

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 893**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/88** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011 PCT/US2011/043086**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006359**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11736496 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2591117**

54 Título: **Administración de ARN autorreplicante utilizando partículas de polímeros biodegradables**

30 Prioridad:

**06.07.2010 US 361907 P**

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

**26.11.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JAIN, SIDDHARTHA;  
SINGH, MANMOHAN y  
O'HAGAN, DEREK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 732 893 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

Administración de ARN autorreplicante utilizando partículas de polímeros biodegradables

**Antecedentes**

- 5 Los portadores de partículas se han utilizado con antígenos adsorbidos o atrapados en intentos por obtener respuestas inmunes adecuadas. Dichos portadores presentan múltiples copias de un antígeno seleccionado al sistema inmune y se cree que promueven la captura y la retención de los antígenos en los ganglios linfáticos locales. Estas partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden aumentar la presentación de antígenos a través de la liberación de citoquinas.

**Sumario de la divulgación**

- 10 En un aspecto, la presente divulgación provee composiciones inmunogénicas que comprenden (a) partículas cargadas positivamente que comprenden a un polímero biodegradable y (b) un replicón de ARN que comprende al menos un polinucleótido que codifica al menos para un antígeno absorbido a las nanopartículas cargadas positivamente.

- 15 En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden: (a) partículas cargadas positivamente que comprenden un polímero biodegradable y un tensioactivo catiónico; (b) un replicón de ARN que comprende al menos un polinucleótido que codifica para al menos un antígeno absorbido en las partículas cargadas positivamente; y (c) un tensioactivo no iónico.

- 20 En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden: (a) partículas cargadas positivamente que comprenden un polímero biodegradable y a un tensioactivo catiónico y (b) un replicón de ARN que comprende al menos un polinucleótido que codifica para al menos un antígeno absorbido a las partículas cargadas positivamente, en el que la proporción del número de moles de nitrógeno catiónico en el tensioactivo catiónico al número de moles de fosfato aniónico en el replicón de ARN (referido en la presente como la proporción N:P) se encuentra en intervalos de 100:1 a 1:100.

Composiciones inmunogénicas de acuerdo con la divulgación pueden ser liofilizadas.

- 25 Las partículas en las composiciones inmunogénicas de la divulgación incluyen nanopartículas y micropartículas. En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas de la divulgación comprenden nanopartículas que tienen un valor  $D(v,0,5)$  que se encuentra entre 50 y 500 nanómetros, un valor Z promedio que se encuentra entre 50 y 500 nanómetros, o ambos. En ciertas realizaciones diferentes, las composiciones inmunogénicas de la divulgación comprenden nanopartículas que tienen un valor  $D(v,0,5)$  que se encuentra entre 500 y 5000 nanómetros, un valor Z promedio que se encuentra entre 500 y 5000 nanómetros, o ambos.

- 30 Las partículas en las composiciones inmunogénicas de la divulgación típicamente comprenden polímeros que se pueden esterilizar, son sustancialmente no tóxicos y son biodegradables. Tales materiales incluyen poliésteres (por ejemplo poli(hidroxiácidos)) tales como polilactida y poliglicolida, poli[ésteres cíclicos] tales como caprolactona, etc.), policarbonatos, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, polifosfacenos y combinaciones de los mismos, entre otros. Más típicamente, las partículas para el uso con la presente divulgación son partículas de polímeros derivadas de poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), por ejemplo, de una poli(lactida) ("PLA") tal y como una poli(L-lactida) o una poli(D,L-lactida), de un copolímero de lactida y glicolida ("PLGA") tal y como un poli(L-lactida-co-glicolida) o poli(D,L-lactida-co-glicolida), o de un copolímero de lactida y caprolactona, entre otros. Las partículas de polímero pueden formarse así utilizando cualquiera de los diversos materiales de partida poliméricos que tienen una variedad de pesos moleculares, tal y como PLGA, una variedad en la proporción monomérica (por ejemplo, lactida:glicolida), la selección, que será en gran parte una cuestión de elección, dependiendo en parte de las especies coadministradas. Estos y otros parámetros se discuten a continuación.

- 45 Los tensioactivos catiónicos para uso en las composiciones de la divulgación varían ampliamente y a continuación se describen numerosos ejemplos. En ciertas realizaciones preferidas, el tensioactivo catiónico es seleccionado de (1,2-dioleoil oxipropil), sal N,N,N-trimetil amonio (DOTAO), dimetil dioctadecil amonio (DDA) y 3-beta-[N-(N',N' dimetilaminoetano)carbamoil] colesterol (DC-Col), entre muchas otras posibilidades.

- 50 Los tensioactivos no iónicos para el uso en las composiciones de la divulgación varían ampliamente y a continuación se describen numerosos ejemplos. En ciertas realizaciones preferidas, el tensioactivo no iónico es seleccionado de poli(alcohol vinílico), polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80) y poloxámeros, entre muchas otras posibilidades.

En ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas de acuerdo con la divulgación comprenderán un poliol, un carbohidrato, o ambos.

Los replicones de ARN para el uso en la divulgación varían ampliamente e incluyen replicones de alfavirus, por ejemplo, replicones de alfavirus derivados de Sindbids (SIN), encefalitis equina venezolana (VEE), virus de Semliki Forest (SFV) y combinaciones de los mismos, entre otros alfavirus.

5 Los antígenos expresados por los replicones de ARN, de acuerdo con la divulgación, incluyen antígenos asociados con virus, bacterias, parásitos, hongos y otros microbios, así como cualquiera de los diversos antígenos tumorales.

La carga neta de una población de partículas dada, puede ser medida utilizando técnicas conocidas incluyendo la medición del potencial zeta de partículas. En ciertas realizaciones la suspensión de partículas de acuerdo con la divulgación tiene un potencial zeta positivo.

10 Por ejemplo, en el caso de las composiciones liofilizadas, tras la adición de agua en una cantidad tal que las partículas están presentes en una concentración de 1-25 mg/ml (por ejemplo, que varía de 1 a 2 a 5 a 10 a 15 a 20 a 25 mg/ml), según la proporción N:P y la carga del tensioactivo catiónico, se puede formar una suspensión en la que las partículas suspendidas tienen un potencial zeta que es mayor que +20 mV, por ejemplo, desde +20 mV a +25 mV a +30 mV a +35 mV a +40 mV a +45 mV a +50 mV a +55 mV a + 60 mV o más.

15 En diversas realizaciones, las composiciones liofilizadas tienen un potencial zeta de acuerdo con el intervalo previo cuando se suspenden a una concentración adecuada para la administración. Por ejemplo, las composiciones liofilizadas, de acuerdo con la presente divulgación, pueden proporcionarse a profesionales de la salud junto con instrucciones sobre el volumen apropiado del fluido (por ejemplo, agua para inyección, etc.) para utilizar la resuspensión/reconstitución de la composición.

20 En ciertas realizaciones la composición de partículas, de acuerdo con la presente divulgación, pueden comprender adyuvantes inmunológicos. Ejemplos de adyuvantes inmunológicos incluyen oligonucleótidos CpG, ARN de doble cadena, toxinas termolábiles de *E. coli*, alumbre, compuestos lipopolisacáridos fosfato, compuestos miméticos de lipopolisacáridos fosfato, análogos de monofosforil lípido A, potenciadores inmunitarios de moléculas pequeñas, muramil tripéptido fosfatidiletanolamina y tocoferoles, entre muchos otros.

