  
 atttgcacac aagtcttcca caaaagcacc tctcgccggt gcaactaaatc tgtgacttcg 360  
 gtcgtctcaa ccttgtttta cgacaaaaaa atgagaacga cgaatccgaa agagactaag 420  
 attgtgattg aactaccgg cagtaccaa cctaagcagg acgatctcat tctcacttgt 480  
 ttcagagggt ggggtgaagca gttgcaaata gattacaaag gcaacgaaat aatgacggca 540  
 gctgcctctc aagggctgac ccgtaaaggt gtgtatgccg ttcggtacaa ggtgaatgaa 600  
 aatcctctgt acgcacccac ctccagaacat gtgaacgtcc tactgaccog cacggaggac 660  
 cgcacgtgt ggaaaacact agccggcgac ccatggataa aaactactgac tgccaagtac 720  
 cctgggaatt tcaactgccac gatagaggag tggcaagcag agcatgatgc catcatgagg 780  
 cacatcttgg agagaccgga ccctaccgac gtcttccaga ataaggcaaa cgtgtgttgg 840  
 gccaaaggctt tagtgccggt gctgaagacc gctggcatag acatgaccac tgaacaatgg 900  
 aactactgtg attatthtga aacggacaaa gctcactcag cagagatagt attgaaccaa 960  
 ctatgctgta ggttctttgg actcgatctg gactccggtc tattttctgc acccactgtt 1020  
 ccgttatcca ttaggaataa tcaactggat aactccccgt cgcctaacat gtacgggctg 1080  
 aataaagaag tgggtccgtca gctctctcgc aggtaccac aactgcctcg ggcagttgcc 1140  
 actggaagag tctatgacat gaactactgg aactgcgca attatgatcc ggcataaac 1200  
 ctagtacctg taaacagaag actgcctcat gctttagtcc tccaccataa tgaacacca 1260  
 cagagtgact tttcttcatt cgtcagcaaa ttgaaggcca gaactgtcct ggtggctcggg 1320

10

ES 2 657 547 T3

gaaaagttgt ccgtcccagg caaaatggtt gactggttgt cagaccggcc tgaggctacc 1380  
 ttcagagctc ggctggattt aggcacccca ggtgatgtgc ccaaataatga cataatattt 1440  
 gttaatgtga ggaccccata taaataccat cactatcagc agtgtgaaga ccatgccatt 1500  
 aagcttagca tgttgaccaa gaaagcttgt ctgcatctga atcccggcgg aacctgtgtc 1560  
 agcataggtt atggttacgc tgacagggcc agcgaaagca tcattggtgc tatagcgcgg 1620  
 cagttcaagt tttcccgggt atgcaaaccg aaatcctcac ttgaagagac ggaagttctg 1680  
 tttgtattca ttgggtacga tcgcaaggcc cgtacgcaca atccttaca gctttcatca 1740  
 accttgacca acatttatac aggttccaga ctccacgaag cgggatgtgc accctcatat 1800  
 catgtggtgc gaggggatat tgccacggcc accgaaggag tgattataaa tgctgctaac 1860  
 agcaaaggac aacctggcgg aggggtgtgc ggagcgtgt ataagaaatt cccggaaagc 1920  
 ttcgatttac agccgatcga agtaggaaaa gcgcgactgg tcaaaggtgc agctaaacat 1980  
 atcattcatg ccgtaggacc aaacttcaac aaagtttcgg aggttgaagg tgacaaacag 2040  
 ttggcagagg cttatgagtc catcgctaag attgtcaacg ataacaatta caagtcagta 2100  
 gcgattccac tgttgtccac cggcatcttt tccgggaaca aagatcgact aaccaatca 2160  
 ttgaaccatt tgctgacagc tttagacacc actgatgcag atgtagccat atactgcagg 2220  
 gacaagaaat gggaaatgac tctcaaggaa gcagtggtta ggagagaagc agtggaggag 2280  
 atatgcatat ccgacgactc ttcagtgaca gaacctgatg cagagctggt gaggggtgcat 2340  
 ccgaagagtt ctttggtctg aaggaaggc tacagcaca gcgatggcaa aactttctca 2400  
 tatttggaag ggaccaagtt tcaccaggcg gccaaagata tagcagaaat taatgccatg 2460  
 tggcccgttg caacggaggc caatgagcag gtatgcatgt atatcctcgg agaaagcatg 2520  
 agcagtatta ggtcgaaatg ccccgctcga gagtcggaag cctccacacc acctagcacg 2580  
 ctgccttgct tgtgcatcca tgccatgact ccagaaagag tacagcgcct aaaagcctca 2640  
 cgtccagaac aaattactgt gtgctcatcc tttccattgc cgaagtatag aatcactggt 2700  
 gtgcagaaga tccaatgctc ccagcctata ttgttctcac cgaaagtgcc tgcgtatatt 2760  
 catccaagga agtatctcgt ggaaacacca ccggtagacg agactccgga gccatcggca 2820  
 gagaaccaat ccacagaggg gacacctgaa caaccaccac ttataaccga ggatgagacc 2880  
 aggactagaa cgcctgagcc gatcatcatc gaagaggaag aagaggatag cataagtttg 2940  
 ctgtcagatg gcccgacca ccaggtgctg caagtgcagg cagacattca cgggcccgcc 3000  
 tctgtatcta gctcatcctg gtccattcct catgcatccg actttgatgt ggacagttta 3060  
 tccatacttg acaccctgga gggagctagc gtgaccagcg gggcaacgtc agccgagact 3120  
 aactcttact tcgcaaagag tatggagttt ctggcgcgac cgggtgcctgc gcctcgaaca 3180  
 gtattcagga accctccaca tcccgtccg cgcacaagaa caccgtcact tgcaccagc 3240



