

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 583**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2011 PCT/US2011/050100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12031046**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2011 E 11763813 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2611420**

54 Título: **Lípidos adecuados para la administración liposómica de ARN que codifica proteínas**

30 Prioridad:

31.08.2010 US 378833 P

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

17.10.2019

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)

Rue de l'Institut 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

GEALL, ANDREW

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 727 583 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

Lípidos adecuados para la administración liposómica de ARN que codifica proteínas

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de EE.UU. número de serie 61/378.833, que se archivó el 31 de agosto de 2010.

5 **Campo técnico**

La presente materia objeto desvelada está en el campo de la administración no vírica de ARN a animales.

Antecedentes de la técnica

10 La administración de ácidos nucleicos para la expresión *in vivo* de proteínas codificadas es útil tanto para terapia génica como para inmunización. Se han ensayado diversos enfoques para la administración exitosa, incluyendo el uso de ADN o ARN, de vehículos de administración víricos o no víricos (o incluso sin vehículo de administración, en una vacuna "desnuda"), de vectores de replicación o de no replicación o de vectores víricos o no víricos.

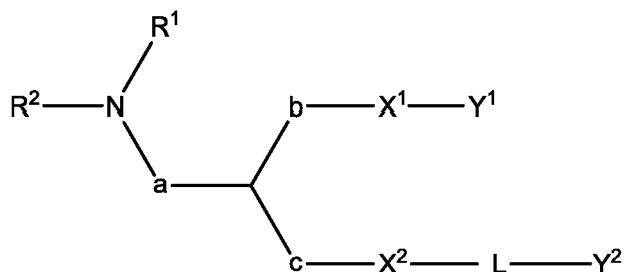
Se mantiene una necesidad de maneras adicionales y mejoradas para la administración de ácidos nucleicos a animales para la expresión *in vivo* de sus proteínas codificadas.

DIVULGACIÓN

15 Descrito en el presente documento, el ARN se administra encapsulado dentro de un liposoma. El ARN codifica un polipéptido de interés. El liposoma incluye al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos de fórmula (I) y fórmula (XI). Estos liposomas pueden administrar eficientemente el ARN para la expresión *in vivo*. La materia objeto desvelada es particularmente útil para la inmunización, en la que el polipéptido codificado es un inmunógeno.

20 De esta manera la materia objeto desvelada proporciona un liposoma dentro del cual se encapsula un ARN que codifica un polipéptido de interés, en el que el liposoma incluye al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos de fórmula (I) y fórmula (XI).

La Fórmula (I) es:



25 en la que:

R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;

a está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

30 b está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

c está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

X¹ es O o S;

X² es O o S;

Y¹ es alquileo C₁₀₋₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀₋₃₀, heteroalquileo C₁₀₋₃₀ o heteroalquinilo C₁₀₋₃₀;

L está ausente o es -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, en el que

35 L^a es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquilenilo C₁₋₁₅, alquinileno C₁₋₁₅, heteroalquileo C₁₋₁₅, heteroalquilenilo C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅;

L^b es arileno C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido o heteroarileno C₅₋₁₃;

L^c es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquilenilo C₁₋₁₅, alquinileno C₁₋₁₅, heteroalquileo C₁₋₁₅, heteroalquilenilo C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅;

40 d es 0 o 1;

e es 0 o 1; y

f es 0 o 1; e

Y² es un esteroide opcionalmente sustituido.

La Fórmula (XI) es:



en la que

- 5 R^a es alquilamida N-terminal;
 z es un número entero de 2 a 10;
 cada AA es un aminoácido, con la condición de que estén presentes al menos una histidina y al menos un aminoácido catiónico;
 R^b es -H o -NH₂.

10 La materia objeto desvelada también proporciona un procedimiento para preparar un liposoma que contiene ARN, que comprende una etapa de mezclar ARN con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos de fórmula (I) y fórmula (XI), en condiciones de tal manera que los compuestos formen un liposoma en el que el ARN esté encapsulado. El ARN y el compuesto pueden mezclarse en presencia de otros compuestos que también se vuelven incorporados en el liposoma, por ejemplo, lípidos adicionales.

El liposoma

15 La materia objeto desvelada utiliza liposomas dentro de los cuales se encapsula ARN que codifica polipéptidos. De esta manera el ARN está separado (como en un virus natural) de cualquier medio externo. Se ha descubierto que encapsulación dentro del liposoma protege al ARN de la digestión por RNasa. Los liposomas pueden incluir algo de 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 liposomas es distinta, por ejemplo, de los complejos lípido/ARN desvelados en la referencia 1, en los que el ARN se mezcla con liposomas preformados.

20 Diversos lípidos anfífilos pueden formar bicapas en un ambiente acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene un ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza hidrófilo aniónico, catiónico o zwitteriónico. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos data de los años 60 y los lípidos formadores de liposomas catiónicos se han estudiado desde los años 90. Algunos fosfolípidos son aniónicos mientras que otros son zwitteriónicos y otros son catiónicos. Las clases adecuadas de fosfolípido incluyen, pero no se limitan a, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas y fosfatidil-gliceroles y algunos fosfolípidos útiles se listan en la Tabla 1. Los lípidos catiónicos útiles en la técnica anterior incluyen, pero no se limitan a, dioleoil trimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DlinDMA), 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los lípidos zwitteriónicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos acil zwitteriónicos y lípidos éter zwitteriónicos. Los ejemplos de lípidos zwitteriónicos útiles son DPPC, DOPC, DSPC, dodecilmfosfolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) y 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE). Los lípidos en los liposomas de la materia objeto desvelada pueden ser saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido saturado para preparar liposomas. Si un lípido insaturado tiene dos colas, ambas colas pueden estar insaturadas o pueden tener una cola saturada y una cola insaturada. Un lípido puede incluir un grupo esteroide en una cola, por ejemplo, como en RV05.

40 Los liposomas de la materia objeto desvelada pueden formarse a partir de un único lípido o, más habitualmente, a partir de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos catiónicos (ii) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos zwitteriónicos y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos zwitteriónicos. De forma similar, una mezcla puede comprender tanto lípidos saturados como insaturados. Cuando se usa una mezcla de lípidos, no todos los lípidos componentes en la mezcla necesitan ser anfífilos, por ejemplo, uno o más lípidos anfífilos pueden mezclarse con colesterol.

45 Los liposomas de la materia objeto desvelada comprenden al menos un compuesto de fórmula (I) y/o al menos un compuesto de fórmula (XI). Los liposomas preferidos de la materia objeto desvelada incluyen un lípido catiónico de fórmula (I). Como se muestra en los ejemplos, tales liposomas son particularmente útiles para la administración *in vivo* de ARN para la expresión de proteínas. Otros liposomas preferidos de la materia objeto desvelada incluyen un lipopéptido de fórmula (XI). Un liposoma puede incluir tanto un liposoma de fórmula (I) como un lipopéptido de fórmula (XI), pero habitualmente incluye solamente uno de estas dos clases de compuesto catiónico.

50 Cuando un liposoma de la materia objeto desvelada se forma a partir de una mezcla de lípidos, se prefiere que la proporción de esos lípidos que tienen la fórmula (I) o (XI) deba estar entre el 20-80 % de la cantidad total de lípidos, por ejemplo, entre el 30-70 % o entre el 40-60 %. Por ejemplo, los liposomas útiles se muestran a continuación en los que el 40 % o el 60 % del lípido total es un lípido de fórmula (I). El resto puede estar formado, por ejemplo, por colesterol (por ejemplo, el 35-50 % de colesterol) y/o DMG (opcionalmente PEGilado) y/o DSPC. Tales mezclas se usan a continuación. Estos valores en porcentaje son porcentajes en moles.

55 Un liposoma puede incluir un lípido anfílico cuya porción hidrófila esté PEGilada (es decir, modificada por la unión covalente de un polietilenglicol). Esta modificación puede aumentar la estabilidad y evitar la adsorción no específica de los liposomas. Por ejemplo, los lípidos pueden conjugarse al PEG usando técnicas tales como aquellas desveladas

en las referencias 2 y 3. Los lípidos PEGilados útiles incluyen PEG-DMG y los lípidos de la fórmula (I) de la referencia 8. El PEG proporciona a los liposomas una cubierta que puede conferir características farmacocinéticas favorables. Pueden usarse diversas longitudes de PEG, por ejemplo, entre 0,5-8 kDa.

5 Las mezclas útiles de lípidos, para formar liposomas de la materia objeto desvelada, comprenden: un lípido catiónico de fórmula (I); colesterol; y un lípido PEGilado, tales como PEG-DMG, es decir, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol) conjugado a PEG. Esta mezcla también puede incluir un lípido zwitteriónico neutro, tal como DSPC (1,2-Diastearoil-sn-glicero-3-fosfocholina) o DPyPE. Estas (y otras) mezclas se usan en los ejemplos a continuación.

10 Los liposomas se dividen habitualmente en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares pequeñas (SUV); y vesículas unilamelares grandes (LUV). Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, formando varios compartimentos acuosos separados. Las SUV y LUV tienen una bicapa única que encapsula un núcleo acuoso; las SUV tienen típicamente un diámetro de ≤ 50 nm y las LUV tienen un diámetro de > 50 nm. Los liposomas de la materia objeto desvelada son idealmente LUV con un diámetro en el intervalo de 60-180 nm y preferentemente en el intervalo de 80-160 nm.

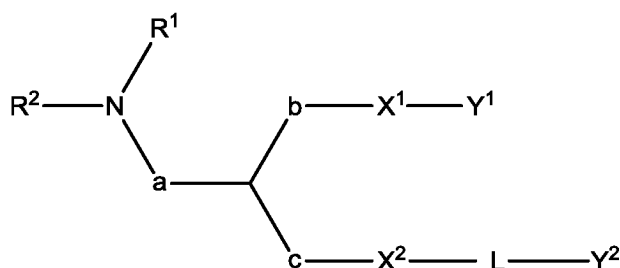
15 Un liposoma de la materia objeto desvelada puede ser parte de una composición que comprende una pluralidad de liposomas y los liposomas dentro de la pluralidad pueden tener un intervalo de diámetros. Para una composición que comprende una población de liposomas con diferentes diámetros: (i) al menos el 80 % en número de los liposomas deben tener diámetros en el intervalo de 60-180 nm y preferentemente en el intervalo de 80-160 nm y/o (ii) el diámetro promedio (por intensidad, por ejemplo, promedio Z) de la población está idealmente en el intervalo de 60-180 nm y preferentemente en el intervalo de 80-160 nm. Los diámetros dentro de la pluralidad deben tener idealmente un índice de polidispersidad $< 0,2$. Se espera que los complejos liposoma/ARN de la referencia 1 tengan un diámetro en el intervalo de 600-800 nm y que tengan una alta polidispersidad. Los diámetros en una población pueden medirse usando dispersión de luz dinámica.

25 Las técnicas para preparar liposomas adecuados se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véanse las referencias 4 a 6. Un procedimiento útil se describe en la referencia 7 e implica mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) tampón, seguido de mezcla, equilibrado, dilución y purificación. Los liposomas preferidos de la materia objeto desvelada son obtenibles mediante este procedimiento de mezcla.

30 Para obtener liposomas con el diámetro o diámetros deseados, puede realizarse la mezcla usando un procedimiento en el que dos corrientes de suministro de solución de ARN acuosas se combinan en una única zona de mezclado con una corriente de una solución de lípido etanólica, todas al mismo caudal, por ejemplo, en un caudal microfluídico como se describe a continuación.

Fórmula (I)

Los lípidos catiónicos de fórmula (I) son como sigue:



35 en la que:

R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalqueno C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;

a está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

40 b está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

c está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

X¹ es O o S;

X² es O o S;

Y¹ es alqueno C₁₀₋₃₀ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₀₋₃₀, heteroalqueno C₁₀₋₃₀ o heteroalquilo C₁₀₋₃₀;

L está ausente o es -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, en la que

45 L^a es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquilenilo C₁₋₁₅, alquilenilo C₁₋₁₅, heteroalquilenilo C₁₋₁₅, heteroalquilenilo C₁₋₁₅ o heteroalquilenilo C₁₋₁₅;

L^b es arileno C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido o heteroarileno C₅₋₁₃;

L^c es alquileo C_{1-15} opcionalmente sustituido, alquenileno C_{1-15} , alquinileno C_{1-15} , heteroalquileo C_{1-15} , heteroalquenileno C_{1-15} o heteroalquinileno C_{1-15} ;

d es 0 o 1;

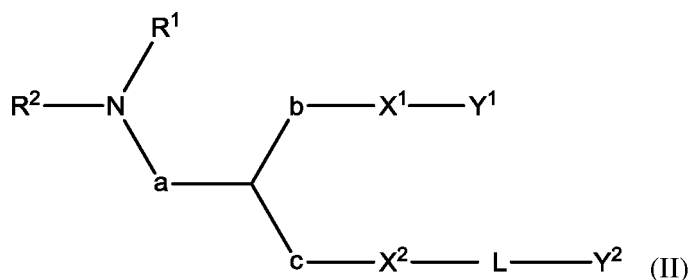
e es 0 o 1; y

5 f es 0 o 1; e

Y^2 es un esteroide opcionalmente sustituido.

De esta manera R^1 y R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un "grupo de cabeza" cíclico con una amina terciaria. Estos compuestos se describen con más detalle en la referencia 8, los contenidos completos de la cual se incorporan en el presente documento por referencia.

10 En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (II):



en la que:

R^1 y R^2 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C_{3-20} opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C_{3-20} , heterocicloalquinilo C_{3-20} o heteroarilo C_{5-20} ;

15 a está ausente o es alquileo C_{1-4} opcionalmente sustituido;

b está ausente o es alquileo C_{1-4} opcionalmente sustituido;

c está ausente o es alquileo C_{1-4} opcionalmente sustituido;

X^1 es O o S;

X^2 es O o S;

20 Y^1 es alquileo C_{10-30} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{10-30} , heteroalquenilo C_{10-30} o heteroalquinilo C_{10-30} ;

L es $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f$, en la que

L^a es alquileo C_{1-15} opcionalmente sustituido, alquenileno C_{1-15} , alquinileno C_{1-15} , heteroalquileo C_{1-15} , heteroalquenileno C_{1-15} o heteroalquinileno C_{1-15} ;

L^b es arileno C_{6-14} opcionalmente sustituido o heteroarileno C_{5-13} ;

25 L^c es alquileo C_{1-15} opcionalmente sustituido, alquenileno C_{1-15} , alquinileno C_{1-15} , heteroalquileo C_{1-15} , heteroalquenileno C_{1-15} o heteroalquinileno C_{1-15} ;

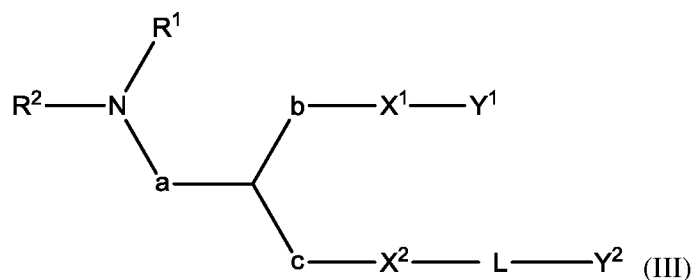
d es 0 o 1;

e es 0 o 1; y

f es 0 o 1;

30 con la condición de que L comprenda uno o más heteroátomos e Y^2 es un esteroide opcionalmente sustituido.

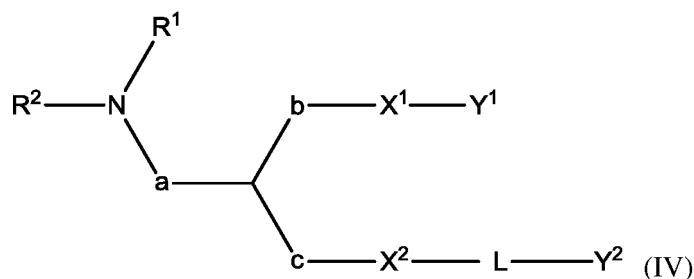
En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (III):



en la que:

- 5 R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;
 a es metileno;
 b es metileno;
 c está ausente;
 X¹ es O o S;
 X² es O o S;
 10 Y¹ es alquenilo C₁₀₋₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀₋₃₀, heteroalquenilo C₁₀₋₃₀ o heteroalquinilo C₁₀₋₃₀;
 L es -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, en la que
- L^a es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquenileno C₁₋₁₅, alquinileno C₁₋₁₅, heteroalquileo C₁₋₁₅, heteroalquenileno C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅;
 L^b es arileno C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido o heteroarileno C₅₋₁₃;
 15 L^c es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquenileno C₁₋₁₅, alquinileno C₁₋₁₅, heteroalquileo C₁₋₁₅, heteroalquenileno C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅;
 d es 0 o 1;
 e es 0 o 1; y
 f es 0 o 1; e
 20 Y² es un esteroide opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (IV):



en la que:

- 25 R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;
 a es metileno;
 b es metileno;
 c está ausente;
 X¹ es O o S;
 X² es O o S;
 30 Y¹ es alquenilo C₁₀₋₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀₋₃₀, heteroalquenilo C₁₀₋₃₀ o heteroalquinilo C₁₀₋₃₀;
 L es -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, en la que
- L^a es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquenileno C₁₋₁₅, alquinileno C₁₋₁₅, heteroalquileo C₁₋₁₅, heteroalquenileno C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅;

L^b es arileno C_{6-14} opcionalmente sustituido o heteroarileno C_{5-13} ;

L^c es alquileo C_{1-15} opcionalmente sustituido, alquenileno C_{1-15} , alquinileno C_{1-15} , heteroalquileno C_{1-15} , heteroalquenileno C_{1-15} o heteroalquinileno C_{1-15} ;

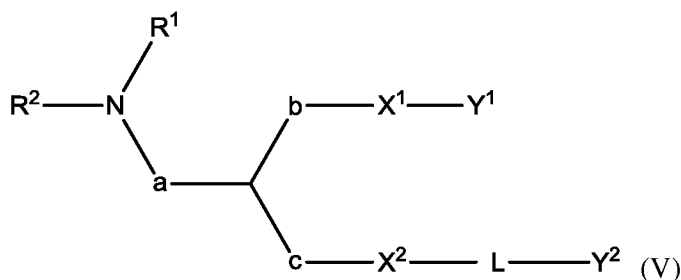
d es 0 o 1;

5 e es 0 o 1; y

f es 0 o 1;

con la condición de que L comprenda uno o más heteroátomos e Y^2 es un esteroide opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (V):



10

en la que:

R^1 y R^2 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C_{3-20} opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C_{3-20} , heterocicloalquinilo C_{3-20} o heteroarilo C_{5-20} ;

15

a es metileno;
b es metileno;
c está ausente;

X^1 es O;

X^2 es O;

20

Y^1 es alquileo C_{10-30} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{10-30} , heteroalquenilo C_{10-30} o heteroalquinilo C_{10-30} ;

L es $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f$, en la que

L^a es alquileo C_{1-15} opcionalmente sustituido, alquenileno C_{1-15} , alquinileno C_{1-15} , heteroalquileno C_{1-15} , heteroalquenileno C_{1-15} o heteroalquinileno C_{1-15} ;

L^b es arileno C_{6-14} opcionalmente sustituido o heteroarileno C_{5-13} ;

25

L^c es alquileo C_{1-15} opcionalmente sustituido, alquenileno C_{1-15} , alquinileno C_{1-15} , heteroalquileno C_{1-15} , heteroalquenileno C_{1-15} o heteroalquinileno C_{1-15} ;

d es 0 o 1;

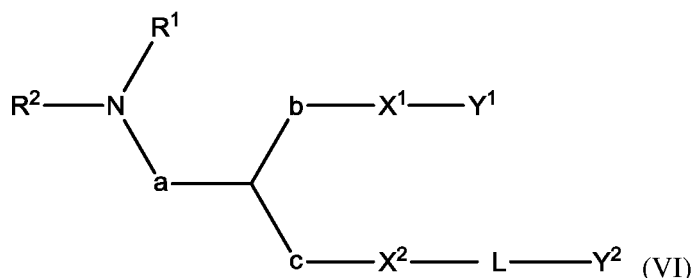
e es 0 o 1; y

f es 0 o 1;

30

con la condición de que L comprenda uno o más heteroátomos e Y^2 es un esteroide opcionalmente sustituido.

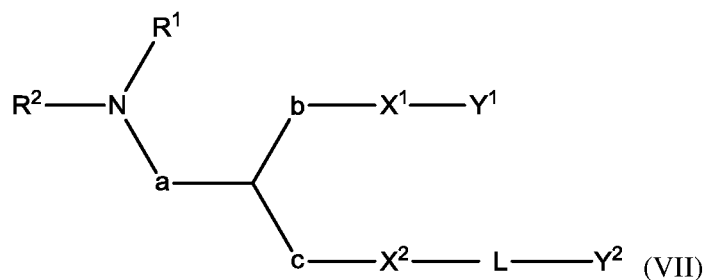
En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (VI):



en la que:

- 5 R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;
 a es metileno;
 b es metileno;
 c está ausente;
 X¹ es O;
 X² es O;
 10 Y¹ es alquenilo C₁₀₋₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀₋₃₀, heteroalquenilo C₁₀₋₃₀ o heteroalquinilo C₁₀₋₃₀;
 L es -L^c-, en la que L^c es heteroalquileno C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, heteroalquenileno C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅; e
 Y² es un esteroide opcionalmente sustituido.

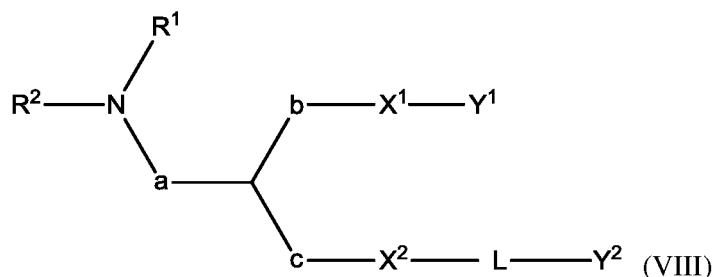
En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (VII):



15 en la que:

- 20 R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;
 a es metileno;
 b es metileno;
 c está ausente;
 X¹ es O;
 X² es O;
 Y¹ es un grupo alquenilo C₁₆₋₂₂ opcionalmente sustituido;
 L es -L^c-, en la que L^c es heteroalquileno C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, heteroalquenileno C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅; e
 25 Y² es un esteroide opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (VIII):

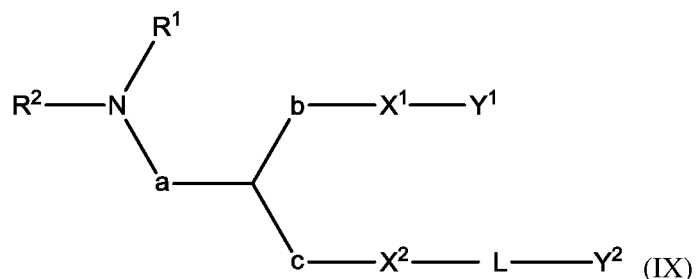


en la que:

- 30 R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;
 a es metileno;
 b es metileno;
 c está ausente;
 35 X¹ es O;
 X² es O;
 Y¹ es un grupo alquenilo C₁₆₋₂₂ opcionalmente sustituido;
 L es -L^c-, en la que L^c es heteroalquileno C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, heteroalquenileno C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅; e
 40 Y² es colesterol conectado a través del grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo esteroide A, estando ausente el

átomo de hidrógeno de dicho grupo hidroxil.

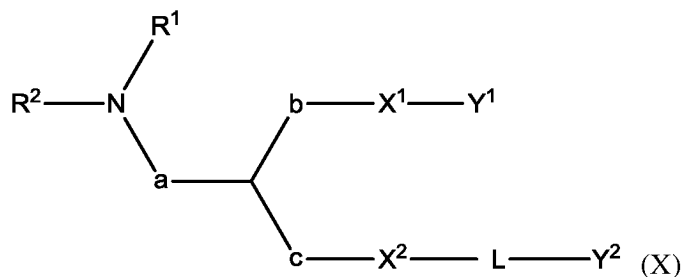
En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (IX):



en la que:

- 5 R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;
a es metileno;
b es metileno;
c está ausente;
- 10 X¹ es O o S;
X² es O o S;
Y¹ es alqueno C₁₀₋₃₀ opcionalmente sustituido, alquino C₁₀₋₃₀, heteroalqueno C₁₀₋₃₀ o heteroalquino C₁₀₋₃₀;
L es -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, en la que
- 15 L^a es alqueno C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₋₁₅, alquino C₁₋₁₅, heteroalqueno C₁₋₁₅, heteroalqueno C₁₋₁₅ o heteroalquino C₁₋₁₅;
L^b es arilo C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido o heteroarilo C₅₋₁₃;
L^c es alqueno C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₋₁₅, alquino C₁₋₁₅, heteroalqueno C₁₋₁₅, heteroalqueno C₁₋₁₅ o heteroalquino C₁₋₁₅;
d es 0 o 1;
e es 0 o 1; y
f es 0 o 1;
- 20 con la condición de que L comprenda uno o más heteroátomos,
Y² es un esteroide opcionalmente sustituido; y
el pKa del compuesto es de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 7.