25 Los adyuvantes inmunológicos pueden estar asociados, por ejemplo, con la superficie de las partículas (por ejemplo, absorbidas o unidas de otra manera), atrapadas dentro de las partículas, o ambas. En ciertas realizaciones, un adyuvante inmunológico puede estar asociado con la superficie de o atrapado dentro de la población de partículas cargadas positivamente que comprenden el replicón de ARN absorbido.

30 En otros aspectos, la presente divulgación provee procedimientos para la producción de composiciones inmunogénicas.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, se provee un procedimiento para formar una composición inmunogénica que comprende: (a) proporcionar partículas cargadas positivamente que comprenden un polímero biodegradable y un tensioactivo catiónico y (b) adsorber un replicón de ARN que comprende al menos un polinucleótido que codifica para al menos un antígeno adsorbido a las partículas cargadas positivamente, en el que la proporción del número de moles de nitrógeno catiónico en el tensioactivo catiónico al número de moles de fosfato aniónico en el replicón de ARN (proporción N:P) está en un intervalo de 10:1 a 1:10.

35 En otras realizaciones, se proporciona un procedimiento para formar una composición inmunogénica que comprende: (a) proporcionar una primera suspensión que comprende partículas cargadas positivamente que comprenden un polímero biodegradable y un tensioactivo catiónico; (b) absorber un replicón de ARN que comprende al menos un polinucleótido que codifica para al menos un antígeno a las nanopartículas en la primera suspensión para formar una segunda suspensión, (c) agregar al menos un componente adicional que comprende un tensioactivo no iónico a la segunda suspensión para formar una tercera suspensión, y (d) liofilizar la tercera suspensión.

40 En algunas de estas realizaciones, la primera suspensión se forma mediante un procedimiento que comprende: (a) combinar (i) un primer líquido que comprende el polímero biodegradable y el tensioactivo catiónico disuelto en solvente orgánico con (ii) un segundo líquido que comprende agua, con lo que se forma la primera suspensión de nanopartículas que comprenden al polímero biodegradable y el tensioactivo catiónico.

En algunas de estas realizaciones, al menos un componente adicional es seleccionado de los polioles, carbohidratos y combinaciones de los mismos.

50 En aún otros aspectos, la presente divulgación proporciona procedimientos para suministrar las composiciones de partículas a un animal huésped (por ejemplo, con fines terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico). El animal huésped (también denominado "sujeto vertebrado" o "sujeto") es preferiblemente un animal vertebrado, más preferiblemente un mamífero, y aún más preferiblemente un ser humano.

55 En aún otros aspectos de la divulgación, una respuesta inmune es estimulada en un animal hospedero de vertebrados al administrar las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento al animal.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la presente divulgación se harán más evidentes para los expertos en la técnica en vista de la divulgación de el presente documento.

### Descripción breve de las figuras

5 Las Figuras 1A-1F muestran una secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:1) para un plásmido que codifica para pT7-mVEEV-FL.RSVF (A317).

Las Figuras 2A-2F muestran una secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:2 para un plásmido que codifica para pT7-mVEEV-FASE (A306).

Las Figuras 3S-3G muestran una secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:3) para un plásmido que codifica para VEE/SIN de ARN auto replicante que contiene el largo completo de RSV-F y al promotor SP6.

10 La Figura 4 muestra un gel para 4 % p/p de nanopartículas PLG/DOTAP formadas utilizando acetona (Tipo I) o acetato de etilo (Tipo II) como solvente orgánico con ARN adsorbido a una proporción 10:1. Para la formulación de cada nanopartícula se muestra lo siguiente: (a) un carril de gel correspondiente al sobrenadante obtenido de las partículas PLG que fueron no tratadas con ARNasa y centrifugadas (para determinar la eficiencia de absorción del ARN), (b) un carril de gel correspondiente a un control en el que el ARN fue desorbido de las partículas de PLG que no fueron tratadas con ARNasa, y (c) un carril de gel correspondiente al ARN adsorbido a las partículas de PLG que fueron tratadas con ARNasa seguido de desorción de las partículas de PLG.

20 La Figura 5 muestra un gel para 4 % p/p de micropartículas PLG/DOTAP con ARN adsorbido a una proporción de N:P de 10:1, 4:1 y 1:4. Para cada formulación de micropartículas se muestra lo siguiente: (a) un carril de gel correspondiente al sobrenadante obtenido de las partículas PLG que fueron no tratadas con ARNasa y centrifugadas (para determinar la eficiencia de absorción del ARN), (b) un carril de gel correspondiente a un control en el que el ARN desorbido (ARN descomplejado) de partículas de PLG que no fueron tratadas con ARNasa, y (c) un carril de gel correspondiente al ARN adsorbido a las partículas de PLG que fueron tratadas con ARNasa seguido de desorción de las partículas de PLG. También se muestran carriles de geles para controles de ARN sin digerir y digerido.

La Figura 6A muestra la expresión combinada de FASE (expresada como RLU) en ratones para diversas formulaciones a los días 1, 3 y 6 después de la inyección.

La Figura 6B muestra la expresión individual de FASE (expresada como RLU) en ratones para diversas formulaciones 6 días después de la inyección.

30 La Figura 7 muestra la expresión de FASE combinada (expresada como RLU) en ratones para diversas formulaciones, incluyendo el 4 % p/p de nanopartículas de PLG Tipo I (acetona) y Tipo II (acetato de etilo) 1, 3 y 6 días después de la inyección.

35 Las Figuras 8A y 8B muestran los resultados para 4 % p/p de micropartículas PLG con ARN RSV-F adsorbido utilizando diferentes tensioactivos catiónicos (DOTAP, DDA Y DC-colesterol) a la proporción N:P de 10:1, 4:1, y 1:4. También se muestran datos de ARN desnudo. Los datos se representan a) en la Figura 8A como tituladores de IgG en los días 13 y 28, y b) en la Figura 8B en el Día 28, a medida que aumenta la titulación de IgG sobre 1 µg de ARN desnudo (es decir, titulación de IgG con formulación/IgG con 1 µg de ARN desnudo).

### Descripción detallada de la divulgación

40 La práctica de la presente divulgación va a emplear, a menos que se indique lo contrario, los procedimientos convencionales de química, química de polímeros, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de las técnicas. Dichas técnicas se explican a detalle en la literatura. Véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, 5th ed. (Blackwell Publishers, 1996); Sam- brook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); Ausubel, F.M. et al., Short Protocols In Molecular Biology, 5th ed. (Current Protocols, 2002); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S., ed, CRC Press, 2003) y Seymour/Carraher's Polymer Chemistry, 5th ed. (Marcel Dekker Inc., 2007).

50 Como se utiliza en esta especificación y en cualquiera de las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" "uno" "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique de forma clara lo contrario. Así, por ejemplo, el término "partícula" se refiere a una o más partículas, y similares.

A menos que se indique lo contrario o a menos que el contexto indique claramente lo contrario, todos los porcentajes y proporciones en el presente documento se dan con base en el peso.

