

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 498**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012 PCT/US2012/053391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13033563**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012 E 12769787 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2750707**

54 Título: **Liposomas pegilados para administración de ARN que codifica inmunógeno**

30 Prioridad:

31.08.2011 US 201161529878 P

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

25.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GEALL, ANDREW y
VERMA, AYUSH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 705 498 T3

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

DESCRIPCIÓN

Liposomas pegilados para administración de ARN que codifica inmunógeno

Campo de la invención

El presente documento invención está en el campo de la administración no vírica de ARN para inmunización.

5 **Antecedentes de la invención**

La administración de ácidos nucleicos para inmunizar animales ha sido un objetivo durante varios años. Se han probado varias estrategias, que incluyen el uso de ADN o ARN, de vehículos de administración vírica o no vírica (o incluso vehículo de no administración, en una vacuna "desnuda"), de vectores replicantes o no replicantes, o de vectores víricos o no víricos. Amidi y col., Syst. Synth. Biol. (2011) 5:21-31 desvela liposomas inmunoestimuladores que expresan antígeno que se preparan a partir de DSPE-PEG5000. El documento WO 2011/08974 y el documento WO 2010/088537 desvelan liposomas que comprenden ARN en los que los liposomas contienen PEG2000.

Permanece la necesidad de vacunas adicionales y mejoradas de ácido nucleico, y en particular, de maneras mejoradas de administración vacunas de ácido nucleico.

Breve descripción de la invención

15 El ámbito de la invención se define mediante las reivindicaciones. De acuerdo con la invención, se logra inmunización de ácido nucleico al administrar ARN encapsulado dentro de un liposoma. El ARN codifica un inmunógeno de interés. El liposoma incluye un lípido PEGilado es decir, el lípido se modifica por unión covalente de un polietilenglicol. El PEG proporciona liposomas con un recubrimiento que puede conferir características farmacocinéticas favorables, por ejemplo, puede incrementar la estabilidad e impedir la adsorción no específica de los liposomas. Los inventores han descubierto que la longitud del PEG puede afectar a la expresión *in vivo* del ARN encapsulado y de este modo la invención usa liposomas que comprenden PEG que tiene una masa molecular promedio por encima de 3 kDa pero menos de 11kDa. El PEG con un peso molecular por debajo de 1 kDa (por ejemplo, 500 o 750 Da) no forma liposomas estables, y los liposomas formados con PEG en el intervalo de 1-3 kDa han mostrado menor eficiencia en experimentos de inmunogenicidad (véase a continuación).

25 Por lo tanto, la invención proporciona un liposoma dentro del cual se encapsula el ARN que codifica un inmunógeno de interés, en el que el liposoma comprende al menos un lípido que incluye una porción de polietilenglicol, de manera que el polietilenglicol está presente en el exterior del liposoma, en el que la masa molecular promedio del polietilenglicol está por encima de 3 kDa pero es menos de 11 kDa. Estos liposomas son adecuados para la administración *in vivo* del ARN a una célula de vertebrado y de este modo son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para inmunizar sujetos frente a diversas enfermedades.

30 Se desvela un procedimiento para preparar un liposoma que contiene ARN, que comprende una etapa de mezclar ARN con uno o más lípidos, en condiciones tales que los lípidos formen un liposoma en el cual se encapsula el ARN, en el que por lo menos un lípido incluye una porción de polietilenglicol que llega a estar localizada en el exterior del liposoma durante el procedimiento, y en el que la masa molecular promedio del polietilenglicol está por encima de 3 kDa pero es menos de 11 kDa.

El liposoma

La invención utiliza liposomas dentro de los cuales se encapsula ARN que codifica un inmunógeno. Por lo tanto, el ARN está separado (como en un virus natural), de cualquier medio externo. Se ha descubierto que la encapsulación dentro del liposoma protege al ARN de la digestión por RNasa. Los liposomas pueden incluir algo del ARN externo (por ejemplo, en su superficie), pero al menos la mitad del ARN (e idealmente todo) se encapsula en el núcleo del liposoma. La encapsulación dentro de los liposomas es distinta de, por ejemplo, los complejos de lípido/ARN desvelados en la referencia 1, en la que el ARN se mezcla con liposomas preformados.

45 Diversos lípidos anfífilos pueden formar bicapas en un ambiente acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo cabezal hidrófilo aniónico, catiónico o zwitteriónico. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos se remonta a la década de 1960, y los lípidos formadores de liposomas catiónicos se han estudiado desde la década de 1990. Algunos fosfolípidos son aniónicos, en tanto que otros son zwitteriónicos y otros son catiónicos. Las clases adecuadas de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, y fosfatidilgliceroles, y algunos fosfolípidos útiles se enumeran en la tabla 1.

50 Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero no se limitan a, dioleoil-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-disteariloxi-N,N- dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-dilineniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA); los lípidos catiónicos útiles adicionales se desvelan en las referencias 2 y 3. Los lípidos zwitteriónicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos zwitteriónicos de acilo y lípidos zwitteriónicos de éter. Los ejemplos de lípidos de zwitteriónicos

útiles son DPPC, DSPC, DOPC, dodecilsfosfolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), y 1,2-difitanoi-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE). Los lípidos pueden estar saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido insaturado para preparar liposomas. Si un lípido insaturado tiene dos extremidades, ambas extremidades pueden estar insaturadas, o puede tener una extremidad saturada y una extremidad insaturada. Un lípido puede incluir un grupo esteroide en una extremidad por ejemplo, como en RV05.

Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un liposoma que tiene una bicapa de lípido que encapsula un núcleo acuoso, en el que: (i) la bicapa de lípido comprende al menos un lípido que incluye una porción de polietilenglicol, tal que el polietilenglicol está presente en el exterior del liposoma, en el que la masa molecular promedio del polietilenglicol está por encima de 3 kDa pero es menos de 11 kDa; y (ii) el núcleo acuoso incluye un ARN que codifica un inmunógeno.

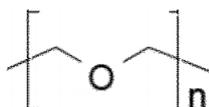
Los liposomas se pueden formar a partir de un lípido individual o de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos (ii) una mezcla de lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos zwitteriónicos; (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos, (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos zwitteriónicos, (vi) una mezcla de lípidos de zwitteriónicos y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos zwitteriónicos. De manera similar, una mezcla puede comprender tanto lípidos saturados como insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (zwitteriónico, saturado), DlinDMA (catiónico, insaturado), y/o DMG (aniónico, saturado). Cuando se usa una mezcla de lípidos, no todos los lípidos componentes en la mezcla necesitan ser anfífilicos, por ejemplo, se pueden mezclar uno o más lípidos anfífilicos con colesterol.

Cuando un liposoma de la invención se forma a partir de una mezcla de lípidos, se prefiere que la proporción de estos lípidos que están PEGilados como se describe en el presente documento sea menos del 10 % de la cantidad total de lípidos, por ejemplo, entre el 0,5-5 %, entre el 1-4 %, o aproximadamente 2 %. Por ejemplo, los liposomas útiles se muestran posteriormente en los cuales el 2 % del lípido total es un PEG-DMG. El resto se puede hacer de por ejemplo, colesterol (por ejemplo, el 35-50 % de colesterol) y/o lípido catiónico (por ejemplo, el 30-70 %) y/o DSPC (por ejemplo, el 5-15 %). Estas mezclas se usan posteriormente. Estos valores de porcentaje son porcentajes en mol.

Por lo tanto, se puede formar un liposoma a partir de un lípido catiónico (por ejemplo DlinDMA, RV05), un lípido zwitteriónico (por ejemplo, DSPC, DPyPE), un colesterol, y un lípido PEGilado. Se usa en los ejemplos una mezcla de DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol, así como varias mezclas adicionales.

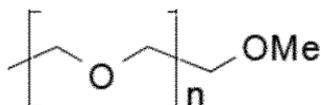
Al menos un lípido dentro del liposoma incluye una porción de polietilenglicol. Los liposomas que incluyen estos lípidos PEGilados tendrán el PEG orientado de modo que está presente en al menos el exterior del liposoma (pero algo del PEG también puede estar expuesto al interior del liposoma, es decir, el núcleo acuoso). Esta orientación se puede lograr al unir el PEG a una parte apropiada del lípido. Por ejemplo, en un lípido anfílico, el PEG se unirá a la cabeza hidrófila, puesto que es esta cabeza, la que se orienta por sí mismo al exterior que da a lo acuoso de la bicapa de lípido. La PEGilación de esta manera se puede lograr por unión covalente de un PEG a un lípido por ejemplo, usando técnicas tales como las descritas en la referencias 1 y 2.

De esta manera, los lípidos PEGilados comprenderán la estructura de PEG:

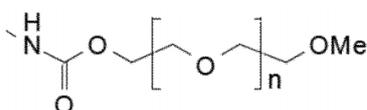


en el que n proporciona un peso molecular para el PEG por encima de 3 kDa pero menos de 11 kDa por ejemplo, 69 o más, o entre 70 y 240, o aproximadamente 113 para una PEGilación de 5 kDa.

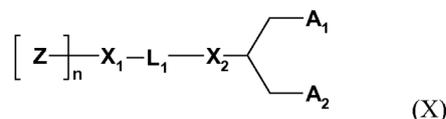
La porción de PEG puede terminar con un grupo -O-metilo, y de este modo un lípido PEGilado puede comprender:



Incluyendo la unión a un nitrógeno en un grupo de la cabeza del lípido, por lo tanto, un lípido PEGilado útil con la invención puede comprender:



Un lípido PEGilado adecuado para el uso con la invención es PEG-DMG, tal como se usa en los ejemplos. Se pueden usar otros lípidos PEGilados, por ejemplo, lípidos de la fórmula (X):



en la que:

- 5 [Z]_n es un componente de grupo hidrófilo de la cabeza de PEG en el que el polímero puede ser lineal o ramificado, y en el que el polímero se puede sustituir de manera opcional;;
 Z se polimeriza por n subunidades;
 n es un grado promedio en número de polimerización entre 10 y 200 unidades de Z (y se puede optimizar para diferentes grupos Z);
- 10 L₁ es un enlazador de alquileo C₁₋₁₀ o heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que incluye cero, uno o dos de un éter (por ejemplo, -O-), éster (por ejemplo, -C(O)O-), succinato (por ejemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por ejemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por ejemplo, -OC(O)O-), urea (por ejemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por ejemplo, -NR'-), amida (por ejemplo, -C(O)NR'-), imina (por ejemplo, -C(NR'-)-), tioéter (por ejemplo, -S-), xantano (por ejemplo, -OC(S)S-) y fosfodíéster (por ejemplo, -OP(O)₂O-), en el que R' se selecciona independientemente de -H, -NH-, -NH₂-, -O-, -S-, un fosfato o un alquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido;
- 15 X₁ y X₂ se seleccionan independientemente de un carbono o un heteroátomo seleccionado de -NH-, -O-, -S- o un fosfato;
 A₁ y A₂ se seleccionan cualquiera independiente de un alquilo C₆₋₃₀, alqueno C₆₋₃₀, y alquilo C₆₋₃₀, en el que A₁ y A₂ pueden ser el mismo o diferente, o A₁ y A₂ conjuntamente con el átomo de carbono al cual se unen forman un esteroide opcionalmente sustituido.
- 20

Un liposoma de la invención incluirá típicamente un gran número de porciones PEG, que pueden ser las mismas o diferentes. La masa molecular promedio del PEG en un liposoma de la invención está por encima de 3 kDa pero es menos de 11 kDa por ejemplo, entre 3,5-9 kDa, entre 4-7,5 kDa, entre 4,5-6 kDa, entre 4,8-5,5 kDa, o 5 kDa. De esta manera, el PEG puede ser un PEG que se conoce comúnmente como "PEG 5000" o "PEG 5K". En algunas realizaciones la invención no abarca liposomas que comprenden un lípido conjugado con PEG en el cual el PEG tiene una masa molecular promedio de 8 kDa; en algunas realizaciones la invención no abarca liposomas que comprenden un lípido conjugado con PEG en el cual el PEG tiene una masa molecular promedio de entre 7,9-8,1 kDa.

25

El PEG comprenderá usualmente cadenas lineales de polímero, pero, en algunas realizaciones, el PEG puede comprender cadenas ramificadas de polímero.

30

En algunas realizaciones, el PEG puede ser un PEG sustituido, por ejemplo en el cual uno o más átomos de carbono en el polímero estén sustituidos por uno o más grupos alquilo, alcoxi, acilo o arilo.

En algunas realizaciones, el PEG puede incluir grupos de copolímero, por ejemplo, uno o más monómeros de propileno, para formar un polímero de PEG-polipropileno.

35 Normalmente, los liposomas se dividen en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares pequeñas (SUV); y vesículas unilaminares grandes (LUV). Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, formando varios compartimentos acuosos separados. Las SUV y LUV tienen una bicapa individual que encapsula un núcleo acuoso; las SUV tienen típicamente un diámetro de ≤50 nm, y las LUV tienen un diámetro >50 nm. Los liposomas de la invención son idealmente LUV con un diámetro en el intervalo de 60-180 nm, y de manera preferente en el intervalo de 80-160 nm.

40

Un liposoma de la invención puede ser parte de una composición que comprende una pluralidad de liposomas, y los liposomas dentro de la pluralidad pueden tener un intervalo de diámetros. Para una composición que comprende una población de liposomas con diferentes diámetros: (i) al menos 80% en número de los liposomas deben tener diámetros en el intervalo de 60-180 nm, y de manera preferente en el intervalo de 80-160 nm, y/o (ii) el diámetro promedio (por intensidad por ejemplo Z-promedio) de la población está idealmente en el intervalo de 60-180nm, y de manera preferente en el intervalo de 80-160 nm. Los diámetros dentro de la pluralidad deben tener de manera ideal un índice de polidispersidad de <0,2. Los complejos de liposoma/ARN de la referencia 1 se esperan que tengan un diámetro en el intervalo de 600-800 nm y tengan una alta polidispersidad.

45

En la técnica son bien conocidas las técnicas para preparar liposomas adecuados, por ejemplo ver referencias 6-8. Un procedimiento útil se describe en la referencia 9 y comprende mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) tampón, seguido por mezclado, puesta en equilibrio, dilución y purificación. Los liposomas preferidos de la invención se pueden obtener por este procedimiento de mezclado. Para obtener liposomas con los diámetros deseados, el mezclado se puede realizar usando un procedimiento en el cual se combinan dos corrientes de alimentación de la solución acuosa de ARN en una zona de mezclado individual con

50

una corriente de una solución de lípido etanólico, todo al mismo caudal, por ejemplo, en un canal microfluídico como se describe a continuación.

El ARN

5 Los liposomas de la invención incluyen una molécula de ARN que (a diferencia del ARN_{si}, como en la referencia 4) codifica un inmunógeno. Después de la administración *in vivo* de las partículas, el ARN se libera de las partículas y se traduce dentro de una célula para proporcionar el inmunógeno *in situ*.

El ARN es de cadena +, y de este modo se puede traducir por células sin necesidad de ninguna etapa de replicación de intervención tal como transcripción inversa. También puede unirse a los receptores de TLR7 expresados por células inmunitarias, iniciando de este modo un efecto adyuvante.