25 En algunas realizaciones los compuestos de fórmula (I) tienen la fórmula (X):



en la que:

- 30 R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;
a es metileno;
b es metileno;
c está ausente;
X¹ es O o S;
X² es O o S;

Y¹ es alqueniilo C₁₀₋₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀₋₃₀, heteroalqueniilo C₁₀₋₃₀ o heteroalquinilo C₁₀₋₃₀;
L es -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, en la que

L^a es alquilenilo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquenileno C₁₋₁₅, alquinileno C₁₋₁₅, heteroalquilenilo C₁₋₁₅, heteroalquenileno C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅;

5 L^b es arileno C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido o heteroarileno C₅₋₁₃;

L^c es alquilenilo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquenileno C₁₋₁₅, alquinileno C₁₋₁₅, heteroalquilenilo C₁₋₁₅, heteroalquenileno C₁₋₁₅ o heteroalquinileno C₁₋₁₅;

d es 0 o 1;

e es 0 o 1; y

10 f es 0 o 1;

con la condición de que L comprenda uno o más heteroátomos,

Y² es un esteroide opcionalmente sustituido; y

el pKa del compuesto es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,2.

a, b y c

15 En una realización, a es alquilenilo C₁₋₂ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, a es alquilenilo C₁ opcionalmente sustituido.

En una realización, b es alquilenilo C₀₋₂ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, b es alquilenilo C₁ opcionalmente sustituido.

20 En una realización, c está ausente o es alquilenilo C₁ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, c está ausente.

En una realización, a, b y c son, si están presentes, no sustituidos.

El grupo de cabeza

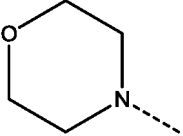
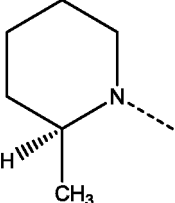
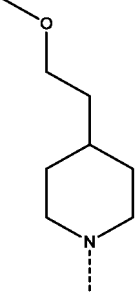
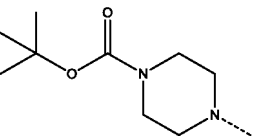
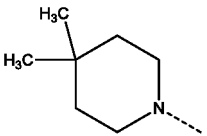
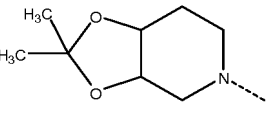
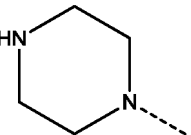
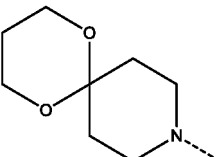
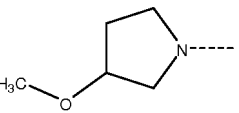
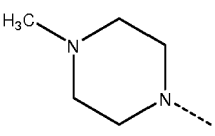
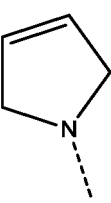
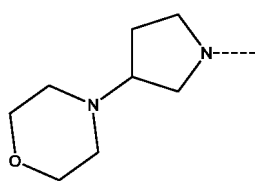
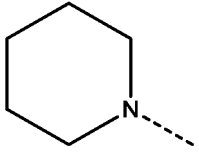
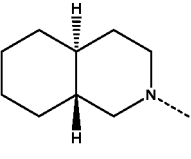
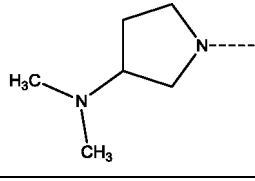
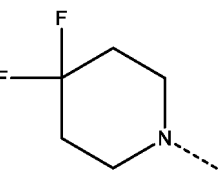
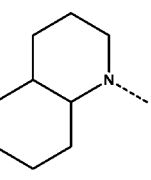
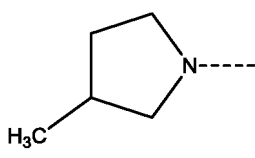
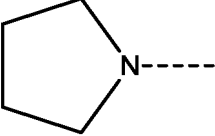
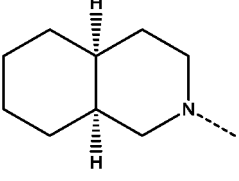
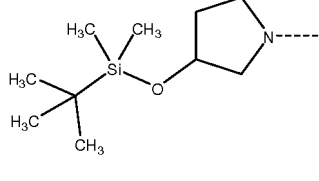
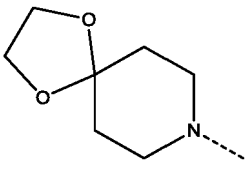
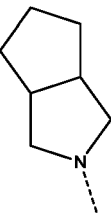
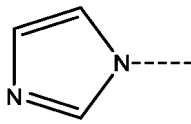
25 En una realización, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalqueniilo C₃₋₂₀, un grupo heterocicloalquinilo C₃₋₂₀, heteroarilo C₅ o un grupo heteroarilo C₆. En una realización, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalqueniilo C₃₋₂₀ o heterocicloalquinilo C₃₋₂₀. En una realización adicional, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido.

30 En una realización, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo C₅₋₁₆ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo C₅₋₁₂ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo C₅ opcionalmente sustituido, un grupo C₆ o un grupo C₇. En una realización adicional, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo C₅ o un grupo C₆ opcionalmente sustituidos.

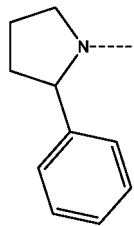
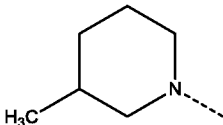
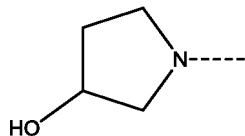
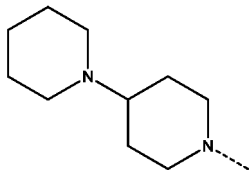
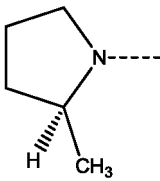
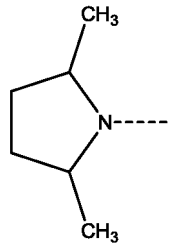
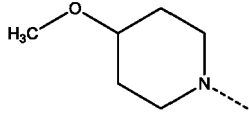
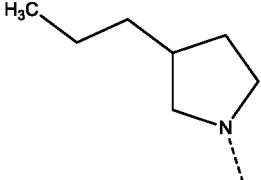
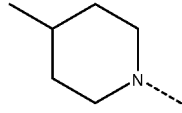
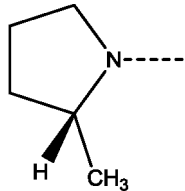
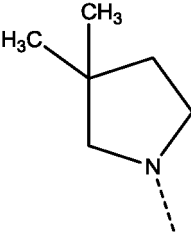
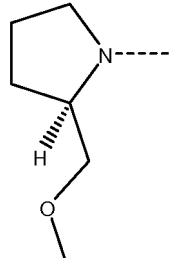
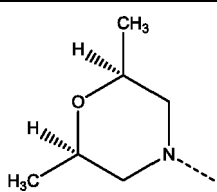
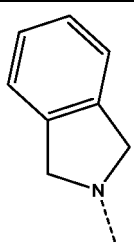
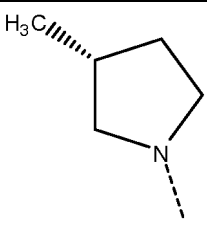
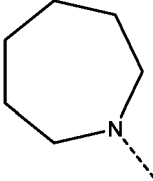
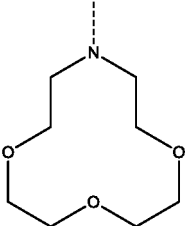
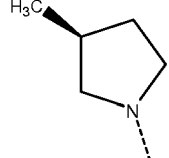
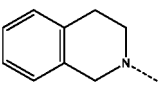
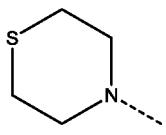
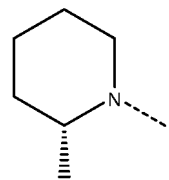
35 En una de las realizaciones preferidas de esta materia objeto desvelada, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman una especie que comprende al menos un átomo de oxígeno.

En una realización, R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos se seleccionan de H¹ a H⁴⁸ como se proporciona en la Tabla 1.

Tabla 1 - Restos nombrados H¹ a H⁴⁸

	Estructura		Estructura		Estructura
H ¹		H ¹⁷		H ³³	
H ²		H ¹⁸		H ³⁴	
H ³		H ¹⁹		H ³⁵	
H ⁴		H ²⁰		H ³⁶	
H ⁵		H ²¹		H ³⁷	
H ⁶		H ²²		H ³⁸	
H ⁷		H ²³		H ³⁹	
H ⁸		H ²⁴		H ⁴⁰	

(continuación)

	Estructura		Estructura		Estructura
H ⁹		H ²⁵		H ⁴¹	
H ¹⁰		H ²⁶		H ⁴²	
H ¹¹		H ²⁷		H ⁴³	
H ¹²		H ²⁸		H ⁴⁴	
H ¹³		H ²⁹		H ⁴⁵	
H ¹⁴		H ³⁰		H ⁴⁶	
H ¹⁵		H ³¹		H ⁴⁷	

(continuación)

	Estructura		Estructura		Estructura
H ¹⁶		H ³²		H ⁴⁸	

X¹ y X²

En una realización, X¹ es O. En otra realización, X² es O. En una realización adicional, tanto X¹ como X² son O.

Enlazador

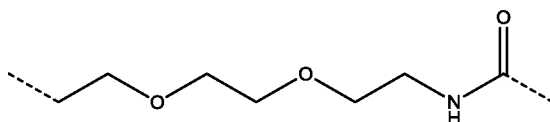
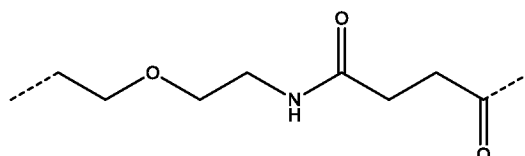
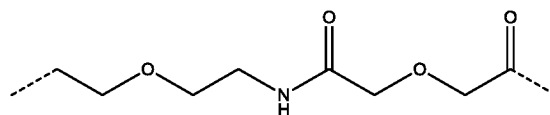
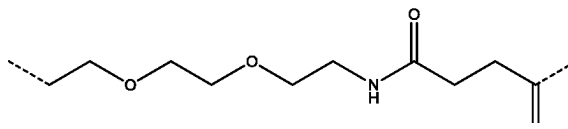
5 En una realización preferida, L comprende al menos un heteroátomo. Esto significa que la cadena que proporciona un enlace directo entre X² e Y² tiene al menos un heteroátomo o, en otras palabras, que cualquier heteroátomo en un sustituyente en L no cuenta para estos fines. En una realización adicional, L comprende al menos un átomo de O.

En una realización, L comprende al menos dos heteroátomos. En una realización adicional, L comprende al menos dos átomos de O.

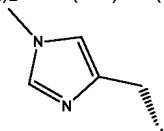
10 En una realización, L^c es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido o heteroalquileo C₁₋₁₅. En una realización, L^c es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido o heteroalquileo C₁₋₁₅ y d y e son ambos O.

En una realización, L^c se selecciona de una de las fórmulas L^{c-i} a L^{c-xxiii}. En una realización, L^c se selecciona de una de las fórmulas L^{c-i} a L^{c-xxiii} y d y e son ambos O.

- L^{c-i} -(CH₂)₂O(CH₂)₂-
- L^{c-ii} -(CH₂)₄-
- L^{c-iii} -CO(CH₂)₂CO-
- L^{c-iv} -CO-
- L^{c-v} -COCH₂OCH₂CO-
- L^{c-vi} -(CH₂)₂O(CH₂)₂NHCO-
- L^{c-vii} -(CH₂)₃O(CH₂)₃-
- L^{c-viii} -(CH₂)₂-
- L^{c-ix} -(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂-
- L^{c-x} -(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂-
- L^{c-xi}



L ^{C-xv}	-(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OCH(CH ₃)-
L ^{C-xvi}	-(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OC(=O)(CH ₂) ₂ CO-
L ^{C-xvii}	-(CH ₂) ₂ OC(=O)(CH ₂) ₂ CO-
L ^{C-xviii}	-(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OCO-
L ^{C-xix}	-(CH ₂) ₂ NHC(=O)CH ₂ OCH ₂ C(=O)-
L ^{C-xx}	-(CH ₂) ₂ NHC(=O)(CH ₂) ₂ C(=O)-
L ^{C-xxi}	-(CH ₂) ₂ NHC(=O)-
L ^{C-xxii}	-(CH ₂) ₂ NHC(=O)CH ₂ NHC(=O)-
L ^{C-xxiii}	-(CH ₂) ₂ NHC(=O)CH(cadena-lateral-1)NHC(=O)-, en la que cadena-lateral-1 representa el grupo



, representando la línea discontinua el enlace al resto de la molécula.

Ya que se prefieren los grupos en los que L comprende al menos un heteroátomo, L^c se selecciona preferentemente de L^{C-i}, L^{C-v} a L^{C-vii} y L^{C-ix} a L^{C-xxiii}.

En una realización, L^c es heteroalquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido.

5 En una realización, L^c es un grupo C₁₋₁₁ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, L^c es un grupo C₁₋₉ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, L^c es un grupo C₃₋₈ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, en la que L^c es un grupo C₄₋₇ opcionalmente sustituido. En una realización adicional, L^c es un grupo C₅, C₆ o C₇ opcionalmente sustituidos.

En una realización preferida, d es 0; e es 0 y f es 1. En una realización preferida, d es 0; e es 0 y f es 1 y L^c es, dentro de las longitudes de cadena expuestas anteriormente, heteroalquileo.

10 Y¹

En una realización, Y¹ es un grupo C₁₂₋₂₈. En una realización adicional, Y¹ es un grupo C₁₄₋₂₆. En una realización adicional, Y¹ es un grupo C₁₆₋₂₄. En una realización adicional, Y¹ es un grupo C₁₆₋₂₂. En una realización adicional, la cadena Y¹ tiene 18, 19, 20 o 21 átomos de largo.

Dentro de los intervalos de carbono expuestos anteriormente, Y¹ es preferentemente alqueno o heteroalqueno.

15 En una realización, Y¹ tiene al menos un grupo alqueno. En una realización adicional, Y¹ tiene 1, 2 o 3 grupos alqueno.

En una realización, Y¹ tiene un grupo alqueno en la posición omega-3. En otra realización, Y¹ tiene un grupo alqueno en la posición omega-6. En otra realización, Y¹ tiene un grupo alqueno en la posición omega-9. En una realización adicional, Y¹ tiene un grupo alqueno en dos o tres de las posiciones omega-3, omega-6 y omega-9. En una realización, Y¹ está insaturado en las posiciones omega-6 y omega-9. En otra realización, Y¹ está insaturado en las posiciones omega-3, omega-6 y omega-9. En una realización, Y¹ está insaturado en la posición omega-9.

20 En una realización, Y¹ tiene al menos un grupo alqueno insaturado cis. En una realización adicional, Y¹ tiene al menos dos grupos alqueno insaturados cis. En una realización adicional, Y¹ tiene al menos tres grupos alqueno insaturados cis. El al menos un grupo alqueno insaturado cis puede estar en una, dos o tres de las posiciones omega-3, omega-6 y omega-9. La insaturación de las cadenas lipídicas se analiza en MacLachlan y col., Journal of Controlled Release 107 (2005) 276-287.

25 En una realización Y¹ se selecciona de Y¹⁻ⁱ to Y^{1-vi} como se proporciona en la Tabla 2.

Tabla 2. Restos relacionados con Y1 nombrados Y¹⁻ⁱ a Y^{1-vi}

Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
Y ¹⁻ⁱ		Y ¹⁻ⁱⁱ	
Y ¹⁻ⁱⁱⁱ		Y ^{1-iv}	
Y ^{1-v}		Y ^{1-vi}	

Y²

En una realización, Y² está enlazado a L a través de un átomo de oxígeno en el esteroide opcionalmente sustituido.
 En una realización adicional, Y² está enlazado a L a través de un átomo de oxígeno en la posición 3 del anillo esteroide A.
 En una realización adicional Y² es un esteroide en el que el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo en la posición 3 del

anillo esteroide A se ha retirado (y la conexión a L es a través del átomo de oxígeno de dicho grupo hidroxilo).

En una realización dicho esteroide se selecciona del grupo que consiste en: anasterol; avenasterol; beta-sitosterol; brassicasterol; calciferol; campesterol; calinosterol; quinasterol; colestanol; colesterol; coprostanol; cicloartenol; deshidrocolesterol; desmosterol; dihidrocalciferol; dihidrocolesterol; dihidroergosterol; dinosterol; epicolesterol; ergosterol; fucosterol; hexahidrolumisterol; hexaol; hidroxicolesterol; lanosterol; lumisterol; parkeol; poriferasterol; saringosterol; sitostanol; sitosterol; estigmastanol; estigmasterol; weinbersterol; zimosterol; ácidos biliares de esteroide (tales como ácido cólico; ácido quenodesoxicólico; ácido glicocólico; ácido taurocólico; ácido desoxicólico y ácido litocólico); y sales de los mismos.

En una realización adicional, el esteroide es colesterol.

10 pKa

El pKa de un lípido es el pH al cual el 50 % de los lípidos están cargados, cayendo en el punto medio entre el punto en que los lípidos están completamente cargados y el punto en que los lípidos están completamente sin cargar. Puede medirse de diversas maneras, pero se mide preferentemente usando el procedimiento desvelado a continuación. El pKa debe medirse típicamente para el lípido solo en lugar de para el lípido en el contexto de una mezcla que también incluye otros lípidos (por ejemplo, no como se realiza en la referencia 2, que mira al pKa de un SNALP en lugar de los lípidos individuales).

El pKa de un lípido se mide en agua a temperatura y presión convencionales usando la siguiente técnica:

- se prepara solución de lípido en etanol 2 mM pesando el lípido y disolviendo en etanol. Se prepara solución 0,3 mM de ácido tolueno nitrosulfónico (TNS) de sonda fluorescente en etanol:metanol 9:1 fabricando en primer lugar solución 3 mM de TNS en metanol y después diluyendo a 0,3 mM con etanol.
- Un tampón acuoso que contiene fosfato sódico, citrato sódico, acetato sódico y cloruro sódico, a las concentraciones de 20 mM, 25 mM, 20 mM y 150 mM, respectivamente, se prepara. El tampón se divide en ocho partes y el pH se ajusta bien con HCl 12 N o NaOH 6 N a 4,44-4,52, 5,27, 6,15-6,21, 6,57, 7,10-7,20, 7,72-7,80, 8,27-8,33 y 10,47-11,12. Se mezclan 400 μ l de solución de lípido 2 mM y 800 μ l de solución de TNS 0,3 mM.
- 7,5 μ l de mezcla de sonda/lípido se añaden a 242,5 μ l de tampón en una placa de 96 pocillos de 1 ml. Esto se realiza con los ocho tampones. Después de mezclar, 100 μ l de cada mezcla de sonda/lípido/tampón se transfieren a una placa negra de 96 pocillos de fondo transparente de 250 μ l (por ejemplo, modelo COSTAR 3904, Corning).
- Se mide la fluorescencia de cada mezcla de sonda/lípido/tampón (por ejemplo, con un espectrofotómetro SpectraMax M5 y el software SoftMax pro 5.2) con excitación 322 nm, emisión 431 nm (auto corte a 420 nm).
- Después de la medición, el valor de fluorescencia de fondo de un pocillo vacío en la placa de 96 pocillos se resta a cada mezcla de sonda/lípido/tampón. Los valores de intensidad de fluorescencia se normalizan después al valor al pH más bajo. La intensidad de fluorescencia normalizada se representa después contra el pH y se proporciona una línea de mejor ajuste.
- Se encuentra el punto en la línea de mejor ajuste al cual la intensidad de fluorescencia normalizada es igual a 0,5. Se encuentra el pH que corresponde a la intensidad de fluorescencia normalizada igual a 0,5 y se considera el pKa del lípido.

Los mejores resultados inmunológicos se ven con lípidos que tienen un pKa en el intervalo de 5,0 a 7,6. Dentro de este intervalo de pKa, los lípidos preferidos tienen un pKa de 5,5 a 6,7, por ejemplo, entre 5,6 y 6,8, entre 5,6 y 6,3, entre 5,6 y 6,0, entre 5,5 y 6,2 o entre 5,7 y 5,9.

40 Compuestos específicos de fórmula (I)

Los compuestos específicos de fórmula (I) que son útiles con la materia objeto desvelada se desvelan en la referencia 8. Por ejemplo, el compuesto puede ser E0024, E0014, E0052, E0118, E0083, E0011, E0008, E0025, E0026, E0069, E0076, E0077, E0078, E0085 o E0088. El compuesto pueden ser los lípidos mostrados a continuación que se usaron en los liposomas "RV03" a "RV12" o en los liposomas "RV15". Los compuestos preferidos son E0026, E0069 y E0078. Los compuestos preferidos son los lípidos mostrados a continuación que se usaron en los liposomas "RV05", "RV08" y "RV09".

En una realización alternativa, en lugar de usar un compuesto de fórmula (I), un liposoma de la materia objeto desvelada usa el compuesto "RV02" (estructura mostrada a continuación). Excepto por esta sustitución, todos los demás aspectos de estos liposomas que contienen RV02 se describen en otra parte en el presente documento.

50 Fórmula (XI)

Los compuestos de fórmula (XI) son lipopéptidos catiónicos que comprenden una alquilamida N-terminal y de 2 a 10 aminoácidos. La Fórmula (XI) es:



en la que

R^a es alquilamida N-terminal

z es un número entero de 2 a 10;

5 cada AA es un aminoácido, con la condición de que estén presentes al menos una histidina y al menos un aminoácido catiónico;

R^b es -H, -OH o -NH₂.

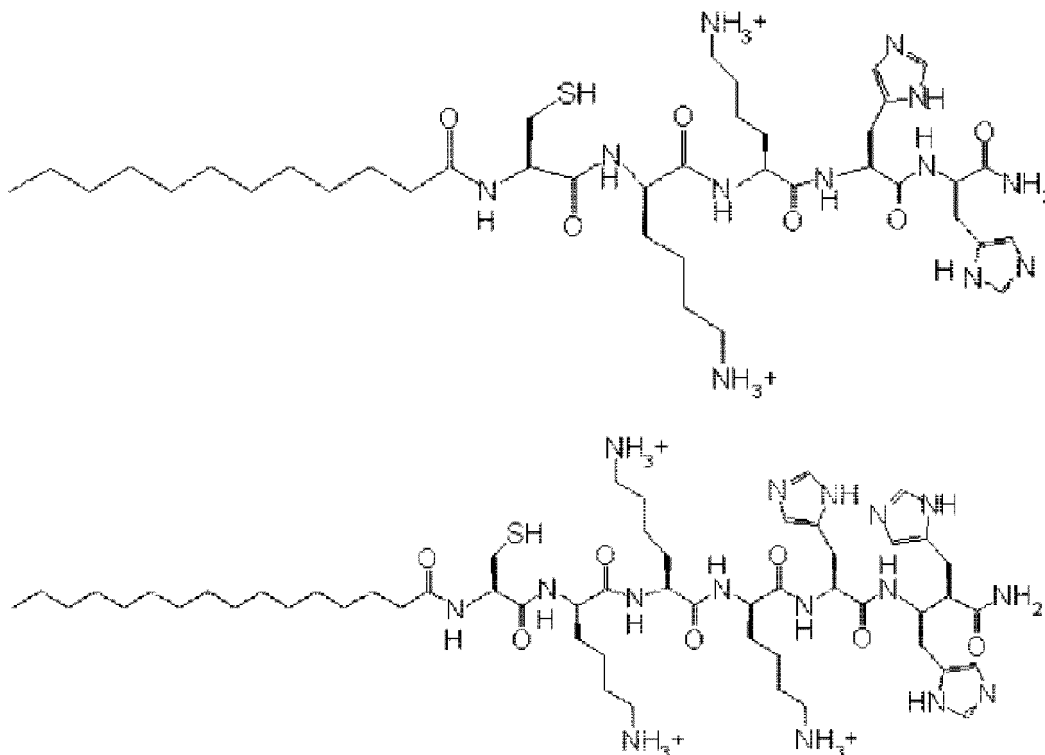
El resto R^a tiene la fórmula $R^c-C(O)-NR^d$ - en la que R^c es un alquilo C₂ a C₂₄ y R^d es -H o C a alquilo C₄. Los grupos R^c adecuados incluyen laurilo ('Lau'; C₁₂) y palmitoilo ('Pal'; C₁₆).

10 La amida del resto R^a se fija a una cadena de oligopéptido de 2 a 10 aminoácidos, por ejemplo, de 3-8 aminoácidos. Esta cadena incluye al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) histidina. También incluye al menos un aminoácido catiónico, por ejemplo, al menos un resto arginina, lisina u ornitina. Se prefiere la inclusión de al menos una lisina e idealmente 2 o 3 lisinas. La histidina se incluye porque su cadena lateral es débilmente básica y predominantemente no ionizada a pH fisiológico, pero está más altamente protonada en el ambiente débilmente ácido del endosoma. Un aminoácido catiónico, tales como lisina o arginina, proporciona una carga positiva unitaria en el lipopéptido a pH neutro.

15 Los oligopéptidos útiles tienen la secuencia de aminoácido -C-K_i-H_j- en la que: i es 1, 2 o 3; y j es 1, 2, 3, 4 o 5.

El C-terminal de la cadena de oligopéptido puede dejarse como -COOH o puede en su lugar formar una amida.