### A. Definiciones

En la presente divulgación, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

El término “partícula” como se utiliza en el presente documento, se refiere a una partícula con un tamaño menor a 10  $\mu\text{m}$  (10000 nm), por ejemplo, un intervalo de entre 10 nm o menos, a 25 nm a 50 nm a 100 nm a 250 nm a 500 nm a 1000 nm (1  $\mu\text{m}$ ) a 2500 nm (2,5  $\mu\text{m}$ ) a 10000 nm (10  $\mu\text{m}$ ). En algunas realizaciones, las partículas secas pueden existir en agregados mayores a 10000 nm en diámetro, pero que se dispersan en partículas de menos de 10000 nm una vez que se adiciona un fluido acuoso y se mezclan utilizando técnicas como el uso de vórtex, entre otros. En ciertas realizaciones, las partículas descritas en el presente documento pueden tener una geometría irregular. Típicamente, las partículas dentro de las composiciones de la presente divulgación tienen una distribución de tamaño en fluido acuoso, en el que el valor Z promedio y/o el valor  $D(v,0,5)$  es menos de 5000 nm, por ejemplo, en un intervalo que varía de 5000 nm a 2500 nm a 1000 nm a 500 nm a 250 nm a 100 nm a 50 nm o menos.

Como se utiliza en el presente documento, las “nanopartículas” son partículas que tienen una distribución de tamaño en fluido acuoso, en el que el valor Z promedio tiene un intervalo de 50 nm a 500 nm. Como se utiliza en el presente documento, las “micropartículas” son partículas que tienen una distribución de tamaño en fluido acuoso en que el valor  $D(v,0,5)$  varía en un intervalo de 500 nm a 5000 nm.

El tamaño de las partículas puede ser determinado (midiendo) utilizando procedimientos disponibles en la técnica. Por ejemplo, el tamaño de las partículas se puede determinar utilizando espectroscopía de correlación de fotones, dispersión dinámica de la luz o dispersión de luz cuasielástica. Estos procedimientos están basados en la correlación del tamaño de partícula con las propiedades de difusión obtenidas por medidas de movimiento Browniano. El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo de las moléculas de solvente que rodean a las partículas. Entre más grande sea la partícula, más lento será el movimiento Browniano. La velocidad está definida por el coeficiente de difusión traslacional (D). El valor medido refiere a como se mueve la partícula dentro de un líquido (diámetro hidrodinámico). El diámetro que se obtiene es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión de traslación que la partícula.

El tamaño de la partícula también puede ser determinado utilizando la dispersión de luz estática, que mide la intensidad de la luz dispersada por las partículas en solución en un solo momento. La dispersión de luz estática mide la intensidad de la luz en función del ángulo de dispersión y la concentración de soluto. Las partículas que pasan a través de una fuente de luz, por ejemplo, un rayo láser, dispersan la luz en un ángulo que es inversamente proporcional a su tamaño. Las partículas grandes generan un patrón de difracción en ángulos de dispersión bajos con alta intensidad, mientras que las partículas pequeñas dan lugar a señales en ángulos amplios de baja intensidad. La distribución de tamaño de las partículas se puede calcular si la intensidad de la luz dispersada de una muestra se mide en función del ángulo. La información angular se compara con un modelo de dispersión (por ejemplo, la teoría de Mie) para poder calcular la distribución del tamaño.

Generalmente, el tamaño de las partículas es determinado a temperatura ambiente e involucra múltiples análisis de la muestra en cuestión (por ejemplo, al menos tres mediciones repetidas en la misma muestra) para obtener un valor promedio para el diámetro de la partícula.

Para la espectroscopía de correlación de fotones, el promedio del valor Z (también denominado la media acumulativa o el diámetro hidrodinámico) se calcula típicamente a partir del análisis de acumulantes (monomodal).

Para las mediciones de dispersión de luz estática (y en algunas realizaciones, también para la espectroscopía de correlación de fotones, se pueden medir los parámetros de tamaño basados en el volumen. Por ejemplo,  $D(v,0,5)$  (donde v significa volumen) es un parámetro de tamaño cuyo valor está definido como el punto donde el 50 % de las partículas (con base en el volumen) en la composición, según las mediciones, tienen un tamaño menor que el valor  $D(v,0,5)$ , y el 50 % de las partículas en la composición tienen un tamaño mayor que el valor de  $D(v,0,5)$ . De manera similar,  $D(v,0,9)$  es un parámetro de tamaño cuyo valor se define como el punto donde el 90 % de las partículas (con base en el volumen) en la composición, según las mediciones, tienen un tamaño que es menor al valor de  $D(v,0,9)$ , y el 10 % de las partículas en la composición tienen un tamaño que es mayor que el del valor de  $D(v,0,9)$ .

Como se define en el presente documento, la “suspensión” es una fase líquida que contiene material de partículas sólidas suspendidas. Las suspensiones pueden ser estables o inestables. Como se define en el presente documento la “solución” es una fase líquida que contiene material disuelto. Como se define en el presente documento, una suspensión o solución “acuosa” es una suspensión o solución que contiene agua, típicamente el 50 % de agua en peso o más, por ejemplo, un intervalo de entre 50 % en peso a 75 % en peso a 90 % en peso a 95 % en peso o más de agua.

Como se define en el presente documento, la composición de partículas “secas” son composiciones de partículas que no se encuentran inmersas en un líquido (por ejemplo, no dentro de una suspensión líquida). Típicamente, una composición de partículas “secas” comprenderá menos del 3 % de agua.

Como se define en el presente documento, la composición de partículas “en blanco” son composiciones de partículas que se encuentran libres de agentes activos (es decir, están libres de productos farmacéuticos, incluyendo fármacos, replicones de ARN, adyuvantes inmunológicos, etc.).

5 El “potencial zeta” como se define en el presente documento, se refiere al potencial eléctrico que existe a través de la interfase de todos los sólidos y líquidos, por ejemplo, el potencial a través de la capa difusa de iones que rodea a una partícula coloidal cargada. El potencial zeta puede ser calculado por movilidad electroforética, por ejemplo, la tasas a las cuales las partículas coloidales viajan a través de electrodos cargados puestos en contacto con la sustancia que será medida, utilizando técnicas bien conocidas.

10 El término “tensioactivo” viene de la expresión “agente activo superficial”. Los tensioactivos se acumulan en las interfases (por ejemplo, en las interfases líquido-líquido, líquido-sólido y/o líquido-gas) y cambian las propiedades de la interfase. Como se utiliza en el presente documento, los tensioactivos incluyen detergentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, estabilizantes de emulsión, lípidos catiónicos, lípidos aniónicos, lípidos zwitteriónicos, y los similares.

15 Como se define en el presente documento, los “carbohidratos” incluyen monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, al igual que sustancias derivadas de monosacáridos, por ejemplo, por reducción (por ejemplo, alditoles), por oxidación de uno o más grupos terminales en los ácidos carboxílicos (por ejemplo, ácido glucurónico), o mediante la sustitución de uno o mas grupos hidroxilo por un átomo de hidrógeno o por un grupo amino (por ejemplo, beta-D-glucosamina y beta-D-galactosamina).