ES 2 657 547 T3

agggcctgct	cgagaaccag	cctagtttcc	accccgccag	gogtgaatag	ggtgatcact	3300
agagaggagc	togaggcgct	taccccgctca	cgcactccta	gcaggtcggt	ctcgagaacc	3360
agcctggtct	ccaacccgcc	aggcgtaaat	agggtgatta	caagagagga	gtttgaggcg	3420
ttcgtagcac	aacaacaatg	acggtttgat	gcgggtgcat	acatcttttc	ctccgacacc	3480
ggtcaagggc	atttacaaca	aaaatcagta	aggcaaacgg	tgctatccga	agtgggtgtg	3540
gagaggaccg	aattggagat	ttcgtatgcc	cogcgcctcg	accaagaaaa	agaagaatta	3600
ctacgcaaga	aattacagtt	aaatcccaca	cctgctaaca	gaagcagata	ccagtccagg	3660
aaggtggaga	acatgaaagc	cataacagct	agacgtattc	tgcaaggcct	agggcattat	3720
ttgaaggcag	aaggaaaagt	ggagtgctac	cgaaccctgc	atcctgttcc	tttgtattca	3780
tctagtgtga	accgtgcctt	ttcaagcccc	aaggtcgcag	tggaagcctg	taacgccatg	3840
ttgaaagaga	actttccgac	tgtggcttct	tactgtatta	ttccagagta	cgatgcctat	3900
ttggacatgg	ttgacggagc	ttcatgctgc	ttagacactg	ccagtttttg	ccctgcaaag	3960
ctgocgagct	ttccaaagaa	acactcctat	ttggaacca	caatacgatc	ggcagtgctt	4020
tcagcgatcc	agaacacgct	ccagaacgtc	ctggcagctg	ccacaaaaag	aaattgcaat	4080
gtcacgcaaa	tgagagaatt	gcccgtattg	gattcggcgg	cctttaatgt	ggaatgcttc	4140
aagaaatag	cgtgtaataa	tgaatattgg	gaaacgttta	aagaaaacc	catcaggctt	4200
actgaagaaa	acgtggtaaa	ttacattacc	aaattaanaag	gaccaaaaagc	tgctgctctt	4260
tttgcaaga	cacataattt	gaatatgttg	caggacatac	caatggacag	gtttgtaatg	4320
gacttaaaga	gagacgtgaa	agtgactcca	ggaacaaaac	atactgaaga	acggcccaag	4380
gtacaggtga	tccaggtgct	cgatccgcta	gcaacagcgt	atctgtgctg	aatccaccga	4440
gagctggtta	ggagattaaa	tgccgtcctg	cttccgaaca	ttcatacact	gtttgatatg	4500
tcggctgaag	actttgacgc	tattatagcc	gagcacttcc	agcctgggga	ttgtgttctg	4560
gaaactgaca	tcgctcgtt	tgataaaaagt	gaggacgacg	ccatggctct	gaccgcgtta	4620
atgattctgg	aagacttagg	tgtggacgca	gagctgttga	cgctgattga	ggcggctttc	4680
ggcgaaattt	catcaataca	tttgcccact	aaaactaat	ttaaattcgg	agccatgatg	4740
aaatctggaa	tgttcctcac	actgtttgtg	aacacagtca	ttaacattgt	aatcgcaagc	4800
agagtgttga	gagaacggct	aaccggatca	ccatgtgcag	cattcattgg	agatgacaat	4860
atcgtgaaa	gagtcaaatc	ggacaaatta	atggcagaca	ggtgcgccac	ctggttgaat	4920
atggaagtca	agattataga	tgctgtggtg	ggcgagaaa	cgcttattt	ctgtggaggg	4980
tttattttgt	gtgactccgt	gaccggcaca	gcgtgccgtg	tgccagaccc	cctaaaaag	5040
ctgtttaagc	ttggcaaacc	tctggcagca	gacgatgaac	atgatgatga	caggagaagg	5100