20 Los compuestos de fórmula (XI) pueden describirse en términos de su cadena de alquilo, su secuencia de aminoácidos y su grupo C-terminal. Por ejemplo, el lipopéptido "Lau-(C-K-H-H)-NH₂" tiene una cadena de laurilo N-terminal, después una cisteína, después lisina, después dos histidinas y una amina C-terminal. Los lipopéptidos adecuados de fórmula (XI) incluyen de esta manera, pero no se limitan a: Lau-(C-K-K-H)-NH₂, Pal-(C-K-H-H)-NH₂, Pal-(C-K-K-H-H)-NH₂, Pal-(C-K-K-H-H-H)-NH₂, Pal-(C-K-K-H-H-H-H)-NH₂, Pal-(C-K-K-H-H-H-H-H)-NH₂, Pal-(C-K-K-K-H-H)-NH₂ y Pal-(C-K-K-K-H-H-H)-NH₂. Estos y otros compuestos se desvelan en la referencia 9 e incluyen:



25

El ARN

Los liposomas de la materia objeto desvelada incluyen una molécula de ARN que (a diferencia del ARNip, como en la referencia 2) codifica un polipéptido. 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 polipéptido *in situ*.

30 El ARN es de cadena + y de esta manera puede traducirse por las células sin necesidad de que intervenga ninguna etapa de replicación tales como la transcripción inversa. También puede unirse a receptores TLR7 expresados por las células inmunes, iniciando de esta manera un efecto adyuvante que es útil para los fines de inmunización.

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

Un sistema adecuado para lograr la auto-replicación es el uso de un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones de cadena + se traducen después del suministro a una célula para dar una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de cadena - genómica del ARN suministrado de cadena +. Estos transcritos de cadena - pueden transcribirse ellos mismos para dar copias adicionales del ARN parental de cadena + y también para dar un transcrito subgenómico que codifica el polipéptido de interés. La traducción del transcrito subgenómico conduce de esta manera a la expresión *in situ* del polipéptido por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de un virus sindbis, un virus del bosque semliki, un virus de encefalitis equina oriental, un virus de encefalitis equina venezolana, etc. Pueden usarse secuencias de virus mutantes o de tipo silvestre, por ejemplo, se ha usado en replicones el mutante TC83 atenuado del VEEV [10].

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

Mientras que los genomas de alfavirus naturales codifican proteínas de virión estructurales además de la poliproteína de replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN auto-replicante de la materia objeto desvelada no codifique proteínas estructurales de alfavirus. De esta manera un ARN auto-replicante preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contienen ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN auto-replicante no puede perpetuarse a sí misma en forma infecciosa. Las proteínas estructurales del alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus de tipo silvestre están ausentes en los ARN auto-replicantes de la materia objeto desvelada y su lugar lo toma el gen o genes que codifican el polipéptido de interés, de tal manera que el transcrito subgenómico codifica ese polipéptido en lugar de las proteínas estructurales del virión de alfavirus.

Por lo tanto una molécula de ARN auto-replicante útil con la materia objeto desvelada puede tener dos marcos de lectura abiertos. El primer marco de lectura abierto (5') codifica una replicasa; el segundo marco de lectura abierto (3') codifica un polipéptido de interés. En algunas realizaciones el ARN puede tener marcos de lectura abiertos adicionales (por ejemplo, en dirección 3'), por ejemplo, para codificar polipéptidos de interés adicionales (véase a continuación) o para codificar polipéptidos accesorios.

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

Las moléculas de ARN auto-replicantes pueden tener diversas longitudes pero normalmente tienen una longitud de 5.000-25.000 nucleótidos, por ejemplo, 8.000-15.000 nucleótidos o 9.000-12.000 nucleótidos. De esta manera el ARN es más largo que el que se ve en la administración de ARNip.

Una molécula de ARN útil con la materia objeto desvelada puede tener una caperuza 5' (por ejemplo, una 7-metilguanósina). Esta caperuza puede mejorar la traducción *in vivo* del ARN.

El nucleótido 5' de una molécula de ARN útil con la materia objeto desvelada puede tener un grupo trifosfato 5'. En un ARN protegido con caperuza este puede unirse a una 7-metilguanósina a través de un puente de 5' a 5'. Un trifosfato 5' puede potenciar la unión de RIG-I y, por lo tanto, promover efectos adyuvantes.

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

Una molécula de ARN útil con la materia objeto desvelada será típicamente monocatenaria. Los ARN monocatenarios pueden iniciar generalmente un efecto adyuvante uniéndose a TLR7, TLR8, helicasas de ARN y/o PKR. El ARN administrado en forma bicatenaria (ARNbc) puede unirse a TLR3 y este receptor puede activarse también por ARNbc que se forma bien durante la replicación de un ARN monocatenario o bien dentro de la estructura secundaria de un ARN monocatenario.

Una molécula de ARN útil con la materia objeto desvelada puede prepararse convenientemente mediante transcripción

in vitro (TIV). La TIV puede usar un molde (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias o creado sintéticamente (por ejemplo, por síntesis génica y/o procedimientos de diseño por ingeniería de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, puede usarse una polimerasa de ARN dependiente de ADN (tal como las polimerasas de ARN del bacteriófago T7, T3 o SP6) para transcribir el ARN a partir de un molde de ADN. Las reacciones de protección con caperuza y de adición de poli-A apropiadas pueden usarse según se requiera (aunque la poli-A del replicón está codificada habitualmente dentro del molde de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener requisitos de rigurosidad para el nucleótido o nucleótidos transcritos 5' y en algunas realizaciones estos requisitos deben coincidir con los requisitos de la replicasa codificada, para asegurar que el ARN transcrito por TIV pueda funcionar eficientemente como un sustrato para su replicasa auto-codificada.

Como se analiza en la referencia 11, el ARN auto-replicante puede incluir (además de cualquier estructura de caperuza 5') uno o más nucleótidos que tengan una nucleobase modificada. De esta manera el ARN puede comprender m5C (5-metilcitosina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina); m2A (2-metiladenosina); Am (2'-O-metiladenosina); ms2m6A (2-metil-2'-O-metiladenosina); i6A (N6-isopenteniladenosina); ms2i6A (2-metil-2'-O-metiladenosina); io6A (N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms2io6A (2-metil-2'-O-metiladenosina); g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina); t6A (N6-treonilcarbamoiladenosina); ms2t6A (2-metil-2'-O-metiladenosina); m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina); hn6A (N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); ms2hn6A (2-metil-2'-O-metiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m11 (1-metilinosina); m'Im (1,2'-O-dimetilinosina); m3C (3-metilcitosina); Cm (2'-O-metilcitosina); s2C (2-tiocitosina); ac4C (N4-acetilcitosina); f5C (5-formilcitosina); m5Cm (5,2'-O-dimetilcitosina); ac4Cm (N4-acetil-2'-O-metilcitosina); k2C (lisidina); m1G (1-metilguanosina); m2G (N2-metilguanosina); m7G (7-metilguanosina); Gm (2'-O-metilguanosina); m22G (N2,N2-dimetilguanosina); m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanosina); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosina); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)); iW (wibutosina); o2iW (peroxiwibutosina); OHiW (hidroxiwibutosina); OHiW* (hidroxiwibutosina sin modificar); imG (wiosina); mimG (metilguanosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galtactosilqueuosina); manQ (mannosilqueuosina); preQo (7-ciano-7-deazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-deazaguanosina); G* (arqueosina); D (dihidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp3U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho5U (5-hidroxiuridina); mo5U (5-metoxiuridina); cmo5U (ácido uridin 5-oxiacético); mcmo5U (éster metílico del ácido uridin 5-oxiacético); chm5U (5-carboxihidroximetiluridina); mchm5U (éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)uridina); mcm5U (5-metoxycarbonilmetiluridina); mcm5Um (S-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm5U (5-metilaminometiluridina); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetiluridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina); cmnm5Um (5-carboximetilaminometil-2'-L-O-metiluridina); cmnm5s2U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m62A (N6,N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitosina); m4Cm (N4,2'-O-dimetilcitosina); hm5C (5-hidroximetilcitosina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carboximetiluridina); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosina); m62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosina); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosina); m3Um (3,2'-O-dimetiluridina); m5D (5-metildihidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitosina); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m'Am (1,2-O-dimetil adenosina) irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina); imG-14 (4-desmetil guanosina); imG2 (isoguanosina); o ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxoadenina, derivados 7 sustituidos de los mismos, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C1-C6)-alquiluracilo, 5-metiluracilo, 5-(C2-C6)-alqueniluracilo, 5-(C2-C6)-alquiluracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(C1-C6)-alquilcitosina, 5-metilcitosina, 5-(C2-C6)-alquenilcitosina, 5-(C2-C6)-alquilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 7-desazaguanina, 8-azaguanina, guanina 7-desaza-7-sustituida, 7-desaza-7-(C2-C6)alquilguanina, guanina 7-desaza-8-sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-desazapurina sustituida, purina 7-desaza-7-sustituida, purina 7-desaza-8-sustituida o un nucleótido abásico. Por ejemplo, un ARN auto-replicante puede incluir una o más nucleobases de pirimidina modificadas, tales como restos de pseudouridina y/o 5-metilcitosina. En algunas realizaciones, sin embargo, el ARN incluye nucleobases no modificadas y puede incluir nucleótidos no modificados, es decir, todos los nucleótidos en el ARN son los ribonucleótidos convencionales A, C, G y U (excepto para cualquier estructura de caperuza 5', que puede incluir una 7'-metilguanosina). En otras realizaciones, el ARN puede incluir una caperuza 5' que comprende una 7'-metilguanosina y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

Un ARN usado con la materia objeto desvelada incluye de forma ideal solamente enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, pero en algunos casos puede contener enlaces fosforamido, fosforotioato y/o metilfosfonato.

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

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

El polipéptido de interés codificado

Las moléculas de ARN usadas con la materia objeto desvelada codifican un polipéptido de interés. Después de la administración de los liposomas el ARN se traduce *in vivo* y la proteína resultante puede ejercer su efecto deseado, por ejemplo, puede provocar una respuesta inmune en el receptor o puede proporcionar una función de interés, tales como una actividad enzimática.

- 5 La molécula de ARN puede codificar un único polipéptido de interés o múltiples polipéptidos. Múltiples polipéptidos pueden presentarse como un único polipéptido (polipéptido de fusión) o como polipéptidos separados. Si los polipéptidos se expresan como polipéptidos separados a partir de un replicón entonces uno o más de estos pueden proporcionarse con un IRES o un elemento promotor vírico adicional en dirección 5'. Alternativamente, pueden expresarse múltiples polipéptidos a partir de una poli proteína que codifica un polipéptido individual fusionado a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo, la proteína 2A del virus de la glosopeda), o como inteínas.

10 A diferencia de las referencias 1 y 12, el ARN codifica un polipéptido con una función *in vivo* útil. Para disipar cualquier duda, la materia objeto desvelada no abarca ARN que codifica una luciferasa de luciérnaga o que codifica una proteína de fusión de la β -galactosidasa de *E.coli* o que codifica una proteína fluorescente verde (GFP). Tales polipéptidos pueden ser útiles como marcadores pero la materia objeto desvelada se refiere a la administración de ARN para la expresión *in vivo* de un polipéptido que puede proporcionar una respuesta terapéutica o inmunológica útil. Además, el ARN no es un ARN de timo de ratón total.

Inmunógenos

20 En algunas realizaciones el ARN codifica un inmunógeno polipeptídico. Después de la administración de los liposomas el ARN se traduce *in vivo* y el inmunógeno puede provocar una respuesta inmune en el receptor. El inmunógeno puede provocar una respuesta inmune 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 inmune puede comprender una respuesta inmune (habitualmente incluyendo IgG) y/o una respuesta inmune mediada por células. El inmunógeno polipeptídico provocará típicamente una respuesta inmune que reconoce el polipéptido bacteriano, vírico, fúngico o parasítico (o del alérgeno o del tumor), pero en algunas realizaciones el polipéptido puede actuar como un mimótopo para provocar una respuesta inmune que reconoce un sacárido bacteriano, vírico, fúngico o parasítico. El inmunógeno será típicamente un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glucoproteína de envuelta, una glucoproteína de púa, etc.

En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmune contra una de estas bacterias:

30 *Neisseria meningitidis*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, proteínas de membrana tales como adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro y proteína de unión a factor H. Una combinación de tres polipéptidos útiles se desvela en la referencia 13.

35 *Streptococcus pneumoniae*: los inmunógenos polipeptídicos útiles se desvelan 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 quinasa StkP (SP1732) y adhesina de superficie neumocócica PsaA.

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

Moraxella catarrhalis.

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

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

Clostridium tetani: el inmunógeno típico es el toxoide tetánico.

45 *Cornynebacterium diphtheriae*: el inmunógeno típico es el toxoide diftérico.

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

Pseudomonas aeruginosa

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

Chlamydia trachomatis: Los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, similares a OmpH, L7/I12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (por ejemplo, como se desvela 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 desvelados en la referencia 23.

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

5 *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/septicemia (MNEC). Los inmunógenos polipeptídicos de UPEC útiles se desvelan en las referencias 25 y 26. Los inmunógenos polipeptídicos útiles de MNEC se desvelan en la referencia 27. Un inmunógeno útil de varios tipos de *E. coli* es AcfD [28].

Bacillus anthracis

Yersinia pestis: Los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, aquellos desvelados en las referencias 29 y 30.

15 *Staphylococcus epidermis*

Clostridium perfringens o *Clostridium botulinum*

Legionella pneumophila

Coxiella burnetii

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

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

Neisseria gonorrhoeae

Treponema pallidum

Haemophilus ducreyi

Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*

25 *Staphylococcus saprophyticus*

Yersinia enterocolitica

Mycobacterium tuberculosis

Rickettsia

Listeria monocytogenes

30 *Vibrio cholerae*

Salmonella typhi

Borrelia burgdorferi

Porphyromonas gingivalis

Klebsiella

35 En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmune contra uno de estos virus:

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

40 *Virus Paramyxoviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de Pneumovirus (por ejemplo, virus sincitial respiratorio, VSR), Rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), Paramyxovirus (por ejemplo, virus paragripal), Metapneumovirus y Morbillivirus (por ejemplo, virus del sarampión).

- Poxviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de *Orthopoxvirus* tales como *Variola vera*, incluyendo pero no limitados a, *Variola major* y *Variola minor*.
- 5 *Picornavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de Picornavirus, tales como Enterovirus, Rhinovirus, Heparnavirus, Cardiovirus y Aphtovirus. 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 coxsackie A o B.
- Bunyavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un *Orthobunyavirus*, tales como el virus de la encefalitis de California, un *Phlebovirus*, tales como el virus de la fiebre del Valle del Rift o un *Nairovirus*, tales como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea y el Congo.
- 10 *Heparnavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Heparnavirus, tales como el virus de la hepatitis A (VHA).
- Filovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un filovirus, tales como un virus del Ébola (incluyendo un virus del ébola de Zaire, de Costa de Marfil, de Reston o de Sudán) o un virus de Marburgo.
- 15 *Togavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Togavirus, tales como un Rubivirus, un Alphavirus o un Arterivirus. Esto incluye el virus de la rubeola.
- Flavivirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Flavivirus, tales como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), el virus del Dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), el virus de la Fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus del Bosque Kyasanur, el virus de la encefalitis del Nilo Occidental, el virus de la Encefalitis de St. Louis, el virus de la encefalitis de primavera-verano de Rusia, el virus de la encefalitis de Powassan.
- 20 *Pestivirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Pestivirus, tales como la diarrea vírica bovina (BVDV), la fiebre porcina clásica (VFPC) o la enfermedad de Border (VEB).
- Hepadnavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Heparnavirus, tales como el virus de la Hepatitis B. Una composición puede incluir un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (AgsHB).
- 25 *Otros virus de la hepatitis*: Una composición puede incluir un inmunógeno de un virus de la hepatitis C, un virus de la hepatitis delta, un virus de la hepatitis E o un virus de la hepatitis G.
- Rhabdovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Rhabdovirus, tales como un Lyssavirus (por ejemplo, un virus de la rabia) y Vesiculovirus (VSV).
- 30 *Caliciviridae*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de Caliciviridae, tales como el virus Norwalk (Norovirus) y virus parecidos a Norwalk, tales como el Virus de Hawai y el Virus de la montaña nevada.
- Coronavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un coronavirus SARS, bronquitis infecciosa aviaria (IBV), virus de la hepatitis de ratón (VHR) y virus de la gastroenteritis transmisible porcina (VGTP). El inmunógeno de coronavirus puede ser un polipéptido de púa.
- 35 *Retrovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Oncovirus, un Lentivirus (por ejemplo, HIV-1 o HIV-2) o un Spumavirus.
- Reovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Orthoreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus o un Coltivirus.
- 40 *Parvovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados del Parvovirus B19.
- Herpesvirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un herpesvirus humano, tales como, únicamente a modo de ejemplo, Virus del Herpes Simple (VHS) (por ejemplo, VHS tipos 1 y 2), Virus de la varicela zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), Citomegalovirus (CMV), Herpesvirus humano 6 (HVH6), Herpesvirus humano 7 (HVH7) y Herpesvirus humano 8 (HVH8).
- 45 *Papovavirus*: Los inmunógenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de los Papillomavirus y Polyomavirus. El papillomavirus (humano) puede ser del serotipo 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 o 65, por ejemplo, de uno o más de los serotipos 6, 11, 16 y/o 18.
- Adenovirus*: Los inmunógenos víricos incluyen aquellos derivados del serotipo 36 de adenovirus (ad-36).
- 50 En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmune contra un virus que infecta a peces, tales

como: virus de la anemia infecciosa de salmón (VAIS), virus de la enfermedad pancreática de salmón (VEPS), virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), virus del bagre de canal (VBC), virus de la enfermedad de linfocistis de pescado (VELP), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), herpesvirus koi, virus tipo picorna de salmón (también conocido como virus tipo picorna del salmón atlántico), virus del salmón encerrado (VSE), rotavirus del salmón atlántico (RSA), virus de la enfermedad de la fresa de trucha (EFT), virus del tumor de salmón coho (VTSC) o virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV).

Los inmunógenos fúngicos pueden derivar de Dermatophytes, incluyendo: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium audouini*, *Microsporium canis*, *Microsporium distortum*, *Microsporium equinum*, *Microsporium gypsum*, *Microsporium 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 apiosperum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffe*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Mortierella* spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaee* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp y *Cladosporium* spp.

En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmune contra un parásito del género *Plasmodium*, tales como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. De esta manera la materia objeto desvelada puede usarse para inmunizar contra la malaria. En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmune contra un parásito de la familia *Caligidae*, particularmente aquellos de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus*, por ejemplo, el piojo de mar tales como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.

En algunas realizaciones el inmunógeno provoca una respuesta inmune contra: alérgenos de polen (alérgenos de polen de árbol, de hierba, de malas hiervas y de césped); alérgenos de insecto o arácnido (alérgenos inhalantes, de saliva y de veneno, por ejemplo, alérgenos de los ácaros, alérgenos de las cucarachas y de los jejenes, alérgenos de veneno de himenópteros); alérgenos del pelo y la caspa de animales (por ejemplo, de perro, gato, caballo, rata, ratón, etc.); y alérgenos alimentarios (por ejemplo, una gliadina). Los alérgenos del polen importantes de árboles, céspedes y hierbas son tales que se originan de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y platanaceae incluyendo, pero no limitados a, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano de sombra (*Platanus*), el orden de las Poales incluyendo céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de las Asterales y Urticales incluyendo hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros alérgenos de inhalación importantes son aquellos de los ácaros del polvo del hogar de los géneros *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros del almacenaje, por ejemplo, *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, aquellos de las cucarachas, los jejenes y las pulgas, por ejemplo, *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides* y aquellos de mamíferos tales como gato, perro y caballo, alérgenos de veneno incluyendo aquellos que se originan de insectos que pican o muerden tales como aquellos del orden taxonómico de los Hymenoptera incluyendo abejas (*Apidae*), avispas (*Vespidae*) y hormigas (*Formicoidea*).

En algunas realizaciones el inmunógeno es un antígeno de tumor seleccionado de: (a) antígenos del cáncer de testículos tales como NYESO-1, SSX2, SCP1 así como RAGE, BAGE, GAGE y polipéptidos de la familia MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que pueden usarse, por ejemplo, para abordar melanoma, tumores de pulmón, cabeza y cuello, CPCNM, mama, gastrointestinal y de vejiga); (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado a diversos tumores sólidos, por ejemplo, colorrectal, de pulmón, cáncer de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado a, por ejemplo, melanoma, cáncer pancreático y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado a, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado a, por ejemplo, melanoma), caspasa-8 (asociado a, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado a, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina (asociada a, por ejemplo, melanoma), TCR (asociado a, por ejemplo, linfoma de linfocitos T no Hodgkiniano), BCR-abl (asociado a, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), trifosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT; (c) antígenos sobre-expresados, por ejemplo, Galectina 4 (asociada a, por ejemplo, cáncer colorrectal), Galectina 9 (asociada a, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada a, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociado a, por ejemplo, diversas leucemias), anhidrasa carbónica (asociada a, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociada a, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociado a, por ejemplo, melanoma), HER-2/neu (asociado a, por ejemplo, cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), mamaglobina, alfa-fetoproteína (asociada a, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociado a, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada a, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica de la telomerasa, MUC-1 (asociado a, por

ejemplo, cáncer de mama y ovario), G-250 (asociado a, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado a, por ejemplo, cáncer de mama, colon) y antígeno carcinoembrionario (asociado a, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal tales como cáncer colorrectal); (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanoma-melanocito tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimuladora de melanocitos, tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa-1/TRP1 y proteína relacionada con tirosinasa-2/TRP2 (asociado a, por ejemplo, melanoma); (e) antígenos asociados a próstata, tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados a por ejemplo, cáncer de próstata; (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados a mieloma y linfomas de células B, por ejemplo). En ciertas realizaciones, los inmunógenos de tumor incluyen, pero no se limitan a, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del virus del papiloma humano (VPH), incluyendo E6 y E7, antígenos del virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de células T humano, 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.

Terapia génica

En algunas realizaciones el ARN codifica un polipéptido que es útil en un contexto de terapia génica. Esta proteína codificada se proporciona además de cualquier polipéptido que se codifica para una capacidad del ARN de auto-replicarse. De esta manera el ARN puede codificar una enzima (por ejemplo, una enzima que no se une al ARN), una citocina, un receptor transmembrana, un canal iónico, una hormona, una proteína de sangre o un anticuerpo. El ARN codifica preferentemente un polipéptido humano en estas categorías.

Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a: ADN polimerasa alfa, ADN polimerasa delta,

las Citocinas de interés incluyen, pero no se limitan a: interleucina 1; interleucina 2; interleucina 4; interleucina 6; interleucina 7; interleucina 12; interleucina 17; GM-CSF; G-CSF; TNF-alfa; interferón alfa; interferón beta; interferón gamma; y secretoneurina.

Los receptores de interés incluyen, pero no se limitan a: el receptor de leptina; el receptor de lipoproteína de baja densidad; el receptor de tipo 2 de la proteína morfogenética ósea; el receptor de TNF; el receptor de la hormona liberadora de gonadotropina; el receptor de dopamina; el receptor de somatostatina; el receptor de vitamina D; el receptor del activador de plasminógeno uroquinasa; el receptor de transferrina; etc.

Los canales iónicos de interés incluyen, pero no se limitan a: HCN2; HCN4; CFTR; la subunidad α del canal Maxi-K; KCNQ2; KCNQ3; y Kv1.5.

Las hormonas de interés incluyen, pero no se limitan a: gonadotropina coriónica; corticotropina; eritropoyetina; glucagones; IGF-1; oxitocina; factor de crecimiento derivado de plaquetas; calcitonina; hormona estimulante del folículo; hormona luteinizante; hormona estimulante de la tiroides; insulina; hormona liberadora de gonadotropina; vasopresina; somatostatina; prolactina; hormona adrenocorticotropa; hormona antidiurética; hormona liberadora de tirotropina; octreótido; hormona de crecimiento humana; relaxina; hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; calcitrol; calciferol; péptido atrial natriurético; gastrina; secretina; colecistoquinina; leptina; neuropéptido Y; grelina; angiotensinógeno; dopamina; y trombopoyetina. Cuando una hormona requiere múltiples subunidades de polipéptido para la actividad, el ARN puede codificar una o más de tales subunidades, por ejemplo, el ARN puede codificar la subunidad alfa y/o la subunidad beta de la hormona estimulante del folículo.

Las proteínas de la sangre de interés incluyen, pero no se limitan a: hemoglobina; fibrinógeno; factor VII; factor VIIa; factor VIII; factor IX; fibrinógeno; trombina; factor de von Willebrand.

Composiciones farmacéuticas

Los liposomas de la materia objeto desvelada son útiles como componentes en las composiciones farmacéuticas para inmunizar sujetos contra diversas enfermedades. Estas composiciones incluirán típicamente un vehículo farmacéuticamente aceptable además de los liposomas. Una descripción exhaustiva de los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 31.

Una composición farmacéutica de la materia objeto desvelada puede incluir uno o más inmunopotenciadores de moléculas pequeñas. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (por ejemplo, Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (por ejemplo, un aminoalquil glucosaminida fosfato, tales como E6020), un agonista de TLR7 (por ejemplo, imiquimod), un agonista de TLR8 (por ejemplo, resiquimod) y/o un agonista de TLR9 (por ejemplo, IC31). Cualquiera de tales agonistas tiene idealmente un peso molecular de <2000 Da. En algunas realizaciones tal agonista o agonistas también se encapsulan con el ARN dentro de los liposomas, pero en otras realizaciones están sin encapsular.