20 Como se define en el presente documento, un “monosacárido” es un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que comprende además un grupo aldehído (en cuyo caso el monosacárido es una aldosa) o un grupo ceto (en cuyo caso el monosacárido es una cetosa). Los monosacáridos típicamente contienen de 3 a 10 carbonos. Además, los monosacáridos comúnmente tienen la fórmula empírica  $(CH_2O)_n$  donde n es un número íntegro de 3 o más, típicamente 3 -10. Ejemplos de aldosas de 3 a 6 carbonos incluyen gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, 2-desoxirribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa. Ejemplos de cetosas de 3-6 carbonos incluyen dihidroxiacetona, eritrolosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa y tagatosa. Los monosacáridos que ocurren de manera natural se encuentran normalmente en forma del isómero D, a diferencia de la forma L.

30 Un “oligosacárido” se refiere a un polímero monosacárido relativamente corto, es decir, uno que contiene de 2 a 30 unidades de monosacárido. Un “polisacárido” es un polímero monosacárido que está más allá de la longitud de un oligosacárido (es decir, que contiene más de 30 unidades de monosacáridos). Además, como se utiliza en el presente documento, el término “polisacárido” también se refiere a un polímero de monosacárido que contiene a dos o más monosacáridos unidos. Para evitar ambigüedad, la segunda definición debe aplicarse en todo momento, a menos que haya indicaciones explícitas de lo contrario. El término “polisacárido” también incluye derivados de polisacáridos, tales como polisacáridos derivados amino-funcionalizados y carboxilo-funcionalizados, entre muchos otros. Los monosacáridos están típicamente unidos por enlaces glicosídicos. Ejemplos específicos incluyen disacáridos (como sacarosa, lactosa, trehalosa, maltosa, gentiobiosa y celobiosa), trisacáridos (como la rafinosa), tetrasacáridos (como la estaquiosa), y pentasacáridos (como la verbascosa).

40 Como se utiliza en el presente documento, el término “sacárido” engloba a los monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Una “especie que contiene sacáridos” es una molécula, de la cual al menos una parte es un sacárido. Ejemplos incluyen agentes crioprotectores de sacáridos, antígenos de sacáridos, antígenos que comprenden sacáridos conjugados a péptidos portadores, y así sucesivamente. Una “especie que contiene polisacáridos” es una molécula, de la cual al menos una parte es un polisacárido.

45 Como se utiliza en el presente documento, un “agente crioprotector” es un agente que protege a una composición de experimentar efectos adversos sobre la congelación y la descongelación. Por ejemplo, en la presente divulgación, agentes crioprotectores tales como polioles y/o carbohidratos, entre otros, pueden añadirse para prevenir que ocurra una aglomeración sustancial de partículas cuando se resuspendan las composiciones liofilizadas de la presente divulgación.

50 Como se utiliza en el presente documento, el término “polinucleótido” significa un homopolímero o un heteropolímero de al menos 2 unidades nucleotídicas (también denominado en el presente documento como “nucleótidos”). Los nucleótidos que forman polinucleótidos, como se define en el presente documento, incluye nucleótidos que ocurren naturalmente, tales como ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, así como equivalentes, derivados, variantes y análogos de nucleótidos que ocurren naturalmente.

55 Un polinucleótido puede estar en forma de cadena sencilla o en forma de cadena múltiple (por ejemplo, doble cadena, triple cadena, etc.). Un polinucleótido puede estar en forma lineal o en forma no lineal (por ejemplo, que comprende elementos circulares, ramificados, etc.). Un polinucleótido puede ser natural, sintético o una combinación de ambos.

Un polinucleótido puede ser capaz de autorreplicarse cuando se introduce a una célula huésped. Ejemplos de polinucleótidos incluyen, por lo tanto, ARN y ADN autorreplicantes y, por ejemplo, seleccionados de replicones,

plásmidos, cósmidos, fagémidos, transposones, vectores virales, cromosomas artificiales (por ejemplo, bacterias, levaduras, etc.) así como otras especies autorreplicantes. Los polinucleótidos incluyen a aquellos que expresan polipéptidos antigénicos en una célula huésped (por ejemplo, antígenos que contienen polinucleótidos). Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos autorreplicantes dentro de los cuales se han insertado secuencias naturales o sintéticas derivadas de organismos eucariontes o procariontes (por ejemplo, secuencias de ADN genómico, secuencias de ARN genómico, secuencias de cADN, etc.). Ejemplos específicos de polinucleótidos autorreplicantes incluyen construcciones de vectores de ARN y construcciones de vectores de ADN, entre otras. Las secuencias que pueden expresarse incluyen secuencias nativas y modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadas en la naturaleza), a secuencias nativas, entre otras. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de la mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen antígenos.

Como define en el presente documento, un "oligonucleótido" es un polinucleótido que tiene un intervalo de tamaño de 5 a 100 y más preferiblemente de 5 a 30 nucleótidos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" incluye ADN, ARN y quimeras formadas a partir de estos.

Una "especie que contiene polinucleótidos" es una molécula, de la cual al menos una parte es un polinucleótido.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no están limitados a una longitud mínima del producto. De esta manera, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares se incluyen dentro de la definición. Las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están abarcadas por la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a una secuencia nativa, por ejemplo, de tal manera que la proteína mantiene la capacidad de ocasionar una respuesta inmunológica o de tener un efecto terapéutico en un sujeto al cual se le administra la proteína.

Una "especie que contiene polipéptidos" es una molécula, de la cual al menos una parte es un polipéptido. Ejemplos incluyen polipéptidos, proteínas que incluyen glicoproteínas, antígenos sacáridos conjugados a proteínas portadoras, etc.

El término "farmacéutico" se refiere a compuestos biológicamente activos tales como fármacos, antibióticos, agentes antivirales, factores de crecimiento, hormonas, antígenos, polinucleótidos, adyuvantes y similares.

El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que ayuda o modifica la acción de un protocolo farmacéutico incluidos, pero no limitados a los adyuvantes inmunológicos, que aumentan o diversifican la respuesta inmune a un antígeno. Por lo tanto, los adyuvantes inmunológicos son compuestos que son capaces de potenciar una respuesta inmune a los antígenos. Los adyuvantes inmunológicos pueden potenciar la inmunidad humoral y/o celular.

Por "antígeno" se entiende a una molécula que contiene uno o más epítopos capaces de estimular el sistema inmune de un huésped para que genere una respuesta inmune específica al antígeno celular cuando se presenta el antígeno, bien, una respuesta de anticuerpos humorales. Un antígeno puede ser capaz de provocar una respuesta celular y/o humoral por sí misma o cuando está presente en combinación con otra molécula.

Un "epítipo" es la porción de una molécula antigénica o un complejo antigénico que determina su especificidad inmunológica. Un epítipo está dentro del alcance de la presente definición de antígeno. Comúnmente, un epítipo es un polipéptido o polisacárido en un antígeno natural. En antígenos artificiales puede ser una sustancia de bajo peso molecular, tal como un derivado de ácido arsánico. Un epítipo reaccionará de manera específica *in vivo* o *in vitro* con, por ejemplo, anticuerpos homólogos o linfocitos T. Los descriptores alternativos son determinantes antigénicos, agrupación estructural antigénica y agrupación hapténica.