gcattgcatg aagagtcaac acgctggaac cgagtgggta ttctttcaga gctgtgcaag 5160  
gcagtagaat caaggtatga aaccgtagga acttccatca tagttatggc catgactact 5220  
ctagctagca gtgttaaate attcagctac ctgagagggg cccctataac tctctacggc 5280  
taacctgaat ggactacgac atagtctagt cgacgccacc atggaactgc tgatcctgaa 5340  
ggccaacgcc atcaccacca tcttgaccgc cgtgaccttc tgcttcgcca gcggccagaa 5400  
catcacggag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg agcaagggct acctgagcgc 5460  
cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag ctgtccaaca tcaaagaaaa 5520  
caagtgaac ggcaaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag caggaactgg acaagtacaa 5580  
gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc cccgccacca acaaccgggc 5640  
cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac aacgccaaaga aaaccaacgt 5700  
gaccctgagc aagaagcggg agcggcgggag cgccatcgcc agcgggggtgg ccgtgtccaa 5760  
ggtgctgcac ctggaaggcg aggtgaacaa gatcaagtcc gccctgctgt ccaccaacaa 5820  
ggcctggtg tccctgagca acggcgtgag cgtgctgacc agcaaggtgc tggatctgaa 5880  
gaactacatc gacaagcagc tgctgccccat cgtgaacaag cagagctgca gcatcagcaa 5940  
catcgagacc gtgatcgagt tccagcagaa gaacaaccgg ctgctggaaa tcaaccggga 6000  
gttcagcgtg aacgccggcg tgaccacccc cgtgagcacc tacatgctga ccaacagcga 6060  
gctgctgtcc ctgatcaatg acatgccccat caccaacgac cagaaaaagc tgatgagcaa 6120  
caacgtgcag atcgtgcggc agcagagcta ctccatcatg agcatcatca aagaagagggt 6180  
gctggcctac gtggtgcagc tgccccctgta cggcgtgato gacaccccct gctggaagct 6240  
gcacaccagc cccctgtgca ccaccaacac caaagagggc agcaacatct gcctgaccgg 6300  
gaccgaccgg ggctggtact gcgacaacgc cggcagcgtg agcttcttcc cccaagccga 6360  
gacctgcaag gtgcagagca accgggtggt ctgcgacacc atgaacagcc tgaccctgcc 6420  
ctccgaggtg aacctgtgca acgtggacat cttcaacccc aagtacgact gcaagatcat 6480  
gacctccaag accgacgtga gcagctcogt gatcacctcc ctggggcgca togtgagctg 6540  
ctacggcaag accaagtgca ccgccagcaa caagaaccgg ggcatcatca agaccttcag 6600  
caacggctgc gactacgtga gcaacaaggg cgtggacacc gtgagcgtgg gcaacacact 6660  
gtactacgtg aataagcagg aaggcaagag cctgtacgtg aagggcgagc ccatcatcaa 6720  
cttctacgac cccctggtgt tccccagcga cgagttcgac gccagcatca gccaggtcaa 6780  
cgagaagatc aaccagagcc tggccttcat ccggaagtcc gacgagctgc tgcacaatgt 6840  
gaatgccggc aagagcacca ccaatatcat gatcaccaca atcatcatcg tgatcattgt 6900  
gatcctgctg tctctgattg ccgtgggcct gctgctgtac tgcaaggccc gcagcacccc 6960  
tgtgaccctg tccaaggacc agctgtcgg catcaacaat atgccttct ccaactgaag 7020