Las composiciones farmacéuticas de la materia objeto desvelada pueden incluir los liposomas en agua corriente (por

ejemplo, a.p.i.) o en un tampón, por ejemplo, un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón histidina o un tampón citrato. Las sales de tampón se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20 mM.

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

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

10 Las composiciones de la materia objeto desvelada pueden incluir quelantes de iones metálicos. Estos pueden prolongar la estabilidad del ARN retirando iones que pueden acelerar la hidrólisis del fosfodiéster. De esta manera una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, etc. Tales quelantes están típicamente presentes entre 10-500 μ M, por ejemplo, 0,1 mM. Una sal de citrato, tal como citrato sódico, también puede actuar como un quelante, mientras que, ventajosamente, también proporciona actividad tamponante.

Las composiciones farmacéuticas de la materia objeto desvelada 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 materia objeto desvelada pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefieren las composiciones libres de mercurio y pueden prepararse vacunas libres de conservantes.

Las composiciones farmacéuticas de la materia objeto desvelada son preferentemente estériles.

20 Las composiciones farmacéuticas de la materia objeto desvelada son preferentemente no pirogénicas, por ejemplo, contienen <1 UE (unidad de endotoxinas, una medida convencional) por dosis y preferentemente $<0,1$ UE por dosis.

Las composiciones farmacéuticas de la materia objeto desvelada son preferentemente libres de gluten.

Las composiciones farmacéuticas de la materia objeto desvelada pueden prepararse 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, de aproximadamente 0,5 ml.

25 Las composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones o suspensiones. La composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, mediante un inhalador, usando un pulverizador fino. La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como un pulverizador o gotas. Son típicos los inyectables para administración intramuscular.

30 Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de liposomas, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo del estado de salud y físico del individuo que se vaya a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se vaya a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica por parte del médico tratante y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de pruebas rutinarias. El contenido de liposoma y de ARN de las composiciones de la materia objeto desvelada se expresará generalmente 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), pero la expresión puede verse a niveles mucho más bajos, por ejemplo, ≤ 1 μ g/dosis, ≤ 100 ng/dosis, ≤ 10 ng/dosis, ≤ 1 ng/dosis, etc.

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

Los liposomas de la materia objeto desvelada no contienen ribosomas.

45 **Procedimientos de tratamiento y usos médicos**

En contraste a las partículas desveladas en la referencia 12, los liposomas y las composiciones farmacéuticas de la materia objeto desvelada son para su uso *in vivo* para provocar una respuesta inmune contra un inmunógeno de interés, o para terapia génica.

50 La materia objeto desvelada proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmune en un vertebrado que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un liposoma o una composición farmacéutica de la materia objeto desvelada. La respuesta inmune es preferentemente protectora y preferentemente implica inmunidad mediada por anticuerpos y/o células. El procedimiento puede generar una respuesta reforzadora.

La materia objeto desvelada también proporciona un liposoma o una composición farmacéutica de la materia objeto desvelada para su uso en un procedimiento para generar una respuesta inmune en un vertebrado.

La materia objeto desvelada también proporciona un liposoma o una composición farmacéutica de la materia objeto desvelada para su uso en un procedimiento de terapia génica en un vertebrado.

- 5 La materia objeto desvelada también proporciona el uso de un liposoma de la materia objeto desvelada para la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmune en un vertebrado.

Al generar una respuesta inmune en el mamífero mediante estos usos y procedimientos, el vertebrado puede protegerse contra diversas enfermedades y/o infecciones, por ejemplo, contra enfermedades bacterianas y/o víricas como se analiza anteriormente. Los liposomas y las composiciones son inmunogénicas y son más preferentemente composiciones de vacuna. Las vacunas de acuerdo con la materia objeto desvelada pueden ser o bien 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, tales como un ser humano o un mamífero veterinario grande (por ejemplo, caballos, vacas, ciervos, cabras, cerdos). Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad, etc.

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

20 Las composiciones de la materia objeto desvelada se administrarán en general directamente a un paciente. La administración directa puede lograrse mediante 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 materia objeto desvelada). Las vías de administración alternativas incluyen rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverización), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosal. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero también puede usarse alternativamente la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

25 La materia objeto desvelada puede usarse para desencadenar inmunidad sistémica y/o mucosal, preferentemente para desencadenar una inmunidad sistémica y/o mucosal mejorada.

30 La dosificación puede ser una pauta en una sola dosis o una pauta en múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta multidosis las diversas dosis pueden administrarse por vías iguales o diferentes, por ejemplo, un cebado parenteral y un refuerzo mucosal, un cebado mucosal y un refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples se administrarán típicamente al menos con 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). En una realización, pueden administrarse dosis múltiples aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del nacimiento, por ejemplo, a la edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se usa a menudo en el Programa Ampliado de Inmunización ("EPI") de la Organización Mundial de la Salud. En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias con una diferencia de aproximadamente dos meses, por ejemplo, con una diferencia de aproximadamente 7, 8 o 9 semanas, seguidas de una o más dosis de refuerzo de aproximadamente 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, por ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias con una diferencia de aproximadamente dos meses, por ejemplo, con una diferencia de aproximadamente 7, 8 o 9 semanas, seguidas de una o más dosis de refuerzo de 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.

Términos químicos y definiciones

Halo

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

Alquilo, alquileo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo etc.

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

5 El término alquilo incluye grupos hidrocarbilo acíclicos monovalentes, rectos o ramificados, saturados. En una realización alquilo es alquilo C₁₋₁₀, en otra realización alquilo C₁₋₆, en otra realización alquilo C₁₋₄, tales como metilo, etilo, n-propilo, grupos i-propilo o t-butilo.

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

El término "alcoxi" significa alquil-O-.

10 El término alquenilo incluye grupos hidrocarbilo acíclicos monovalentes, rectos o ramificados, insaturados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, sin triples enlaces carbono-carbono. En una realización alquenilo es alquenilo C₂₋₁₀, en otra realización alquenilo C₂₋₆, en otra realización alquenilo C₂₋₄.

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

El término "alquinilo" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos monovalentes, rectos o ramificados, insaturados, que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y, en una realización, sin dobles enlaces carbono-carbono. En una realización, alquinilo es alquinilo C₂₋₁₀, en otra realización alquinilo C₂₋₆, en otra realización alquinilo C₂₋₄.

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

25 El término "alquileo" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos divalentes, rectos o ramificados, saturados. En una realización alquileo es alquileo C₁₋₁₀, en otra realización alquileo C₁₋₆, en otra realización alquileo C₁₋₄, tales como metileno, etileno, n-propileno, grupos i-propileno o t-butileno.

El término "alquenileno" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos divalentes, rectos o ramificados, insaturados, que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono y, en una realización, sin triples enlaces carbono-carbono. En una realización alquenileno es alquenileno C₂₋₁₀, en otra realización alquenileno C₂₋₆, en otra realización alquenileno C₂₋₄.

30 El término "alquinileno" incluye grupos hidrocarbilo acíclicos divalentes, rectos o ramificados, insaturados, que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y, en una realización, sin dobles enlaces carbono-carbono. En una realización alquinileno es alquinileno C₂₋₁₀, en otra realización alquinileno C₂₋₆, en otra realización alquinileno C₂₋₄.

Heteroaquilo etc.

35 El término "heteroaquilo" incluye grupos alquilo en los que 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 reemplazan independientemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r, o Si (y preferentemente O, S(O)_q o N), con la condición de que al menos uno de los átomos de carbono del alquilo se mantenga. El grupo heteroaquilo puede estar C-enlazado o hetero-enlazado, es decir, puede estar enlazado 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.

40 El término "heterocicloalquilo" incluye grupos cicloalquilo en los que 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 reemplazan independientemente por O, S(O)_q o N, con la condición de que al menos uno de los átomos de carbono del cicloalquilo se mantenga. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen oxiranilo, tiananilo, aziridinilo, oxetanilo, tiatanilo, azetidínilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, 1,4-oxatianilo, morfolinilo, 1,4-ditianilo, piperazinilo, 1,4-azatianilo, oxepanilo, tiepanilo, azepanilo, 1,4-dioxepanilo, 1,4-oxatiepanilo, 1,4-oxaazepanilo, 1,4-ditiepanilo, 1,4-tieazepanilo y 1,4-diazeapanilo. El grupo heterocicloalquilo puede estar C-enlazado o N-enlazado, es decir, puede estar enlazado al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o a través de un átomo de nitrógeno.

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

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

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

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

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

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

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

Arilo

30 El término "arilo" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos monovalentes, aromáticos, tales como fenilo o naftilo (por ejemplo, 1-naftilo o 2-naftilo). En general, los grupos arilo pueden ser grupos aromáticos de anillos condensados monocíclicos o policíclicos. Los arilo preferidos son arilo C₆-C₁₄.

Otros ejemplos de grupos arilo son derivados monovalentes de aceantrileno, acenaftileno, acefenaftileno, antraceno, azuleno, criseno, 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.

35 El término "arileno" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos divalentes aromáticos, tales como fenileno. En general, los grupos arileno pueden ser grupos aromáticos de anillos condensados monocíclicos o policíclicos. Los arileno preferidos son arileno C₆-C₁₄. Otros ejemplos de grupos arileno son derivados divalentes de aceantrileno, acenaftileno, acefenaftileno, antraceno, azuleno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno y rubiceno.

Heteroarilo

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

45 En general, los grupos heteroarilo pueden ser grupos heteroaromáticos de anillos condensados monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclicos). En una realización, los grupos heteroarilo contienen 5-13 miembros del anillo (preferentemente 5-10 miembros) y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos del anillo seleccionados independientemente 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, anillo bicíclico condensado de 9 miembros o anillo bicíclico condensado de 10 miembros.

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

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

Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclico 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.

- 5 Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclico de 6 miembros son piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo.

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

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

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

- 15 Los ejemplos de grupos heteroarilo bicíclico de anillo condensado de 9 miembros son benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, benzoimidazolilo, 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 bicíclico de 10 miembros contienen 1-3 miembros del anillo que son átomos de =N- (donde el resto de los 10 miembros del anillo son átomos de carbono).

- 20 Los ejemplos de grupos heteroarilo bicíclico de anillo condensado de 10 miembros son quinolinilo, isoquinolinilo, cinnolinilo, 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.

- 25 El término "heteroarilalquilo" significa alquilo sustituido con un grupo heteroarilo.

El término "heteroarileno" incluye grupos hidrocarbilo cíclicos divalentes heteroaromáticos, que contienen adicionalmente uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y NR^N, donde R^N se define a continuación (y en una realización es H o alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆)). En general, los grupos heteroarileno pueden ser grupos heteroaromáticos de anillos condensados monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclicos). En una realización, los grupos heteroarilo contienen 5-13 miembros del anillo (preferentemente 5-10 miembros) y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos del anillo seleccionados independientemente 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, anillo bicíclico condensado de 9 miembros o anillo bicíclico condensado de 10 miembros. El término "heteroarileno" incluye derivados divalentes de cada uno de los grupos heteroarilo analizados anteriormente.

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

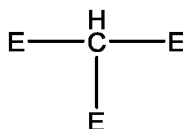
Grupos ausentes

- 40 Cuando un grupo a, b o c en la fórmula (I) está "ausente", lo que se entiende es que un único enlace está presente en su lugar, es decir, que los dos grupos a cualquier lado del grupo a, b o c están directamente unidos entre sí.

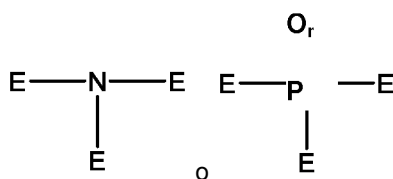
General

Salvo que se indique explícitamente de otra manera, cuando las combinaciones de grupos se denominan en el presente documento como un resto, por ejemplo, arilalquilo, el último grupo mencionado contiene el átomo por el cual el resto está unido al resto de la molécula.

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



se reemplace por



(en la 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

- 5 -CH₂- se reemplaza por -O-, -S(O)_q-, -NR^N- o -P(O)_rR^N-, en el que R^N es H o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, heteroalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, heterocicloalquilo C₃₋₆, alquenilo C₂₋₆, heteroalquenilo C₂₋₆, cicloalquenilo C₃₋₆, heterocicloalquenilo C₃₋₆, fenilo o heteroarilo que contiene 5 o 6 miembros del 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.

- 10 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 de otra manera se mantengan iguales. Por lo tanto, por ejemplo, -CH₂- se reemplaza por -SiH₂-; -CH= se reemplaza por -SiH=; y ≡C-H se reemplaza por ≡Si-H.

- 15 A modo de aclaración, con respecto a los grupos que contienen heteroátomos mencionados anteriormente (tales como heteroalquilo etc.), cuando se da un número de átomos de carbono, por ejemplo heteroalquilo C₃₋₆, lo que se pretende es un grupo basado en alquilo C₃₋₆ en el que uno o más de los 3-6 átomos de carbono de la cadena se reemplace por O, S(O)_q o N. En consecuencia, un grupo heteroalquilo C₃₋₆ contendría, por ejemplo, menos de 3-6 átomos de carbono de la cadena. Como otro ejemplo, un grupo piridilo se clasificaría como un grupo heteroarilo C₆ incluso aunque contenga 5 átomos de carbono.

Sustitución

- 20 Los grupos de los compuestos de la materia objeto desvelada (por ejemplo, grupos alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, alquilenilo, alquenileno, heteroalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquenilo, heterocicloalquenilo, heteroalquinilo, heteroalquilenilo, heteroalquenileno, arilalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo o heteroarilheteroalquilo etc.) pueden estar sustituidos o no sustituidos, en una realización no sustituidos. Normalmente, la sustitución implica el reemplazamiento hipotético de un átomo de hidrógeno con un grupo
- 25 sustituyente, o dos átomos de hidrógeno en el caso de sustitución por =O.

Cuando se sustituye, habrá generalmente 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.

- 30 En una realización, el sustituyente o sustituyentes es o son independientemente Sub¹ o Sub² (en una realización Sub²) en los que:

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 or -Z^sR^s, en las que;

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

R^s es independientemente H o alquilo C₁₋₆, heteroalquilo C₁₋₆, -(Alk^a)_f-cicloalquilo C₃₋₆, -(Alk^a)_f-heterocicloalquilo C₃₋₆, alquenilo C₂₋₆, heteroalquenilo C₂₋₆, -(Alk^a)_f-cicloalquenilo C₃₋₆, -(Alk^a)_f-heterocicloalquenilo C₃₋₆, alquinilo C₂₋₆, heteroalquinilo C₂₋₆, -(Alk^a)_f-arilo C₆₋₁₄, -(Alk^a)_f-arilo C₆₋₁₄ o -(Alk^a)_f-heteroarilo (donde heteroarilo contiene 5-13 miembros del anillo), donde

- 40 f es 0 o 1;

Alk^a es alquilenilo C₁₋₆ o heteroalquilenilo C₁₋₆; y

R^s está opcionalmente sustituido por sí mismo (en una realización no sustituido) por 1 a 3 sustituyentes Sub²;

- 45 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)Oalquilo 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(alquil C₁₋₆)C(=O)O(alquilo C₁₋₆), -N(alquil C₁₋₆)C(=O)N(alquilo C₁₋₆)₂, -OC(=O)N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquil C₁₋₆)C(=O)alquilo C₁₋

- 5 $6, -C(=S)N(\text{alquilo } C_{1-6})_2, -N(\text{alquil } C_{1-6})C(=S)\text{alquilo } C_{1-6}, -SO_2N(\text{alquilo } C_{1-6})_2, -N(\text{alquil } C_{1-6})SO_2\text{alquilo } C_{1-6}, -N(\text{alquil } C_{1-6})C(=S)N(\text{alquilo } C_{1-6})_2, -N(\text{alquil } C_{1-6})SO_2N(\text{alquilo } C_{1-6})_2, -\text{alquil } C_{1-6}, -\text{heteroalquil } C_{1-6}, -\text{cicloalquil } C_{3-6}, -\text{heterocicloalquil } C_{3-6}, -\text{alquenil } C_{2-6}, -\text{heteroalquenil } C_{2-6}, -\text{cicloalquenil } C_{3-6}, -\text{heterocicloalquenil } C_{3-6}, -\text{alquinil } C_{2-6}, -\text{heteroalquinil } C_{2-6}, -\text{aril } C_{6-14}, -\text{heteroalquil } C_{5-13}, -Z^1\text{-alquilo } C_{1-6}, -Z^1\text{-cicloalquilo } C_{3-6}, -Z^1\text{-alquenilo } C_{2-6}, -Z^1\text{-cicloalquenilo } C_{3-6}$ o $-Z^1\text{-alquinilo } C_{2-6}$; y Z^1 es independientemente O, S, NH o N(alquilo C_{1-6}).

Aunque R^s en Sub^1 puede estar opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes Sub^2 , Sub^2 no está sustituido. Sin embargo, en una realización, R^s no está sustituido.

En una realización, R^s es H o alquilo C_{1-6} , opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes Sub^2 .

- 10 En una realización, Sub^2 es independientemente halógeno, trihalometilo, trihaloetilo, $-NO_2$, $-CN$, $-N+(\text{alquilo } C_{1-6})_2O^-$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-SO\text{alquilo } C_{1-6}$, $-SO_2\text{alquilo } C_{1-6}$, $-C(=O)H$, $-C(=O)\text{alquilo } C_{1-6}$, $=O$, $-N(\text{alquilo } C_{1-6})_2$, $-C(=O)NH_2$, $-\text{alquil } C_{1-6}$, $-\text{cicloalquil } C_{3-6}$, $-\text{heterocicloalquil } C_{3-6}$, $-Z^1\text{-alquilo } C_{1-6}$ o $-Z^1\text{-cicloalquilo } C_{3-6}$.

En una realización, cuando el grupo sustituido es acíclico (por ejemplo, alquilo, heteroalquilo, alquenilo etc.), Sub^1 no es $-R^s$ y Sub^2 no es $-\text{alquil } C_{1-6}$, $-\text{heteroalquil } C_{1-6}$, $-\text{alquenil } C_{2-6}$, $-\text{heteroalquenil } C_{2-6}$, $-\text{alquenil } C_{2-6}$ o $-\text{heteroalquinil } C_{2-6}$.

- 15 Cuando un grupo distinto de Sub^2 tiene al menos 2 posiciones que pueden estar sustituidas, el grupo puede estar sustituido por ambos extremos de una cadena de alquileo, alquenileno, alquinileno, heteroalquileo, heteroalquenileno o heteroalquinileno (en una realización que contiene 1 a 6 átomos, en una realización adicional 3 a 6 átomos y en una realización adicional 3 o 4 átomos) para formar un resto cíclico. Esa cadena está opcionalmente sustituida con 1 a 3 sustituyentes Sub^2 . En una realización esa cadena no está sustituida. Por lo tanto, los términos "cicloalquilo", "cicloalquenilo", "cicloalquinilo", "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", "heterocicloalquinilo", "arilo" y "heteroarilo" opcionalmente sustituidos incluyen especies condensadas. Por ejemplo, "cicloalquilo opcionalmente sustituido" incluye una especie en la que dos anillos cicloalquilo se condensan y "heteroarilo opcionalmente sustituido" incluye una especie en la que un anillo heterocicloalquilo se condensa al anillo aromático (por ejemplo, 5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-ilo).

- 25 Cuando un grupo distinto de Sub^2 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 2 a 8 átomos, en una realización adicional 3 a 6 átomos y en una realización adicional 4 o 5 átomos) para formar un resto cíclico. Esa cadena está opcionalmente sustituida con 1 a 3 sustituyentes Sub^2 . En una realización esa cadena no está sustituida. Por lo tanto, los términos "cicloalquilo", "cicloalquenilo", "cicloalquinilo", "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", "heterocicloalquinilo", "arilo" y "heteroarilo" opcionalmente sustituidos incluyen especies espiró.

A modo de aclaración, cuando un grupo tiene un heteroátomo, un sustituyente puede unirse al heteroátomo. Por lo tanto, por ejemplo, "heteroalquilo opcionalmente sustituido" incluye $-CH_2-N(Sub^1)-CH_2-$, $-CH(Sub^1)-NH-CH_2-$ y $-CH(Sub^1)-N(Sub^1)-CH_2-$ etc.

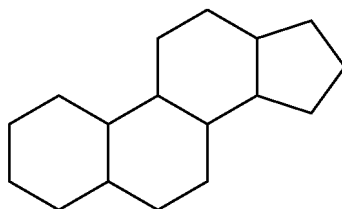
35 Términos modificadores

- 40 Cuando una lista está precedida por un modificador, se pretende que el modificador se entienda que se aplica a cada uno de los artículos en la lista. Por ejemplo, la frase "heterocicloalquilo C_{3-20} , heterocicloalquenilo C_{3-20} , heterocicloalquinilo C_{3-20} o heteroarilo C_{5-20} opcionalmente sustituidos" significa que cada uno de los cuatro artículos en la lista, es decir, el grupo heterocicloalquilo C_{3-20} , el grupo heterocicloalquenilo C_{3-20} , el grupo heterocicloalquinilo C_{3-20} y el grupo heteroarilo C_{6-20} , pueden estar opcionalmente sustituidos.

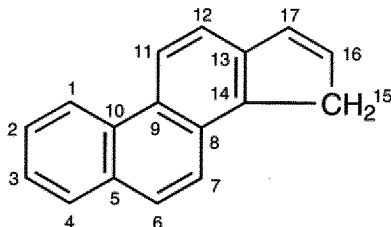
- 45 Cuando un grupo se caracteriza por un primer modificador y después, más tarde, el mismo grupo se caracteriza por un posterior modificador, lo que se entiende es que el grupo se caracteriza por ambos modificadores simultáneamente. Por ejemplo, si un grupo se describe como un grupo "heterocicloalquinilo C_{3-20} " (el primer modificador) y después más tarde el mismo grupo se describe como un grupo " C_{5-16} " (el modificador posterior), lo que se entiende es un grupo heterocicloalquinilo C_{5-16} .

Esteroides

Como se usa en el presente documento, el término "esteroide" se refiere a cualquier grupo que comprende la siguiente estructura (cuya estructura se denomina en el presente documento "esqueleto esteroide").



Puramente para los fines de ilustración, el esqueleto esteroide se ha dibujado anteriormente como totalmente saturado. El término esteroide, sin embargo, también pretende abarcar casos en los que hay insaturación en el esqueleto esteroide. Por ejemplo, el término esteroide abarca un grupo que comprende el esqueleto básico completamente insaturado (mancude), 15H-ciclopenta[a]fenantreno:



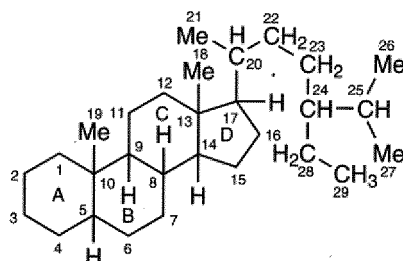
5

El término esteroide también abarca un grupo que comprende un esqueleto esteroide parcialmente insaturado.

El término esteroide también abarca derivados "seco" del esqueleto esteroide, es decir, grupos en los que se ha efectuado la escisión del anillo; derivados "nor" y "homo" del esqueleto esteroide que implican la contracción del anillo y la expansión, 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, tales derivados seco no se abarcan por el término "esteroide". En otra realización, tales derivados nor no se abarcan por el término "esteroide". En otra realización, tales derivados homo no se abarcan por el término "esteroide". De esta manera en una realización, tales derivados seco, nor y homo no se abarcan por el término "esteroide".

El término esteroide también abarca casos en los que uno o más de los átomos de carbono en la estructura etiquetada esqueleto esteroide se reemplazan por un heteroátomo. En una de tales realizaciones, 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 reemplazan independientemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si (y preferentemente O, S(O)_q o N). En una realización, sin embargo, el término "esteroide" comprende especies en las que el "esqueleto esteroide básico" no contiene heteroátomos.

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



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

Insaturación

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

30 **General**

La práctica de la presente materia objeto desvelada empleará, a menos que se indique de otra manera, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en las referencias bibliográficas. Véanse, por ejemplo, las referencias 32-38, etc.

35 La expresión "que comprende" abarca "que incluye", así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

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

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

de la definición de la materia objeto desvelada.

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

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

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

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

La familia del receptor tipo RIG-I ("RLR") incluye diversas helicasas de ARN que juegan papeles clave en el sistema inmune innato [39]. RLR-1 (también conocido como RIG-I o gen I inducible por ácido retinoico) tiene dos dominios de reclutamiento de caspasa cerca de su N-terminal. El nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-1 es "DDX58" (por el polipéptido 58 de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)) y la ID de HGNC única 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 caspasa cerca de su N-terminal. El nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-2 es "IFIH1" (por el dominio 1 de interferón inducido con helicasa C) y la ID de HGNC única 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 de HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-3 es "DHX58" (por el polipéptido 58 de caja DEXH (Asp-Glu-X-His)) y la ID de HGNC única es HGNC:29517. La secuencia RefSeq para el gen RLR-3 humano es GI: 149408121.