Frecuentemente, un epítipo va a incluir entre 5 y 10 aminoácidos. Los epítopos de una determinada proteína pueden identificarse utilizando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos, utilizando técnicas bien conocidas. Véase por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos correspondientes a las proporciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar a los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía se encuentran unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas y se describen, por ejemplo, en Patente de los Estados Unidos No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:3998-4002); Geysen et al. (1986) (Molec. Immunol. 23:709-715). De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente mediante la determinación de la conformación espacial de los aminoácidos, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra.

El término "antígeno" como se utiliza en el presente documento, denota antígenos de ambas subunidades, es decir, antígenos que se encuentran separados y que son discretos de un organismo completo con el que el

antígeno está asociado y muerto en la naturaleza, como bacterias atenuadas o inactivadas, virus, parásitos u otros patógenos o células tumorales. Los anticuerpos tales como anti-idiotipo, o fragmentos del mismo, y mimotipos peptídicos sintéticos, que pueden imitar a un antígeno o a un determinante antigénico, también están abarcados bajo la definición de antígeno como se utiliza en el presente documento.

5 Además, para fines de la presente divulgación, un “antígeno” se refiere a una proteína que tiene modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína mantenga la capacidad de obtener una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis sitio-dirigidas, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones del huésped que produce antígenos. Los antígenos pueden derivarse de  
10 cualquiera de los diversos virus, bacterias, parásitos, hongos y otros microbios, así como de cualquiera de los diversos antígenos tumorales.

Una “respuesta inmunológica” o una “respuesta inmune” a una composición de interés es el desarrollo, en un sujeto, de una respuesta inmune humoral y/o celular a moléculas presentes en la composición.

15 Las respuestas inmunes incluyen respuestas inmunes innatas y adaptativas. Las respuestas inmunes innatas son respuestas de acción rápida que proporcionan la primera línea de defensa para el sistema inmunológico. En contraste, la inmunidad adaptativa utiliza la selección y la expansión clonal de las células inmunes que tienen genes receptores organizados somáticamente (por ejemplo, receptores de células T y B) que reconocen antígenos de un determinado patógeno o trastorno (por ejemplo, un tumor), de esta manera proporciona especificidad y memoria inmunológica. Las respuestas inmunes innatas, entre muchos de sus efectos, conducen  
20 a un rápido estallido de citoquinas inflamatorias y la activación de células presentadoras de antígenos (CPA), como los macrófagos y las células dendríticas. Para distinguir los patógenos de los componentes propios, el sistema inmune innato utiliza una variedad de receptores relativamente invariables que detectan las firmas de patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos, o PMAPs. Se sabe que la adición de componentes microbianos a las vacunas experimentales conduce al desarrollo de respuestas inmunes adaptativas robustas y duraderas. Se ha reportado que el mecanismo detrás de esta potenciación de las  
25 respuestas inmunes involucra receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) que se expresan diferencialmente en una variedad de células inmunitarias, incluyendo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales, células B y células no inmunitarias. El compromiso de los RRP conduce a la activación de algunas de estas células y su secreción de citoquinas y quimiocinas, así como a la maduración y la migración de otras células. En conjunto, esto crea un entorno inflamatorio que conduce al establecimiento de la respuesta inmune adaptativa. Los RRP incluyen receptores no fagocíticos tales como los receptores tipo-Toll (RTTs) y las proteínas del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), y receptores que inducen la fagocitosis, como los receptores recolectadores, los receptores de manosa y los receptores beta-glucanos.

35 Los RTTs reportados (junto con los ejemplos de algunos agonistas RTT reportados, que se pueden utilizar como adyuvantes inmunológicos en diversas realizaciones de la divulgación), incluyendo a los siguientes: RTT1 (lipoproteínas bacterianas de micobacterias *Neisseria*), RTT2 (partículas de levadura zimosán, peptidoglicano, lipoproteínas, glicolípidos y lipopolisacáridos), RTT3 (ARN viral de doble cadena, poli:IC), RTT4 (lipopolisacáridos bacterianos), RTT5 (flagelina bacteriana), RTT6 (partículas de levadura zimosán, ácido lipoteicoico, lipopéptidos de micoplasma), RTT7 (ARN de cadena sencilla, imiquimod, resiquimod y otros  
40 compuestos sintéticos como loxoribina y bropirimina), RTT8 (ARN de cadena sencilla, resiquimod) y RTT9 (oligonucleótidos CpG), entre otros. Las células dendríticas son reconocidas como algunos de los tipos celulares más importantes para iniciar el cebado de células T CD4+ auxiliares (TH) y para inducir la diferenciación de células T CD8+ en células asesinas. Se ha reportado que la señalización de RTT juega un papel importante en la determinación de la calidad de estas respuestas de células T auxiliares, por ejemplo, con la naturaleza de la  
45 señal de RTT que determinan el tipo de respuesta específico de TH que se observa (por ejemplo, respuesta TH1 contra TH2). Una combinación de anticuerpo (humoral) e inmunidad celular se produce como parte de una respuesta tipo TH1, mientras que una respuesta de tipo TH2 es predominantemente una respuesta de anticuerpo. Se ha reportado que diversos ligandos de RTT, tales como ADN CpG (RTT9) y las imidazoquinolinas (RTT7, RTT8), estimulan la producción de citoquinas a partir de células inmunes *in vitro*. Las imidazoquinolinas son los primeros compuestos pequeños, similares a fármacos que se muestran como agonistas de RTT. Para  
50 más información, véase por ejemplo, A. Pashine, N. M. Valiante and J. B. Ulmer, *Nature Medicine* 11, S63-S68 (2005), K. S. Rosenthal and D. H. Zimmerman, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(8), 821-829 (2006), y las referencias allí citadas.

55 Para propósitos de la presente divulgación, una “respuesta inmune humoral” se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpos, mientras que una “respuesta inmune celular” está mediada por linfocitos T y/o otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta antígeno-específica por parte de las células T citolíticas (CTLs). Las CTL tienen una especificidad por los antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y se expresan en la superficie de las células. Las CTLs ayudan a inducir y a promover  
60 la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta antígeno-específica por parte de las células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y centran la actividad de células efectoras no

específicas contra células que muestran antígenos peptídicos en asociación con moléculas del CPH en su superficie. Una "respuesta inmune celular" también se refiere a la producción de citoquinas, quimiocinas y otras moléculas similares producidas por células T activadas y/u otras células blancas de la sangre, incluidas aquellas derivadas de células T CD4+ Y CD8+.

- 5 Una composición tal como una composición inmunogénica o una vacuna que ocasiona una respuesta inmune celular que puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas de CPH en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por células se dirige a, o cerca de, las células que presentan un antígeno en su superficie. Además, se pueden generar linfocitos T específicos para permitir la futura protección de un huésped inmunizado.
- 10 La capacidad de una composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células, puede determinarse mediante una serie de ensayos conocidos en la técnica, como los ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, mediante el ensayo de linfocitos T específicos para un antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medición de la producción de citoquinas por parte de células T en respuesta a la reestimulación con el antígeno. Tales ensayos son bien conocidos. Véase por ejemplo, Erickson et al. (1993) (J. Immunol. 151:4189-4199); Doe et al. (1994) (Eur. J. Immunol. 24:2369-2376).