10 Los ARN de cadena + preferidos son autorreplicantes. Una molécula de ARN autorreplicante (replicón) puede llevar, cuando se administra a una célula de vertebrado, sin ninguna proteína, a la producción de múltiples ARN hijos por transcripción de sí mismo (mediante una copia antisentido que se genera de sí mismo). Una molécula de ARN autorreplicante de esta manera es típicamente una molécula de cadena + que se puede traducir directamente después de la administración a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN
15 que entonces produce transcritos tanto antisentido como homosenrido a partir del ARN administrado. De esta manera, el ARN administrado conduce a la producción de múltiples ARN hijos. Estos ARN hijos, así como transcritos subgenómicos colineales, se pueden traducir por sí mismos para proporcionar la expresión *in situ* de un inmunógeno codificado, o se pueden transcribir para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido como el ARN administrado que se traducen para proporcionar la expresión *in situ* del inmunógeno. Los resultados completos de
20 de esta secuencia de transcripciones es una enorme amplificación en el número de los ARN de replicón introducidos y de este modo el inmunógeno codificado llega a ser un producto polipeptídico principal de las células.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación es usar un replicón de ARN a base de alfavirus. Estos replicones de cadena + se traducen después de la administración a una célula para dar una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se auto-escinde para proporcionar un complejo de
25 replicación que crea copias de hebra genómica del ARN administrado de cadena +. Estos transcritos de cadena - pueden transcribirse por sí mismos para dar copias adicionales del ARN parental de cadena + y también para dar una transcrito subgenómico que codifica para el inmunógeno. La traducción del transcrito subgenómico conduce de esta manera a la expresión *in situ* del inmunógeno por la célula infectada. Los replicones adecuados de alfavirus pueden usar una replicasa de un virus de Sindbis, un virus del bosque de Semliki, un virus de encefalitis equina del este, un virus de encefalitis equina venezolana, etcétera. Las secuencias mutantes o de tipo silvestre de los virus se pueden usar, por ejemplo, en los replicones [10] se ha usado el mutante TC83 atenuado de VEEV.

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

En tanto que los genomas naturales de alfavirus codifican para proteínas estructurales de virión, además de la poliproteína de replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN autorreplicante de la invención no codifique para proteínas estructurales de alfavirus. De esta manera, un ARN autorreplicante preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones
40 que contienen ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, diferente de un alfavirus tipo silvestre, la molécula de ARN autorreplicante no puede perpetuarse por sí misma en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus tipo silvestre están ausentes de los ARN autorreplicantes de la invención y su lugar se toman por genes que codifican para el inmunógeno de interés, tal que el transcrito subgenómico codifica para el inmunógeno en lugar de las proteínas estructurales de virión de
45 alfavirus.

De esta manera, una molécula de ARN autorreplicante útil con la invención puede tener dos marcos de lectura abierta. El primer marco de lectura abierta (5') codifica para una replicasa, y el segundo marco de lectura abierta (3') codifica para un inmunógeno. En algunas realizaciones, el ARN puede tener marcos de lectura abierta adicionales (por ejemplo en la dirección 3') para codificar inmunógenos adicionales (ver más adelante) o para codificar polipéptidos auxiliares.
50

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

Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden tener diversas longitudes, pero típicamente son de 5000-25000 nucleótidos de longitud por ejemplo, 8000-15000 nucleótidos, o 9000-12000 nucleótidos. De esta manera, el ARN es más largo que el visto en la administración de ARN_{si}.

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

El nucleótido 5' de una molécula de ARN útil con la invención puede tener un grupo 5'-trifosfato. En un ARN con caperuza esto se puede enlazar a una 7-metilguanosina mediante un puente 5'-a-5'. Un 5'-trifosfato puede mejorar la unión RIG-I y de esta manera promover los efectos adyuvantes.

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

10 Una molécula de ARN útil con la invención será típicamente de cadena simple. Los ARN de cadena simple pueden iniciar en general un efecto adyuvante por la unión a TLR7, TLR8, ARN-helicasa y/o PKR. El ARN administrado en forma de cadena doble (ARNds) puede unirse a TLR3, y este receptor también se puede activar por ARNds que se forma ya sea durante la replicación de un ARN de cadena simple o dentro de la estructura secundaria de un ARN de cadena simple.

15 Una molécula de ARN útil con la invención se pueden preparar de manera conveniente por transcripción *in vitro* (IVT). La IVT puede usar un molde (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias, o creado de manera sintética (por ejemplo, por síntesis génica y/o métodos de ingeniería de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como las ARN-polimerasas de bacteriófago T7, T3 o SP6) se puede usar para transcribir el ARN de un molde de ADN. Las reacciones apropiadas de adición de caperuza y adición de poli-A se pueden usar como se requiera (aunque la poli-A del replicón normalmente se codifica dentro del molde de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener requisitos rigurosos para el(los) nucleótido(s) transcrito(s) en 5' y en algunas realizaciones estos requisitos se deben corresponder con los requisitos de la replicasa codificada, para asegurar que el ARN transcrito con IVT puedan funcionar de manera eficaz como un sustrato para su replicasa autocodificada.

20 Como se analiza en la referencia 11, el ARN autorreplicante puede incluir (además de cualquier estructura de caperuza en 5') uno o más nucleótidos que tienen una base nitrogenada modificada. Por ejemplo, un ARN autorreplicante puede incluir una o más bases nitrogenadas modificadas de pirimidina, tal como residuos de pseudouridina y/o 5-metilcitosina. En algunas realizaciones, sin embargo, el ARN no incluye bases nitrogenadas modificadas, y puede no incluir nucleótidos modificados, es decir, todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos A, C, G y U normales (excepto para cualquier estructura de caperuza en 5', que puede incluir un 7'-metilguanosina). En otras realizaciones, el ARN puede incluir una caperuza en 5' que comprende una 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos en 5' se pueden metilar en la posición 2' de la ribosa.

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

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

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

El inmunógeno

35 Las moléculas de ARN usadas con la invención codifican un inmunógeno de polipéptido. Después de la administración de los liposomas, el ARN se traduce *in vivo* y el inmunógeno puede producir una respuesta inmunitaria en el receptor. El inmunógeno puede producir una respuesta inmunitaria contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito (o, en algunas realizaciones, contra un alérgeno; y en otras realizaciones, contra un antígeno tumoral). La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta de anticuerpos (que incluye normalmente IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. El inmunógeno de polipéptido producirá típicamente una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido bacteriano, vírico, fúngico o parásito correspondiente (o alérgeno o tumor), pero en algunas realizaciones, el polipéptido puede actuar como un mimotopo para producir una respuesta inmunitaria que reconoce un sacárido bacteriano, vírico, fúngico o parásito. El inmunógeno será típicamente un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glicoproteína de envoltura, una glicoproteína de espiga, etcétera.

40 La molécula de ARN puede codificar para un inmunógeno de polipéptido individual o múltiples polipéptidos. Se pueden presentar múltiples inmunógenos como un inmunógeno de polipéptido individual (polipéptido de fusión) o como polipéptidos separados. Si los inmunógenos se expresan como polipéptidos separados de un replicón entonces se pueden proporcionar uno o más de estos con un IRES aguas arriba o un elemento promotor vírico adicional. Como alternativa, se pueden expresar múltiples inmunógenos de una poliproteína que codifica para inmunógenos individuales fusionados a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo, proteína 2A de virus de enfermedad de pies y boca), o como inteínas.

55 A diferencia de las referencias 1 y 12, el ARN codifica para un inmunógeno. Para evitar la duda, la invención no abarca ARN que codifica para una luciferasa de luciérnaga o que codifica para una proteína de fusión de β -galactosidasa de *E. coli* o que codifica para una proteína fluorescente verde (GFP). Estos polipéptidos pueden ser

útiles como marcadores, o aun en un contexto de terapia génica, pero la invención se refiere a la administración de ARN para producir un sistema de respuesta inmunológica. De esta manera, el inmunógeno tampoco es una proteína propia que se administra para complementar o sustituir una proteína hospedadora defectuosa (como en terapia génica). Tampoco, el ARN no es ARN de timo de ratón total.

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

Neisseria meningitidis: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, proteínas de membrana tal como adhesinas, autotransvehículoos, toxinas, proteínas de adquisición de hierro, y proteína de unión a factor H. En la referencia 13 se describe una combinación de tres polipéptidos útiles.

10 *Streptococcus pneumoniae*: los inmunógenos de polipéptido útiles se describen en la referencia 14. Estos incluyen, pero no se limitan a, la subunidad RrgB pilus, el precursor de beta-N-acetil-hexosaminidasa (spr0057), spr0096, proteína de estrés general GSP-781 (spr2021, SP2216), serina/treonina-cinasa STKP (SP1732), y adhesina de superficie neumocócica PsaA.

Streptococcus pyogenes: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos descritos en las referencias 15 y 16.

15 *Moraxella catarrhalis*.

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

20 *Staphylococcus aureus*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos descritos en la referencia 17, tal como hemolisina, esxA, esxB, proteína de unión a ferricromo (sta006) y/o la lipoproteína sta011.

Clostridium tetani: el inmunógeno típico es toxoide tetánico.

Cornynebacterium diphtheriae: el inmunógeno típico es toxoide diftérico.

Haemophilus influenzae: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos descritos en las referencias 18 y 19.

25 *Pseudomonas aeruginosa*

Streptococcus agalactiae: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos descritos en la referencia 15.

30 *Chlamydia trachomatis*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no están limitados a, PepA, LerE, ArtJ, DnaK, CT398, OmpH-tipo, L7/L12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (por ejemplo como se describe en la referencia 20. LcrE [21] y HtrA [22] son dos inmunógenos preferidos.

Chlamydia pneumoniae: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos descritos en la referencia 23.

Helicobacter pylori: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, CagA, VacA, NAP, y/o ureasa [24].

35 *Escherichia coli*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, inmunógenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Las cepas ExPEC incluyen *E.coli* uropatógena (UPEC) y *E.coli* asociada a meningitis/sepsis (MNEC). Los inmunógenos polipeptídicos de UPEC útiles se describen en las referencias 25 y 26. Los inmunógenos de MNEC útiles se describen en la referencia 27. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E.coli* es AcfD [28].

40 *Bacillus anthracis*

Yersinia pestis: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las referencias 29 y 30.

Staphylococcus epidermis

Clostridium perfringens o *Clostridium botulinums*

Legionella pneumophila

45 *Coxiella burnetii*

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

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

Neisseria gonorrhoeae

Treponema pallidum

Haemophilus ducreyi

5 *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*

Staphylococcus saprophyticus

Yersinia enterocolitica

Mycobacterium tuberculosis

Rickettsia

10 *Listeria monocytogenes*

Vibrio cholerae

Salmonella typhi

Borrelia burgdorferi

Porphyromonas gingivalis

15 *Klebsiella*

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

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

Virus de *Paramyxoviridae*: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de pneumovirus (por ejemplo, virus sincitial respiratorio, RSV), rubulavirus (por ejemplo, virus de paperas), paramixovirus (por ejemplo, virus de parainfluenza), metaneumovirus y morbilivirus (por ejemplo, virus de sarampión).

25 *Poxviridae*: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de *Orthopoxvirus* tal como *Variola vera*, incluyendo pero no limitado a, *Variola major* y *Variola minor*.

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

Bunyavirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de una *Orthobunyavirus*, tal como virus de encefalitis de California, un Flebovirus, tal como virus de Fiebre del Valle del Rift, o un Nairovirus, tal como virus de fiebre hemorrágica de Crimean-Congo.

35 *Heparnavirus*: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Heparnavirus, tal como virus de hepatitis A (VHA).

Filovirus: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un filovirus, tal como un virus de Ébola (incluyendo un ebolavirus de Zaire, Ivory Coast, Reston o Sudan) o un virus de Marburg.

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

40 *Flavivirus*: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Flavivirus, tal como virus de encefalitis transmitida por garrapata (TBE), virus de dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis japonesa, virus del Bosque de Kyasanur, virus de la encefalitis del Oeste del Nilo, virus de encefalitis de St. Louis, virus de encefalitis de primavera-verano ruso, virus de encefalitis de Powassan.

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

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

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

Rhabdovirus: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de Rhabdovirus, tal como un Lyssavirus (por ejemplo, un virus de rabia) y Vesiculovirus (VSV).

Caliciviridae: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de Caliciviridae, tal como virus de Norwalk (norovirus), y virus tipos Norwalk, tal como virus de Hawaii y virus de montaña de nieve.

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

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

15 *Reovirus*: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Orthoreovirus, un rotavirus, un Orbivirus, o un Coltivirus.

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

20 *Herpesvirus*: los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de herpesvirus humano, tal como, solo a manera de ejemplo, virus de herpes simple (HSV) (por ejemplo, HSV tipos 1 y 2), virus de varicela-zoster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus 6 humano (HHV6), herpesvirus 7 humano (HHV7), y herpesvirus 8 humano (HHV8).

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

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

30 En algunas realizaciones, el inmunógeno produce una respuesta inmunitaria contra un virus que infecta peces, tal como: virus de anemia infecciosa de salmón (ISAV), virus de enfermedad pancreática de salmón (SPDV), virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus de bagre de canal (CCV), virus de enfermedad de linfocistis de pez (FLDV), virus de necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), herpesvirus de koi, virus tipo picorna de salmón (también conocido como virus tipo picorna de salmón atlántico), virus de salmón de lago (LSV), rotavirus de salmón atlántico (ASR), virus de enfermedad de la fresa de la trucha (TSD), virus de tumor coho de salmón (CSTV), o virus de septicemia hemorrágica vírica (VHSV).

35 Los inmunógenos fúngicos pueden derivar de Dermatophytes, que incluye: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouini*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. *album*, var. *discoides*, var. *ochraceum*, *Trichophyton violaceum* y/o *Trichophyton faviforme*; o de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporidia*, *Encephalitozoon spp.*, *Septata intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi*; los menos comunes son *Brachiola spp*, *Microsporidium spp.*, *Nosema spp.*, *Pleistophora spp.*, *Trachipleistophora spp.*, *Vittaforma spp* *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffeii*, *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*.

55 En algunas realizaciones, el inmunógeno produce una respuesta inmunitaria contra un parásito del género *Plasmodium*, tal como *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. De esta manera, la invención se puede usar para inmunizar contra malaria. En algunas realizaciones, el inmunógeno produce una respuesta

inmunitaria contra un parásito de la familia *Caligidae*, particularmente aquellos de los géneros, *Lepeophtheirus* y *Caligus*, por ejemplo, piojos de mar tal como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.

5 En algunas realizaciones, el inmunógeno produce una respuesta inmunitaria contra: alérgenos de polen (alérgenos de polen de árbol, hierba, maleza y pasto), alérgenos de insectos o arácnidos (alérgenos inhalantes, de saliva y veneno, por ejemplo, alérgenos de garrapata, alérgenos de cucaracha y mosquito, alérgenos de veneno de himenóptera); alérgenos de caspa y cabello animal (por ejemplo de perro, gato, caballo, rata, ratón, etcétera); y alérgenos de alimento (por ejemplo, una gliadina). Los alérgenos de polen importante de árboles, céspedes y hierbas son de un origen de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y platanaceae incluyendo, pero no limitado a, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), el orden de Poales incluyendo céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de Asterales y Urticales incluyendo hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros importantes alérgenos de inhalación son aquellos de ácaros de polvo de casa del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento, por ejemplo, *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, aquellos de cucarachas, mosquitos y pulgas, por ejemplo, *Blattella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, y aquellos de mamíferos tal como alérgenos de gato, perro y caballo, alérgenos de veneno incluyendo los de origen de insectos picantes o mordedores, tal como aquellos del orden taxonómico de Himenóptera incluyendo abejas (*Apidae*), avispas (*Vespidae*), y hormigas (*Formicoidae*).