ES 2 657 547 T3

tctagacggc	gogcccaccc	agcggccgca	tacagcagca	attggcaagc	tgcttacata	7080
gaactcggcg	cgattggcat	gocgccttaa	aatttttatt	ttatttttct	tttcttttcc	7140
gaatcggatt	ttgtttttaa	tatttcaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	7200
aaaaaagaag	agcgttttaa	cacgtgatat	ctggcctcat	gggccttctt	ttcactgccc	7260
gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaac	atggatcatag	ctgtttcctt	7320
gcgtattggg	cgctctccgc	ttcctcgcgc	actgactcgc	tgcgctcggg	cgttcgggta	7380
aagcctgggg	tgccaatga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	7440
cgttgctggc	gtttttccat	aggetccgcc	ccccgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	7500
caagtcaag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	7560
gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgacct	tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc	7620
tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gtcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	7680
aggctcgttc	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	7740
ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	7800
cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggtatgt	aggcgggtgt	acagagttct	7860
tgaagtgggt	gcctaactac	ggctacacta	gaagaacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	7920
tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	7980
ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gocgagaaaa	aaaggatctc	8040
aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	8100
aagggatttt	ggtcatgaat	acacggtgcc	tgactgcggt	agcaatttaa	ctgtgataaa	8160
ctaccgcatt	aaagcttata	gatgataagc	tgtaaacat	gagaattctt	agaaaaactc	8220
atcgagcadc	aatgaaaact	gcaatttatt	catatcagga	ttatcaatac	catatttttg	8280
aaaaagccgt	ttctgtaatg	aaggagaaaa	ctcaccgagg	cagttccata	ggatggcaag	8340
atcctggtat	cggtctgcga	ttccgactcg	tccaacatca	atacaacct	ttaatttccc	8400
ctcgtcaaaa	ataaggttat	caagtgagaa	atcaccatga	gtgacgactg	aatccggtga	8460
gaatggcaaa	agcttatgca	tttctttcca	gacttgttca	acaggccagc	cattacgctc	8520
gtcatcaaaa	tcactcgcac	caaccaaacc	gttattcatt	cgtgattgcg	cctgagcgag	8580
acgaaatagc	cgatcgcgtg	taaaaggaca	attacaaaca	ggaatcgaat	gcaaccggcg	8640
caggaacact	gccagcgcac	caacaatatt	ttcacctgaa	tcaggatatt	cttctaatac	8700
ctggaatgct	gttttcccg	ggatcgcagt	ggtgagtaac	catgcatcat	caggagtacg	8760
gataaaatgc	ttgatggtcg	gaagaggcat	aaattccgtc	agccagttta	gtctgacat	8820
ctcatctgta	acatcattgg	caacgctacc	tttgccatgt	ttcagaaaca	actctggcgc	8880

ES 2 657 547 T3

atcgggcttc	ccatacaatc	gatagattgt	cgcacctgat	tgcccgacat	tatcgcgagc	8940
ccatttatac	ccatataaat	cagcatccat	gttggaaattt	aatcgcggcc	tcgagcaaga	9000
cgtttcccgt	tgaatatggc	tcataacacc	ccttgtatta	ctgtttatgt	aagcagacag	9060
ttttattggt	catgagcggg	tacatatttg	aatgtattta	gaaaaataaa	caaatagggg	9120
ttccgcgcac	atttccccga	aaagtgccac	ctaaattgta	agcgttaata	ttttgttaaa	9180
attcgcgtta	aatttttggt	aaatcagctc	atthtttaac	caataggccg	aaatcggcaa	9240
aatcccttat	aatcaaaaag	aatagaccga	gatagggttg	agtggccgct	acagggcgct	9300
cccattcgcc	attcaggctg	cgcaactggt	gggaagggcg	tttcgggtgcg	ggcctcttcg	9360
ctattaogcc	agctggcgaa	agggggatgt	gctgcaaggc	gattaagttg	ggtaacgcca	9420
gggttttccc	agtcacacgc	gtaatacgc	tcactataga	taggcggcgc	atgagagaag	9480
cccagaccaa	ttacctacc	aaaatggaga	aagttcacgt	tgacatcgag	gaagacagcc	9540
cattcctcag	agctttgcag	cggagcttcc	cgcagtttga	ggtagaagcc	aagcaggtca	9600
ctgataatga	ccatgcta	gccagagcgt	tttcgcactc	ggcttcaaaa	ctgatcgaaa	9660
cggagggtgga	cccatccgac	acgatccttg	acattggaag	tgcccccgcc	cgcagaatgt	9720
attctaagca	caagtatcat	tgtatctgtc	cgatgagatg	tgccggaagat	cggacagat	9780
tgtataagta	tgcaactaag	ctgaagaaaa	actgtaagga	aataactgat	aaggaattgg	9840
acaagaaaat	gaaggagctc	gccgcctca	tgagcgaccc	tgacctggaa	actgagacta	9900
tgtgcctcca	cgacgacgag	tcgtgtcgct	acgaagggca	agtcgctgtt	taccaggatg	9960
tatacgcggt	tgacggaccg	acaagtctct	atcaccaagc	caataagggg	gttagagtgc	10020
cctactggat	aggctttgac	accaccctt	ttatgtttaa	gaacttggct	ggagcatatc	10080
catcactc	taccaactgg	gccgacgaaa	ccgtgttaac	ggctcgtaac	ataggcctat	10140
gcagctctga	cgttatggag	cggtcacgta	gagggatgtc	cattcttaga	aagaagtatt	10200
tgaaaccatc	caacaatggt	ctattctctg	ttggctcgac	catctaccac	gagaagaggg	10260
acttactgag	gagctggcac	ctgccgtctg	tatttcactt	acgtggcaag	caaaattaca	10320
catgtcgggt	tgagactata	gttagttgcg	acgggtacgt	cgtaaaaga	atagctatca	10380
gtccaggcct	gtatgggaag	ccttcaggct	atgctgctac	gatgcaccgc	gaggattct	10440
tgtgctgcaa	agtgcagac	acattgaacg	gggagaggg	ctcttttccc	gtgtgcacgt	10500
atgtgccagc	tacattgtgt	gaccaaata	ctggcact	ggcaacagat	gtcagtgcgg	10560
acgacgcgca	aaaactgctg	gttgggctca	accagcgtat	agtcgtcaac	ggcgcaccc	10620
agagaaacac	caataccatg	aaaaattacc	ttttgcccg	agtggcccag	gcatttgcta	10680
gggtgggcaa	ggaatataag	gaagatcaag	aagatgaaag	gccactagga	ctacgagata	10740
gacagttagt	catggggtgt	tgttgggctt	ttagaaggca	caagataaca	tctatttata	10800