- Por lo tanto, una respuesta inmunológica podría incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes efectos entre otros: la producción de anticuerpos por, por ejemplo, células B; y/o la activación de células T supresoras y/o células T y  $\delta$  dirigidas específicamente a un antígeno, o antígenos, presentes en la composición de la vacuna de interés. Estas respuestas podrían servir, por ejemplo, para neutralizar la inefectividad, y/o mediar la complementación de anticuerpos, o anticuerpos dependientes de la toxicidad celular (ADCC) para proveer protección a un huésped inmunizado. Dichas respuestas pueden ser determinadas, por ejemplo, utilizando inmunoensayos estandarizados y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica, como por ejemplo radioinmunoensayos y ELISAs.
- 20

- 25 Una composición inmunogénica que contiene un antígeno o un polinucleótido (por ejemplo, una construcción de vectores) que conduce a la expresión de un antígeno de acuerdo con la presente divulgación mostrando "inmunogenicidad mejorada" cuando posee una mayor capacidad para provocar una respuesta inmune que la respuesta inmune provocada por una cantidad equivalente de antígeno/polinucleótido en un estado "desnudo" independientemente de las partículas formadas a partir de polímero(s) biodegradable(s). Una composición
- 30 inmunogénica puede mostrar "inmunogenicidad mejorada" por ejemplo, porque la composición es más fuerte inmunológicamente o porque una dosis más baja o menor dosis de la composición son necesarias para lograr una respuesta inmune en el sujeto al que se le administra la composición. Dicha inmunogenicidad mejorada puede determinarse administrando la composición y los controles adecuados a los animales y comparando la titulación de los anticuerpos y/o la inmunidad mediada por células frente a los dos utilizando ensayos estándar.

- 35 Como se utiliza en el presente documento, el "tratamiento" se refiere a cualquiera de (i) la prevención de una infección o un trastorno patogénico (por ejemplo, cáncer) en cuestión en un sujeto vertebrado, (ii) la reducción o eliminación de síntomas en un sujeto vertebrado que tiene la infección o el desorden en cuestión, y (iii) la eliminación sustancial o completa de la infección o trastorno patogénico en cuestión en un sujeto vertebrado. El tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de la llegada de la infección o trastorno patogénico en
- 40 cuestión) o terapéuticamente (después de la llegada de las mismas).

- Los términos "cantidad efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" de una composición inmunogénica de la presente divulgación se refieren a una cantidad suficiente de la composición inmunogénica para tratar o diagnosticar una condición de interés. La cantidad exacta requerida va a variar de un sujeto a otro, dependiendo, por ejemplo, en la especie, la edad y la condición general del sujeto; la severidad de la condición a tratar; el
- 45 antígeno particular de interés; en el caso de la respuesta inmunológica, la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos; por ejemplo, y el grado de protección deseado; y el modo de administración, entre otros factores. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual. Por lo tanto, una "cantidad terapéuticamente efectiva" generalmente estará en un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado a través de pruebas rutinarias.

- 50 Por "sujeto vertebrado" o "animal vertebrado" se entiende cualquier miembro del subfilum de los cordados, incluyendo, sin limitación, mamíferos tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras, caballos, y seres humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y aves de caza, como gallos y gallinas, incluyendo pollos, pavos y otras aves gallináceas. El término no denota una edad en particular. Así, se cubren tanto animales adultos como animales recién nacidos.

- 55 Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos excesivamente indeseables en el individuo o interactuar en él de manera excesivamente deletérea con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenida.

El término “excipiente” se refiere a cualquier sustancia esencialmente accesoria que pueda estar presente en la forma de dosificación terminada. Por ejemplo, el término “excipiente” incluye vehículos, aglutinantes, desintegrantes, rellenos (diluyentes), lubricantes, deslizantes (mejoradores de flujo), auxiliares de compresión, colores, edulcorantes, conservadores, agentes de suspensión/dispersión, formadores/revestimientos de películas, sabores y tintas de impresión.

Por “pH fisiológico” o un “pH en el intervalo fisiológico” se entiende un pH en el intervalo de aproximadamente 7,0 a 8,0, más típicamente en el intervalo de 7,2 a 7,6.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “construcción de vectores” generalmente se refiere a cualquier ensamblado que sea capaz de dirigir la expresión de una, o varias, secuencias de ácidos nucleicos o genes de interés. La construcción de un vector típicamente incluye un promotor/potenciador de la transcripción o uno o varios elementos que definen a un locus, u otros elementos que puedan controlar la expresión génica por otros medios tales como el corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación postraducciona del mensajero, o la modificación postranscripcional de la proteína. Adicionalmente, la construcción del vector incluye típicamente una secuencia que, cuando se transcribe, está unida de manera operacional a la secuencia o secuencias de los genes de interés y actúa como una secuencia de iniciación de la traducción. La construcción del vector también puede incluir, de manera opcional, una señal que dirige la poliadenilación, un marcador seleccionable, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Adicionalmente, si la construcción del vector se coloca en un retrovirus, la construcción del vector puede incluir una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (RTLs), y sitios de unión a cebadores de cadena positiva y negativa. Apropriados para el retrovirus utilizado (si estos no se encuentran ya presentes).

Una “construcción de vector de ADN” se refiere a una molécula de ADN que es capaz de dirigir la expresión de una, o más, secuencias de ácidos nucleicos o de un gen o genes de interés.

Un tipo específico de construcción de vector de ADN es un plásmido, que es una molécula de ADN episomal circular capaz de replicarse de manera autónoma dentro de una célula huésped. Típicamente, un plásmido es un ADN de doble cadena que se encuentra en forma circular, un bucle en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. pCMV es un plásmido específico que es bien conocido en la técnica. Un vector preferido pCMV contiene el potenciador/promotor de CMV y un terminador de la hormona de crecimiento bovino. Un ejemplo específico se describe con detalle en Chapman, B.S., et al. (1991) (Nucleic Acids Res. 19: 3979-3986).

Se conocen otras construcciones de vectores de ADN que están basadas en virus de ARN. Estas construcciones de vectores de DNA comprenden típicamente a un promotor que función en una célula eucarionte, 5' de una secuencia de cADN para la cual el producto de transcripción es una construcción de vector de ARN (por ejemplo, un replicón de vector de ARN de alfavirus) y una región de terminación 3'. La construcción del vector de ARN comprende de manera preferible un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de la fiebre amarilla o alfavirus (por ejemplo, virus Sindbis, virus Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana o virus del Río Ross), los cuales han sido modificados por la sustitución de uno o más genes de proteínas estructurales con una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga seleccionada que codifica para un producto de interés. Las construcciones de vectores de ARN se pueden obtener por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN. Ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en virus Sindbis (pSIN) como pSINCP, descritos, por ejemplo, en Patente de los Estados Unidos Nos. 5,814,482 and 6,015,686, así como en International Publication Nos. WO 97/38087, WO 99/18226 and WO 02/26209. La construcción de dichos vectores, en general, se describe en Patente de los Estados Unidos No. 5,814,482 y 6,015,686.