20 En algunas realizaciones, el inmunógeno es un antígeno tumoral seleccionado de: (a) antígenos de cáncer de testículo, tal como NY-ESO-1, SSX2, SCP1, así como polipéptidos de las familias RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, y MAGE-12 (que se pueden usar, por ejemplo, para afrontar melanoma, tumores de pulmón, cabeza y cuello, NSCLC, tumores de mama, gastrointestinales y de vejiga; (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociados con diversos tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado con, por ejemplo, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, melanoma), caspasa-8 (asociado con, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), ClA 0205 (asociado con, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta-catenina (asociado con, por ejemplo, melanoma), TCR (asociado con, por ejemplo, linfoma no de Hodgkins de linfocitos T), BCR-abl (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), triosafosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27, y LDLR-FUT; (c) antígenos sobreexpresados, por ejemplo, galectina 4 (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, varias leucemias), anhidrasa carbónica (asociado con, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociado 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), mamaglobina, alfa-fetoproteína (asociado con, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociado con, por ejemplo, cáncer gástrico y pancreático), proteína catalítica de telomerasa, MUC-1 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama y ovario), G-250 (asociado con, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, colon), y antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, y cánceres del tracto gastrointestinal, tal como cáncer colorrectal); (d) antígenos en común, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanoma-melanocito tal como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de hormona estimuladora de melanocitos, tirosinasa, proteína-1 relacionada con tirosinasa/TRP1 y proteína-2 relacionada con tirosinasa/TRP2 (asociado con, por ejemplo, melanoma); (e) antígenos asociados a próstata tal como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociado con, por ejemplo, cáncer de próstata; (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados con mieloma y linfomas de linfocitos B, por ejemplo). En ciertas realizaciones, los inmunógenos tumorales incluyen, pero no se limitan a, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos de virus de Epstein-Barr, EBNA, antígenos de papilomavirus humano (VPH), incluyendo E6 y E7, antígenos de virus de hepatitis B y C, antígenos de virus linfotrópico de linfocitos T humanos, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27,29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, y similares.

Composiciones farmacéuticas

Los liposomas de la invención son útiles como componentes en composiciones farmacéuticas para inmunizar sujetos contra varias enfermedades. Estas composiciones incluirán típicamente un vehículo farmacéuticamente aceptable, además de los liposomas. En la referencia 31 está disponible un análisis completo de vehículos farmacéuticamente aceptables.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir uno o más inmunopotenciadores de molécula pequeña. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (por ejemplo, Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (por ejemplo, un aminoalquil glucosaminida fosfato, tal como E6020), un agonista de TLR7 (por ejemplo, imiquimod), un agonista de TLR8 (por ejemplo, resiquimod) y/o un agonista de TLR9 (por ejemplo, IC31). Cualquier agonista tiene de manera ideal un peso molecular de <2000Da. En algunas realizaciones, estos agonistas también se encapsulan con el ARN dentro de los liposomas, pero en otras realizaciones pueden no estar encapsulados.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir los liposomas en agua corriente (por ejemplo, a.p.i.) o en un tampón, por ejemplo un tampón de fosfato, un tampón Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato, un tampón de histidina, o un tampón de citrato. Las sales de tampón típicamente se incluirán en el intervalo de 5-20 mm.

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

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

10 Las composiciones de la invención pueden incluir quelantes de iones metálicos. Estos pueden prolongar la estabilidad del ARN al remover iones que pueden acelerar la hidrólisis por fosfodiéster. De esta manera, una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, etcétera. Estos quelantes están típicamente presentes a entre 10-500 μ M por ejemplo 0,1mM. Una sal de citrato, tal como citrato de sodio, también puede actuar como un quelante, que también de manera ventajosa proporciona actividad de tampón.

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

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir uno o más conservantes, tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefieren composiciones sin mercurio, y se pueden preferir vacunas sin conservante.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente estériles.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente, no pirogénicas que contienen por ejemplo <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, de manera preferente $<0,1$ UE por dosis.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente sin gluten.

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

25 Las composiciones se pueden preparar como productos inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones. La composición se puede preparar para administración pulmonar, por ejemplo por un inhalador, usando una pulverizador de partículas finas. La composición se puede preparar para administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo como un pulverizador o unas gotas. Los productos inyectables para administración intramuscular son típicos.

30 Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de liposomas, así como cualquier otro componente, como se necesite. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis individual o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo que se va a tratar, de la edad, del grupo taxonómico del individuo que se a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etcétera), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseada, de la formulación de la vacuna, de la valoración de la situación médica del doctor que trata, y de otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad estará dentro de un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos de rutina. El contenido de liposoma y ARN de las composiciones de la invención se expresara en general en términos de la cantidad de ARN por dosis. Una dosis preferida tiene ≤ 100 μ g de ARN (por ejemplo, de 10-100 μ g, tal como aproximadamente 10 μ g, 25 μ g, 50 μ g, 75 μ g o 100 μ g). Aunque la expresión se puede ver a niveles mucho menores (por ejemplo, ≤ 1 μ g/dosis, ≤ 100 ng/dosis, ≤ 10 ng/dosis, <1 ng/dosis), se prefiere una dosis mínima de 0.1 μ g.

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

Los liposomas de la invención no contienen ribosomas.

45 **Procedimientos de tratamiento y usos médicos**

Al contrario de las partículas descritas en la referencia 12, los liposomas y composiciones farmacéuticas de la invención son para uso *in vivo* para producir una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno de interés.

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

La invención también proporciona un liposoma o una composición farmacéutica de la invención para su uso en un

procedimiento para generar una respuesta inmunitaria en un vertebrado.

La invención también proporciona el uso de un liposoma de la invención en la elaboración de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un vertebrado.

5 Al generar una respuesta inmunitaria en el vertebrado por estos usos y procedimientos, el vertebrado se puede proteger contra varias enfermedades y/o infecciones, por ejemplo, contra enfermedades bacterianas y/o víricas como se analiza anteriormente. Los liposomas y las composiciones son inmunogénicos, y son de manera más preferente composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo a la invención pueden ser ya sea profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas.

10 El vertebrado es preferentemente un mamífero, tal como un humano o un mamífero veterinario grande (por ejemplo, caballos, vacas, ciervos, cabras, cerdos). Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño que está empezando a andar o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna pensada para niños también se puede administrar a adultos por ejemplo, para valorar la seguridad, la dosis, la inmunogenicidad, etc.

15 Se pueden usar vacunas preparadas de acuerdo a la invención para tratar tanto niños como adultos. De esta manera, un paciente humano puede ser de menos de 1 año de edad, de menos de 5 años de edad, de 1-5 años de edad, de 5-15 años de edad, de 15-55 años de edad, o de al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad, y de manera preferente ≥ 65 años de edad), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, los trabajadores del cuidado de la salud, personal militar y de servicio armado, mujeres embarazadas, los enfermos crónicos o pacientes inmunodeficientes. Las vacunas no solo son adecuadas para estos grupos, sin embargo, y se pueden usar de manera más general en una población.

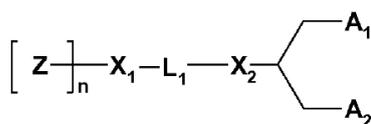
25 Las composiciones de la invención se administrarán en general directamente a un paciente. La administración directa se puede lograr por inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica, o al espacio intersticial de un tejido; a diferencia de la referencia 1, la inyección intraglosal no se usa típicamente con la presente invención). Las vías alternativas de administración incluyen administración rectal, oral (por ejemplo comprimidos, pulverizador), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, ótica, pulmonar o administración a otra mucosa. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero se puede usar de manera alternativa la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

30 La invención se puede usar para producir inmunidad sistémica y/o de la mucosa, de manera preferente para producir una inmunidad de la mucosa y/o sistémica mejorada.

35 La dosis puede ser por una pauta de dosis individual o una pauta de múltiple dosis. Se puede usar múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta de múltiples dosis, las diversas dosis se pueden dar por la misma o diferente vía por ejemplo, una primovacuna parenteral y un refuerzo en mucosa, una primovacuna en mucosa y un refuerzo parenteral, etc. Las múltiples dosis se administrarán típicamente con al menos 1 semana de separación (por ejemplo aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etcétera). En una realización, se pueden administrar múltiples dosis aproximadamente con 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas desde el nacimiento, por ejemplo, a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se usa frecuentemente en el Programa de Inmunización Extendida ("EPI", por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud. En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias con aproximadamente dos meses de separación, por ejemplo, aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de separación, seguido por una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. En una realización adicional, las tres dosis primarias se administran aproximadamente con dos meses de separación, por ejemplo, de aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de separación, seguido por una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses a 1 año después de la tercera dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10, o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

Fórmula (X)

Se desvelan compuestos de fórmula (X) que contienen un grupo hidrófilo de cabeza de polímero enlazado a una porción de lípido. Se puede describir como "lípidos silenciosos" y tienen la fórmula:



en los que:

[Z]_n es un componente del grupo hidrófilo de la cabeza seleccionado de PEG y polímeros basados en poli(oxazolona), poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida] y poli(aminoácidos), en los que el polímero puede ser lineal o ramificado, y en los que el polímero se puede sustituir de manera opcional;

en los que Z se polimeriza por n subunidades;

n es un grado de polimerización promedio en número de entre 10 y 200 unidades de Z, en el que n se optimiza para diferentes tipos de polímero;

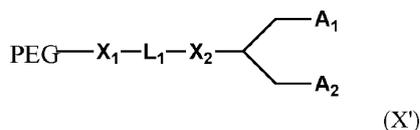
L₁ es un enlazador de alquileo C₁₋₁₀ o heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que incluye cero, uno o dos de un éter (por ejemplo, -O-), éster (por ejemplo, -C(O)O-), succinato (por ejemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por ejemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por ejemplo, -OC(O)O-), urea (por ejemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por ejemplo, -NR'-), amida (por ejemplo, -C(O)NR'-), imina (por ejemplo, -C(NR')-), tioéter (por ejemplo, -S-), xantano (por ejemplo, -OC(S)S-) y fosfodiéster (por ejemplo, -OP(O)₂O-),

en los que R' se selecciona independientemente de -H, -NH-, -NH₂, -O-, -S-, un fosfato o un alquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido;

X₁ y X₂ se seleccionan independientemente de un carbono o un heteroátomo seleccionado de -NH-, -O-, -S- o un fosfato;

A₁ y A₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₆₋₃₀, alqueno C₆₋₃₀, y alquino C₆₋₃₀, en los que A₁ y A₂ pueden ser los mismos o diferentes, o A₁ y A₂ junto con el átomo de carbono al cual se están unidos forman un esteroide opcionalmente sustituido.

En una realización, el compuesto de fórmula (X) tiene la fórmula (X')



en el que:

PEG es un poli(etilenglicol), en el que el PEG puede ser lineal o ramificado;

n es un grado de polimerización promedio en número de entre 70 y 240 unidades de óxido de etileno;

L₁ es un enlazador de heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que contiene uno o dos de un éter, éster, succinato, carbamato, carbonato, urea, amina, amida, imina, tioéter, xantato, y fosfodiéster;

X₁ y X₂ son oxígeno;

A₁ y A₂ se seleccionan independientemente de un alquilo C₆₋₃₀, alqueno C₆₋₃₀, y alquino C₆₋₃₀, en el que A₁ y A₂ pueden ser los mismos o diferentes, o en el que A₁ y A₂ junto con el átomo de carbono al cual se unen forma un esteroide opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones de la invención, cuando un lípido tiene la fórmula X', la invención no abarca lípidos en los que n es un grado de polimerización, promedio en número de 200 unidades de PEG. En otras realizaciones, en las que un lípido tiene la fórmula X', la invención no abarca lípidos los que n es un grado de polimerización promedio en número de entre 190-210 unidades de PEG. En otras realizaciones, en las que un lípido tiene la fórmula X', la invención no abarca lípidos en los que n es un grado de polimerización promedio en número por encima de 150 unidades de PEG o por encima de 130 unidades de PEG. En algunas realizaciones de la invención, en las que un lípido tiene la fórmula X', la invención no abarca lípidos en los que n es un grado de polimerización promedio en número de entre 10 y 200 unidades de PEG. En algunas realizaciones, la invención no abarca liposomas que incluyen un lípido que tiene la fórmula X'.

Los lípidos de las fórmulas (X) y (X'), y cuando se formulan con lípidos catiónicos para formar liposomas, pueden aumentar la duración de tiempo durante el cual puede existir *in vivo* un liposoma (por ejemplo, en la sangre). Pueden proteger la superficie de un liposoma y reducir de este modo la opsonización por las proteínas sanguíneas y la captación por macrófagos. Los detalles adicionales están en las referencias 32 y 33. En una realización, el lípido comprende un grupo seleccionado de PEG (algunas veces referido como poli(óxido de etileno)) y polímeros basados

en poli(oxazolona), poli(alcohol vínlico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida] y poli(aminoácidos).

- Los lípidos PEGilados adecuados para su uso con la invención incluyen conjugados de polietilenglicol-diacilglicerol o polietilenglicol-diacilglicamida (PEG-DAG) incluyendo aquellos que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida que tiene una longitud de cadena de alquilo que comprende independientemente de aproximadamente C4 a C40 átomos de carbono saturados o insaturados. El grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos. El lípido PEGilado se puede seleccionar de PEG-dilaurilglicerol, PEG-dimiristilglicerol (n.º de catálogo GM-020 de NOF), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-disterilglicerol, PEG-dilaurilglicamida, PEG-dimiristilglicamida, PEG-dipalmitoil-glicamida y PEG-disterilglicamida, PEG-colesterol (1-[8'-(colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega] -metil-poli(etilenglicol), PEG-DMB (3,4-Ditetradecoxil-bencil-[omega]-metil-poli(etilenglicol)-éter), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000] (n.º de catálogo 880210P de Avanti Polar Lipids).

Definiciones y términos químicos

Halo

- 15 El término "halógeno" (o "halo") incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Alquilo, alquileno, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, etc.

Los términos "alquilo", "alquileno", "alquenilo" y "alquinilo" se usan en el presente documento para referirse a formas acíclicas de cadena tanto lineal como ramificada. Los análogos cíclicos de los mismos se refieren como cicloalquilo, etc.

- 20 El término "alquilo" incluye grupos de hidrocarbilo acíclicos lineales o ramificados, saturados, monovalentes. En una realización, el alquilo es alquilo C₁₋₁₀, en otra realización es alquilo C₁₋₆, en otra realización es alquilo C₁₋₄, tal como grupos metilo, etilo, n-propilo, i-propilo o t-butilo.

El término "cicloalquilo" incluye grupos hidrocarbilos cíclicos monovalentes, saturados. En una realización el cicloalquilo es cicloalquilo C₃₋₁₀, en otra realización es cicloalquilo C₃₋₆ tal como ciclopentilo y ciclohexilo.

- 25 El término "alcoxi" significa alquil-O-.

El término "alquenilo" incluye grupos de hidrocarbilo acíclicos, insaturados, monovalentes, lineales o ramificados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y en una realización, ningún triple enlace carbono-carbono. En una realización, el alquenilo es alquenilo C₂₋₁₀, en otra realización es alquenilo C₂₋₆, en otra realización es alquenilo C₂₋₄.

- 30 El término "cicloalquenilo" incluye grupos de hidrocarbilo cíclicos, parcialmente insaturados, monovalentes que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y en una realización, ningún triple enlace carbono-carbono. En una realización, el cicloalquenilo es cicloalquenilo C₃₋₁₀, en otra realización es cicloalquenilo C₅₋₁₀, por ejemplo, ciclohexenilo o benzociclohexilo.

- 35 El término "alquinilo" incluye grupos de hidrocarbilo acíclicos, insaturados, monovalentes, lineales o ramificados que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y en una realización, ningún doble enlace carbono-carbono. En una realización, el alquinilo es alquinilo C₂₋₁₀, en otra realización es alquinilo C₂₋₆, en otra realización es alquinilo C₂₋₄.