ES 2 657 547 T3

```

agcgcccgga tacccaaacc atcatcaaag tgaacagoga tttccactca ttcgtgctgc 10860
ccaggatagg cagtaacaca ttggagatcg ggctgagaac aagaatcagg aaaatgtag 10920
aggagcacia ggagccgtca cctctcatta ccgccgagga cgtacaagaa gctaagtgcg 10980
cagccgatga ggctaaggag gtgcgtgaag ccgaggagtt gcgcgcagct ctaccacctt 11040
tggcagctga tgttgaggag cccactctgg aagccgatgt agacttgatg ttacaagagg 11100
ctggggccgg ctcagtggag acacctcgtg gcttgataaa ggttaccagc tacgatggcg 11160
aggacaagat cggctcttac gctgtgcttt ctccgcaggc tgtactcaag agtgaaaaat 11220
tatcttgcac ccaccctctc gctgaacaag tcatagtgat aacacactct ggccgaaaag 11280
ggcgttatgc cgtggaacca taccatggta aagtagtggg gccagagggg catgcaatac 11340
ccgtccagga ctttcaagct ctgagtgaaa gtgccaccat tgtgtacaac gaacgtgagt 11400
tcgtaaacag gtacctgcac catattgcca cacatggagg agcgctgaac actgatgaag 11460
aatattacia aactgtcaag cccagcgagc acgacggcga atacctgtac gacatcgaca 11520
ggaaacagtg cgtcaagaaa gaactagtca ctgggctagg gctcacaggc gagctggtgg 11580
atcctccctt ccatgaattc gcctacgaga gtctgagaac acgaccagcc gctccttacc 11640
aagtaccaac cataggggtg tatggcgtgc caggatcagg caagtctggc atcattaana 11700
gc 11702