Otros ejemplos de construcciones de vectores incluyen construcciones de vectores de ARN (construcciones de vectores de alfavirus) y similares. Como se utiliza en el presente documento, “construcción de vectores de ARN”, “vector de replicón de ARN”, “vector de replicón” y “replicón” se refieren a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o auto replicación *in vivo*, típicamente dentro de una célula diana. La construcción del vector de ARN se utiliza directamente, sin el requerimiento de introducción de ADN a una célula y transporte al núcleo donde se produciría la transcripción. Al utilizar el vector de ARN para la administración directa en el citoplasma de la célula huésped, la replicación autónoma y la traducción de la secuencia heteróloga de ácidos nucleicos ocurre de manera eficiente.

En un aspecto, la molécula de ARN auto replicante se deriva de, o se basa en, un alfavirus. En otros aspectos, la molécula de ARN autorreplicante se deriva de, o se basa en, un virus diferente que el alfavirus, preferiblemente, un virus de ARN de cadena positiva y, más preferiblemente, un picornavirus, flavivirus, rubivirus, pestivirus, hepacivirus, calicivirus o coronavirus. Las secuencias de alfavirus salvajes adecuadas son bien conocidas y están disponibles a partir de depósitos de secuencia, tales como: American Type Culture Collection, Rockville, Md. Ejemplos representativos de alfavirus adecuados incluyen Aura (ATCC VR-368), virus Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), virus del Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), Virus de la encefalomiélitis equina del este (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fuerte Morgan (ATCC VR-924), virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylgach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), Mayaro virus

(ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), virus Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), Ross River virus (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), Sindbis virus (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinití (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), encefalomiélitis equina venezolana (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), encefalomiélitis equina occidental (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926), y, finalmente. Y-62-33 (ATCC VR-375).

## B. Procedimientos generales

### 1. Partículas poliméricas

Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la presente divulgación comprenden partículas poliméricas. Una "partícula polimérica" es una partícula que comprende uno o más tipos de polímeros, típicamente, 50 % en peso o más polímeros, por ejemplo, de 50 % en peso a 75 % en peso a 90 % en peso a 95 % en peso a 97,5 % en peso a 99 % en peso o más.

Como se utiliza en el presente documento, los "polímeros" son moléculas que contienen múltiples copias (por ejemplo, 5 a 10 a 25 a 50 a 100 a 250 a 500 a 1000 o más copias) de un o más unidades constitucionales, comúnmente denominadas monómeros. Tal y como se utiliza en el presente documento, "monómeros" puede referirse a monómeros libres y a aquellos que se incorporan en polímeros, con la distinción que queda clara en el contexto en el que se utiliza el término.

Como se utiliza en el presente documento, un polímero es "biodegradable" si sufre una escisión de enlaces a lo largo de la cadena principal del polímero *in vivo*, sin importar el mecanismo de escisión de enlaces (por ejemplo, ruptura enzimática, hidrólisis, oxidación, etc.).

Los polímeros pueden adoptar varias configuraciones, las cuales pueden seleccionarse, por ejemplo, de configuraciones lineales, cíclicas y ramificadas. Las configuraciones ramificadas incluyen configuraciones en forma de estrella (por ejemplo, configuraciones en las que tres o más cadenas emanan de una sola región de la rama), configuraciones de peine (por ejemplo, configuraciones que tienen una cadena principal y una pluralidad de cadenas laterales), configuraciones dendríticas (por ejemplo, polímeros arborescentes y hiperramificados), configuraciones de red (por ejemplo, polímeros reticulados), etc..

Como se utiliza en el presente documento, los "homopolímeros" son polímeros que contienen múltiples copias de una sola unidad constitucional. Los "copolímeros" son polímeros que contienen copias múltiples de al menos dos unidades constitucionales distintas, cuyos ejemplos incluyen copolímeros aleatorios, estadísticos, de gradiente, periódicos (por ejemplo, alternados) y de bloques.

Como se utiliza en el presente documento, los "copolímeros de bloque" son copolímeros que contienen dos o más bloques de polímeros que difieren, por ejemplo, debido a que una unidad constitucional (es decir, un monómero) se encuentra en un bloque de polímero que no se encuentra en otro bloque de polímero.

Como se utiliza en el presente documento, un "bloque de polímero" es una agrupación de unidades constitucionales (por ejemplo, 5 a 10 a 25 a 50 a 100 a 250 a 500 a 1000 o más unidades) que forman una parte o la totalidad de un polímero. Los bloques pueden ser ramificados o no ramificados. Los bloques de polímeros pueden contener un solo tipo de unidad constitucional (también referidos en el presente documento como "bloques de homopolímeros") que pueden proporcionarse, por ejemplo, de forma periódica (por ejemplo, alternando), aleatoria, estadística o con distribución en gradiente.

Algunos ejemplos de estructuras de copolímeros de bloques incluyen, entre otros, a los siguientes; (a) bloque de polímeros que tienen bloques alternativos del tipo  $(AB)_m$ ,  $Y A(BA)_m$  donde A es el primer polímero de bloque, B es un segundo bloque de polímero que es diferente del primer bloque de polímero, y m es un número entero positivo de 1 o más, y (b) copolímeros de bloque que tienen arquitecturas de múltiples brazos, tales como  $X(BA)_n$  y  $X(AB)_n$ , donde n es un número positivo de 2 o más y X es una especie central (por ejemplo, un residuo de molécula iniciadora, el residuo de una molécula a la que se le unen cadenas poliméricas preformadas, etc.). Además de las especies de centros mencionadas anteriormente, los polímeros (incluidos los copolímeros de bloques) pueden contener una variedad de otras especies de cadenas laterales no poliméricas, incluyendo los residuos del iniciador, los residuos de moléculas de enlaces, y las moléculas tipo tapa, entre otras especies. Es necesario notar que tales especies no poliméricas generalmente se ignoran en los polímeros descritos (incluyendo copolímeros de bloque). Por lo tanto, un copolímero de bloque  $X(BA)_2$  generalmente se designa como un copolímero tribloque ABA, un copolímero de bloque  $X(BA)_3$  generalmente se le denomina como un polímero estrella con un bloque medio B y tres bloques finales A. Otros ejemplos de copolímeros de bloques incluyen copolímeros en peine que tienen un esqueleto de cadena B y múltiples cadenas laterales A, así como copolímeros en peine que tienen un esqueleto de cadena A y múltiples cadenas laterales B.