La PKR es una proteína quinasa dependiente de ARN bicatenario. Juega un papel clave en el sistema inmune innato. "EIF2AK2" (por factor 2 de iniciación de traducción eucariota-alfa quinasa 2) es el nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica esta enzima y su ID de HGNC única es HGNC:9437. La secuencia RefSeq para el gen PKR humano es GI:208431825.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 2 es una micrografía electrónica de liposomas.

La Figura 3 muestra la expresión proteica (como unidades de luz relativas, ULR) el día 6 después de la administración de ARN en los liposomas con diversos lípidos catiónicos.

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

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

La Figura 6 muestra la expresión proteica los días 1, 3 y 6 después de la administración de cuatro dosis diferentes de ARN encapsulado en liposoma.

La Figura 7 muestra títulos de IgG anti-F en animales que reciben replicón empaquetado en virión (VRP o VSRP), 1 µg de ARN desnudo y 1 µg de ARN encapsulado en liposoma.

La Figura 8 muestra títulos de IgG anti-F en animales que reciben VRP, 1 µg de ARN desnudo y 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposoma.

La Figura 9 muestra títulos de anticuerpo neutralizantes en animales que reciben VRP o bien 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposoma.

La Figura 10 muestra los niveles de expresión después de la administración de un replicón como ARN desnudo (círculos), ARN encapsulado en liposoma (triángulo y cuadrado) o como un lipoplejo (triángulo invertido).

La Figura 11 muestra títulos de IgG específicos de F (2 semanas después de la segunda dosis) después de la administración de un replicón como ARN desnudo (0,01-1 µg), ARN encapsulado en liposoma (0,01-10 µg) o empaquetado como un virión (VRP, 10⁶ unidades infecciosas o UI).

5 La Figura 12 muestra títulos de IgG específicos de F (círculos) después de la administración de un replicón como ARN desnudo (1 µg), ARN encapsulado en liposoma (0,1 o 1 µg) o empaquetado como un virión (VRP, 10⁶ UI). También se muestran los títulos en los ratones sin exposición previa. Las líneas sólidas muestran medias geométricas.

10 La Figura 13 muestra la producción de citocinas intracelulares después de la reestimulación con péptidos sintéticos que representan los epítomos mayores en la proteína F, 4 semanas después de una segunda dosis. El eje y muestra el % de citocina+ de CD8+CD4-.

La Figura 14 muestra títulos de IgG específicos de F (títulos log₁₀ medios + desv. est.) durante 63 días después de la inmunización de vacas los días 0 y 21.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA MATERIA OBJETO DESVELADA

Replicones de ARN

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

20 El ADN del plásmido que codifica replicones de alfavirus (llamados: pT7-mVEEV-FL.RSVF o A317; pT7-mVEEV-SEAP o A306; pSP6-VCR-GFP o A50) sirvieron como molde para la síntesis de ARN *in vitro*. Los replicones contienen los elementos genéticos de alfavirus requeridos para la replicación de ARN pero carecen de aquellos productos génicos codificantes necesarios para el ensamblaje de las partículas; las proteínas estructurales se reemplazan en su lugar por una proteína de interés (un indicador, tales como SEAP o GFP, o bien un inmunógeno, tales como la proteína F de RSV de longitud completa) y de esta manera los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago (T7 o SP6) en dirección 5' del ADNc del alfavirus facilita la síntesis del ARN del replicón *in vitro* y una ribozima del virus de la hepatitis delta (VHD) inmediatamente en dirección 3' de la cola poli(A) genera el extremo 3' correcto a través de su actividad de auto-escisión.

30 Después de la linealización del ADN del plásmido en dirección 3' de la ribozima del VHD con una endonucleasa de restricción adecuada, los transcritos de escorrentía se sintetizaron *in vitro* usando la polimerasa de ARN dependiente de ADN derivada del bacteriófago T7 o SP6. Las transcripciones se realizaron durante 2 horas a 37 °C en presencia de 7,5 mM (polimerasa de ARN de T7) o 5 mM (polimerasa de ARN de 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 molde se digirió con DNasa TURBO (Ambion). El ARN del replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. El ARN sin caperuza se tapó con caperuza post-transcripcionalmente con la Enzima de Caperuza de Vacuna (ECV) usando el Sistema de formación de caperuza ScriptCap m7G (Epicentre Biotechnologies) como se indica en el manual del usuario; los replicones tapados con caperuza de esta manera se dan con el prefijo "v", por ejemplo vA317 es el replicón A317 tapado con caperuza por ECV. El ARN tapado con caperuza post-transcripcionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo la DO_{260nm}. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante.

Encapsulación en liposomas a base de Dlin-DMA

El ARN se encapsuló en liposomas fabricados esencialmente por el procedimiento de las referencias 7 y 40. Los liposomas estaban hechos de DSPC al 10 % (zwitteriónico), DlinDMA al 40 % (catiónico), colesterol al 48 % y DMG conjugado con PEG al 2 % (PEG 2 kDa). Estas proporciones se refieren al % en moles en el liposoma total.

45 El DlinDMA (1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) se sintetizó usando el procedimiento de la referencia 2. La DSPC (1,2-diasteraoil-sn-glicero-3-fosfolina) se obtuvo de Anolyse. El colesterol se obtuvo de Sigma-Aldrich. El DMG conjugado a PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)], sal de amonio), el DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, sal de cloruro) y el DC-cholesterol (clorhidrato de 3β-[N-(N',N'-dimetilamino)etano]-carbamoil]colesterol) fueron de Avanti Polar Lipids.

50 Brevemente, los lípidos se disolvieron en etanol (2 ml), un replicón de ARN se disolvió en tampón (2 ml, citrato sódico 100 mM, pH 6) y estos se mezclaron con 2 ml de tampón seguido de 1 hora de equilibrado. La mezcla se diluyó con 6 ml de tampón, después se filtró. El producto resultante contenía liposomas, con eficiencia de encapsulación del -95 %. La Figura 2 muestra una micrografía electrónica de ejemplo de liposomas preparados por estos procedimientos. Estos liposomas contienen ARN encapsulado que codifica el antígeno F de RSV de longitud completa. La dispersión dinámica de luz de un lote mostró un diámetro promedio de 141 nm (Zav por intensidad) o 78 nm (por número).

En un procedimiento de encapsulación particular, se prepararon soluciones madre de lípido fresco en etanol. 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg of Colesterol y 8,07 mg de DMG conjugado con PEG se pesaron y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. Se usaron tres PEG conjugados diferentes: PEG-1000, PEG-2000 o PEG-3000. La solución madre de lípido recientemente preparada se sacudió suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 min para formar una mezcla homogénea. A continuación, 226,7 µl de la solución madre se añadieron a 1,773 ml de etanol para fabricar una solución madre de trabajo de lípidos de 2 ml. Una solución de trabajo de 2 ml de ARN se preparó también a partir de una solución madre de ~ 1 µg/µl en tampón citrato 100 mM (pH 6). Tres viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) se enjuagaron con solución Away de RNasa y se lavaron con mucha agua MiliQ antes de su uso para descontaminar los viales de RNAsas. Uno de los viales se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípido y ARN (como se describe más tarde). Las soluciones de trabajo de lípido y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 min antes de cargarse en jeringas de conexión de Luer de 3 cm³. Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cm³. Las jeringas que contenían ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador T (PEEK™ 500 µm unión ID) usando tubos FEP (etileno-propileno fluorado; todos los tubos FEP usados tuvieron un diámetro interno de 2 mm y un diámetro externo de 3 mm; obtenidos de IDEX Health Science). La salida del mezclador T también fueron tubos FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón citrato se conectó a una parte de tubos separada. Todas las jeringas se condujeron a un caudal de 7 ml/min usando una bomba de jeringa. Las salidas del tubo se posicionaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). La barra de agitación se sacó y la solución de etanol/acuosa se permitió equilibrar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cm³, que se conectó a una parte de tubos FEP y en otra jeringa de 5 cm³ conectada a una longitud igual de tubos FEP, se cargó una cantidad igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se condujeron a un caudal de 7 ml/min usando la bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). A continuación, la mezcla recogida de la segunda etapa de mezcla (liposomas) se pasó a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que une y retira moléculas aniónicas, obtenida de Pall Corporation). Antes de usar esta membrana para los liposomas, 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6) se pasaron sucesivamente a través de la misma. Los liposomas se calentaron durante 10 min a 37 °C antes de pasar a través de la membrana. A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de IX PBS usando filtración de flujo tangencial antes de recuperar el producto final. El sistema TFF y las membranas de filtración de fibra hueca se obtuvieron de Spectrum Labs (Rancho Domínguez) y se usaron de acuerdo con las directrices del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de polisulfona con un corte de tamaño de poro de 100 kDa y área superficial de 8 cm². Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* se diluyeron las formulaciones a la concentración de ARN requerida con IX PBS.

El porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN se determinaron mediante el kit de reactivos Quant-iT RiboGreen RNA (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN ribosómico patrón proporcionado en el kit se usó para generar una curva patrón. Los liposomas se diluyeron 10x o 100x en el tampón IX TE (del kit) antes de la adición del tinte. Por separado, los liposomas se diluyeron 10x o 100x en el tampón IX TE que contenía Triton X al 0,5 % antes de la adición del tinte (para romper los liposomas y de esta manera ensayar el ARN total). En lo sucesivo se añadió una cantidad igual de tinte a cada solución y después se cargaron ~180 µl de cada solución después de la adición del tinte por duplicado en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos. La fluorescencia (Ex 485 nm, Em 528 nm) se leyó en un lector de microplacas. Todas las formulaciones de liposomas se dosificaron *in vivo* a base de la cantidad encapsulada de ARN.

Para obtener liposomas más pequeños el procedimiento de jeringa/tubo se reemplazó por un procedimiento en el que las soluciones de lípido y ARN se mezclan en canales en un chip microfluídico. Se prepararon soluciones madre de lípido fresco en etanol. 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg of Colesterol y 8,07 mg de DMG con PEG se pesaron y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre de lípido recientemente preparada se sacudió suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 min para formar una mezcla homogénea. A continuación, 226,7 µl de la solución madre se añadieron a 1,773 ml de etanol para fabricar una solución madre de trabajo de lípidos de 2 ml. Una solución de trabajo de 4 ml de ARN se preparó también a partir de una solución madre de ~ 1 µg/µl en tampón citrato 100 mM (pH 6). Cuatro viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) se enjuagaron con solución Away de RNasa y se lavaron con mucha agua MiliQ antes de su uso para descontaminar los viales de RNAsas. Dos de los viales se usaron para la solución de trabajo de ARN (2 ml en cada vial=) y los otros para recoger las mezclas de lípido y ARN. Las soluciones de trabajo de lípido y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 min antes de cargarse en jeringas de conexión de Luer de 3 cm³. Las jeringas que contienen ARN y los lípidos se conectaron a un Chip de unión Mitos Droplet (un dispositivo microfluídico de vidrio obtenido de Syrris, n.º de Parte 3000158) usando tubos de PTFE de 0,076 cm de ID x 0,158 cm de OD, (Syrris) usando un conector de borde de 4 vías. Dos corrientes de ARN y una corriente de lípido se condujeron por bombas de jeringa y la mezcla del etanol y la fase acuosa se realizó en la unión X (100 µm x 105 µm) del chip. El caudal de las tres corrientes se mantuvo a 1,5 ml/min, de esta manera la relación de caudal acuoso a etanólico total fue 2:1. La salida del tubo se posicionó para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). La barra de agitación se sacó y la solución de etanol/acuosa se permitió equilibrar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después la mezcla se cargó en una jeringa de 5 cm³ que se ajustó a un trozo de tubos PTFE de 0,076 cm de ID x 0,158 cm de OD y en otra jeringa de 5 cm³ con igual longitud de tubos PTFE, se cargó un volumen igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se condujeron a un caudal de 3 ml/min usando la bomba de jeringa y la mezcla final se recogió en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de IX PBS usando el sistema TFF antes de recuperar el producto final. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de con un corte de tamaño de poro

de 100 kDa y área superficial de 20 cm². Para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, se diluyeron las formulaciones a la concentración de ARN requerida con IX PBS. Mientras que los liposomas preparados usando el procedimiento de jeringa/tubo con 75 µg de ARN tuvieron un diámetro promedio Z de 148 nm y un índice de polidispersidad de 0,122, el chip de mezcla dio liposomas con un diámetro promedio Z de 97 nm y un índice de polidispersidad de 0,086. La proporción de ARN encapsulado disminuyó ligeramente del 90 % al 87 %.

Se mostró que la encapsulación dentro del liposoma protege al ARN de la digestión por RNasa. Los experimentos usaron 3,8 mUA de RNasa A por microgramo de ARN, incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente. La RNasa se inactivó con Proteinasa K a 55 °C durante 10 minutos. Una mezcla 1:1 v/v de muestra a 25:24:1 v/v/v, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico se añadió después para extraer el ARN de los lípidos en la fase acuosa. Las muestras se mezclaron sometiendo a vórtex durante unos pocos segundos y después se colocaron en una centrifuga durante 15 minutos a 12k RPM. La fase acuosa (que contenía el ARN) se retiró y se usó para analizar el ARN. Antes de cargar todas las muestras (400 ng de ARN por pocillo) se incubaron con tinte de carga de formaldehído, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65 °C y se enfriaron a temperatura ambiente. Se usaron marcadores de Ambion Millennium para aproximar el peso molecular de la construcción de ARN. El gel se hizo correr a 90 V. El gel se tiñó usando oro SYBR al 0,1 % de acuerdo con las directrices del fabricante en agua golpeando suavemente a temperatura ambiente durante 1 hora. La Figura 1 muestra que la RNasa digiere completamente el ARN en ausencia de encapsulación (carril 3). El ARN es indetectable después de la encapsulación (carril 4) y no se ven cambios si estos liposomas se tratan con RNasa (carril 4). Después de que los liposomas tratados con RNasa se sometan a extracción con fenol, se ve el ARN sin digerir (carril 6). Después de 1 semana a 4 °C el ARN podría verse sin ninguna fragmentación (Figura 4, flecha). La expresión de proteínas *in vivo* no se cambió después de 6 semanas a 4 °C y un ciclo de congelación-descongelación. De esta manera el ARN encapsulado en liposoma es estable.

Para evaluar la expresión *in vivo* del ARN se codificó una enzima indicadora (SEAP; fosfatasa alcalina secretada) en el replicón, en lugar del inmunógeno. Los niveles de expresión se midieron en sueros diluidos 1:4 en tampón de dilución IX Phospha-Light usando un sustrato de fosfato alcalino quimioluminiscente. Ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad (5/grupo) se inyectaron intramuscularmente el día 0, 50 µl por pata con 0,1 µg o 1 µg de ARN por dosis. El mismo vector se administró también sin los liposomas (en IX PBS libre de RNasa) a 1 µg. También se ensayaron replicones empaquetados en viriones. Los replicones empaquetados en viriones usados en el presente documento (denominados "VRP") se obtuvieron mediante los procedimientos de la referencia 41, donde el replicón de alfavirus deriva del VEEV mutante o una quimera derivada del genoma de VEEV diseñado para contener el UTR 3' del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento (PS) del virus Sindbis, empaquetado co-electroporándolo en las células BHK con ARN ayudantes defectuosos que codifican los genes de la cápside y la glucoproteína del virus Sindbis.

Como se muestra en la FIG. 5, la encapsulación aumentó los niveles de SEAP aproximadamente 1/2 log a la dosis de 1 µg y el día 6 la expresión de una dosis de 0,1 µg encapsulada coincidió con los niveles vistos con una dosis de 1 µg no encapsulada. El día 3 los niveles de expresión excedieron aquellos logrados con los VRP (cuadrados). De esta manera lo expresado aumentó cuando el ARN se formuló en los liposomas con respecto al ARN control desnudo, incluso a una dosis 10x menor. La expresión también fue más alta con respecto al control VRP, pero la cinética de la expresión fue muy diferente (véase la Figura 5). La administración del ARN con la electroporación dio como resultado una expresión aumentada con respecto al ARN control desnudo, pero estos niveles fueron menores que con liposomas.

Para evaluar si el efecto visto en los grupos de liposoma se debió meramente a los componentes del liposoma o estaba ligado a la encapsulación, el replicón se administró en forma encapsulada (con dos protocolos de purificación diferentes, 0,1 µg de ARN) o mezclado con los liposomas después de su formación (un "lipoplejo" no encapsulado, 0,1 µg de ARN) o como ARN desnudo (1 µg). La Figura 10 muestra que el lipoplejo dio los niveles más bajos de expresión, mostrando que la encapsulación es esencial para la expresión potente.

Experimentos de SEAP adicionales mostraron una clara respuesta a dosis *in vivo*, viéndose la expresión después de la administración de tan poco como 1 ng de ARN (Figura 6). Experimentos adicionales que comparan la expresión a partir de 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 material encapsulado dio una expresión 12 veces más alta el día 6; a una dosis de 0,1 µg los niveles fueron 24 veces más altos el día 6.

En lugar de mirar los niveles promedio en el grupo, también se estudiaron los animales individuales. Aunque varios animales no respondieron a los replicones desnudos, la encapsulación eliminó los que no respondieron. Los experimentos adicionales reemplazaron DlinDMA por DOTAP ("RV13"). Aunque los liposomas DOTAP dieron mejor expresión que el replicón desnudo, fueron inferiores a los liposomas DlinDMA (2 a 3 veces de diferencia el día 1).

Para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* se construyó un replicón para expresar la proteína F de longitud completa a partir del virus sincitial respiratorio (RSV). Este se administró desnudo (1 µg), encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg) o empaquetado en viriones (10⁶ UI; "VRP") los días 0 y 21. La Figura 7 muestra los títulos de IgG anti-F 2 semanas después de la segunda dosis y los liposomas claramente potencian la inmunogenicidad. La Figura 8 muestra los títulos 2 semanas después, en cuyo punto no hubo diferencia estadística entre el ARN encapsulado a 0,1 µg, el ARN encapsulado a 1 µg o el grupo VRP. Los títulos de neutralización (medidos como reducción de placa al 60 %, "PRNT60") no fueron significativamente diferentes en estos tres grupos 2 semanas después de la segunda dosis

(Figura 9). La Figura 12 muestra los títulos tanto de IgG como de PRNT 4 semanas después de la segunda dosis.

La Figura 13 confirma que el ARN provoca una respuesta de células T CD8 robusta.

Los experimentos adicionales compararon los títulos de IgG específicos de F en ratones que recibieron VRP, 0,1 µg de ARN encapsulado en liposoma o 1 µg de ARN encapsulado en liposoma. Las relaciones de los títulos (VRP: liposoma) a diversos tiempos después de la segunda dosis fueron como sigue:

5

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

De esta manera el ARN encapsulado en liposoma induce esencialmente la misma magnitud de respuesta inmune como se ve con la administración de virión.

Los experimentos adicionales mostraron respuestas de IgG específicas de F superiores con una dosis de 10 µg, respuestas equivalentes para las dosis de 1 µg y 0,1 µg y una respuesta menor con una dosis de 0,01 µg. La Figura 11 muestra títulos de IgG en ratones que reciben el replicón en forma desnuda a 3 dosis diferentes, en liposomas a 4 dosis diferentes o como VRP (10⁶ UI). La respuesta vista con ARN encapsulado en liposomas a 1 µg no fue estadísticamente significativa (ANOVA) cuando se compara con VRP, pero la respuesta más alta vista con ARN encapsulado en liposomas a 10 µg fue estadísticamente significativa (p<0,05) cuando se compara con ambos de estos grupos.

10

15

Un estudio adicional confirmó que los 0,1 µg de ARN encapsulado en liposoma dieron respuestas de IgG anti-F mucho más altas (15 días después de la segunda dosis) que los 0,1 µg del ADN administrado e incluso fueron más inmunogénicos que 20 µg de ADN de plásmido que codifica el antígeno F, administrado por electroporación (Elgen™ DNA Delivery System, Inovio).

20

25

Un estudio adicional se realizó en rata algodónera (*Sigmodon hispidis*) en lugar de ratones. A una dosis de 1 µg la encapsulación de liposoma aumentó los títulos de IgG específica de F en 8,3 veces en comparación con el ARN desnudo y aumentó los títulos de neutralización (medidos como PRNT60) en 9,5 veces. La magnitud de la respuesta de anticuerpos fue equivalente a aquella inducida por 5x10⁶ UI de VRP. Tanto el ARN desnudo como encapsulado en liposomas fue capaz de proteger a las ratas algodóneras de la provocación por RSV (1x10⁵ unidades formadoras de placas), reduciendo la carga vírica de pulmón al menos 3,5 logs. La encapsulación aumentó la reducción aproximadamente 2 veces.

30

Se realizó un estudio en animales grandes en ganado vacuno. Las vacas se inmunizaron con 66 µg de replicón que codifica la proteína F del RSV de longitud completa los días 0 y 21, formulado dentro de liposomas. El PBS solo se usó como un control negativo y se usó una vacuna licenciada como un control positivo ("Triangle 4" de Fort Dodge, que contiene el virus muerto). La Figura 14 muestra títulos de IgG específicos de F durante un periodo de 63 días empezando desde la primera inmunización. El replicón de ARN fue inmunogénico en las vacas, aunque dio títulos menores que la vacuna licenciada. Todas las vacas vacunadas mostraron anticuerpos específicos de F después de la segunda dosis y los títulos fueron muy estables desde el periodo de 2 a 6 semanas después de la segunda dosis (y fueron particularmente estables para la vacuna de ARN).

Encapsulación en liposomas usando lípidos catiónicos alternativos

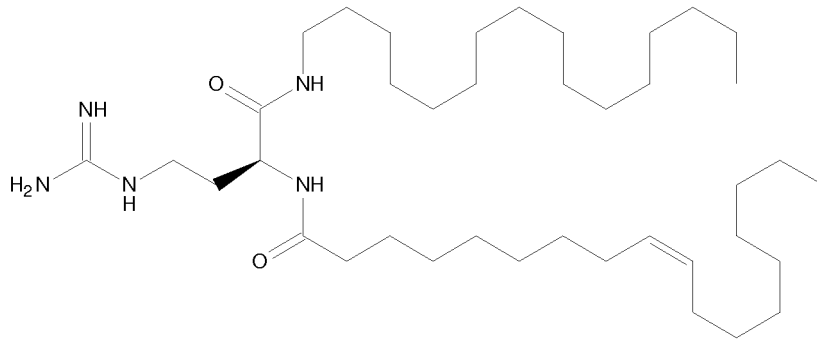
35

Como una alternativa al uso de DlinDMA, se usan los lípidos catiónicos de la referencia 8. Estos lípidos pueden sintetizarse como se desvela en la referencia 8.

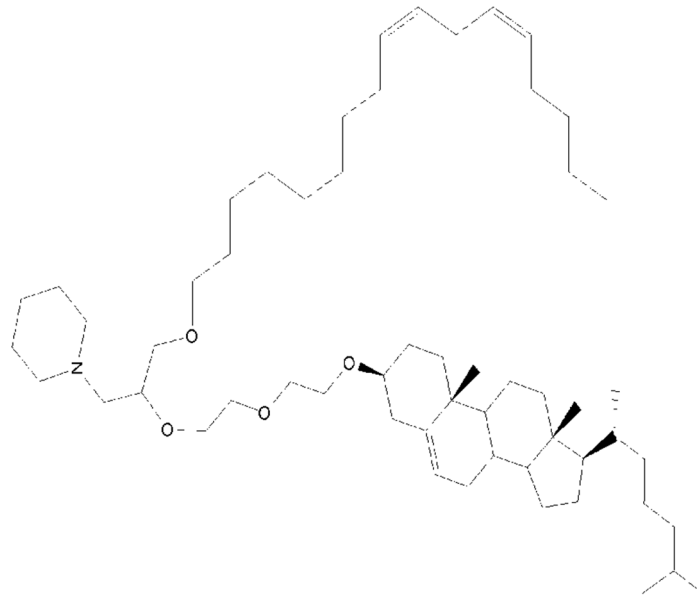
40

Los liposomas formados anteriormente usando DlinDMA se denominan en lo sucesivo aquí la serie "RV01". El DlinDMA se reemplazó por diversos lípidos catiónicos en las series "RV02" a "RV12" como se describe a continuación. Se formaron dos tipos diferentes de cada liposoma, usando PEG2000-DMG al 2 % bien con (01) un 40 % del lípido catiónico, DSPC al 10 % y colesterol al 48 % o (02) un 60 % del lípido catiónico y colesterol al 38 %. De esta manera una comparación de los liposomas (01) y (02) muestra el efecto del lípido zwitteriónico neutro.