```

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

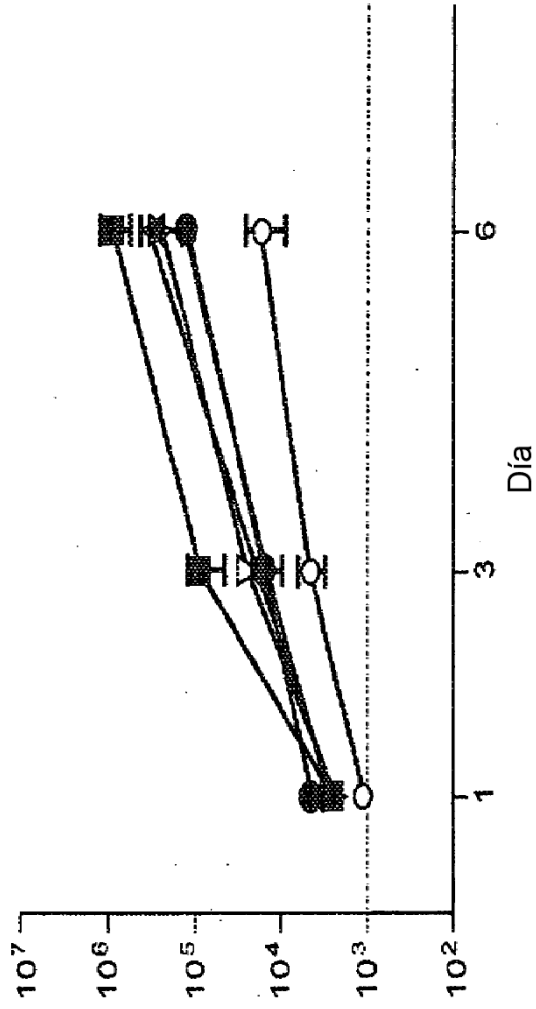
<400> 3

10 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 30

## REIVINDICACIONES

1. Una emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica que comprende partículas en emulsión que contienen un núcleo de aceite que está en fase líquida a 25°C y un lípido catiónico, y una molécula de ácido nucleico que forma complejos con las partículas en emulsión, en la que el lípido catiónico es DOTAP, DOTMA, DOEPC, DSTAP, DODAC o DODAP, y la concentración del lípido catiónico en la emulsión aceite en agua es desde 1,6 mg/ml hasta 25 mg/ml, en la que la molécula de ácido nucleico es un ARN autorreplicante que codifica un antígeno, y en la que el diámetro promedio de las partículas en emulsión es desde 80 nm hasta 180 nm y la N/P de la emulsión es al menos 4:1, en la que N/P se refiere a la cantidad en moles de átomos de nitrógeno protonables en el lípido catiónico dividido por la cantidad en moles de fosfatos en la molécula de ARN; con la condición de que la molécula de ácido nucleico no codifique la fosfatasa alcalina secretada, y la condición adicional de que la molécula de ácido nucleico no sea un ARN codificado por el plásmido A317, cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO:1.
2. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de la reivindicación 1, en la que se tampona la emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica, y tiene un pH desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0, por ejemplo en la que el tampón es un tampón de citrato, un tampón de succinato, un tampón de acetato, o una combinación de los mismos.
3. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de la reivindicación 1 o 2, en la que la emulsión comprende además una sal inorgánica, opcionalmente en la que la concentración de sal inorgánica no es mayor de 30 mM.
4. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la emulsión comprende además un agente tonificante no iónico, por ejemplo en la que el agente tonificante no iónico es un azúcar, un alcohol de azúcar, o una combinación de los mismos, por ejemplo sacarosa, trehalosa, sorbitol, dextrosa, o una combinación de los mismos.
5. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la emulsión comprende además un polímero en la fase acuosa, por ejemplo en la que el polímero es un poloxámero, opcionalmente en el que la emulsión contiene aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 20 % (p/v) de polímero.
6. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que: (i) el diámetro promedio de las partículas en emulsión es desde 80 nm hasta 130 nm; y/o (ii) la relación de N/P de la emulsión es desde 4:1 hasta 20:1, por ejemplo en la que la relación de N/P de la emulsión es desde 4:1 hasta 15:1; y/o (iii) la emulsión es isotónica.
7. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el núcleo de aceite comprende un aceite que se selecciona del grupo que consiste de: aceite de Ricino, aceite de Coco, aceite de Maíz, aceite de semilla de Algodón, aceite de Onagra, aceite de Pescado, aceite de Jojoba, aceite de Manteca de cerdo, aceite de Linaza, aceite de Oliva, aceite de Cacahuete, aceite de Cártamo, aceite de Sésamo, aceite de Soja, Escualeno, Escualano, aceite de Girasol, aceite de Germen de trigo, y combinaciones de los mismos.
8. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el lípido catiónico comprende una amina cuaternaria, por ejemplo en la que el lípido catiónico es DOTAP.
9. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la partícula comprende además un tensioactivo, tal como un tensioactivo no iónico, por ejemplo en la que el tensioactivo es trioleato de sorbitán (SPAN85), polisorbato 80 (Tween 80), o una combinación de los mismos.
10. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la emulsión comprende además un antioxidante.
11. Un procedimiento para elaborar una emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica como según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende proporcionar (i) una emulsión aceite en agua catiónica que contiene partículas en emulsión que contienen un núcleo de aceite y un lípido catiónico, y (ii) una solución acuosa que contiene un ácido nucleico, y combinar (i) y (ii) elaborar de esta manera dicha emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica.
12. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en medicina.
13. La emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de dicha emulsión aceite en agua catiónica inmunogénica.