El término "cicloalquinilo" incluye grupos de hidrocarbilo cíclicos, parcialmente insaturados, monovalentes que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y en una realización, ningún doble enlace carbono-carbono. En una realización el cicloalquinilo es cicloalquinilo C₃₋₁₀, en otra realización es cicloalquinilo C₅₋₁₀.

- 40 El término "alquileno" incluye grupos de hidrocarbilo acíclicos, saturados, divalentes, lineales o ramificados. En una realización, el alquileno es alquileno C₁₋₁₀, en otra realización es alquileno C₁₋₆, en otra realización es alquileno C₁₋₄, tal como grupos metileno, etileno, n-propileno, i-propileno o t-butileno.

- 45 El término "alquenileno" incluye grupos de hidrocarbilo acíclicos, insaturados, divalentes, lineales o ramificados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono, y en una realización ningún triple enlace carbono-carbono. En una realización, el alquenileno es alquenileno C₂₋₁₀, en otra realización es alquenileno C₂₋₆, en otra realización es alquenileno C₂₋₄.

- 50 El término "alquinileno" incluye grupos de hidrocarbilo acíclicos, insaturados, lineales o ramificados, divalentes que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, y en una realización ningún doble enlace carbono-carbono. En una realización, el alquinileno es alquinileno C₂₋₁₀, en otra realización es alquinileno C₂₋₆, en otra realización es alquinileno C₂₋₄.

Heteroalquilo, etc.

5 El término "heteroalquilo" incluye grupos alquilo en los cuales hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos carbonos átomos, en otra realización un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si (y de manera preferente O, S(O)_q o N), con la condición de que al menos permanezca uno de los átomos de carbono de alquilo. El grupo heteroalquilo puede estar C-enlazado o hetero-enlazado, es decir, se puede enlazar al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si.

10 El término "heterocicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo en los cuales hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos carbonos átomos, en otra realización un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que permanezca al menos uno de los átomos de carbono de cicloalquilo. Los ejemplos de los grupos heterocicloalquilo incluyen oxiranilo, tianilo, aziridinilo, oxetanilo, tianilo, azetidino, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, 1,4-oxatiano, morfolinilo, 1,4-ditiano, piperazinilo, 1,4-azatiano, oxepanilo, tiepanilo, azepanilo, 1,4-dioxepanilo, 1,4-oxatiepanilo, 1,4-oxaazepanilo, 1,4-ditiepanilo, 1,4-tieazepanilo y 1,4-diazepanilo. El grupo heterocicloalquilo puede estar C-enlazado o N-enlazado, es decir, se puede enlazar al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de un átomo de nitrógeno.

20 El término "heteroalquenilo" incluye grupos alquenilo en los cuales hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que permanezca al menos uno de los átomos de carbono de alquenilo. El grupo heteroalquenilo puede estar C-enlazado o hetero-enlazado, es decir, se puede enlazar al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_q o N.

25 El término "heterocicloalquenilo" incluye grupos cicloalquenilo en los cuales hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, se reemplaza cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que al menos uno de los átomos de carbono de cicloalquenilo permanezca. Los ejemplos de grupos heterocicloalquenilo incluyen 3,4-dihidro-2H-piranilo, 5-6-dihidro-2H-piranilo, 2H-piranilo, 1,2,3,4-tetrahidropiridinilo y 1,2,5,6-tetrahidropiridinilo. El grupo heterocicloalquenilo puede estar C-enlazado o N-enlazado, es decir, se puede enlazar al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de un átomo de nitrógeno.

30 El término "heteroalquinilo" incluye grupos alquinilo en los cuales hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que permanezca al menos uno de los átomos de carbono de alquinilo. El grupo heteroalquinilo puede estar C-enlazado o hetero-enlazado, es decir, se puede enlazar al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de O, S(O)_q o N.

35 El término "heterocicloalquinilo" incluye grupos cicloalquinilo en los cuales hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que permanezca al menos uno de los átomos de carbono de cicloalquinilo. El grupo heterocicloalquinilo puede estar C-enlazado o N-enlazado, es decir, se puede enlazar al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de un átomo de nitrógeno.

40 El término "heteroalquileno" incluye grupos alquileno en los cuales hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que permanezca al menos uno de los átomos de carbono de alquileno.

45 El término "heteroalquenileno" incluye grupos alquenileno en los cuales hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que permanezca al menos uno de los átomos de carbono de alquenileno.

50 El término "heteroalquinileno" incluye grupos alquinileno en los cuales hasta tres átomos de carbono, en una realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, se reemplazan cada uno independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que permanezca al menos uno de los átomos de carbono de alquinileno.

Arilo

55 El término "arilo" incluye grupos hidrocarbilo monovalentes, aromáticos, cíclicos, tales como fenilo o naftilo (por ejemplo, 1-naftilo o 2-naftilo). En general, los grupos arilo pueden ser grupos aromáticos de anillo fusionado monocíclicos o policíclicos. El arilo preferido es el arilo C₆₋₁₄.

Otros ejemplos de grupos arilo son derivados monovalentes de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, crisenno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno y rubiceno.

El término “arilalquilo” significa alquilo sustituido con un grupo arilo, por ejemplo, bencilo.

- 5 El término “arileno” incluye grupos de hidrocarbilo divalentes, aromáticos, cíclicos, tales como fenileno. En general, los grupos arileno pueden ser grupos aromáticos de anillo fusionado monocíclicos o policíclicos. El arileno preferido es arileno C₆₋₁₄. Otros ejemplos de grupos arileno son derivados divalentes de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, crisenno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno y rubiceno.

10 Heteroarilo

El término “heteroarilo” incluye grupos de hidrocarbilo cíclicos, heteroaromáticos, monovalentes que contienen adicionalmente uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y NR^N, en los que R^N se define posteriormente (y en una realización es H o alquilo (por ejemplo alquilo C₁₋₆)).

- 15 En general, los grupos heteroarilo pueden ser grupos heteroaromáticos de anillo fusionado monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclicos). En una realización, los grupos heteroarilo contienen 5-13 miembros de anillo (de manera preferente 5-10 miembros) y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos de anillo independientemente seleccionados de O, S, N y NR^N. En una realización, un grupo heteroarilo puede ser de 5, 6, 9 o 10 miembros, por ejemplo, monocíclico de 5 miembros, monocíclico de 6 miembros, bicíclico de anillo fusionado de 9 miembros o bicíclico de anillo fusionado de 10 miembros.

- 20 Los grupos heteroaromáticos monocíclicos incluyen grupos heteroaromáticos que contienen 5-6 miembros de anillo y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados de O, S, N o NR^N.

En una realización, los grupos heteroarilo monocíclicos de 5 miembros contienen 1 miembro de anillo que es un grupo -NR^N-, un átomo -O- o un átomo -S-, y opcionalmente 1-3 miembros de anillo (por ejemplo, 1 o 2 miembros de anillo) que son átomos =N- (en los que el resto de los 5 miembros de anillo son átomos de carbono).

- 25 Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de 5 miembros son pirrolilo, furanilo, tiofenilo, pirazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, tiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, 1,3,5-triazinilo, 1,2,4-triazinilo, 1,2,3-triazinilo y tetrazolilo.

Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos de 6 miembros son piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo.

- 30 En una realización, los grupos heteroarilo monocíclicos de 6 miembros contienen 1 o 2 miembros de anillo que son átomos =N- (en los que el resto de los 6 miembros de anillo son átomos de carbono).

Los grupos heteroaromáticos bicíclicos incluyen grupos heteroaromáticos de anillo fusionado que contienen de 9-13 miembros de anillo y 1, 2, 3, 4 o más heteroátomos seleccionados de O, S, N o NR^N.

- 35 En una realización, los grupos heteroarilo bicíclicos de 9 miembros contienen 1 miembro de anillo que es un grupo -NR^N-, un átomo -O- o un átomo -S- y, opcionalmente, 1-3 miembros de anillo (por ejemplo, 1 o 2 miembros de anillo) que son átomos =N- (donde el resto de los 9 miembros de anillo son átomos de carbono).

- 40 Los ejemplos de grupos heteroarilo bicíclicos de anillo fusionado de 9 miembros son benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, bencimidazolilo, indazolilo, benzotriazolilo, pirrolo[2,3-b]piridinilo, pirrolo[2,3-c]piridinilo, pirrolo[3,2-c]piridinilo, pirrolo[3,2-b]piridinilo, imidazo[4,5-b]piridinilo, imidazo[4,5-c]piridinilo, pirazolo[4,3-d]piridinilo, pirazolo[4,3-c]piridinilo, pirazolo[3,4-c]piridinilo, pirazolo[3,4-b]piridinilo, isoindolilo, indazolilo, purinilo, indolinilo, imidazo[1,2-a]piridinilo, imidazo[1,5-a]piridinilo, pirazolo[1,2-a]piridinilo, pirrolo[1,2-b]piridazinilo e imidazo[1,2-c]pirimidinilo.

En una realización, los grupos heteroarilo bicíclicos de 10 miembros contienen de 1-3 miembros de anillo que son átomos =N- (en los que el resto de los 10 miembros de anillo son átomos de carbono).

- 45 Los ejemplos de grupos heteroarilo bicíclicos de anillo fusionado de 10 miembros son quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, 1,6-naftiridinilo, 1,7-naftiridinilo, 1,8-naftiridinilo, 1,5-naftiridinilo, 2,6-naftiridinilo, 2,7-naftiridinilo, pirido[3,2-d]pirimidinilo, pirido[4,3-d]pirimidinilo, pirido[3,4-d]pirimidinilo, pirido[2,3-d]pirimidinilo, pirido[2,3-b]pirazinilo, pirido[3,4-b]pirazinilo, pirimido[5,4-d]pirimidinilo, pirazino[2,3-b]pirazinilo y pirimido[4,5-d]pirimidinilo.

El término “heteroarilalquilo” significa alquilo sustituido con un grupo heteroarilo.

- 50 El término “heteroarileno” incluye grupos hidrocarbilo cíclicos, heteroaromáticos, divalentes que contienen adicionalmente uno o más heteroátomos independientemente seleccionado de O, S, N y NR^N, en los que R^N se define más adelante (y en una realización es H o alquilo (por ejemplo alquilo C₁₋₆)). En general, los grupos

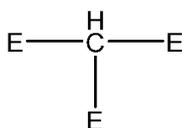
heteroarileno pueden ser grupos heteroaromáticos de anillo fusionado monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclicos). En una realización, los grupos heteroarileno contienen 5-13 miembros de anillo (de manera preferente 5-10 miembros) y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos de anillo independientemente seleccionado de O, S, N y NR^N. En una realización, un grupo heteroarileno puede ser de 5, 6, 9 o 10 miembros, por ejemplo, monocíclico de 5 miembros, monocíclico de 6 miembros, bicíclico de anillo fusionado de 9 miembros o bicíclico de anillo fusionado de 10 miembros. El término "heteroarileno" incluye derivados divalentes de cada uno de los grupos heteroarileno analizados anteriormente.

Los términos "arilo", "aromático", "heteroarilo" y "heteroaromático" también incluyen grupos que están parcialmente reducidos. De esta manera, por ejemplo, "heteroarilo" incluye especies fusionadas en las cuales se ha reducido uno de los anillos a un anillo saturado (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-ilo).

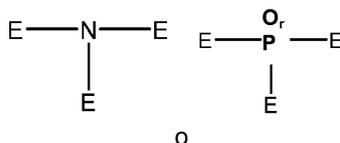
Aspectos generales

A menos que se indique explícitamente de otro modo, cuando las combinaciones de grupos se citan en el presente documento como una porción, por ejemplo, arilalquilo, el último grupo mencionado contiene el átomo por el cual la porción se une al resto de la molécula.

15 Cuando se hace referencia a un átomo de carbono de un grupo alquilo u otro grupo que se reemplaza por O, S(O)_q, N o P(O)_r, lo que se propone es que:



se reemplaza por



20 (en los que E no puede ser H);

-CH= se reemplaza por -N= o -P(O)_r=;

≡C-H se reemplaza por ≡N o ≡P(O)_r; o

25 -CH₂- se reemplaza por -O-, -S(O)_q- o -P(O)_rR^N- donde R^N es H o alquilo C₁₋₆, heteroalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, heterocicloalquilo C₃₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, heteroalqueno C₂₋₆, cicloalqueno C₃₋₆, heterocicloalqueno C₃₋₆, fenilo, o heteroarilo que contiene 5 o 6 miembros de anillo. R^N es preferentemente H, alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₃₋₆.

q es independientemente 0, 1 o 2. En una realización, q es 0.

r es independientemente 0 o 1. En una realización, r es 0.

30 Cuando se hace referencia a un átomo de carbono que se reemplaza por Si, lo que se pretende es que el átomo de carbono se intercambie por un átomo de silicio, pero que los enlaces permanezcan de otro modo igual. De esta manera, por ejemplo, -CH₂- se reemplaza por -SiH₂-; -CH= se reemplaza por -SiH=, y ≡CH se reemplaza por ≡Si-H.

35 A modo de aclaración, con relación a los grupos que contienen heteroátomos mencionados anteriormente (tal como heteroalquilo etcétera), cuando se da un número de átomos de carbono, por ejemplo heteroalquilo C₃₋₆, que se pretende que sea un grupo a base de alquilo C₃₋₆ en el cual uno o más de los 3-6 átomos de carbono de la cadena se reemplazan por O, S(O)_q o N. Por consiguiente, un grupo heteroalquilo C₃₋₆ contendrá por ejemplo, menos de 3-6 átomos de carbono de la cadena. Como otro ejemplo, un grupo piridilo se clasificará como un grupo heteroarilo C₆ aunque contenga 5 átomos de carbono.

Sustitución

40 Los grupos de los compuestos usados en la invención (por ejemplo, grupos alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alqueno, cicloalqueno, alquino, alqueno, alqueno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, heteroalqueno, heterocicloalqueno, heteroalquino, heteroalqueno, heteroalqueno arilo, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo o heteroarilheteroalquilo etcétera) puede estar sustituido o insustituido, en una realización está insustituido. Típicamente, la sustitución comprende el reemplazo nomenclativo de un átomo de hidrógeno con un grupo sustituyente, o dos átomos de hidrógeno en el caso de sustitución por =O.

45 Cuando se sustituye, en general habrá de 1 a 5 sustituyentes en cada grupo, en una realización 1 a 3 sustituyentes,

en una realización 1 o 2 sustituyentes, en una realización 1 sustituyente. Una realización incluye más de un sustituyente en el mismo átomo, por ejemplo, un grupo acetal.