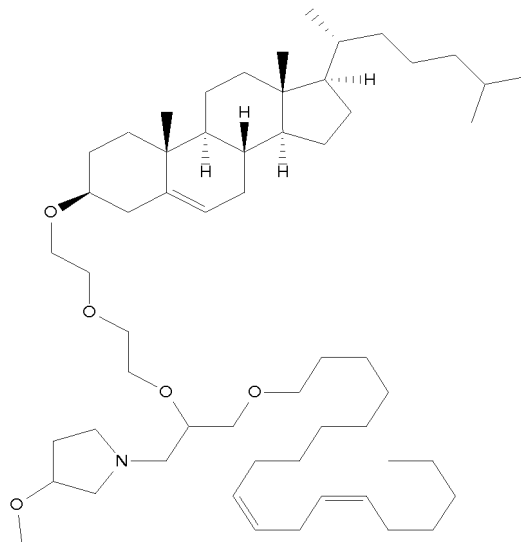
Los liposomas RV02 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:



Los liposomas RV03 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:

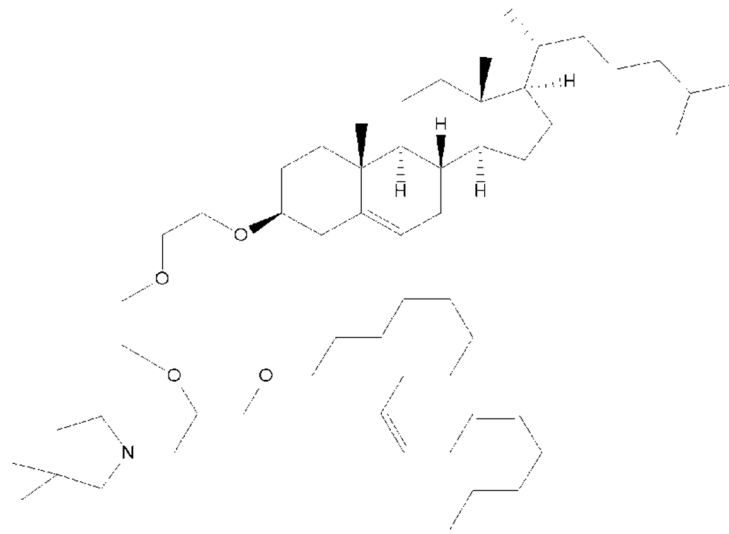


Los liposomas RV04 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:

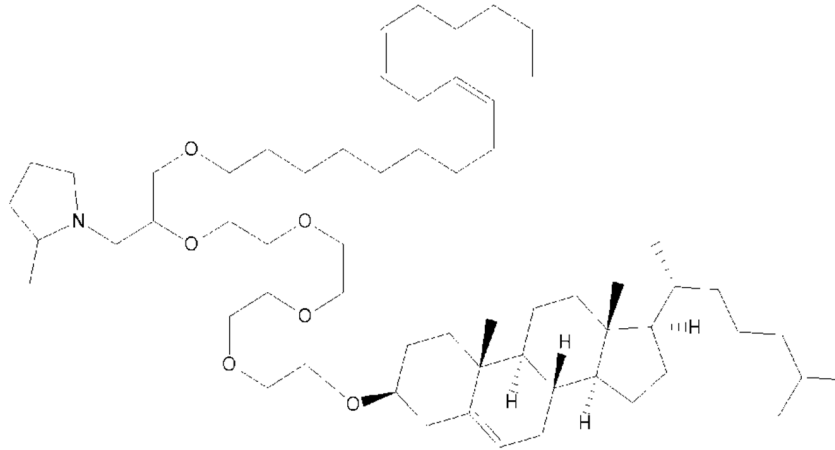


5

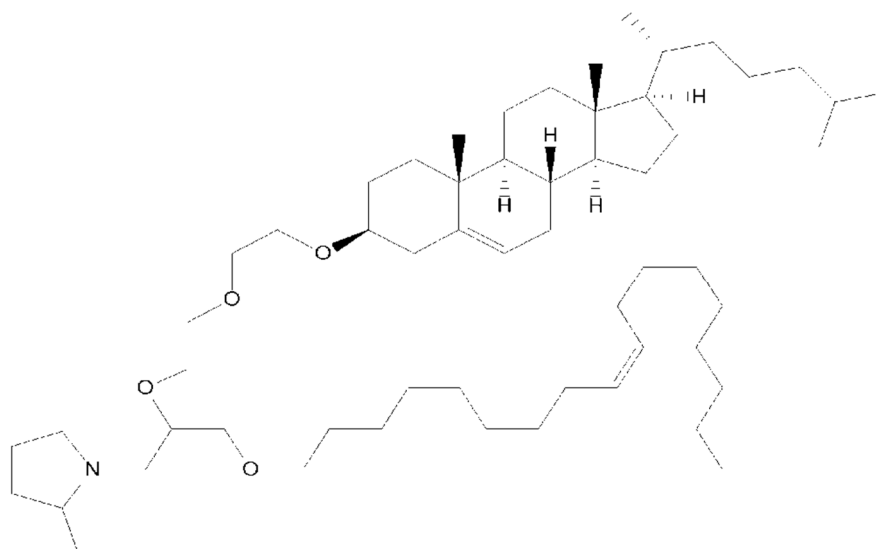
Los liposomas RV05 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:



Los liposomas RV06 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:

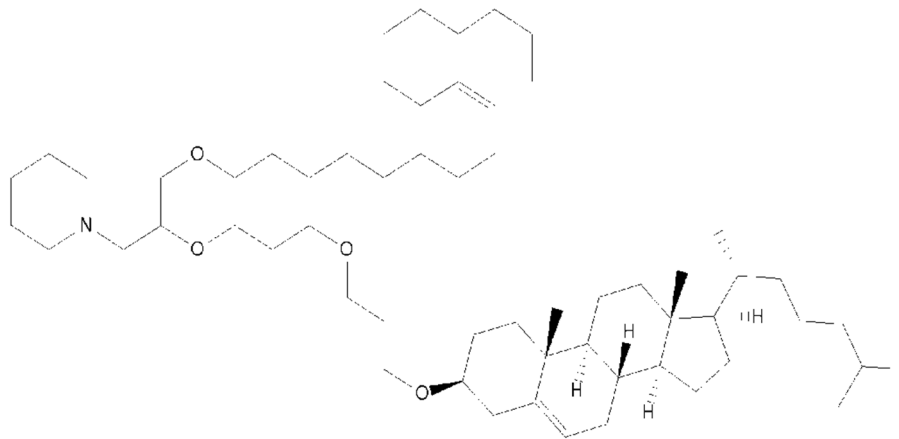


Los liposomas RV07 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:

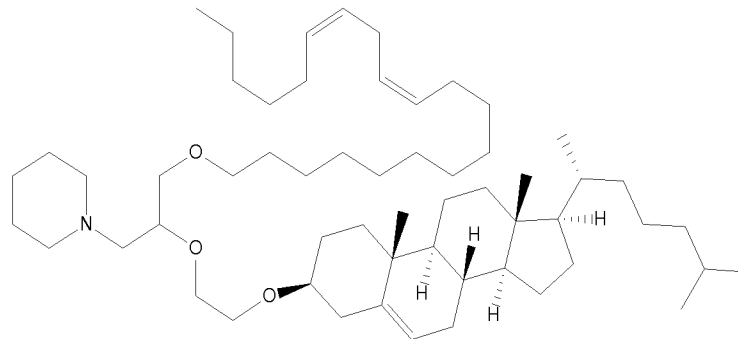


5

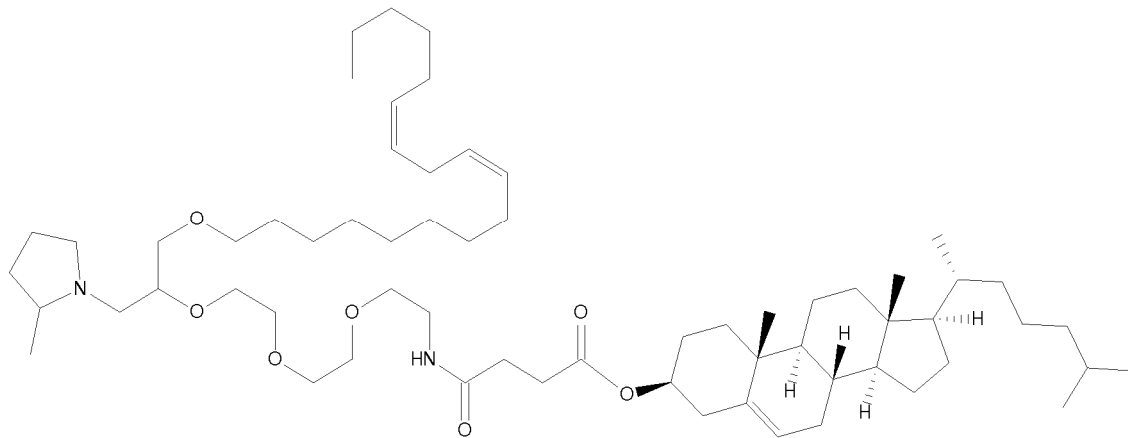
Los liposomas RV08 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:



Los liposomas RV09 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:

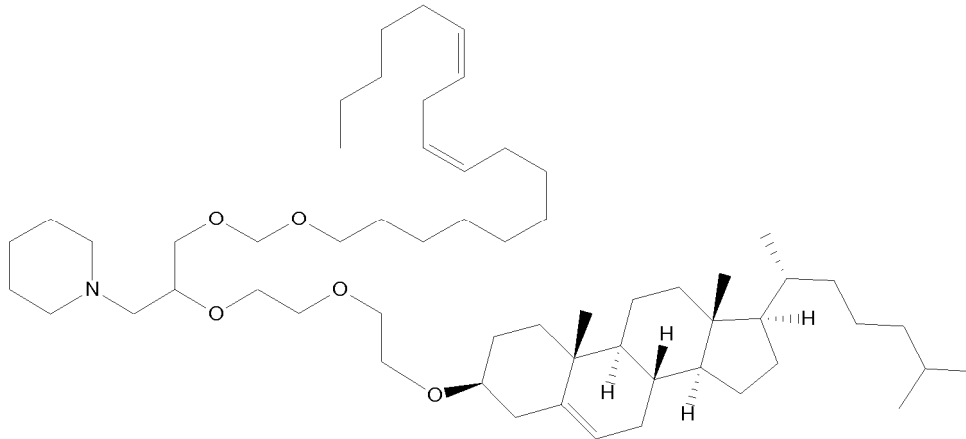


Los liposomas RV10 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:

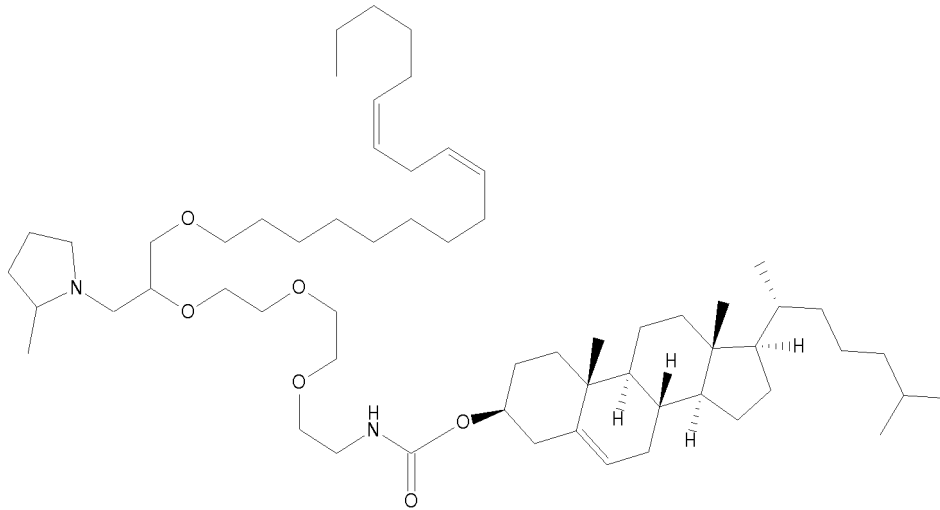


5

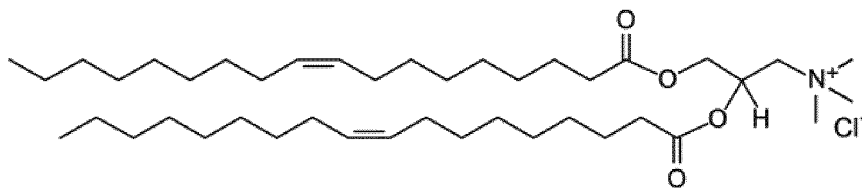
Los liposomas RV11 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:



Los liposomas RV12 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:

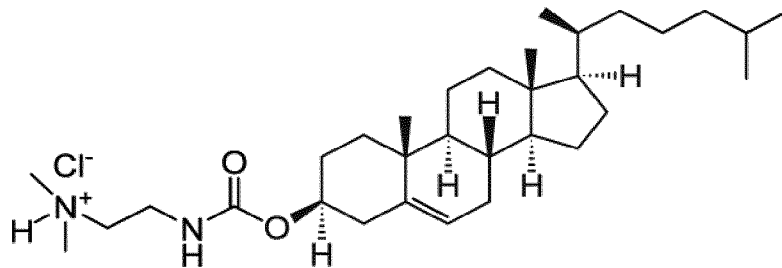


Los liposomas RV13 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico (DOTAP, para fines comparativos):

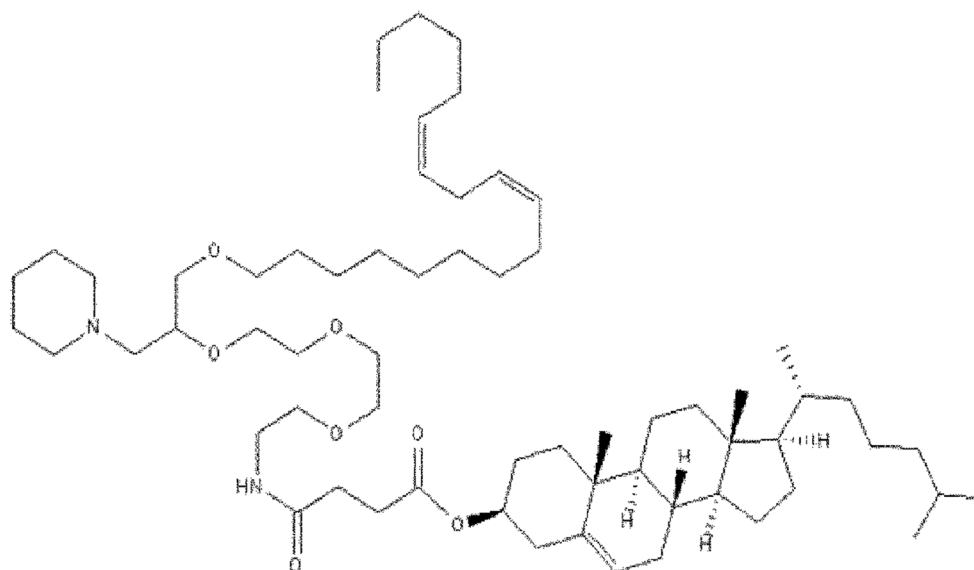


5

Los liposomas RV14 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico (DC-colesterol, por comparación):



Los liposomas RV15 se fabricaron usando el siguiente lípido catiónico:



5 Estos liposomas se ensayaron con el indicador SEAP descrito anteriormente. La siguiente tabla muestra el tamaño de los liposomas (promedio Z e índice de polidispersidad), el % de encapsulación de ARN en cada liposoma, junto con la actividad SEAP detectada los días 1 y 6 después de la inyección. La actividad SEAP es relativa a los liposomas "RV01(02)" fabricados a partir de DiIndMA, colesterol y PEG-DMG:

RV	Zav (pdl)	% de encapsulación	SEAP día 1	SEAP día 6
RV01 (01)	154,6 (0,131)	95,5	80,9	71,1
RV01 (02)	162,0 (0,134)	85,3	100	100
RV02 (01)	133,9 (0,185)	96,5	57	45,7
RV02 (02)	134,6 (0,082)	97,6	54,2	4,3
RV03 (01)	158,3 (0,212)	62,0	65,7	44,9
RV03 (02)	164,2 (0,145)	86	62,2	39,7
RV04 (01)	131,0 (0,145)	74,0	91	154,8
RV04 (02)	134,6 (0,117)	81,5	90,4	142,6
RV05 (01)	164,0 (0,162)	76,0	76,9	329,8
RV05 (02)	177,8 (0,117)	72,8	67,1	227,9
RV06 (01)	116,0 (0,180)	79,8	25,5	12,4
RV06 (02)	136,3 (0,164)	74,9	24,8	23,1
RV07 (01)	140,6 (0,184)	77	26,5	163,3
RV07 (02)	138,6 (0,122)	87	29,7	74,8
RV 08 (01)	176,7 (0,185)	50	76,5	187
RV08 (02)	199,5 (0,191)	46,3	82,4	329,8
RV09 (01)	165,3 (0,169)	72,2	65,1	453,9
RV09 (02)	179,5 (0,157)	65	68,5	658,2
RV10 (01)	129,7 (0,184)	78,4	113,4	47,8
RV10 (02)	147,6 (0,131)	80,9	78,2	10,4
RV11 (01)	129,2 (0,186)	71	113,6	242,2
RV11 (02)	139 (0,198)	75,2	71,8	187,2
RV12 (01)	135,7 (0,161)	78,8	65	10
RV12 (02)	158,3 (0,287)	69,4	78,8	8,2

La Figura 3 ilustra los niveles de expresión de SEAP vistos el día 6. Los mejores resultados se vieron con RV04, RV05, RV07, RV08, RV09 y RV11.

10 Diversos de estos liposomas se usaron también para administrar un replicón que codifica una proteína F de RSV de longitud completa. Un estudio comparó RV01, RV05 y RV13; los títulos de IgG en suero específicos de F más altos se vieron con RV01 y los más bajos con RV13. Otro estudio comparó RV01, RV02, RV04 y RV07; los mejores resultados

se vieron de nuevo con RV01, rindiendo RV07 peor. Otro estudio comparó RV01, RV03, RV08, RV09 y RV14; los mejores resultados se vieron de nuevo con RV01, rindiendo RV03 y RV14 peor. Otro estudio comparó RV01, RV10, RV11 y RV15; los mejores resultados se vieron de nuevo con RV01. En general, Los mejores resultados se vieron con RV01, RV05, RV08 y RV09, mientras que RV13 (DOTAP) y RV14 (DC-colesterol) fueron peores.

- 5 De esta manera no todos los liposomas fueron eficaces para provocar respuestas inmunes. En general, aún así, se observó que la mejor efectividad inmunológica se vio cuando el lípido catiónico en los liposomas tuvo un pKa en el intervalo de 5,0 a 7,6 y particularmente en el intervalo de 5,5 a 6,7, entre 5,6 y 6,3, entre 5,6 y 6,0 o entre 5,7 y 5,9.

Expresión de BHK

- 10 Los liposomas con diferentes lípidos se incubaron con células BHK durante toda la noche y se evaluaron para la potencia de expresión de proteínas. Desde una línea basal con lípido RV05, la expresión podría aumentarse 18x añadiendo 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE) al 10 % al liposoma o 10x añadiendo (cis) fosfatidilcolina 18:2 al 10 %. En general, los estudios *in vivo* mostraron que las colas de los lípidos insaturados tienden a potenciar los títulos de IgG elevados contra antígenos codificados.

Inmunogenicidad de RSV

- 15 El replicón auto-replicante vA317 que codifica la proteína F de RSV se administró a ratones BALB/c, 4 u 8 animales por grupo, por vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con el replicón (1 µg) solo o formulado como liposomas con RV05 o (por comparación) con RV01 o RV13. Los liposomas RV01 tuvieron DiinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG-DMG al 2 %, pero con cantidades diferentes de ARN. Los liposomas RV05 tuvieron bien RV05 al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG-DMG al 2 % o RV05 al 60 %, colesterol al 38 % y PEG-DMG al 2 %. Los liposomas RV13 tuvieron DOTAP al 40 %, DOPE al 10 %, colesterol al 48 % y PEG-DMG al 2 %. Los liposomas se prepararon usando diversas técnicas. Por comparación, se administró ADN de plásmido desnudo (20 µg) que expresa el mismo antígeno F de RSV usando electroporación o bien con liposomas RV01(10) (0,1 µg de ADN). Se usaron cuatro ratones como un grupo control sin tratamiento previo.

El diámetro de partícula promedio Z y el índice de polidispersidad fueron:

RV	Zav (nm)	pdl	Preparación
RV01 (10)	158,6	0,088	(A)
RV01 (08)	156,8	0,144	(A)
RV01 (05)	136,5	0,136	(B)
RV01 (09)	153,2	0,067	(A)
RV01 (10)	134,7	0,147	(A)
RV05 (01)	148	0,127	(A)
RV05 (02)	177,2	0,136	(A)
RV13 (02)	128,3	0,179	(A)

- 25 El suero se recogió para el análisis de anticuerpos los días 14, 36 y 49. Los bazo se cosecharon de los ratones el día 49 para el análisis de linfocitos T.

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

RV	Día 14	Día 36
Plásmido de ADN desnudo	439	6712
ARN A317 desnudo	78	2291
RV01 (10)	3020	26170
RV01 (08)	2326	9720
RV01 (05)	5352	54907
RV01 (09)	4428	51316
RV05 (01)	1356	5346
RV05 (02)	961	6915
ADN RV01 (10)	5	13
RV13 (02)	644	3616

La proporción de linfocitos T que son citocina positivos y específicos para el péptido F51-66 del RSV son como sigue, mostrando solamente cifras que son estadísticamente significativas por encima de cero:

RV	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
Plásmido de ADN desnudo	0,04	0,07		0,10	0,57	0,29		0,66
ARN A317 desnudo	0,04	0,05		0,08	0,57	0,23		0,67
RV01 (10)	0,07	0,10		0,13	1,30	0,59		1,32
RV01 (08)	0,02	0,04		0,06	0,46	0,30		0,51
RV01 (05)	0,08	0,12		0,15	1,90	0,68		1,94
RV01 (09)	0,06	0,08		0,09	1,62	0,67		1,71
RV05 (01)					0,06	0,04		0,19
RV05 (02)	0,05	0,07		0,11	0,64	0,35		0,69
ADN RV01 (10)				0,03				0,08
RV13 (02)	0,03	0,04		0,06	1,15	0,41		1,18

De esta manera las formulaciones de liposoma potenciaron significativamente la inmunogenicidad con respecto a los controles de ARN desnudos, como se determina por los títulos de IgG específicos de F y las frecuencias de linfocitos T aumentados. El ADN de plásmido formulado con liposomas o desnudo administrado usando electroporación, fue significativamente menos inmunogénico que el ARN auto-replicante formulado en liposomas.

5 Inmunogenicidad de RSV en diferentes cepas de ratón

El replicón "vA142" codifica la glucoproteína de fusión (F) de superficie de tipo silvestre de longitud completa del RSV pero con el péptido de fusión eliminado y el extremo 3' se forma por escisión mediada por ribozima. Se ensayó en tres cepas de ratón diferentes.

10 A los ratones BALB/c se les dieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 μ l por pata) los días 0 y 22. Los animales se dividieron en 8 grupos de ensayo (5 animales por grupo) y un control sin tratamiento previo (2 animales):

Al Grupo 1 se dio replicón desnudo (1 μ g).

Al Grupo 2 se dio 1 μ g de replicón administrado en liposomas "RV01(37)" con DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, Col al 48 %, DMG conjugado con PEG al 2 %.

Al Grupo 3 se dio lo mismo que al grupo 2, pero a 0,1 μ g de ARN.

15 Al Grupo 4 fue 1 μ g de replicón en liposomas "RV05(11)" (lípidos RV05 al 40 %, 18:2 PE al 30 % (DLoPE, colesterol al 28 %, PEG-DMG al 2 %).

Al Grupo 5 se dieron 5 μ g de proteína de subunidad F de RSV adyuvantada con hidróxido de aluminio.

El Grupo 6 fue un control sin tratamiento previo (2 animales).

20 Los sueros se recogieron para el análisis de anticuerpos los días 14, 35 y 49. Las GMT de las IgG de suero específicas de F fueron:

Día	1	2	3	4	5	6
14	82	2463	1789	1171	1293	5
35	1538	34181	25605	13718	73809	5

El día 35 los títulos (GMT) de IgG1 y IgG2a específicos de F fueron como sigue:

IgG	1	2	3	4	5
IgG1	94	6238	4836	8288	78604
IgG2a	5386	77064	59084	14437	24

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero de RSV los días 35 y 49 fueron como sigue (los datos son títulos de neutralización de reducción en placa del 60 % de conjuntos de 2-5 ratones, 1 conjunto por grupo):

Día	1	2	3	4	5	6
35	<20	143	20	32	111	<20
49	<20	139	<20	41	1009	<20

Los bazos se cosecharon el día 49 para el análisis de linfocitos T. Las frecuencias de linfocitos T citocina-positivos

específicos (CD4+ o CD8+) de F netas promedio fueron como sigue, mostrando solamente cifras que fueron estadísticamente significativas por encima de cero (específicas para los péptidos de RSV F51-66, F164-178, F309-323 para CD4+ o para los péptidos F85-93 y F249-258 para CD8+):

Grupo	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
1	0,03	0,06		0,08	0,47	0,29		0,48
2	0,05	0,10		0,08	1,35	0,52		1,11
3	0,03	0,07		0,06	0,64	0,31		0,61
4	0,03	0,08		0,07	0,65	0,28		0,58
5		0,02			0,04	0,04		
6								

5 Los ratones C57BL/6 se inmunizaron de la misma manera, pero un 7º grupo recibió VRP (1×10^6 UI) que expresan la glucoproteína de fusión de superficie de tipo silvestre de longitud completa de RSV (delección del péptido de fusión).