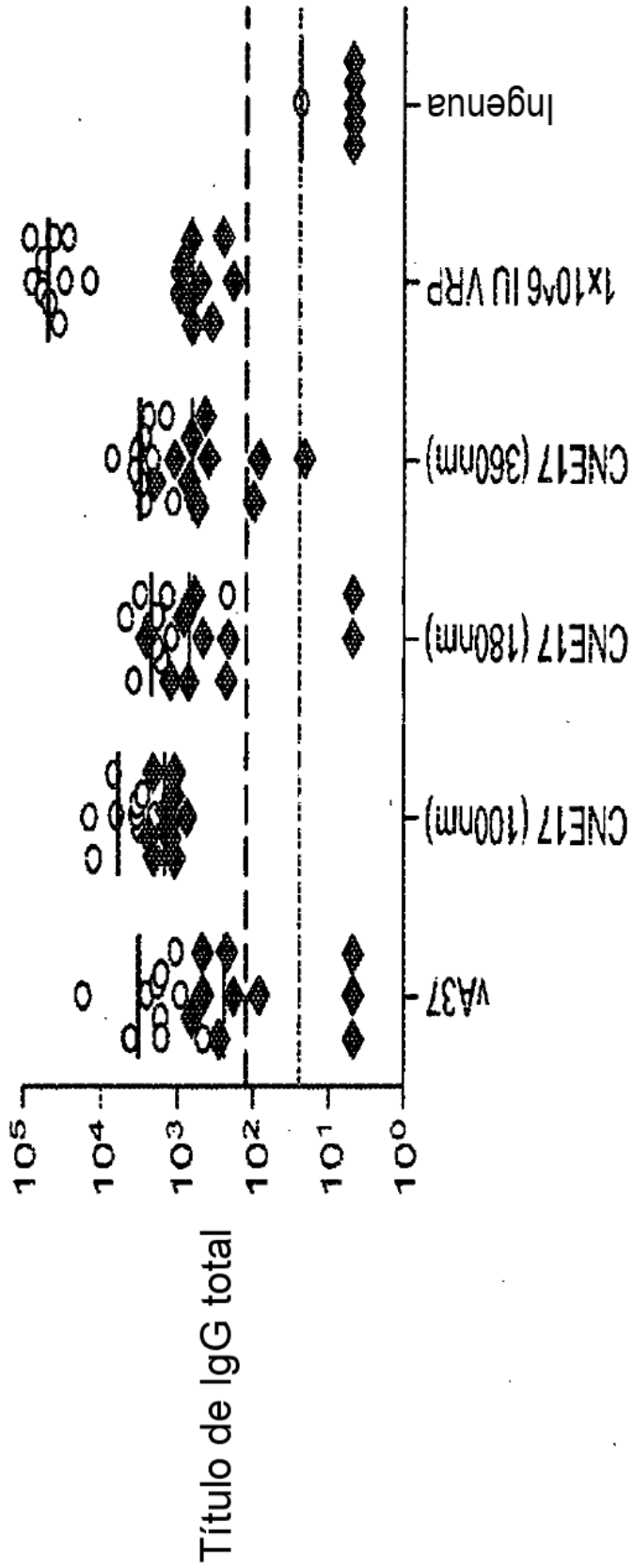
**FIG. 1A**  
**1 µg VA306 + CNE17 (10:1 N/P)**  
 10<sup>-1062</sup> SEAP 19



Expresión de SEAP (RLU)