En una realización, la sustitución es independientemente Sub¹ o Sub² (en una realización Sub²) en la que:

5 Sub¹ es independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, -NO₂, -CN, -N⁺(R^s)₂O⁻, -CO₂H, -CO₂R^s, -SO₃H, -SOR^s, -SO₂R^s, -SO₃R^s, -OC(=O)OR^s, -C(=O)H, -C(=O)R^s, -OC(=O)R^s=O, -NR^s₂, -C(=O)NH₂, -C(=O)NR^s₂, -N(R^s)C(=O)OR^s, -N(R^s)C(=O)NR^s₂, -OC(=O)NR^s₂, -N(R^s)C(=O)R^s, -C(=S)NR^s₂, -NR^sC(=S)R^s, -SO₂NR^s₂, -NR^sSO₂R^s, -N(R^s)C(=S)NR^s₂, -N(R^s)SO₂NR^s₂, -R^s o -Z^sR^s, en el que;

Z^s es independientemente O, S o NR^s;

10 R^s es independientemente H o alquilo C₁₋₆, heteroalquilo C₁₋₆, -(Alq^a)_f-cicloalquilo C₃₋₆, -(Alq^a)_f-heterocicloalquilo C₃₋₆, alquenilo C₂₋₆, heteroalquenilo C₂₋₆, -(Alq^a)_f-cicloalquenilo C₃₋₆, -(Alq^a)_f-heterocicloalquenilo C₃₋₆, alquinilo C₂₋₆, heteroalquinilo C₂₋₆, -(Alq^a)_f-arilo C₆₋₁₄, -(Alq^a)_f-arilo C₆₋₁₄ o -(Alq^a)_f-heteroarilo (en los que el heteroarilo contiene 5-13 miembros de anillo), en los que

f es 0 o 1;

Alq^a es alquileo C₁₋₆ o heteroalquileo C₁₋₆; y

15 R^s está opcionalmente sustituido por sí mismo (en una realización insustituido) por 1 a 3 sustituyentes Sub²;

20 Sub² es independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, -NO₂, -CN, -N⁺(alquilo C₁₋₆)₂O⁻, -CO₂H, -CO₂alquilo C₁₋₆, -SO₃H, -SOalquilo C₁₋₆, -SO₂alquilo C₁₋₆, -SO₃alquilo C₁₋₆, -OC(=O)alquilo C₁₋₆, -C(=O)H, -C(=O)alquilo C₁₋₆, -OC(=O)alquilo C₁₋₆, =O, -N(alquilo C₁₋₆)₂, -C(=O)NH₂, -C(=O)N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)C(=O)O(alquilo C₁₋₆), -N(alquilo C₁₋₆)C(=O)N(alquilo C₁₋₆)₂, -OC(=O)N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)C(=O)alquilo C₁₋₆, -C(=S)N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)C(=S)alquilo C₁₋₆, -SO₂N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)SO₂alquilo C₁₋₆, -N(alquilo C₁₋₆)C(=S)N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆)SO₂N(alquilo C₁₋₆)₂, -alquilo C₁₋₆, -heteroalquilo C₁₋₆, -cicloalquilo C₃₋₆, -heterocicloalquilo C₃₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -heteroalquenilo C₂₋₆, -cicloalquenilo C₃₋₆, -heterocicloalquenilo C₃₋₆, -alquinilo C₂₋₆, -heteroalquinilo C₂₋₆, -arilo C₆₋₁₄, -heteroarilo C₅₋₁₃, -Z^l-alquilo C₁₋₆, -Z^l-cicloalquilo C₃₋₆, -Z^l-alquenilo C₂₋₆, -Z^l-cicloalquenilo C₃₋₆ o -Z^l-alquinilo C₂₋₆; y

25 Z^l es independientemente O, S, NH o N(alquilo C₁₋₆).

Mientras que R^s en Sub¹ puede estar opcionalmente sustituido por 1 a 3 sustituyentes Sub², Sub² está insustituido. Sin embargo, en una realización, R^s está insustituido.

En una realización, R^s es H o alquilo C₁₋₆, opcionalmente sustituido por 1 a 3 sustituyentes Sub².

30 En una realización, Sub² es independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, -NO₂, -CN, -N⁺(alquilo C₁₋₆)₂O⁻, -CO₂H, -SO₃H, -SOalquilo C₁₋₆, -SO₂alquilo C₁₋₆, -C(=O)H, -C(=O)alquilo C₁₋₆, =O, -N(alquilo C₁₋₆)₂, -C(=O)NH₂, -alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, heterocicloalquilo C₃₋₆, -Z^l-alquilo C₁₋₆ o -Z^l-cicloalquilo C₃₋₆.

35 En una realización, en la que el grupo sustituido es acíclico (por ejemplo, alquilo, heteroalquilo, alquenilo, etcétera), Sub¹ no es -R^s y Sub² no es -alquilo C₁₋₆, -heteroalquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -heteroalquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆ o -heteroalquinilo C₂₋₆.

40 Cuando un grupo diferente de Sub² tiene al menos 2 posiciones que pueden estar sustituidas, el grupo se puede sustituir por ambos extremos de una cadena de alquileo, alquenileno, alquinileno, heteroalquileo, heteroalquenileno o heteroalquinileno (en una realización que contiene de 1 a 6 átomos, en una realización adicional de 3 a 6 átomos, y en una realización adicional de 3 o 4 átomos) para formar un resto cíclico. La cadena está opcionalmente sustituida por 1 a 3 sustituyentes Sub². En una realización esa cadena no está sustituida. De esta manera, los términos "cicloalquilo", "cicloalquenilo", "cicloalquinilo", "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", "heterocicloalquinilo", "arilo" y "heteroarilo" opcionalmente sustituidos incluyen especies fusionadas. Por ejemplo "cicloalquilo opcionalmente sustituido" incluye una especie en la cual se fusionan dos anillos de cicloalquilo, y "heteroarilo opcionalmente sustituido" incluye una especie en la cual un anillo de heterocicloalquilo se fusiona al anillo aromático (por ejemplo 5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-ilo).

45

50 Cuando un grupo diferente de Sub² tiene un átomo que puede estar sustituido dos veces, ese átomo puede estar sustituido por ambos extremos de una cadena de alquileo, alquenileno, alquinileno, heteroalquileo, heteroalquenileno o heteroalquinileno (en una realización que contiene de 2 a 8 átomos, en una realización adicional de 3 a 6 átomos, y en una realización adicional 4 o 5 átomos) para formar una porción cíclica. Esa cadena está opcionalmente sustituida por 1 a 3 sustituyentes Sub². En una realización esa cadena no está sustituida. De esta manera, los términos "cicloalquilo", "cicloalquenilo", "cicloalquinilo", "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", "heterocicloalquinil", "arilo" y "heteroarilo" opcionalmente sustituidos incluyen especies espiró.

A modo de aclaración, cuando un grupo tiene un heteroátomo, un sustituyente se puede unir al heteroátomo. De esta manera, por ejemplo, "heteroalquilo opcionalmente sustituido" incluye -CH₂-N(Sub¹)-CH₂-, -CH(Sub¹)-NH-CH₂- y

–CH(Sub¹)-N(Sub¹)-CH₂- etc.

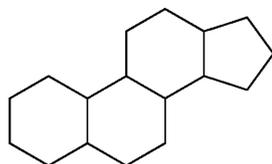
Términos modificadores

5 Cuando una lista se precede por un modificador, se pretende que el modificador se entienda como que se aplica a cada uno de los artículos en la lista. Por ejemplo, la frase “grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀, heterocicloalqueno C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos” significa que cada uno de los cuatro artículos en la lista, específicamente, el grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀, el grupo heterocicloalqueno C₃₋₂₀, el grupo heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ y el grupo heteroarilo C₆₋₂₀, pueden estar opcionalmente sustituidos.

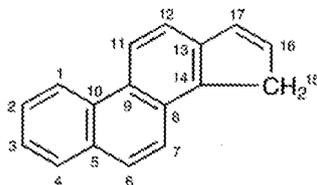
10 Cuando un grupo se caracteriza por un primer modificador y luego, posteriormente, el mismo grupo se caracteriza por un modificador posterior, lo que se quiere decir es que el grupo se caracteriza por ambos modificadores de forma simultánea. Por ejemplo, si un grupo se describe como un grupo “heterocicloalquinilo C₃₋₂₀” (el primer modificador) y luego posteriormente, el mismo grupo se describe como un grupo “C₅₋₁₆” (el modificador posterior), lo que se quiere decir es un grupo heterocicloalquinilo C₅₋₁₆.

Esteroides

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “esteroide” se refiere a cualquier grupo que comprende la siguiente estructura (estructura que se refiere en el presente documento como la “estructura esteroide”).



20 Puramente para propósitos de ilustración, la estructura esteroide se ha dibujado anteriormente como completamente saturada. Sin embargo el término esteroide, también se propone que abarque casos donde hay insaturación en la estructura esteroide. Por ejemplo, el término esteroide cubre un grupo que comprende la estructura básica completamente insaturada (mancude), 15*H*-ciclopenta[*a*]fenantreno:

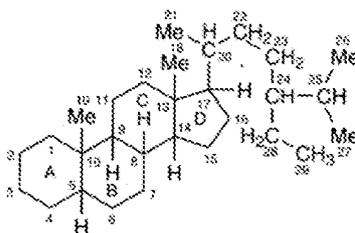


El término esteroide también abarca un grupo que comprende una estructura esteroide parcialmente insaturada.

25 El término esteroide también abarca derivados (secos) de la estructura esteroide, es decir, grupos en los cuales se ha efectuado la escisión del anillo; derivados “nor” y “homo” de la estructura esteroide que comprenden contracción y expansión del anillo, respectivamente (véase Systemic Nomenclature of Organic Chemistry, por D. Hellwinkel, publicado por Springer, 2001, ISBN: 3-540-41138-0, página 203 para “seco” y página 204 para “nor” y “homo”). En una realización, sin embargo, estos derivados seco no se abarcan por el término “esteroide”. En otra realización, estos derivados nor no se abarcan por el término “esteroide”. En otra realización, estos derivados homo no se abarcan por el término “esteroide”. De esta manera, en una realización, estos derivados seco, nor, y homo no se abarcan por el término “esteroide”.

35 El término esteroide también cubre casos donde uno o más de los átomos de carbono en la estructura marcada como estructura esteroide se reemplazan por un heteroátomo. En esta realización, hasta seis átomos de carbono, en una realización hasta cinco átomos de carbono, en otra realización hasta cuatro átomos de carbono, en otra realización hasta tres átomos de carbono, en otra realización hasta dos átomos de carbono, en otra realización un átomo de carbono, se reemplaza cada uno independientemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si (y de manera preferente O, S(O)_q o N). En una realización, sin embargo, el término “esteroide” comprende especies en las cuales la “estructura básica esteroides” no contiene heteroátomos.

Un sistema de anillo de esteroide se numera de acuerdo a la convención expuesta a continuación.



El término esteroide abarca esteroides, hormonas esteroides, ácidos biliares y sales de ácidos biliares. Un esteroide es cualquier esteroide con un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A.

Insaturación

- 5 De acuerdo con el uso normal, la posición omega-3 se refiere al tercer enlace de la terminal (metilo) de la cadena; la posición omega-6 se refiere al sexto enlace de la terminal (metilo) de la cadena y la posición omega-9 se refiere al noveno enlace de la terminal (metilo) de la cadena.

Aspectos generales

- 10 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, referencias 34-40, etcétera

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

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

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

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

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

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

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

- 35 La familia de receptores tipo RIG-I (“RLR”) incluye diversas ARN helicasas que juegan papeles claves en el sistema inmunitario innato [41]. RLR-1 (también conocido como gen I inducible por ácido retinoico o RIG-I) tiene dos dominios de reclutamiento de caspasa cerca de su extremo N-terminal. El nombre HGNC aprobado para el gen que codifica para la RLR-1-helicasa es “DDX58” (para el polipéptido 58 de la secuencia DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)) y el ID HGNC único es HGNC:19102. La secuencia RefSeq para el gen RLR-1 humano es GI:77732514. RLR-2 (también conocido como MDA5 o gen 5 asociado a diferenciación de melanoma) también tiene dos dominios de reclutamiento de caspasas cerca de su extremo N-terminal. El nombre HGNC aprobado para el gen que codifica para la RLR-2-helicasa es “IFIH1” (para interferón inducido con el dominio 1 de helicasa C) y el ID HGNC único es HGNC:18873. La secuencia RefSeq para el gen RLR-2 humano es GI:27886567. RLR-3 (también conocido como LGP2 o laboratorio de genética y fisiología 2) no tiene dominios de reclutamiento de caspasa. El nombre HGNC aprobado para el gen que codifica para la RLR-3-helicasa es “DHX58” (para el polipéptido 58 de la secuencia DEXH (Asp-Glu-X-His)) y el ID HGNC único es HGNC:29517. La secuencia RefSeq para el gen RLR-3 humana es GI:149408121.

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

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un gel con ARN teñido. Los carriles muestran (1) marcadores (2) replicón desnudo (3) replicón después de tratamiento con RNasa (4) replicón encapsulado en liposoma (5) liposomas después de tratamiento con RNasa (6) liposoma tratado con RNasa luego sometida a extracción de fenol/cloroformo.

5 La figura 2 muestra un gel con ARN teñido. Los carriles muestran (1) marcadores (2) replicón desnudo (3) replicón encapsulado en liposoma (4) liposoma tratado con RNasa luego sometido a extracción con fenol/cloroformo.

10 La figura 3 muestra la expresión de proteína (como unidades relativas de luz, URL) en los días 1, 3 y 6 después de la administración de ARN en liposomas con PEG de diferentes longitudes: 1 kDa (triángulos); 2 kDa (círculos); 3 kDa (cuadrados).

La figura 4 muestra la expresión de proteína en los días 1, 3 y 6 después de la administración de ARN con un replicón empacado en virión (cuadrado), ARN desnudo (diamantes), o en liposomas (+ = 0,1 µg, x = 1 µg).

15 La figura 5 muestra los log₁₀ de títulos de IgG específicos de F en ratones BALB/c. Los 5 grupos tienen longitudes de PEG, de izquierda a derecha, de 1, 2, 3, 5 o 10 kDa. Los círculos muestran títulos 2 semanas después de una inyección 1; los triángulos muestran títulos de 2 semanas después de la segunda inyección; las barras muestran la media para los dos títulos.

Modos de llevar a cabo la invención**Replicones de ARN**

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

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

35 Después de la linealización del ADN de plásmido aguas abajo de la ribozima de HDV con una endonucleasa adecuada de restricción, se sintetizaron transcritos de repetición *in vitro* usando ARN polimerasa dependiente de ADN derivada de bacteriófago T7 o SP6. Las transcripciones se realizaron durante 2 horas a 37 °C en la presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa de T7) o 5 mM (ARN polimerasa SP6) de cada uno de los nucleósidos trifosfatos (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion). Después de la transcripción, el ADN del molde se digirió con TURBO DNasa (Ambion). El ARN de replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua sin nucleasa. Al ARN sin caperuza se le colocó una caperuza de manera postranscripcional con enzima de colocación de caperuza de vaccinia (VCE) usando el sistema de colocación de caperuza ScriptCap m7G (Epicentre Biotechnologies) como se resumen en el manual del usuario; los replicones con caperuza colocada de esta manera se dan por el prefijo "v" por ejemplo vA317 es el replicón A317 con colocación de caperuza por VCE. El ARN con caperuza colocada postranscripcionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua sin nucleasa. La concentración de las muestras de ARN se determinó al medir la DO_{260nm}. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó por desnaturalización por electroforesis en gel de agarosa.

Encapsulación liposomal

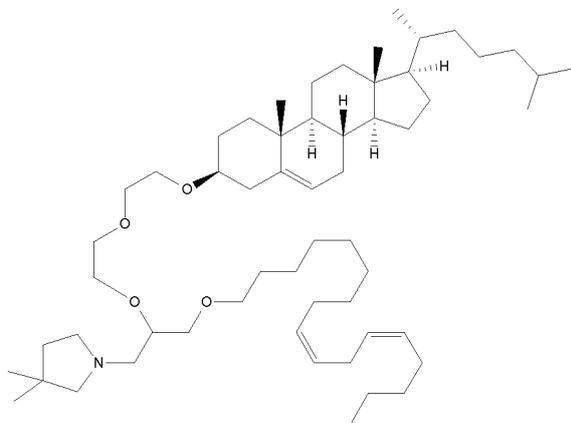
45 Se encapsuló ARN en liposomas elaborados esencialmente por el procedimiento de las referencias 9 y 42. Brevemente, se disolvieron los lípidos en etanol, un replicón de ARN se disolvió en tampón, y éstos se mezclaron con tampón seguido por la puesta en equilibrio. La mezcla se diluyó con tampón luego se filtró. El producto resultante contuvo liposomas, con alta eficiencia de encapsulación. Los liposomas se elaboraron con DSPC al 10 % (zwitteriónico), DlinDMA al 40 % (catiónico), colesterol al 48 % y DMG al 2 % conjugado con PEG. Estas proporciones se refieren a los % en moles en el liposoma total.