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

Día	1	2	3	4	5	6	7
14	1140	2133	1026	3045	2975	5	1101
35	1721	5532	3184	9525	39251	5	12139

El día 35 los títulos (GMT) de IgG1 y IgG2a específicos de F fueron como sigue:

IgG	1	2	3	4	5	6
IgG1	66	247	14	468	56258	79
IgG2a	2170	7685	5055	1573	35	14229

10 Los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero de RSV los días 35 y 49 fueron como sigue (los datos son títulos de neutralización de reducción en placa del 60 % de conjuntos de 2-5 ratones, 1 conjunto por grupo):

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

Los bazos se cosecharon el día 49 para el análisis de linfocitos T. Las frecuencias de linfocitos T citocina-positivos específicos (CD8+) de F netas promedio fueron como sigue, mostrando solamente cifras que fueron estadísticamente significativas por encima de cero (específicas para los péptidos de RSV F85-93 y F249-258):

Grupo	CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
1	0,42	0,13		0,37
2	1,21	0,37		1,02
3	1,01	0,26		0,77
4	2,13	0,70		1,77
5	0,10	0,05		
6				
7	2,83	0,72		2,26

15 Nueve grupos de ratones C3H/HeN se inmunizaron de la misma manera. Los títulos de IgG específicos de F (GMT) fueron:

Día	1	2	3	4	5	6	7
14	5	2049	1666	298	3519	5	806
35	152	27754	19008	3424	62297	5	17249

El día 35 los títulos (GMT) de IgG1 y IgG2a específicos de F fueron como sigue:

IgG	1	2	3	4	5	6
IgG1	5	1323	170	136	83114	189
IgG2a	302	136941	78424	15667	3800	72727

Los títulos de anticuerpos neutralizantes de suero de RSV los días 35 y 49 fueron como sigue:

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

De esta manera diferentes lípidos (RV01 y RV05; pKa 5,8 & 5,85) se ensayaron en tres cepas de ratón de cruces diferentes. Para las cepas BALB/c y C3H RV05 fue menos eficaz que RV01, pero fue más eficaz en la cepa B6. En todos los casos, sin embargo, los liposomas fueron más eficaces que dos nanoemulsiones catiónicas que se ensayaron en paralelo.

Ratas algodoneras

El replicón vA142 también se ensayó en ratas algodoneras usando liposomas formados a partir de:

- (a) DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 % y PEG DMG 2000 al 2 %.
- (b) RV05 al 40 %, DLoPE al 30 % (18:2 PE), colesterol al 28 % y PEG DMG 2000 al 2 %.

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

Grupo 1 ARN auto-replicante (vA142, 0,1 µg, RSV-F) formulado en liposomas (a)

Grupo 2 ARN auto-replicante (vA142, 0,1 µg, RSV-F) formulado en liposomas (b)

Grupo 3 ARN auto-replicante (vA142, 1 µg, RSV-F) formulado en liposomas (a)

15 **Grupo 4** ARN auto-replicante (vA142, 1 µg, RSV-F) formulado en liposomas (b)

Grupo 5 VRP (1x10⁶ UI) expresando la glucoproteína F de superficie de tipo silvestre de longitud completa del RSV

Grupo 6 vacuna de proteína de subunidad F de RSV (5 µg) adyuvantada con hidróxido de aluminio

Grupo 7 un control sin tratamiento previo (3 animales)

20 Todas las ratas algodoneras (excepto el grupo 7) se vacunaron con 5 µg de subunidad F + hidróxido de aluminio el día 49 (cuatro semanas después de la segunda vacunación).

El suero se recogió para el análisis de anticuerpos 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	112	1403	943	15123
2	49	1008	513	15308
3	558	3938	2383	16563
4	342	3207	2151	24494
5	1555	7448	4023	25777
6	8425	81297	54776	82911
7	5	5	5	5

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

Grupo	Día 21	Día 35	Día 49	Día 64
1	26	162	58	1772
2	27	371	163	2449
3	66	788	306	161

(continuación)

Grupo	Día 21	Día 35	Día 49	Día 64
4	75	448	201	5733
5	137	2879	1029	1920
6	307	2570	1124	2897
7	10	-	-	10

De esta manera las ratas algodoneras se vacunaron con replicón bA142 formulado con RV01 o RV05 y el replicón se dio a dos dosis (1,0 y 0,1 µg). Después de la primera vacunación de replicón los títulos de IgG en suero específicos de F fueron más altos con RV01 que RV05, pero los títulos de neutralización fueron aproximadamente iguales. Los títulos en todos los grupos se potenciaron mediante una segunda vacunación homóloga dada el día 21. Después de la segunda vacunación de replicón, los títulos de IgG en suero específicos de F fueron de nuevo más altos con RV01 que con RV05 y los títulos de neutralización de RSV siguieron generalmente la misma tendencia.

La vacunación de proteína el día 49 no potenció los títulos de anticuerpo en ratas algodoneras previamente vacunadas con proteína, pero proporcionó una gran potenciación a los títulos en ratas algodoneras previamente vacunadas con ARN. Los títulos (IgG total y neutralización) fueron más altos el día 64 usando RV05 que usando RV01.

Diferentes lípidos catiónicos con el replicón RSV vA317

Experimentos adicionales compararon cuatro lípidos catiónicos diferentes (RV01, RV02, RV04 y RV07). Todos los liposomas contenían PEG-DMG 2000 al 2 % pero el resto de composiciones lipídicas varió. Las composiciones y las características físicas fueron como sigue:

Nombre	Lípido 1	Otros lípidos	Diám Zav (nm)	pdl	% encaps ^a
A	RV01, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	158,6	0,088	90,7
B	RV02, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	146,8	0,084	97,5
C	RV04, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	136,7	0,165	67,3
D	RV04, 60 %	colesterol al 38 %	176,3	0,157	55,2
E	RV07, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	144,9	0,204	82
F	RV07, 60 %	colesterol al 38 %	124,1	0,195	80

Para la comparación de la inmunogenicidad, también se fabricaron liposomas HT, SUV y MLV con RV01, usando los mismos componentes en las mismas proporciones, pero con procedimientos de fabricación que no son escalables (pero son más rápidos). Brevemente, se creó una solución madre de etanol que contenía 37 mg/ml de DLinDMA, 12 mg/ml de DSPC, 28 mg/ml de colesterol y 8 mg/ml de PEG DMG 2000. 100 µl de la solución madre se diluyeron en un total de 1 ml de etanol. Los liposomas se prepararon evaporando la solución de etanol usando un evaporador rotatorio a 19,99 Pa de presión durante 30 minutos a 50 °C. La evaporación de etanol residual se aseguró colocando las muestras durante toda la noche al vacío en un secador por congelación. La película de lípido se hidrató y se dispersó añadiendo 1,0 ml de agua desionizada filtrada y se colocó a 50 °C para asegurar la suspensión completa de los lípidos en los MLV. Una alícuota se retiró de los MLV y se sometió a ultrasonidos con un sonicador de sonda con un pulso de 1 segundo durante 5 minutos a 100 % de potencia para formar los SUV. Ambas de las soluciones resultantes se complejaron con ARN de replicón. Los liposomas HT se fabricaron usando una solución madre de etanol que contenía 37 mg/ml de DLinDMA, 12 mg/ml de DSPC, 28 mg/ml de colesterol y 8 mg/ml de PEG DMG 2000. 100 µl de la solución madre se diluyeron a 400 µl con etanol. La solución de etanol resultante se añadió gota a gota a 600 µl de tampón citrato 10 mM a pH 6,5 que contiene 40 µg de ARN en agitación constante. La solución resultante se dializó durante toda la noche contra 4 l de tampón PBS usando una membrana de diálisis 10.000 MWCO.

A ratones BALB/c, 8 por grupo, se dieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con replicón desnudo (1 µg) o 0,1 µg de ARN encapsulado. Los títulos de IgG en suero específicos de F (GMT) 2 semanas después de estas dos inyecciones fueron como sigue:

Liposomas	Día 14	Día 35
ARN A317 desnudo	111	469
A	1834	30519
B	1050	5681
C	430	4127
D	779	4693
E	586	6424
F	121	2568

(continuación)

Liposomas	Día 14	Día 35
HT	3878	19982
MLV	1381	49480
SUV	4158	37526

Para RV07 la ausencia de DSPC provocó una gran disminución en la inmunogenicidad.

Lípidos adicionales (RV01, RV03, RV08, RV09, RV14) se ensayaron de la misma manera:

Nombre	Lípido 1	Otros lípidos	Diám Zav (nm)	pdl	% encap ⁿ
G	RV01, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	158,6	0,088	90,7
H	RV03, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	150,3	0,188	83,1
I	RV03, 60 %	colesterol al 38 %	161,1	0,239	68,4
J	RV08, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	191,1	0,227	51,7
K	RV08, 60 %	colesterol al 38 %	214,2	0,208	43,1
L	RV09, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	161,6	0,209	64,5
M	RV09, 60 %	colesterol al 38 %	170,7	0,121	82,4
N	RV14, 60 %	DSPC al 30 %	155,5	0,238	63,3
O	RV01, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	96,14	0,087	92

Liposomas	Día 14	Día 35
ARN A317 desnudo	35	457
G	2421	10757
H	15	52
I	16	85
J	991	1921
K	7	610
L	1082	1421
M	146	286
N	27	212
O	4695	19773

- 5 El liposoma N (con DC-colesterol) rindió poco, incluso por debajo del control de ARN desnudo. En cambio, los lípidos catiónicos restantes dieron resultados útiles. El liposoma O se preparó mediante un procedimiento de mezcla diferente (chip microfluídico) a partir del liposoma G y este liposoma más pequeño dio mejores resultados con aproximadamente la misma encapsulación.

Lípidos adicionales (RV01, RV10, RV11, RV15) se ensayaron de la misma manera:

Nombre	Lípido 1	Otros lípidos	Diám Zav (nm)	pdl	% encap ⁿ
P	RV01, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	158,6	0,088	90,7
Q	RV10, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	123,6	0,14	80,3
R	RV11, 40 %	DSPC al 10 %, colesterol al 48 %	137,1	0,155	81
S	RV11, 60 %	colesterol al 38 %	135,4	0,175	79,7
T	RV15, 40 %	colesterol al 38 %	111	0,167	76,4

10

Liposomas	Día 14	Día 35
ARN A317 desnudo	185	982
P	2787	27416
Q	24	161
R	633	1715
S	405	2733

(continuación)

Liposomas	Día 14	Día 35
T	761	2459

5 Excepto por el liposoma Q cada uno de estos liposomas rindió mejor que el control. El lípido RV10 en el liposoma Q tiene un pKa de 7,86 que parece ser demasiado alto para ser útil *in vivo*. Incluso dentro del intervalo de pKa útil de 5,0 a 7,6, sin embargo, aunque los resultados fueron buenos, ninguno de los lípidos con una cola de alquilo y una cola que contiene esteroide dio resultados tan buenos como RV01.

Se fabricaron liposomas adicionales con RV05. Los liposomas tuvieron todos un 40 % de RV05 y un 2 % de lípido PEGilado, pero los componentes restantes variaron (aunque siempre se incluyó el colesterol). Las características físicas fueron:

Nombre	lípido PEGilado	Otros componentes	Zav (nm)	pdl	% de encapsul ⁿ
U	DMG	DSPC al 10 %, Col al 48 %	102,2	0,12	76,81
V	Colesterol	DSPC al 10 %, Col al 46 %, 2 % α GC	103,7	0,107	72,58
W	DMG	DPyPE al 10 %, Col al 48 %	99,6	0,115	78,34
X	DMG	PC 18:3 al 10 %, Col al 48 %	130	0,14	87,92
Y	DMG	PC 18:2 al 10 %, Col al 48 %	101,1	0,133	76,64
Z	DMG	PC 18:2 al 30 %, Col al 28 %	134,3	0,158	57,76

α GC = α -galactosilceramida

Los ratones BALB/c se ensayaron como antes:

Inyección	Día 14	Día 35
ARN desnudo	321	915
U	551	955
V	342	2531
W	1127	3881

10

X	364	1741
Y	567	5679
Z	1251	5303

Para un lípido catiónico con una cola de lípido asimétrica (alquilo + colesterol), cambiar el lípido neutro del DSPC (cola lipídica C18 saturada) a PC 18:2 o 18:3 (con 2 y 3 dobles enlaces insaturados por cola) aumentó los títulos de IgG totales. Se observaron resultados comparables reemplazando DSPC por DPyPE.

15 En un experimento final con el lípido RV05 se fabricó un liposoma con RV05 al 40 %, PC 18:2 al 10 %, DPyPE al 40 %, colesterol al 8 % y PEG DMG 2000 al 2 %. Estos liposomas tuvieron un diámetro Zav de 124,7 nm, un pdl de 0,17 y una encapsulación de ARN del 61,5 %. Se usaron para vacunar ratones BALB/c como antes (dosis de 0,1 μ g de ARN), en comparación con ARN desnudo (1 μ g) o con liposomas a base de RV01 (DlinDMA al 40 %, DSPC al 10 %, colesterol al 48 %, PEG DMG 2000 al 2 %). Los títulos de IgG en suero específicos de F (GMT) fueron como sigue:

Grupo	Día 14	Día 35
ARN desnudo	28	721
RV01	2237	12407
RV05	703	1732

20 De esta manera los liposomas RV05 fueron más inmunogénicos que el ARN desnudo, pero menos inmunogénicos que los liposomas RV01.

Los bazo se cosecharon el día 49 para el análisis de linfocitos T. Las frecuencias de linfocitos T citocina-positivos específicos (CD4+ o CD8+) de F netas promedio fueron como sigue, mostrando solamente cifras que fueron estadísticamente significativas por encima de cero (específicas para los péptidos de RSV F51-66, F164-178, F309-323 para CD4+ o para los péptidos F85-93 y F249-258 para CD8+):

25

Grupo	CD4-CD8+				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
Desnudo	0,02	0,02	0,04		0,36	0,16		0,28
RV01	0,03	0,03	0,04		0,66	0,17		0,56
RV05	0,06	0,06	0,09		0,86	0,24		0,69

En términos de respuestas de linfocitos T, por lo tanto, RV05 dio mejores resultados que RV01.

Tabla 1: fosfolípidos útiles

DDPC	1,2-Didecanoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-fosfato
DEPC	1,2-Erucoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG	1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS	1,2-Dilauroil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG	1,2-Miristoil-sn-Glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPS	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfato
DOPC	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOPS	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPS	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-diftanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfato
DSPC	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diostearoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPS	1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenado
HSPC	PC de soja hidrogenado de alta pureza
HSPC	PC de soja hidrogenado
LYSOPC MIRÍSTICO	1-Miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMÍTICO	1-Palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC ESTEÁRICO	1-Estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
MPPC de esfingomielina de leche	1-Miristoil,2-palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
MSPC	1-Miristoil,2-stearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

PMPC	1-Palmitoil,2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-Palmitoil,2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG	1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
PSPC	1-Palmitoil,2-stearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-Estearoil,2-miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-Estearoil,2-oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-Stearoil,2-palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

REFERENCIAS

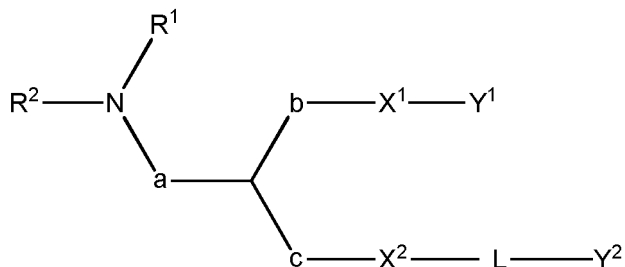
- [1] Johanning y col. (1995) *Nucleic Acids Res* 23:1495-1501.
- [2] Heyes y col. (2005) *J Controlled Release* 107:276-87.
- [3] Documento WO2005/121348.
- 5 [4] *Liposomes: Methods and Protocols, Volumen 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols.* (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [5] *Liposome Technology, volúmenes I, II & III.* (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [6] *Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes).* (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002.
- 10 [7] Jeffs y col. (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372.
- [8] Documento WO2011/076807.
- [9] Tarwadi y col. (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:940-950.
- [10] Documento WO2005/113782.
- [11] Documento WO2011/005799.
- 15 [12] El Ouahabi y col. (1996) *FEBS Letts* 380:108-12.
- [13] Giuliani y col. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29): 10834-9.
- [14] Documento WO2009/016515.
- [15] Documento WO02/34771.
- [16] Documento WO2005/032582.
- 20 [17] Documento WO2010/119343.
- [18] Documento WO2006/110413.
- [19] Documento WO2005/111066.
- [20] Documento WO2005/002619.
- [21] Documento WO2006/138004.
- 25 [22] Documento WO2009/109860.
- [23] Documento WO02/02606.
- [24] Documento WO03/018054.
- [25] Documento WO2006/091517.
- [26] Documento WO2008/020330.
- 30 [27] Documento WO2006/089264.
- [28] Documento WO2009/104092.

- [29] Documento WO2009/031043.
- [30] Documento WO2007/049155.
- [31] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [32] Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- 5 [33] Handbook of Experimental Immunology, Vol. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [34] Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [35] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- 10 [36] Ausubel y col. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).
- [37] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)
- [38] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [39] Yoneyama & Fujita (2007) Cytokine & Growth Factor Reviews 18:545-51.
- [40] Maurer y col. (2001) Biophysical Journal, 80:2310-2326.
- 15 [41] Perri y col. (2003) J Virol 77:10394-10403.

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma dentro del cual se encapsula un inmunógeno polipeptídico, en el que el liposoma incluye al menos un compuesto de fórmula (I), en el que

la Fórmula (I) es:



5

en la que:

R¹ y R² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo C₃₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterocicloalquenilo C₃₋₂₀, heterocicloalquinilo C₃₋₂₀ o heteroarilo C₅₋₂₀;

10

a está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

b está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

c está ausente o es alquileo C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

X¹ es O o S;

X² es O o S;

15

Y¹ es alquileo C₁₀₋₃₀ opcionalmente sustituido, alquileo C₁₀₋₃₀, heteroalquileo C₁₀₋₃₀ o heteroalquinilo C₁₀₋₃₀;

L está ausente o es -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, en la que

L^a es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquilenilo C₁₋₁₅, alquilenilo C₁₋₁₅, heteroalquileo C₁₋₁₅, heteroalquilenilo C₁₋₁₅ o heteroalquinilenilo C₁₋₁₅;

L^b es arileno C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido o heteroarileno C₅₋₁₃;

20

L^c es alquileo C₁₋₁₅ opcionalmente sustituido, alquilenilo C₁₋₁₅, alquilenilo C₁₋₁₅, heteroalquileo C₁₋₁₅, heteroalquilenilo C₁₋₁₅ o heteroalquinilenilo C₁₋₁₅;

d es 0 o 1;

e es 0 o 1; y

f es 0 o 1; e

Y² es un esteroide opcionalmente sustituido.

25

2. El liposoma de la reivindicación 1, en el que el liposoma tiene un diámetro en el intervalo de 80-160 nm.

3. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN es un ARN auto-replicante.

4. El liposoma de la reivindicación 3, en el que la molécula de ARN auto-replicante codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN auto-replicante y (ii) el polipéptido de interés.

30

5. El liposoma de la reivindicación 4, en el que la molécula de ARN tiene dos marcos de lectura abiertos, el primero de los cuales codifica una replicasa de alfavirus y el segundo de los cuales codifica el polipéptido de interés.

6. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que la molécula de ARN tiene 9000-12000 nucleótidos de longitud.

7. El liposoma de cualquier reivindicación anterior, en el que el inmunógeno puede provocar una respuesta inmune *in vivo* contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.

35

8. El liposoma de la reivindicación 7, en el que el inmunógeno puede provocar una respuesta inmune *in vivo* contra una glucoproteína F del virus sincitial respiratorio.

9. Una composición farmacéutica que comprende un liposoma de cualquier reivindicación anterior.

40

10. El liposoma de la reivindicación 1-8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9, para su uso en un procedimiento para potenciar una respuesta inmune protectora en un vertebrado, comprendiendo la etapa de administrar al vertebrado una cantidad eficaz de dicho liposoma o de dicha composición farmacéutica.