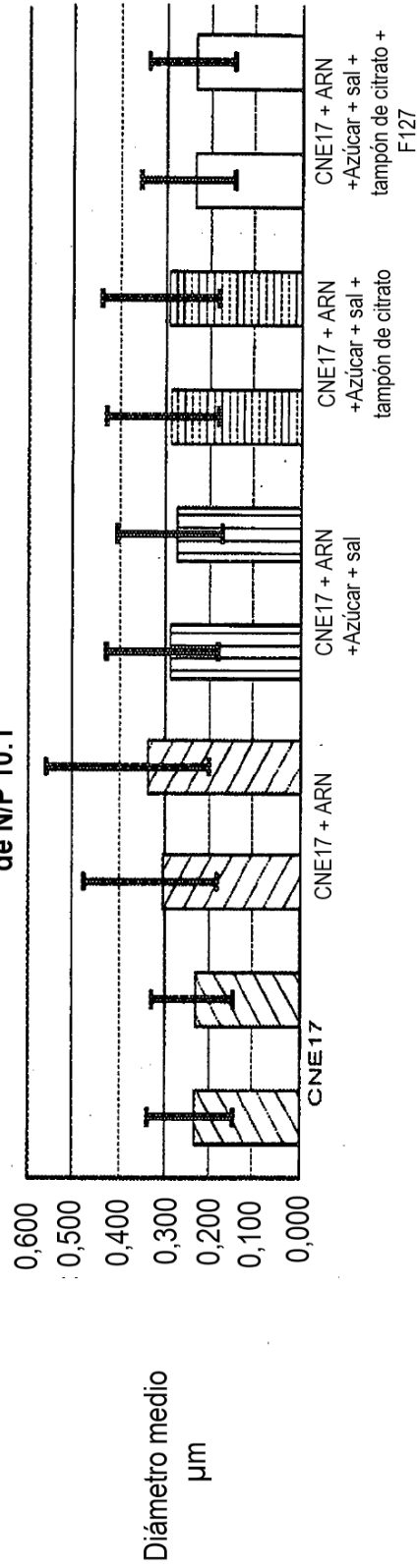
- Desnudo 1 µg VA306
- 100nm
- ▲ 140nm
- ▽ 180nm
- ◆ 360nm
- 1 µm

**FIG. 1B**  
Estudio de ARN 10-1069 PLG/CNE RSV-F  
Títulos de IgG totales 2wp1/2wp2

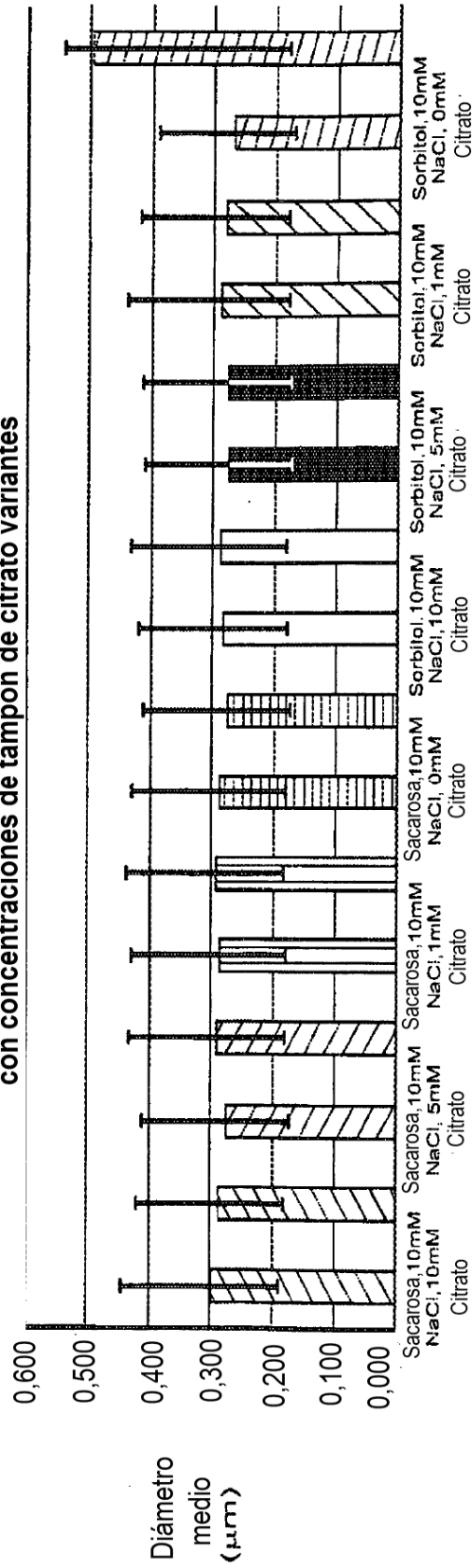




**FIG. 2A**  
**Tamaños de partícula Horiba de CNE 17 en relaciones**  
**de N/P 10:1**



**FIG. 2B**  
**Tamaños de partícula Horiba de CNE 17 con soluciones tampón de sacarosa y sorbitol con concentraciones de tampón de citrato variantes**



**FIG. 2C**  
 Tamaños de partícula Horiba de CNE 17 con sacarosa 280 mM,  
 NaCl 10 mM, Citrato 1 mM y excipientes de polímero