55 Se sintetizó DlinDMA (1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) usando el procedimiento de la referencia 4. Se compró DSPC (1,2-Diastearoil-sn-glicero-3- fosfocolina) de Genzyme. Se obtuvo colesterol de Sigma-Aldrich. DMG conjugado con PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3- fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol), sal de amonio), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, sal de cloruro) y DC-Chol (3p-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-

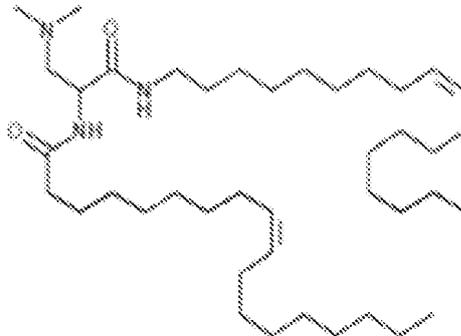
carbamoil]colesterol-clorhidrato) se compraron de Avanti Polar Lipids.

En algunos liposomas, se usaron lípidos catiónicos alternativos en lugar de DlinDMA por ejemplo RV05 o RV17:

RV05 (véase la ref. 3)



RV17 (véase la ref. 2)



- 5 En general, se han usado ocho procedimientos diferentes para preparar liposomas de acuerdo con la invención. Estos se citan en el texto como procedimientos (A) a (H) y difieren principalmente con relación a las etapas de filtración y TFF. Los detalles son como sigue:

(A) se prepararon soluciones madre frescas de lípidos en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG 2000 y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre de lípido recién preparada se agitó suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Entonces, se añadieron 755 µl de la solución madre a 1,245 ml de etanol para elaborar una solución madre de lípido de trabajo de 2 ml. Esta cantidad de lípido se usó para formar liposomas con 250 µg de ARN. También se preparó una solución de trabajo de 2 ml de ARN de una solución madre de ~ 1 µg/µl en tampón de citrato 100 mM (pH 6). Tres frascos de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) se enjuagaron con solución RNase Away (Molecular BioProducts) y se lavaron con abundancia de agua MilliQ antes del uso para descontaminar los frascos de las RNasas. Uno de los frascos se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recolectar las mezclas de lípido y ARN (tal como se describe más adelante). Las soluciones de lípido y ARN de trabajo se calentaron a 37 °C durante 10 min antes de que se cargaran en jeringas con seguro Luer de 3cc. Se cargaron 2 ml de tampón de citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contienen ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador T (unión PEEK™ 500 µm, Idex Health Science) usando tubería FEP (etilenpropileno fluorado; una tubería FEP tiene un diámetro interno de 2 mm x diámetro externo de 3 mm, suministrada por Idex Health Science). La salida del mezclador T también fue tubería FEP. La tercera jeringa que contiene el tampón de citrato se conectó a una pieza separada de tubería FEP. Todas las jeringas se accionan entonces, a un caudal de 7 ml/min usando una bomba de jeringa. Las salidas de la tubería se colocaron para recolectar las mezclas en un frasco de vidrio de 20 ml (mientras que se agita). La barra de agitación se extrajo y se dejó que la solución de etanol/acuosa llegue a el equilibrio a temperatura ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se conectó a una pieza de tubería FEP y en otra jeringa de 5 cc conectada a un tramo igual de tubería FEP, se cargó una cantidad igual de tampón de citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 7 ml/min usando la bomba de jeringa y la mezcla final se recolectó en un frasco de vidrio de 20 ml (mientras que se agita). Entonces, la mezcla recolectada del segundo paso de mezclado (liposoma) se hizo pasar a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que se une y remueve moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation). Antes de hacer pasar los liposomas, se hicieron pasar sucesivamente 4 ml de NaOH 1M, 4 ml de NaCl 1M y 10 ml de tampón de citrato 100 mM (pH 6) a través de la membrana Mustang. Los liposomas se calentaron durante 10 min a 37 °C antes de que se hicieran pasar a través de la membrana. Entonces, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de IX PBS usando TFF antes de recuperar el producto final. El sistema de TFF y las membranas de filtración de fibra hueca se compraron de Spectrum Labs y se usaron de acuerdo a las guías del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de polisulfona con un umbral de tamaño de 100 kD y un área superficial de 8 cm². Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración requerida de ARN con 1X PBS.

(B) Como el procedimiento (A), excepto que, después de la agitación, se añadieron 226,7 µl de la solución concentrada a 1,773 ml de etanol para elaborar una solución madre de lípido de trabajo de 2 ml, modificando de este modo la proporción lípido:ARN.

(C) Como el procedimiento (B) excepto que se omitió la filtración Mustang, de modo que los liposomas pasaron del frasco de vidrio de 20 ml a la diálisis de TFF.

(D) Como el procedimiento (C) excepto que la TFF usó membranas de fibra hueca de polietersulfona (PES) (número de parte P-C1-100E-100-01N) con un umbral de tamaño de poro de 100 kD y un área superficial de 20 cm².

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

5 (F) Como el procedimiento (A), excepto que se omitió la filtración Mustang, de modo que los liposomas pasaron del frasco de vidrio de 20 ml a la diálisis de TFF.

(G) Como el procedimiento (D) excepto que se preparó una solución de trabajo de 4 ml del ARN a partir de una solución madre de ~1µg/µl en tampón de citrato 100 mM (pH 6). Entonces, se prepararon cuatro frascos de vidrio de 20 ml de la misma manera. Dos de ellos se usaron para la solución de trabajo de ARN (2 ml en cada frasco) y los otros para recolectar las mezclas de lípido y ARN, como en (C). En lugar de usar el mezclador T, se conectaron jeringas que contienen ARN y los lípidos a un Chip de unión Mitos Droplet (un dispositivo microfluídico de vidrio obtenido de Syrris, Parte no. 3000158), usando tubería PTFE (diámetro interno de 0,762 mm x diámetro externo de 1,59 mm) usando un conector de borde de 4 vías (Syrris). Se generaron dos lujos de ARN y un flujo de lípido por bombas de jeringa y el mezclado de etanol y la fase acuosa se hizo en la unión X (100 µm x 105 µm) del chip. El caudal de las tres corrientes se mantuvo a 1,5 ml/min, por lo tanto, la proporción de caudal acuoso a etanólico total fue 2:1. La salida del tubo se colocó para recolectar las mezclas en un frasco de vidrio de 20 ml (mientras que se agita). Se extrajo la barra de agitación y la solución de etanol/acuosa se dejó llevar a equilibrio a temperatura ambiente durante 1 h. Entonces, la mezcla se cargó en una jeringa de 5 cc, que se adaptó a otra pieza de la tubería PTFE, y en otra jeringa de 5 cc con una longitud igual de tubería PTFE, un volumen igual de tampón de citrato 100 mM (pH 6) se cargó. Las dos jeringas se accionaron a una velocidad de flujo de 3 ml/min usando una bomba de jeringa y la mezcla final se recolectó en un frasco de vidrio de 20 ml (mientras que se agita). Entonces, los liposomas se recolectaron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de IX PBS usando TFF, como en (D).

25 (H) Como el procedimiento (A), excepto que la solución concentrada de lípido de trabajo 2 ml se elaboró al mezclar 120,9 µl de la solución madre de lípido con 1,879 ml de etanol. También, después de mezclar en el mezclador T los liposomas del frasco de 20 ml se cargaron en un casete de diálisis Pierce Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, resistencia extra, capacidad de 0,5-3 ml) y se dializó contra 400-500 ml de IX PBS durante la noche a 4 °C en un recipiente de plástico sometido a autoclave antes de recuperar el producto final.

30 Después de la formación del liposoma, se puede determinar el porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN mediante un kit de reactivo de ARN Quant-iT RiboGreen (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, usando la norma de ARN ribosómico en el kit para generar una curva patrón. Por ejemplo, se diluyeron los liposomas a 10x o a 100x en tampón IX TE (del kit) antes de la adición del tinte. De manera separada, los liposomas se diluyeron a 10x o a 100x en el tampón IX TE que contiene Triton X al 0,5 % antes de la adición del tinte (para romper los liposomas y de este manera valorar el ARN total). Posteriormente, se adicionó una cantidad total de tinte a cada solución y luego ~180 µl de cada solución después de la adición del tinte se cargó en duplicado en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Se lee la fluorescencia (Ex 485 nm, Em 528 nm) en un lector de microplaca. Las formulaciones de liposoma pueden dosificarse *in vivo* basándose en la cantidad encapsulada de ARN.

40 La encapsulación en liposomas demostró que protege el ARN de la digestión por RNasa. Los experimentos usaron 3,8 U_mA de RNasa A por microgramo de ARN, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se inactivó la RNasa con proteinasa K a 55°C durante 10 minutos. Entonces se añadió una mezcla 1:1 v/v de muestra 25:24:1 v/v/v, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para extraer ARN de los lípidos en la fase acuosa. Las muestras se mezclaron mediante agitación vorticial durante unos pocos segundos y luego se colocaron en una centrifuga durante 15 minutos a 12k RPM. La fase acuosa (que contiene el ARN) se removió y se usó para analizar el ARN. Antes de la carga (400 ng de ARN por pocillo) todas las muestras se incubaron con tinte de carga de formaldehído, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65 °C y se enfriaron a temperatura ambiente. Los marcadores Ambion Milenium se usaron para aproximar el peso molecular de la construcción de ARN. El gel se corrió a 90 V. El gel se tiñó usando SYBR Gold al 0,1 % de acuerdo con las instrucciones del fabricante en agua, mediante agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La figura 1 muestra que RNasa digiere completamente al ARN en la ausencia de encapsulación (carril 3). El ARN fue indetectable después de la encapsulación (carril 4), y no se dio cambio si estos liposomas se trataron con RNasa (carril 4). Después de que los liposomas tratados con RNasa se sometieron a extracción con fenol, se vio el ARN no digerido (carril 6). Aun después de 1 semana a 4 °C, el ARN se puede ver sin ninguna fragmentación (figura 2, flecha). La expresión *in vivo* de proteína estuvo sin cambio después de 6 semanas a 4°C y un ciclo de congelación-descongelación. De esta manera, es estable el ARN encapsulado en liposoma.

55 **Expresión de gen indicador**

Para valorar la expresión *in vivo* del ARN, una enzima reportera (SEAP; fosfatasa alcalina segregada) se codificó en el replicón, en lugar de un inmunógeno. Se midieron los niveles de expresión en sueros diluidos a 1:4 en tampón de dilución IX Phospha-Light usando un sustrato quimioluminiscente de fosfato alcalino. A los ratones BALB/c de 8-10 semanas de vida (5/grupo) se les inyectaron por vía intramuscular en el día 0, 50 µl por pata con una dosis de 0,1 µg

o 1 µg de ARN. El mismo vector también se administró sin los liposomas (en IX PBS sin RNasa) a 1 µg. También se probaron replicones empaquetados en virión. Los replicones empaquetados en virión usados en el presente documento (citados como "VRP") se obtuvieron por los procedimientos de la referencia 43, en los que el replicón de alfavirus se deriva del VEEV mutante o una quimera derivada del genoma de VEEV diseñada para contener el 3' UTR de virus Sindbis y una señal de empaquetamiento de virus Sindbis (PS), empaquetada por coelectroporación en células BHK con ARN auxiliares defectuosos que codifican para la cápside del virus Sindbis y genes de glucoproteína.

Tal como se muestra en la figura 4, la encapsulación incrementó los niveles de SEAP por aproximadamente ½ log a la dosis de 1 µg, y en el día 6 la expresión de una dosis encapsulada de 0,1 µg coincidió con los niveles vistos con la dosis no encapsulada de 1 µg. Para el día 3 los niveles de expresión excedieron aquellos logrados con VRP (cuadrados). De esta manera, la expresión de SEAP aumentó cuando el ARN se acumuló en los liposomas con relación al control de ARN desnudo, aun a una dosis 10x menor. La expresión también fue mayor con relación al control de VRP, pero la cinética de expresión fue muy diferente (véase la figura 4). La administración del ARN con electroporación dio como resultado un aumento en la expresión en relación con el control desnudo, pero los niveles fueron menores que con los liposomas.

Para valorar si el efecto visto en los grupos de liposomas fue debido principalmente a los componentes de liposoma, o estuvo ligado a la encapsulación, el replicón se administró en forma encapsulada (con dos diferentes protocolos de purificación, 0,1 µg de ARN), o se mezcló con los liposomas después de su formación (un "lipoplex" no encapsulado, 0,1 µg de ARN), o como ARN desnudo (1 µg). El lipoplex dio los niveles de expresión más bajos, lo que demuestra que la encapsulación es esencial para una potente expresión.

Los experimentos adicionales de SEAP demostraron una clara respuesta a la dosis *in vivo*, con la expresión vista después de la administración de tan poco como 1 ng de ARN. Los experimentos adicionales que comparan la expresión de los replicones encapsulados y desnudos indicaron que 0,01 µg de ARN encapsulado fue equivalente a 1 µg de ARN desnudo. A una dosis de 0,5 µg de ARN, el mineral encapsulado dio una expresión 12 veces mayor en el día 6; en una dosis de 0,1 µg, los niveles fueron 24 veces mayores en el día 6.

En lugar de considerar a niveles promedio en este grupo, también se estudiaron animales individuales. En tanto que varios animales no respondieron a los replicones desnudos, la encapsulación eliminó a los que no respondieron.

Expresión *in vivo* de inmunógenos

Para valorar la inmunogenicidad *in vivo* se construyó un replicón para expresar proteína F de longitud completa del virus respiratorio sincitial (RSV). Este se administró desnudo (1 µg), encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg), o empaquetado en viriones (10⁶ UI; "VRP") en los días 0 y 21. Los liposomas mejoraron claramente la inmunogenicidad, y el ARN produjo una fuerte respuesta de linfocitos T CD8. Los experimentos adicionales compararon los títulos de IgG específicos de F en ratones que reciben VRP, 0,1 µg de ARN encapsulado en liposoma, o 1 µg de ARN encapsulado en liposoma. El ARN encapsulado en liposoma induce esencialmente la misma magnitud de respuesta inmunitaria que la vista con la administración de viriones.

Un estudio adicional confirmó que 0,1 µg de ARN encapsulado en liposoma daba respuestas mucho mayores de anti-IgG F (15 días después de la segunda dosis) que 0,1 µg de ADN administrado, y fue aún más inmunogénico que 20 µg de ADN de plásmido que codifica para el antígeno F, administrado por electroporación.

Para estudiar la inmunogenicidad de la proteína F del RSV se preparó un replicón autorreplicante "vA31", que codifica la proteína F de RSV. Esto se administró a ratones BALB/c, 4 u 8 animales por grupo, por vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con 1 µg de replicón solo o se formuló como liposomas preparadas con DLinDMA tal como se describe anteriormente. El PEG-DMG en estos lípidos incluyó PEG-2000. En comparación, el ADN de plásmido desnudo (20 µg) que expresa el mismo antígeno F de RSV se administró, usando ya sea la electroporación o con los liposomas (0,1 µg de ADN). Se usaron cuatro ratones como un grupo de control sin tratamiento previo. Se recolectó suero para análisis de anticuerpos en los días 14 y 36. Los bazos se recolectaron de ratones en el día 49 para el análisis de linfocitos T.