FIG. 1

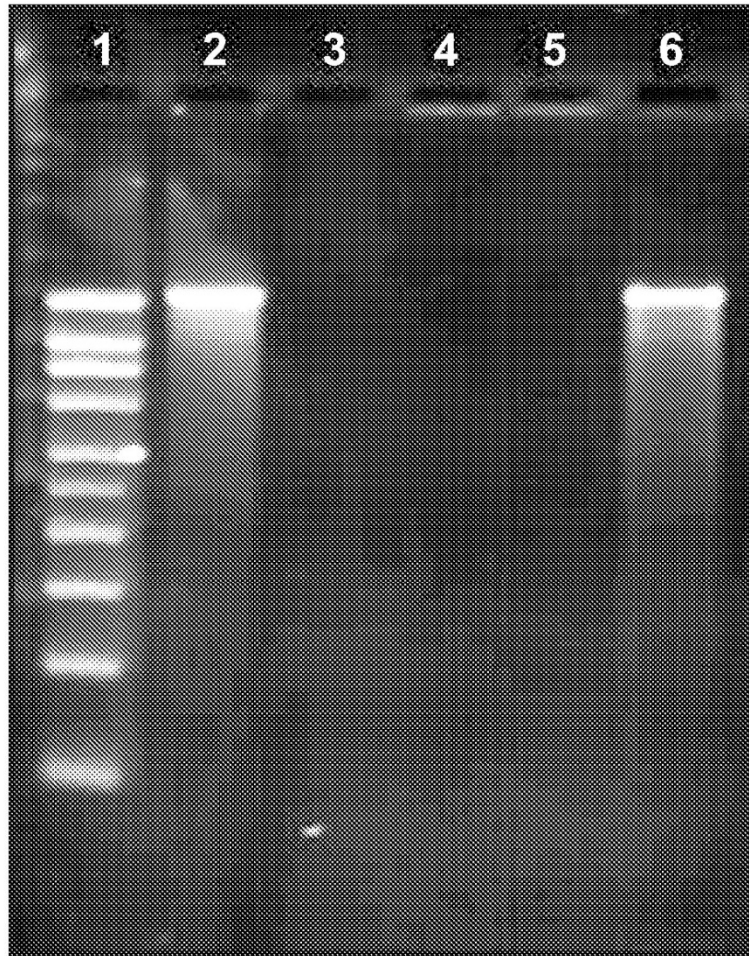


FIG. 2

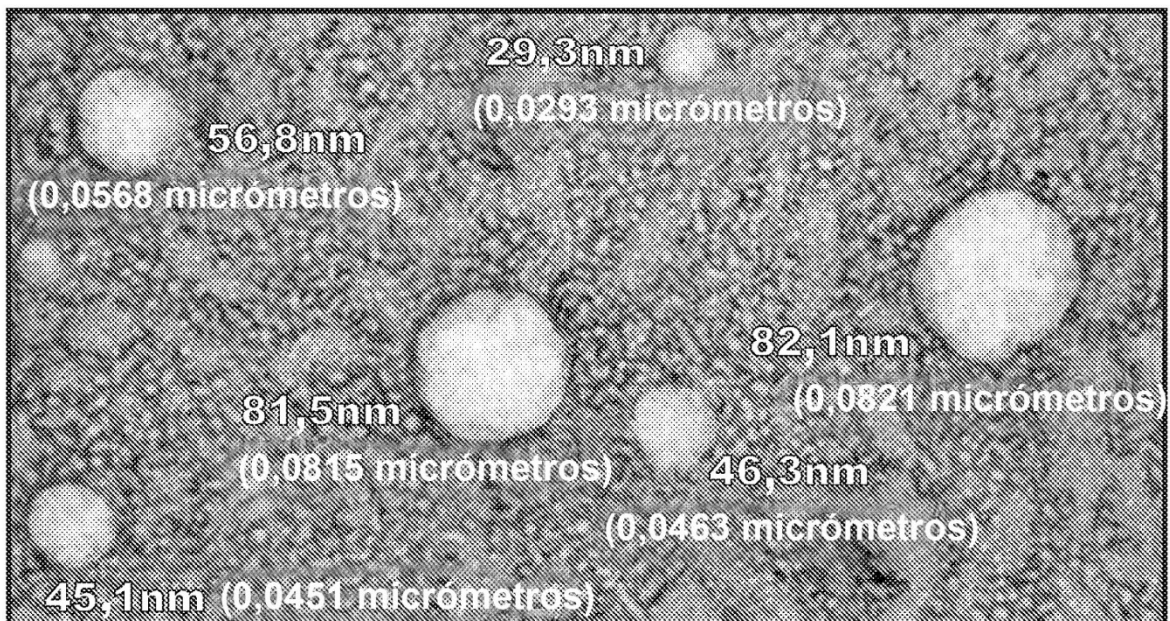


FIG. 3

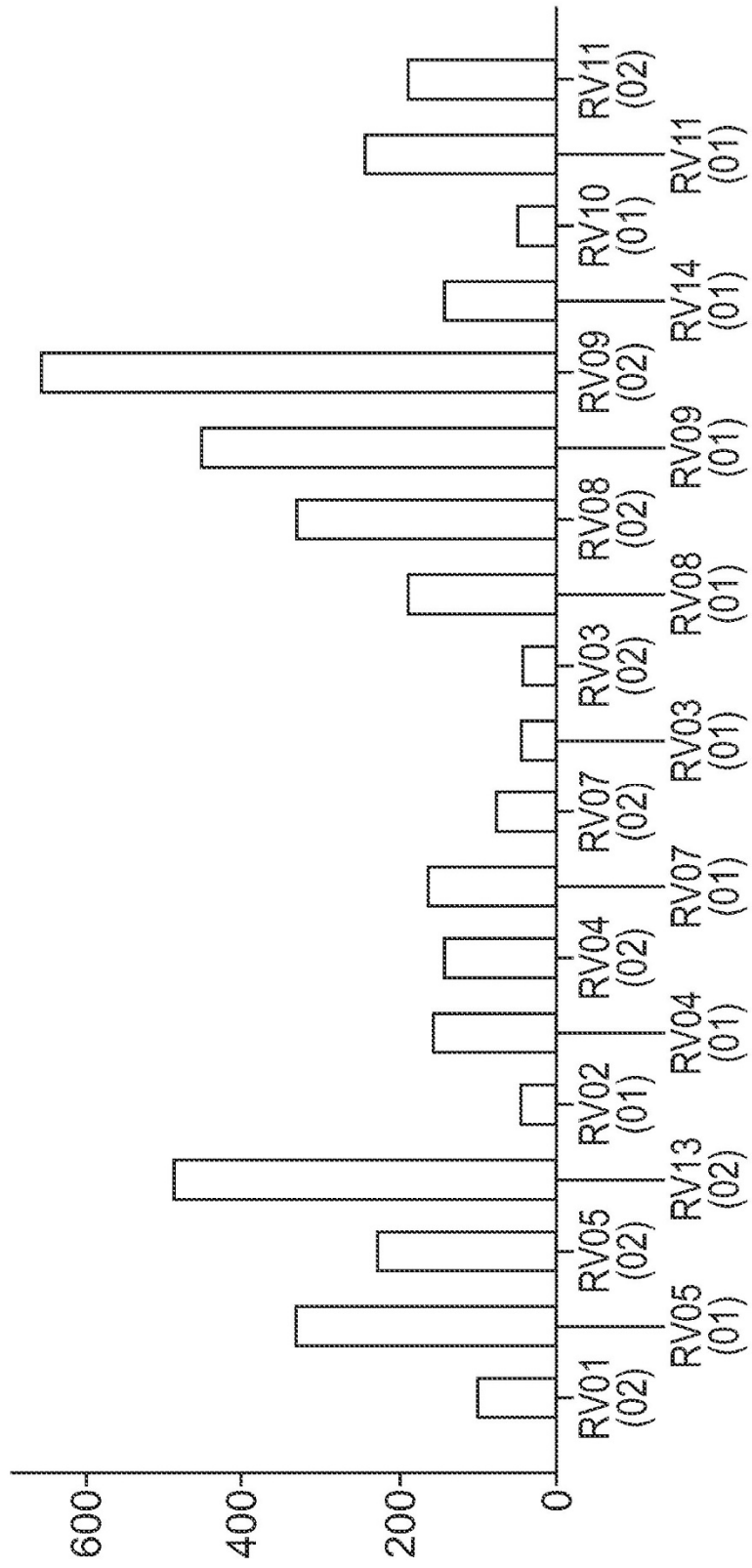


FIG. 4

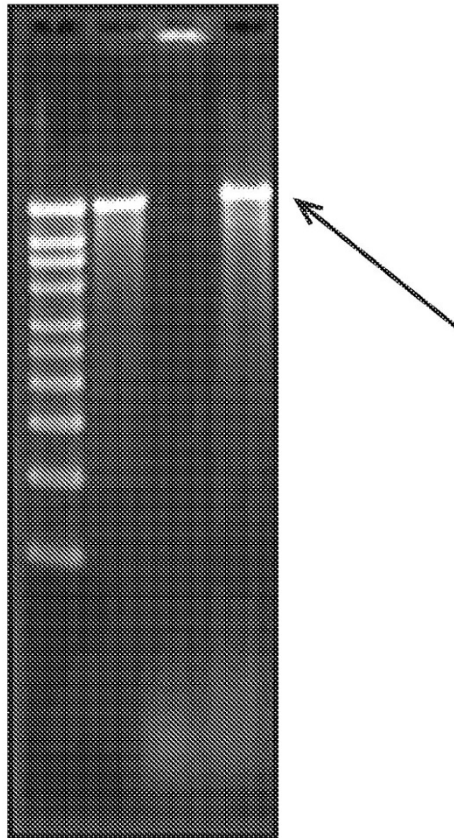


FIG. 5

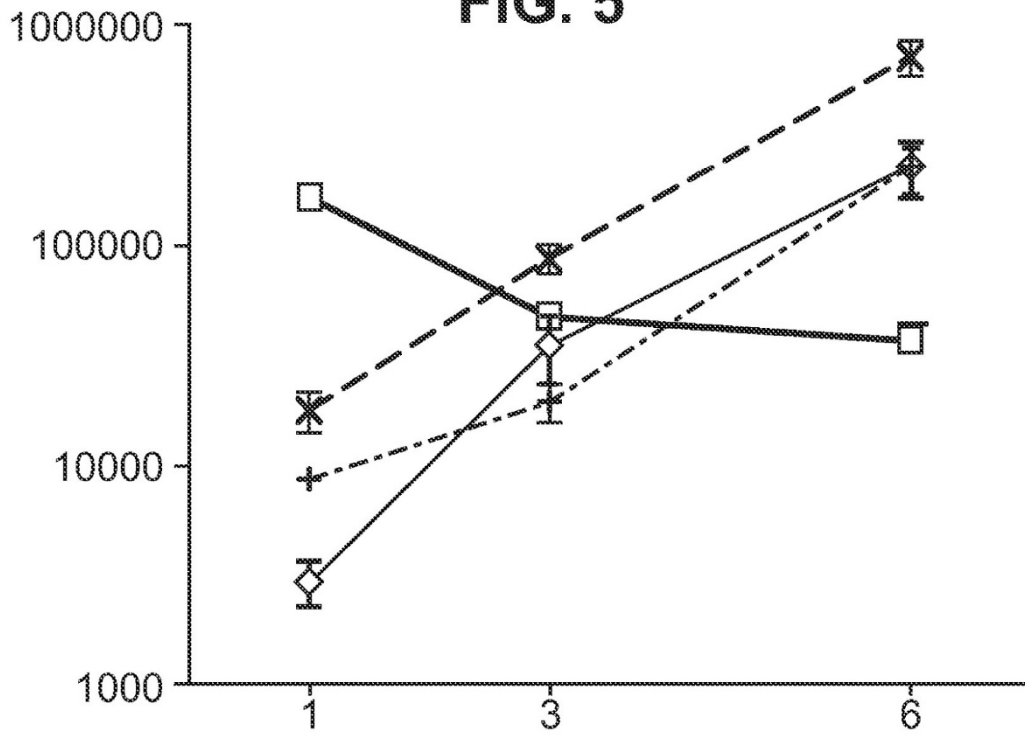


FIG. 6

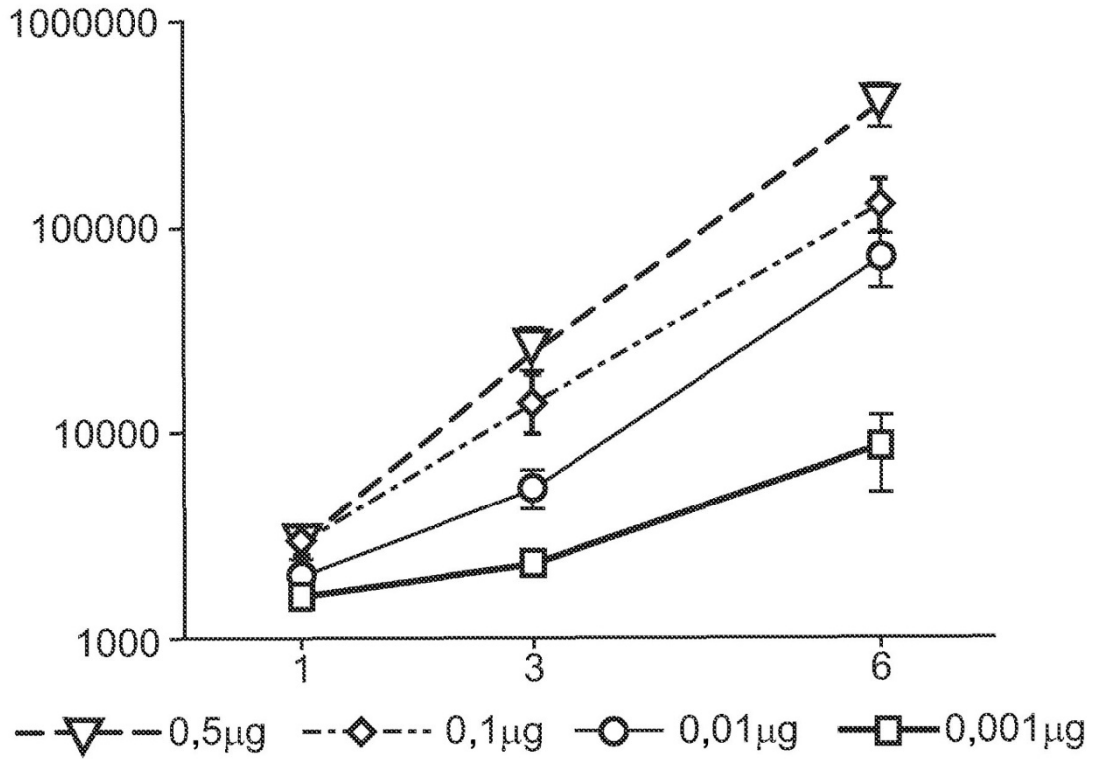


FIG. 7

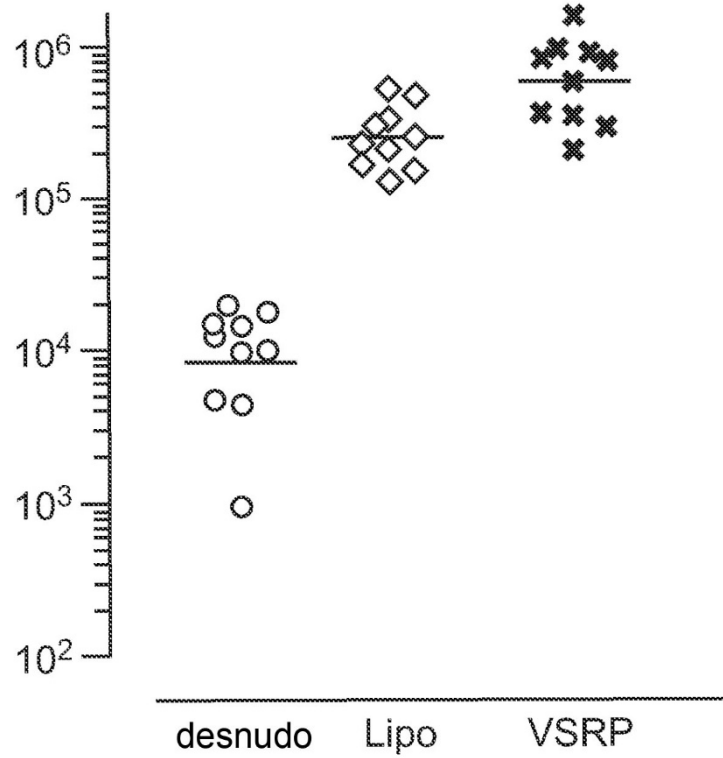


FIG. 8

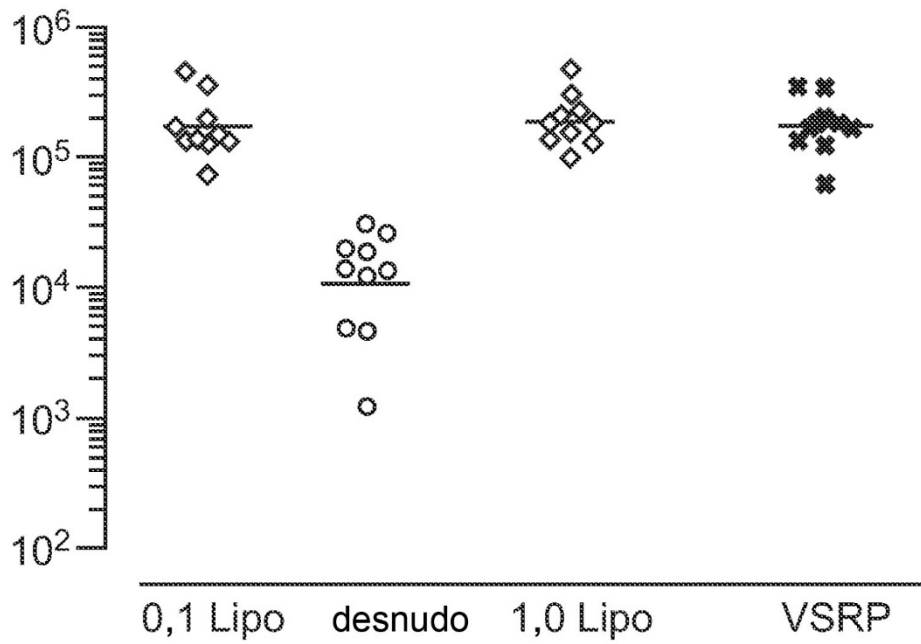


FIG. 9

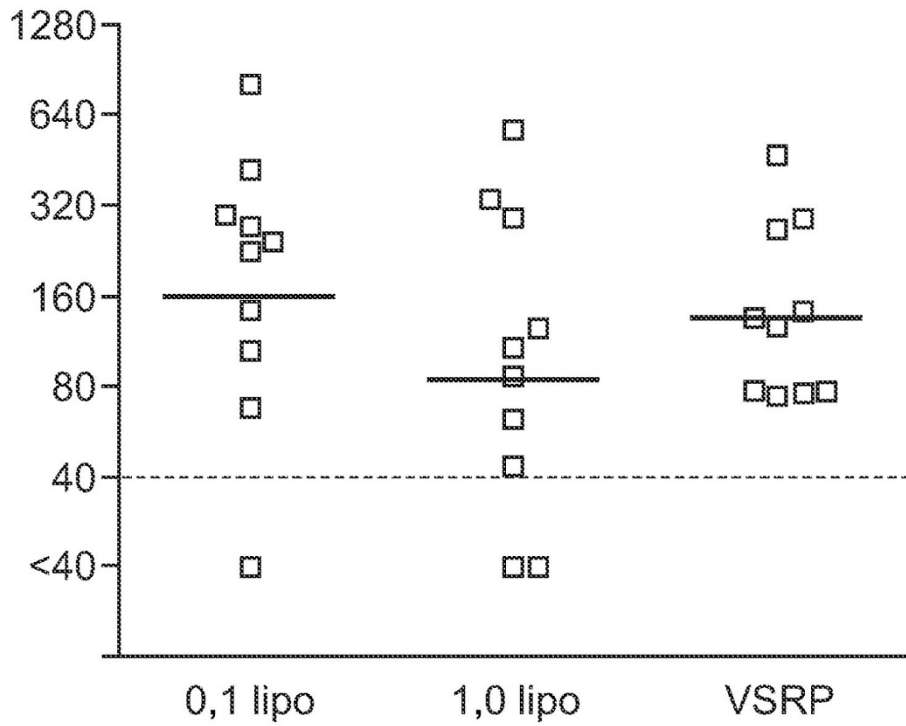


FIG. 10

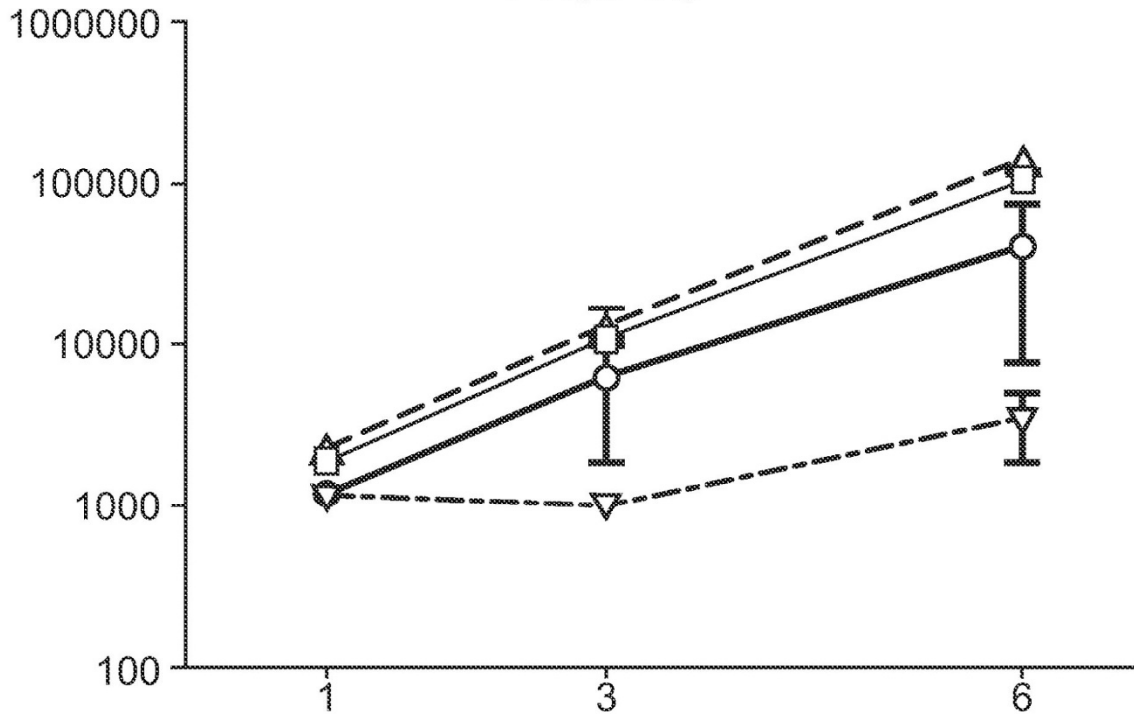


FIG. 11

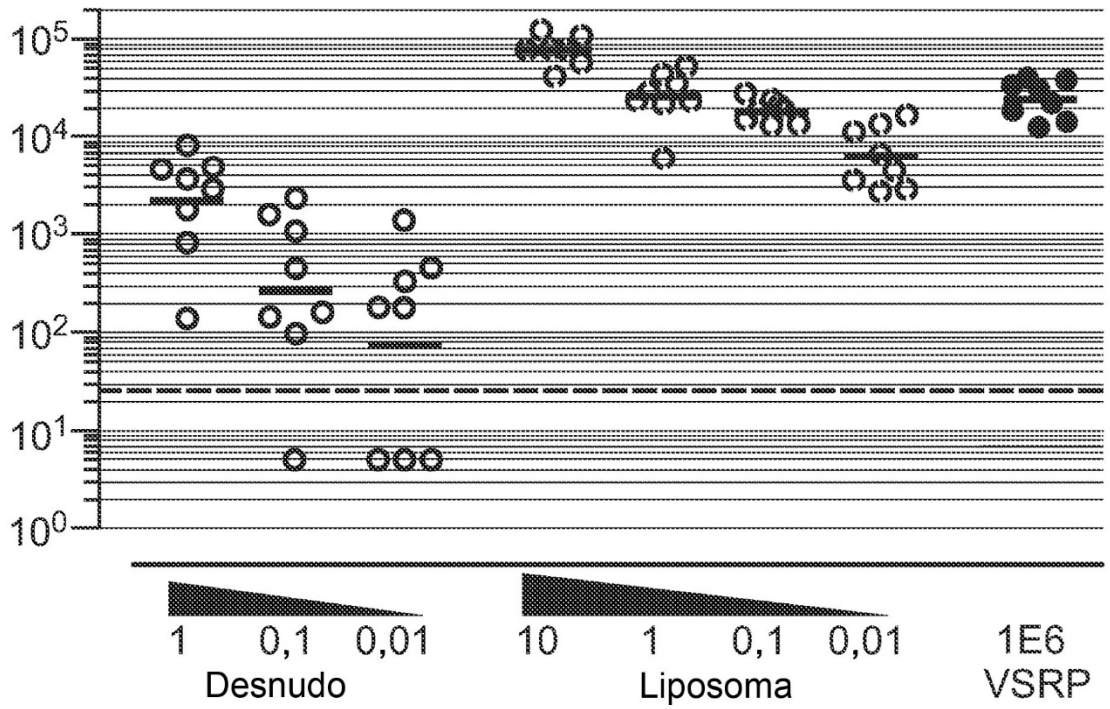


FIG. 12

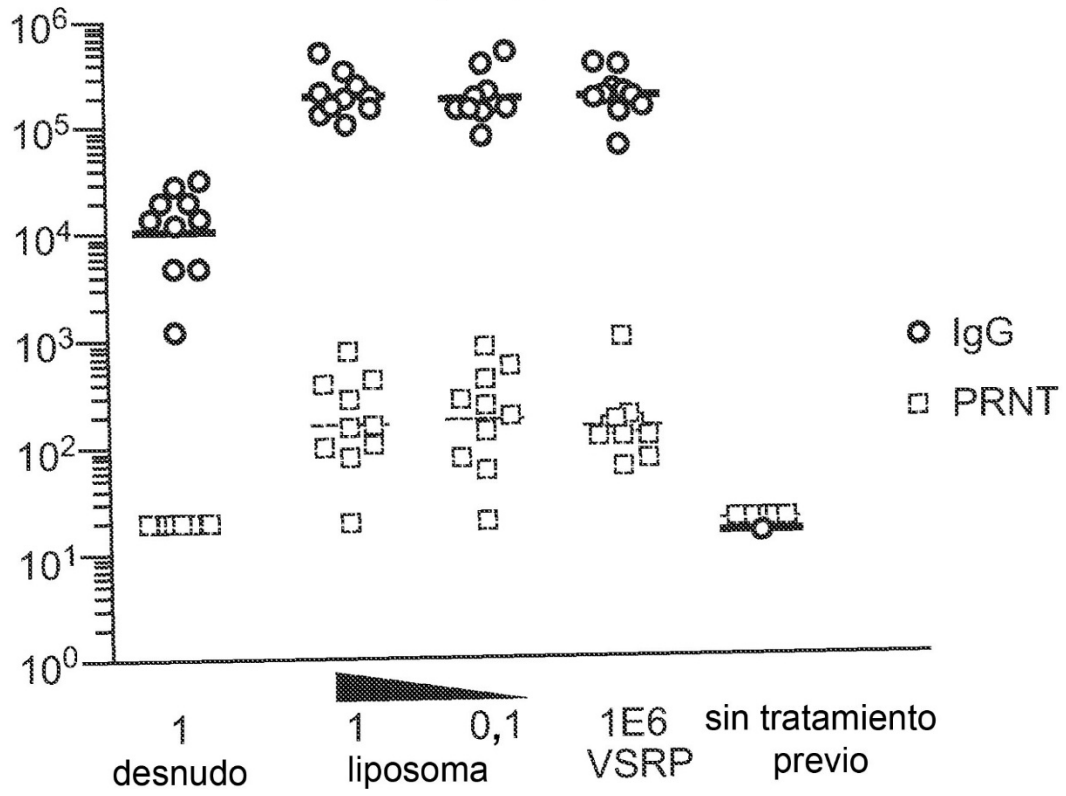


FIG. 14

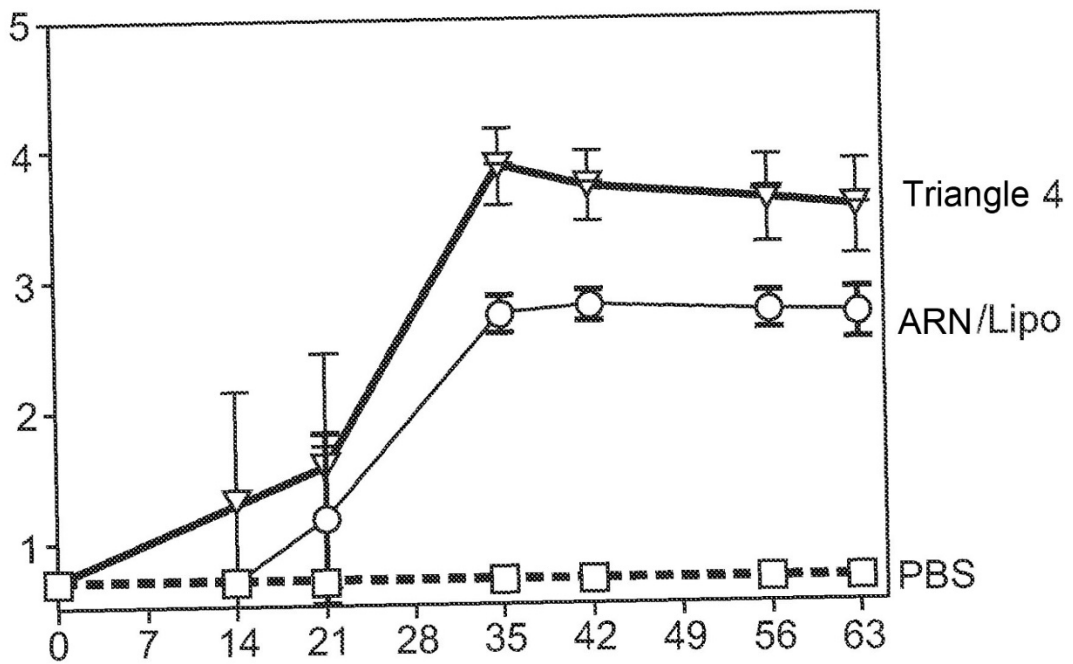


FIG. 13