Los títulos de IgG en suero específicos de F (GMT) fueron como sigue, que muestran datos para 4 diferentes preparaciones de liposomas que contienen ARN, y en comparación, los liposomas que contienen ADN:

RV	Día 14	Día 36
Plásmido de ADN desnudo	439	6712
ARN A317 desnudo	78	2291
Liposoma n.º 1	3020	26170

(continuación)

RV	Día 14	Día 36
Liposoma n.º 2	2326	9720
RV	Día 14	Día 36
Liposoma n.º 3	5352	54907
Liposoma n.º 4	4428	51316
Liposoma n.º 5 (ADN)	5	13

5 De esta manera, las formulaciones de liposoma mejoraron significativamente la inmunogenicidad con relación a los controles de ARN desnudo, como se determina por los títulos aumentados de IgG específicos de F (y también frecuencias de linfocitos T; datos no mostrados). El ADN de plásmido formulado con liposomas, o administrado desnudo usando electroporación, fue significativamente menos inmunogénico que el ARN autorreplicante formulado en liposoma.

Longitud más larga de PEG

10 Para comparar el efecto de la longitud de PEG en la inmunogenicidad *in vivo*, los dos diferentes conjuntos de liposomas se prepararon usando el procedimiento (H), ya sea con 150 µg de ARN o sin ARN (para elaborar liposomas vacíos). Se usaron dos diferentes mezclas de lípidos, que tienen ambas DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 %, y PEG-DMG al 2 %, pero las dos composiciones usaron ya sea PEG 2000 o PEG 5000. El replicón de ARN fue vA375 que codifica para la glicoproteína de fusión superficial de RSV.

15 La siguiente tabla muestra el tamaño de los liposomas (Z promedio e índice de polidispersidad) y el % de encapsulación de ARN en cada uno:

Composición	PEG	Zav (nm)	pdl	ARN	Encapsulación
A	2000	152,1	0,05	+	92,5 %
B	2000	144	0,13	-	-
C	5000	134	0,13	+	71,6 %
D	5000	130,3	0,178.	-	-

Los liposomas se administraron a ratones BALB/c (10 por grupo) por inyección intramuscular bilateral (50 µl por pata) en los días 0 y 21. Las dosis fueron de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 o 1 µg. Los títulos de PRNT60 e IgG en suero específicos de F (GMT) fueron como sigue, 2 semanas después de la primera o segunda inyección:

Liposoma	ARN (n)	2wp1	2wp2	PRNT60 (2wp2)
Control con tampón	0	-	-	10
B	0	-	-	10
D	0	-	-	10
A	0,01	3399	50691	37
C	0,01	3959	37025	51
A	0,03	3446	53463	83
C	0,03	5842	50763	180

(continuación)

Liposoma	ARN (n)	2wp1	2wp2	PRNT60 (2wp2)
A	0,1	8262	76808	238
C	0,1	7559	122555	314
A	0,3	5913	82599	512
C	0,3	5712	126619	689
A	1	8213	85138	441
C	1	9434	199991	1055

5 La inclusión de PEG 5000 produce mayores títulos específicos de F que el PEG 2000, después de dos dosis de 0,1 (1,6x), 0,3 (1,5x) o 1 µg (2,4x) de ARN. El análisis estadístico (prueba T) mostró que los títulos específicos de F (2sp2) fueron estadísticamente diferentes (P <0,05) entre los grupos de PEG 2000 y PEG 5000 a las dosis de 0,01, 0,1, 0,3 y 1 µg de ARN. El PEG 5000 dio mayores títulos neutralizadores (2,4x) a 1 µg de ARN, P <0,05.

Se realizaron experimentos comparativos similares con el replicón vA317. Los liposomas se elaboraron por el procedimiento (H) con DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG DMG al 2 % (ya sea PEG 2000 o PEG 5000). Sus características fueron como sigue:

Nombre	PEG	Zav (nm)	pdl	Encapsulación
2k	2000	122,3	0,068	95,23 %
5k	5000	106,1	0,136	61,61 %

10 A ratones BALB/c, 8 por grupo, se les dieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con ARN desnudo (1 µg) o encapsulado en liposoma (0,1 µg). El suero se recolectó en los días 14 y 35, y los bazo se recolectaron el día 49.

La IgG en suero específica de F (GMT) fue como sigue, 2 semanas después de la primera o segunda inyección:

Grupo	Día 14	Día 35
ARN desnudo	28	721
2k	2237	12407
5k	5654	39927

15 Las frecuencias de linfocitos T positivos a citocina específicos de F, netos, promedio (CD4+ o CD8+) fueron como sigue, que muestra solo cifras que fueron estadísticamente significativas por encima de cero (específico para los péptidos F51-66, F164-178, F309-323 de RSV para CD4+, o para los péptidos F85-93 y F249-258 para CD8+):

Grupo	CD4-CD8+				CD4-CD8+			
	IFNγ	IL2	IL5	TNFα	IFNγ	IL2	IL5	TNFα
Desnudo	0,02	0,02	0,04		0,36	0,16		0,28
2k	0,03	0,04		0,03	0,66	0,17		0,56

(continuación)

Grupo	CD4-CD8+				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
5k	0,06	0,08		0,07	1,42	0,46		1,09

5 De esta manera, los títulos de IgG específicos de F aumentaron 2,5 veces (2wpl) y 3 veces (2sp2) al aumentar el peso molecular del grupo de cabeza de PEG 2000-5000. También hubo un impacto positivo en las respuestas de linfocitos T.

Efecto de la longitud de PEG hasta 10kDa

10 Se usaron ratones BALB/c para estudiar el impacto de diferentes longitudes de PEG en el intervalo de 1-10kDa. Cinco grupos recibieron dos dosis (días 0 y 21) de 0,1 μ g de ARN que codifica la proteína F del RSV (replicón vA375) en liposomas formados del lípido catiónico DLinDMA y diferentes longitudes de PEG-DMG (1 kDa, 2 kDa, 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa). Se midieron los títulos de IgG específicos de F 14 días después de la primera y segunda dosis y los resultados se muestran en la figura 5. Los datos muestran que las longitudes de PEG de 2, 3, 5 y 10 kDa proporcionan esencialmente los mismos títulos en ambos puntos de tiempo, y estos son todos mejores que los vistos con PEG de 1 kDa.

15 Los animales de control recibieron liposomas de DLinDMA con PEG-DMG de 2 kDa, pero no ARN. Estos animales mostraron un título de anti-F de IgG que también aumentó después de la segunda dosis (pero a niveles mucho menores que en los animales que reciben ARN encapsulado). Las muestras de suero de este grupo no muestran una respuesta no específica en placas de ELISA revestidas con PBS o gp140.

20 Se midieron citocinas en suero 5 horas después de las inyecciones de los liposomas. En general, no se dieron respuestas de IL-1 β o TNF- α en ningún ratón, y las respuestas para IL-12/p70, IL-6, IL-10, IFN- γ e IP-10 fueron equivalentes para todas las longitudes de PEG. La respuesta de KC/GRO fue significativamente menor en ratones quienes recibieron liposomas con PEG-DMG de 5 kDa o de 10 kDa que en liposomas sin PEGilación.

Estudios de PEG5000 con RSV

25 Se usaron cuatro diferentes replicones para este estudio, todos que codifican para la glicoproteína F de tipo silvestre de longitud completa del RSV con el péptido de fusión deletado. El replicón vA372 se formó por transcripción de vertido (runoff). El extremo 3' del replicón vA142 se formó por escisión mediada por ribozima. En el vA368 la expresión de la proteína se activa por el sitio de entrada a ribosoma interno EV71 (IRES). En el replicón vA369, la expresión está dirigida por el IRES del EMCV.

Se formaron liposomas con lípido catiónico RV17 al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 49,5 %, PEG DMG 5000 al 0,5 %, elaborados usando el procedimiento (H) con un tamaño de lote de 175 μ g de ARN.

30 A los ratones BALB/c, 7 animales por grupo, se les dieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 μ l por pata) en los días 0 y 21 con:

Grupo 1.- ARN autorreplicante (vA372, 1,0 μ g) formulado en liposomas

Grupo 2.- ARN autorreplicante (vA142, 1,0 μ g) formulado en liposomas

Grupo 3.- VRP que contiene el ARN de vA142 (1×10^6 UI)

35 **Grupo 4.**- ARN autorreplicante (vA368, 1,0 μ g) formulado en liposomas

Grupo 5.- VRP que contiene el ARN de vA368 (1×10^6 UI)

Grupo 6.- ARN autorreplicante (vA369, 1,0 μ g) formulado en liposomas

Grupo 7.- VRP que contiene el ARN de vA369 (1×10^6 UI)

Grupo 8.- Control sin tratamiento previo (4 animales)

40 Se recolectaron los sueros para análisis de anticuerpos en los días 0, 20, 35. Los bazos se recolectaron en el día 35 para el análisis de los linfocitos T.

Los títulos de IgG en suero específicos de F y los títulos de neutralización (GMT) fueron como sigue:

Grupo	IgG Día 20	IgG Día 35	Neutral ^N
1	4678	76715	195
2	2471	51963	116
3	2898	42441	202
4	1463	33194	134
5	2236	33456	65
6	1524	37330	49
7	2785	31640	66
8	5	5	

De esta manera, los cuatro replicones fueron inmunogénicos y cada uno produjo anticuerpos tipo IgG específicos de F en suero después de la primera vacunación, con la segunda vacunación que refuerza de manera efectiva la respuesta. Se detectaron anticuerpos neutralizantes de RSV después de la segunda vacunación. Se indujeron títulos similares de anticuerpos después de la segunda vacunación por un replicón en el cual se formó el extremo 3' por escisión mediada por ribozima (vA142) y un replicón en el cual el extremo 3' se formó por transcripción de vertido (runoff) (vA372). La expresión mediada por EV71 o EMCV del antígeno F no mejora la respuesta del anticuerpo al replicón (vA368 o vA369 vs vA142). De manera similar, las respuestas de linfocitos T (no mostradas) no diferencian los replicones en los cuales el extremo 3' se formó por escisión mediada por ribozima (vA142) o transcripción de vertido (runoff) (vA372), y no muestra un beneficio a la expresión dirigida por EV71 o EMCV del antígeno F (vA238 o vA369 frente a vA142).

El replicón vA142 también se probó en ratas de algodón (*Sigmodon hispidis*) usando los liposomas formados de:

- (a) DlinDMA al 40 %, DPSC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG DMG 2000 al 2 %, elaborado por el procedimiento (D) con un tamaño de lote de 175 µg de ARN
- (b) RV17 al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 49,5 % y PEG DMG 5000 al 0,5 %, elaborado usando el procedimiento (H) con un tamaño de lote de 200 µg de ARN.
- (c) RV05 al 40 %, DLoPE al 30 % (18:02 PE), colesterol al 28 % y PEG DMG 2000 al 2 %, elaborado usando el procedimiento (H) con un tamaño de lote de 200 µg de ARN.

A las ratas de algodón, 4-8 animales por grupo, se les dieron vacunaciones intramusculares (100 µl en una pata) en los días 0 y 21 con:

- Grupo 1.**- ARN autorreplicantes (vA142, 1 µg, VSR-F) formulado en liposomas (a)
- Grupo 2.**- ARN autorreplicante (vA142, 0.1 µg, VSR-F) formulado en liposomas (a)
- Grupo 3.**- ARN autorreplicante (vA142, 1 µg, VSR-F) formulado en liposomas (b)
- Grupo 4.**- ARN autorreplicante (vA142, 0.1 µg, VSR-F) formulado en liposomas (b)
- Grupo 5.**- ARN autorreplicante (vA142, 1 µg, VSR-F) formulado en liposomas (c)
- Grupo 6.**- ARN autorreplicante (vA142, 0.1 µg, VSR-F) formulado en liposomas (c)
- Grupo 7.**- VRP (1x10⁶ IU) que expresa la glicoproteína F de superficie tipo silvestre de longitud completa de RSV
- Grupo 8.**- vacuna de proteína subunidad F de RSV (5 µg) con adyuvante de hidróxido de aluminio
- Grupo 9.**- un control sin tratamiento previo (3 animales)

Todas las ratas de algodón (excepto el grupo 9) se vacunaron con 5 µg de subunidad F + hidróxido de aluminio en el día 49 (cuatro semanas después de la segunda vacunación).

El suero se recolectó para análisis de anticuerpo en los días 0, 21, 35, 49, 64.

Los títulos de IgG en suero específicos de F (GMT) fueron como sigue:

Grupo	Día 21	Día 35	Día 49	Día 64
1	558	3938	2383	16563
2	112	1403	943	15123

(continuación)

Grupo	Día 21	Día 35	Día 49	Día 64
3	330	2927	2239	25900
4	51	503	503	20821
5	342	3207	2151	24494
6	49	1008	513	15308
7	1555	7448	4023	25777
8	8425	81297	54776	82911
9	5	5	5	5

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero de RSV fueron como sigue:

Grupo	Día 21	Día 35	Día 49	Día 64
1	66	788	306	161
2	26	162	58	1772
3	69	291	198	3221
4	24	72	43	1135
5	75	448	201	5733
6	27	371	163	2449
7	137	2879	1029	1920
8	307	2570	1124	2897
9	10	-	-	10

- 5 La vacunación de proteína no refuerza los títulos de anticuerpo en las ratas de algodón previamente vacunadas con proteína, pero proporciona un gran refuerzo a los títulos en las ratas de algodón previamente vacunadas con ARN. En la mayoría de los casos, los títulos de neutralización en suero de RSV después de dos vacunaciones con ARN seguido por proteína fueron iguales a los títulos inducidos por dos o tres vacunaciones de proteína con adyuvante, secuenciales.

10 **Inmunogenicidad de CMV**

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

A los ratones BALB/c, 10 por grupo, se les dio vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0, 21 y 42 con VRP que expresan gH/gL (1×10^6 UI), VRP que expresan gHsol/gL (1×10^6 UI) y PBS como controles. Dos grupos de prueba recibieron 1 µg del replicón vA160 o vA322 formulado en liposomas (DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, Colesterol al 48 %, PEG-DMG 2000 al 2 %; elaborado usando el procedimiento (D), pero con un tamaño de lote de 150 µg de ARN).

Los liposomas de vA160 tienen un diámetro Z_{av} (Z promedio) de 168 nm, un pdl (índice de polidispersidad) de 0,144, y encapsulación del 87,4 % de encapsulación. Los liposomas de vA322 tienen un diámetro Z_{av} de 162 nm, un pdl de 0,131, y encapsulación del 90 %.

Los replicones fueron capaces de expresar dos proteínas de un vector individual.

Se recolectaron sueros para análisis inmunológico en el día 63 (3wp3). Los títulos de neutralización de CMV (lo recíproco de la dilución en suero que produce una reducción del 50 % en el número de sitios de virus positivos por pocillo, con relación a los controles) fueron como sigue:

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

- 5 El ARN, que expresa ya sea una forma de longitud completa o soluble del complejo de CMV gH/gL produjo de esta manera altos títulos de anticuerpos neutralizantes, como se valora en células epiteliales. Los títulos promedio producidos por los ARN encapsulados en liposomas fueron al menos tan altos como los correspondientes VRP.

Los experimentos repetidos confirmaron que el replicón fue capaz de expresar dos proteínas de un vector individual. El replicón de ARN dio un título 3wp3 de 11457, en comparación a 5516 de los VRP.

- 10 Los experimentos adicionales usaron diferentes replicones, además de vA160, y usaron un PEG más largo en los liposomas. El replicón vA526 expresa el complejo pentamérico de CMV (gH-gL-UL128-UL130-UL131) bajo el control de tres promotores subgenómicos: el primero activa la expresión de gH; el segundo activa la expresión de gL; el tercero activa la expresión de la poliproteína UL128-2A-2A-UL130-UL131, que contiene dos sitios de escisión 2A entre los tres genes UL. El replicón vA527 expresa el complejo pentamérico CMV mediante tres promotores subgenómicos y dos IRES: el primer promotor subgenómico activa la expresión de gH; el segundo promotor subgenómico activa la expresión de gL; el tercer promotor subgenómico activa la expresión de UL128; UL130 está bajo control de un IRES de EMCV IRES; UL131 está bajo el control de un IRES de EV71. Estos tres replicones se administraron por liposoma (preparado por el procedimiento (H), con tamaño de lote de 150 µg; DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 %, PEG DMG 5000 al 2 %) o por VRP.
- 20 A ratones BALB/c, 10 grupos de 10 animales, se les dieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0, 21 y 42 con:

- 25 Grupo 1.- VRP que expresan gH FL/gL (1x10⁶ UI)
Grupo 2.- pentamérico, 2A VRP (1x10⁵ UI)
Grupo 3.- pentamérico, 2A VRP (1x10⁶ UI)
Grupo 4.- pentamérico. IRES VRP (1x10⁵ UI)
Grupo 5.- ARN autorreplicante vA160 (1 µg) formulado en liposomas
Grupo 6.- ARN auto -replicante vA526 (1µg) formulado en liposomas
Grupo 7.- ARN autorreplicante vA527 (1 µg) formulado en liposomas
Grupo 8.- ARN autorreplicante vA160 (1 µg) formulado en una nanoemulsión catiónica
Grupo 9.- ARN autorreplicante vA526 (1 µg) formulado en una nanoemulsión catiónica
Grupo 10.- ARN autorreplicante vA527 (1 µg) formulado en una nanoemulsión catiónica.

Los sueros se recolectaron para análisis inmunológico en los días 21 (3wp1), 42 (3wp2) y 63 (3wp3). Los títulos de neutralización en suero de CMV en los días 21, 42 y 63 fueron:

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

De esta manera, se puede usar ARN autorreplicante para expresar múltiples antígenos de un vector individual y para formular una potente y específica respuesta inmunitaria. El replicón puede expresar cinco antígenos (complejo pentamérico de CMV (gH-gL-UL128-UL130-UL131) y formular una potente respuesta inmunitaria. El ARN autorreplicante administrado en liposomas con PEG5000 fue capaz de producir altos títulos de anticuerpos neutralizantes, como se valora en células epiteliales, en todos los puntos de tiempo valorados (3wp1, 3wp2, y 3wp3). Estas respuestas fueron superiores a los VRP correspondientes y las nanoemulsiones catiónicas.

Tabla 1: fosfolípidos útiles

DDPC	1,2-didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-dierucoil-sn-glicero-3- fosfato
DEPC	1,2-erucoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG	1,2-dierucoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1- glicerol...)]
DLOPC	1,2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-dilauroil-sn-glicero-3- fosfato
DLPC	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-dilauroil -sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS	1,2-dilauroil -sn-glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG	1,2-miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPS	1,2-Dimiristoil -sn-glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOPS	1,2-dioleoil -sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	DPPA1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanol-amina
DPPG	1,2-dipalmitoil -sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPS	1,2-dipalmitoil -sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato
DSPC	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-diestearoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DGSEP	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
EPC	huevo-PC
HEPC	PC de huevo hidrogenado
HSPC	PC de soja hidrogenado de alta pureza
HSPC	PC de soya hidrogenado
LysoPC MIRÍSTICO	1-miristoil -sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LysoPC PALMÍTICO	1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LysoPC ESTEARICO	1-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
Esfingomielina MPPC de leche	1-miristoil,2-palmitoil-sn-glicero-3 fosfatidilcolina
MSPC	1-miristoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina
PMPC	1-palmitoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina
POPC	1-palmitoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidil-etanolamina
POPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol)...]
PSPC	1-palmitoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina
SMPC	1-estearoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina
SOPC	1-estearoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-estearoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina

Referencias

10 [1] Johanning et al. (1995) Nucleic Acids Res 23:1495-1501.

- [2] WO2011/057020.
- [3] WO2011/076807.
- [4] Heyes et al. (2005) *J Controlled Release* 107:276-87.
- [5] WO2005/121348.
- 5 [6] *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols*, (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [7] *Liposome Technology*, volumes I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [8] *Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes)*, (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002.
- 10 [9] Jeffs et al. (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372.
- [10] WO2005/113782.
- [11] WO2011/005799.
- [12] El Ouahabi et al. (1996) *FEBS Letts* 380: 108-12.
- [13] Giuliani et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci EUA* 103(29): 10834-9.
- 15 [14] WO2009/016515.
- [15] WO02/34771.
- [16] WO2005/032582.
- [17] WO2010/119343.
- [18] WO2006/110413.
- 20 [19] WO2005/111066.
- [20] WO2005/002619.
- [21] WO2006/138004.
- [22] WO2009/109860.
- [23] WO02/02606.
- 25 [24] WO03/018054.
- [25] WO2006/091517.
- [26] WO2008/020330.
- [27] WO2006/089264.
- [28] WO2009/104092.
- 30 [29] WO2009/031043.
- [30] WO2007/049155.
- [31] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [32] Romberg et al. (2008) *Pharmaceutical Research* 25:55-71.
- [33] Hoekstra et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41 -52
- 35 [34] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [35] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [36] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory

Press).

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

[38] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).

[39] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al, eds., 1998)

5 [40] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997)

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

[42] Maurer et al. (2001) Biophysical Journal, 80: 2310-2326.

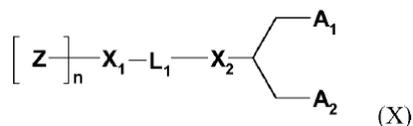
[43] Perri et al. (2003) J Virol 77: 10394-10403

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma dentro del cual se encapsula ARN que codifica un inmunógeno de interés, en el que el liposoma comprende al menos un lípido que se modifica mediante la unión covalente de un resto de polietilenglicol, de manera que el polietilenglicol está presente sobre el exterior del liposoma, en el que la masa molecular promedio del polietilenglicol está por encima de 3 kDa pero menos de 11 kDa, y en el que el liposoma no contiene ribosomas.

2. El liposoma de la reivindicación 1, que comprende PEG-DMG y/o

(i) un lípido de fórmula (X):



en la que:

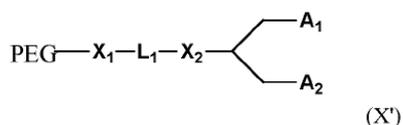
[Z]_n es un componente de grupo hidrófilo de la cabeza de PEG polimerizado por n subunidades, en la que n es un grado de polimerización promedio en número entre 10 y 200 unidades de Z, y en el que el PEG puede ser lineal o ramificado, y se puede sustituir opcionalmente;

L₁ es un enlazador de alquileo C₁₋₁₀ o heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que incluye cero, uno o dos de un éter (por ejemplo -O-), éster (por ejemplo, -C(O)O-), succinato (por ejemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por ejemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por ejemplo, -OC(O)O-), urea (por ejemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por ejemplo, -NR'-), amida (por ejemplo, -C(ONR')-), imina (por ejemplo, -C(NR')-), tioéter (por ejemplo, S-), xantato (por ejemplo, -OC(S)S-), y fosfodiéster (por ejemplo, -OP(O)₂O-), en el que R' se selecciona independientemente de -H, -NH-, -NH₂, -O-, -S-, un fosfato o un alquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido;

X₁ y X₂ se seleccionan independientemente de un carbono o un heteroátomo seleccionado de -NH-, -O-, -S- o un fosfato;

A₁ y A₂ se seleccionan independientemente de un alquilo C₆₋₃₀, alqueno C₆₋₃₀ y alquinilo C₆₋₃₀, en el que A₁ y A₂ pueden ser el mismo o diferente, o A₁ y A₂, junto con el átomo de carbono al que se unen forman un esteroide opcionalmente sustituido; y/o

(ii) un lípido de fórmula (X'):



en la que:

PEG es un poli(etilenglicol) polimerizado por n subunidades, en el que n es un grado de polimerización promedio en número de entre 70 y 240 unidades de óxido de etileno, en el que el PEG puede ser lineal o ramificado, y se puede sustituir opcionalmente;

L₁ es un enlazador de heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que contiene uno o dos de un éter, éster, succinato, carbamato, carbonato, urea, amina, amida, imina, tioéter, xantato y fosfodiéster;

X₁ y X₂ son oxígeno;

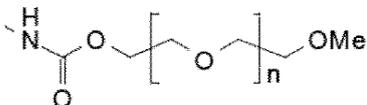
A₁ y A₂ se seleccionan independientemente de un alquilo C₆₋₃₀, alqueno C₆₋₃₀ y alquinilo C₆₋₃₀, en el que A₁ y A₂ pueden ser el mismo o diferente, o en el que A₁ y A₂, junto con el átomo de carbono al que se unen forman un esteroide opcionalmente sustituido.

3. El liposoma de la reivindicación 1, en el que el lípido que se modifica mediante enlace covalente de un resto de polietilenglicol comprende la estructura de PEG:



en la que n está entre 70 y 240, por ejemplo, en la que n es aproximadamente 113, y opcionalmente en la que el resto PEG termina con un grupo -O metilo.

4. El liposoma de la reivindicación 3, en el que el lípido comprende la estructura:



5. El liposoma de cualquier reivindicación precedente, en el que el liposoma tiene un diámetro en el intervalo de 80-160 nm.

- 5 6. El liposoma de cualquier reivindicación precedente, en el que el liposoma comprende un lípido con un grupo catiónico de cabeza.
7. El liposoma de cualquier reivindicación precedente, en el que el liposoma comprende un lípido con un grupo zwitteriónico de cabeza.
8. El liposoma de cualquier reivindicación precedente, en el que el ARN es una molécula de ARN autorreplicante.
- 10 9. El liposoma de la reivindicación 8, en el que la molécula de ARN autorreplicante codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN a partir de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un inmunógeno.
10. El liposoma de la reivindicación 9, en el que la molécula de ARN autorreplicante tiene dos marcos de lectura abierta, el primero de los cuales codifica una replicasa de alfavirus y el segundo de los cuales codifica el inmunógeno.
- 15 11. El liposoma de cualquier reivindicación precedente, en el que la molécula de ARN es de 9000-12000 nucleótidos de longitud.
12. El liposoma de cualquier reivindicación precedente, en la que el inmunógeno puede generar una respuesta inmunitaria *in vivo* frente a una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.
13. Una composición farmacéutica que comprende un liposoma de cualquier reivindicación precedente.
- 20 14. El liposoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o la composición farmacéutica de la reivindicación 13, para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado.

FIGURA 1

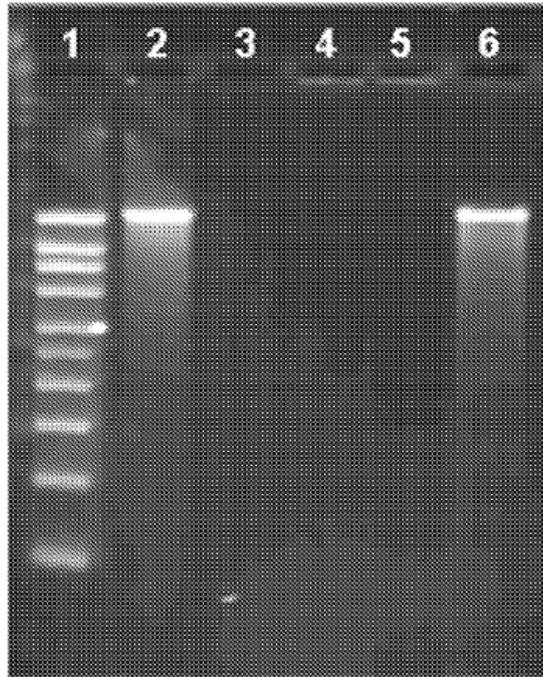


FIGURA 2

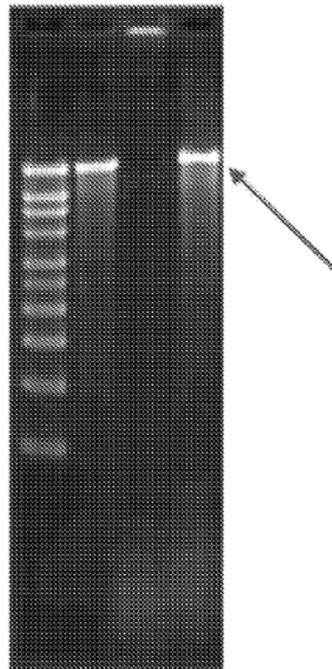


FIGURA 3

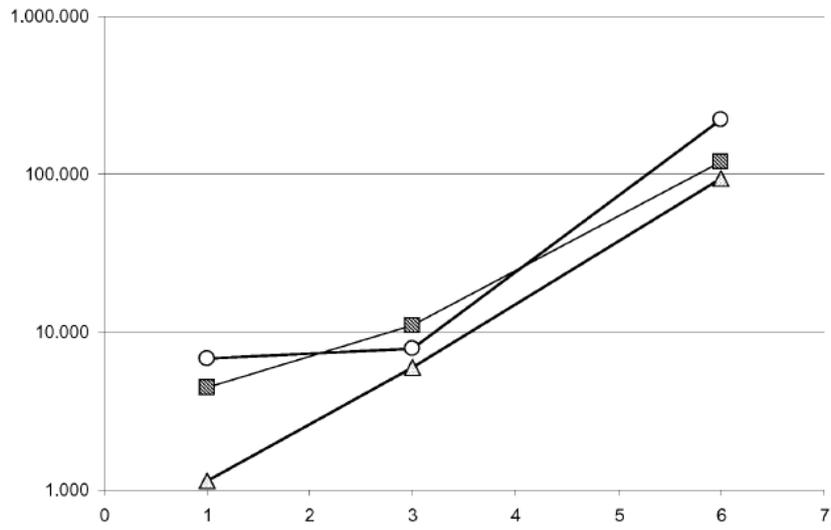


FIGURA 4

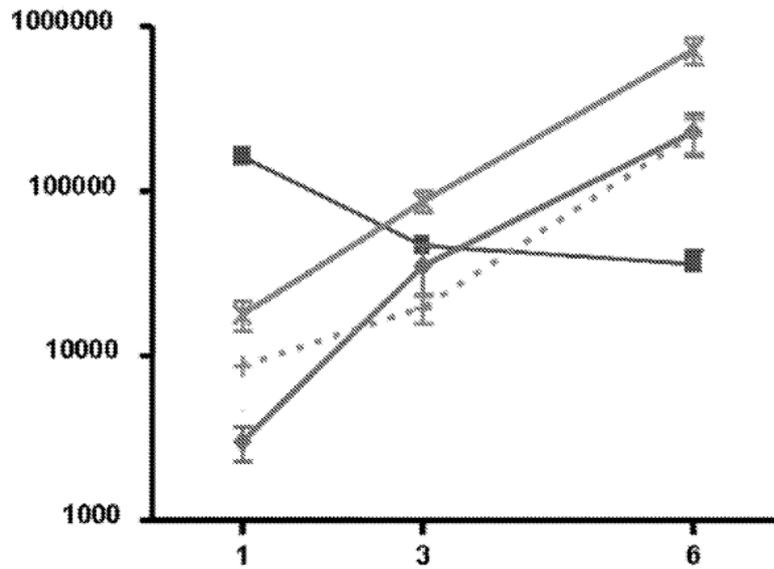


FIGURA 5