Como se mencionó anteriormente, un "bloque de polímero" se define en el presente documento como una agrupación de unidades constitucionales que forman parte o la totalidad de un polímero. Por lo tanto, se puede decir que los homopolímeros contienen un solo bloque de homopolímero. Los copolímeros, por otro lado, pueden

- 5 contener un solo bloque de copolímero (por ejemplo, un bloque de copolímero periódico, un bloque de copolímero aleatorio, un bloque de copolímero de gradiente, etc.) o múltiples homopolímeros y/o bloques de copolímeros (por ejemplo, un bloque de copolímero que contiene múltiples bloques de homopolímeros diferentes, un copolímero de bloques que comprende múltiples bloques de copolímeros diferentes, o un copolímero de bloques que comprende uno o más bloques de homopolímeros y uno o más bloques de copolímeros).
- Los polímeros para el uso en las partículas poliméricas de la divulgación son preferiblemente, o al menos parcialmente, biodegradables.
- 10 Ejemplos de polímeros que son al menos parcialmente biodegradables, incluyen homopolímeros formados a partir de un único bloque de homopolímero biodegradable, copolímeros no de bloque formados a partir de un único bloque de copolímeros biodegradables (por ejemplo, seleccionados de bloques alternos, aleatorios, de gradiente, etc.), y copolímeros de bloques que contienen al menos un bloque de polímero biodegradable, por ejemplo, un copolímero de bloque que contiene uno o más bloques de polímeros biodegradables y uno o más bloques de polímeros adicionales.
- 15 Los ejemplos de polímeros biodegradables incluyen, por ejemplo, homopolímeros y copolímeros de los siguientes: poliésteres (por ejemplo, poli[hidroxiácidos], poli[ésteres cíclicos], etc.), policarbonatos, politozoésteres, polianhídridos, policicloacacrilatos (por ejemplo, polialquilcianoacrilato o "PACA") y polifosfatos.
- 20 Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen bloques de copolímeros que contienen combinaciones de dos o más bloques de polímeros biodegradables correspondientes a los anteriores (por ejemplo, dos o más bloques seleccionados de poliéster, policarbonato, poliortoéster, polianhídrido, policianoacrilato y/o bloques de polifosfazina), y un copolímero de bloques que comprende uno o más de los bloques de polímeros biodegradables anteriores y uno o más bloques de polímeros adicionales que difieren de los bloques de polímeros biodegradables anteriores.
- 25 Ejemplos de bloques de polímeros adicionales incluyen bloques de polímeros hidrofílicos tales como bloques de poliéter, por ejemplo, bloques de óxido de polietileno (por ejemplo, polietilenglicol) (véase Park et al., Langmuir 20 (6): 2456-2465 (2004)) y bloques de óxido de polipropileno (por ejemplo, polipropilenglicol), bloques de alcohol polivinílico, bloques de polivinilpirrolidona, bloques de poli(ácido acrílico), bloques de poli(ácido metacrílico), bloques de poli(N-isopropilacrilamida-con-N, N-dimetilacrilamida) (véase Liu et al., Biomaterials 26 (24): 5064-5074 (2005)), bloques de polietilimina (véase Nam et al., Biomaterials 24 (12): 2053-2059 (2003)), bloques de poli(aminoácido), y así sucesivamente. Ejemplos de bloques de polímeros adicionales también
- 30 incluyen bloques de polímeros que están cargados negativamente a pH fisiológico, por ejemplo, poli(ácidos carboxílicos) tales como los bloques de poli(ácido acrílico) y bloques de poli(ácido metacrílico), y ciertos bloques de poliaminoácidos (dependiendo del punto isoeléctrico), así como las sales de las mismas, entre otras. Otros ejemplos de bloques de polímeros adicionales incluyen bloques de polímeros que se están cargados
- 35 positivamente a pH fisiológico, por ejemplo, bloques de poliamina, tales como bloques de polietilimina y bloques de quitosán, además de ciertos bloques de poliaminoácidos (dependiendo del punto isoeléctrico), así como las sales de los mismos, entre otros. Dichos polímeros con bloques de polímeros cargados pueden emplearse, por ejemplo, como agentes inductores de carga de partículas (véase a continuación). En ciertas
- 40 realizaciones, se emplean copolímeros dibloque AB, copolímeros tribloque ABA y copolímeros tribloque BAB, en los que A designa un bloque de polímero adicional y B designa un bloque polimérico biodegradable.
- En diversas realizaciones preferidas, se forman polímeros biodegradables, por ejemplo, a partir de los siguientes: poliésteres, (por ejemplo, polihidroxiácidos, policaprolactona, polidioxanona, etc.), policarbonatos, poliortoésteres, polianhidruros, polifosfenacinas y combinaciones de los mismos. Más típicos son los poliésteres, por ejemplo, homopolímeros y copolímeros de ácido glicólico, ácido L-láctico, ácido D,L-láctico, ácido
- 45 hidroxibutírico, ácido hidroxivalérico, caprolactona y dioxanona, entre otros. Incluso los más típicos son los homopolímeros y copolímeros de L-láctida, D,L-láctida, y glicolida, por ejemplo, poliglicolida, polilactida, por ejemplo, poli(L-lactida) o poli(D,L-láctida) (referida en el presente documento como PLA) y poli(lactida-co-glicolida), por ejemplo, poli(L-lactida-co-glicolida) y poli(D,L-lactida-co-glicolida) (designada en el presente documento como "PLG" o "PLGA").
- 50 Los polímeros anteriormente descritos están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y un peso molecular apropiado para un uso determinado, se determina fácilmente por un experto en la técnica. Así, por ejemplo, un peso molecular adecuado para PLA puede ser del orden aproximado de 2000 a 5000, entre otros valores. Un peso molecular apropiado para PLG puede variar en un intervalo de entre 5000 hasta 20000, entre otros valores.
- 55 Cuando se emplean copolímeros, podrían estar disponibles copolímeros con una variedad de proporciones de monómeros. Por ejemplo, cuando se utiliza PLG para formar las partículas, una variedad de proporciones molares de lactida:glicolida van a encontrar uso en el presente documento, y la proporción es en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de cualquier especie coadministrada absorbida y/o atrapada y la tasa de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero PLG 50:50, que contiene 50 % de D,L-lactida y 50 % de

glicolida, va a proporcionar un copolímero de reabsorción más rápido, mientras que PLG 75:25 se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10 incluso más lentamente, debido al aumento del componente lactida. Las mezclas de partículas con diferentes proporciones de lactida:glicolida también pueden ser utilizadas en el presente documento para lograr la cinética de liberación deseada. La velocidad de la degradación de las partículas de la presente divulgación también puede ser controlada mediante factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero.

Cuando se utilizan, los copolímeros de PLG son típicamente aquellos que tienen una proporción molar de lactida:glicolida que varía, por ejemplo, de 20:80 a 25:75 a 40:60 a 45:55 a 50:50 a 55:45 a 60:40 a 75:25 a 80:20, y con un peso molecular que varía, por ejemplo, de 2500 a 5000 a 10000 a 40000 a 50000 a 70000 a 100000 a 200000 Daltons, entre otros valores. Los copolímeros de PLG con distintas proporciones de lactida:glicolida, pesos moleculares y grupos finales están fácilmente disponibles comercialmente de varias fuentes que incluyen Boehringer Ingelheim, Alemania, Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL, EE.UU. y Lakeshore Biomaterials, Birmingham, AL, EE.UU. Algunos copolímeros de PLG de ejemplo, disponibles con Boehringer Ingelheim, incluyen: (a) RG 502, un PLG que tiene grupos terminales éster alquilo de manera predominante en uno de los extremos de la cadena, una proporción molar de lactida:glicolida de 50:50 y un peso molecular de 12000 Da, (b) RG 503, un PLG que tiene grupos terminales éster alquilo de manera predominante en uno de los extremos de la cadena, una proporción molar de lactida:glicolida de 50:50 y un peso molecular de 34000 Da, (c) RG 504, un PLG que tiene grupos terminales éster alquilo de manera predominante en uno de los extremos de la cadena, una proporción molar de lactida:glicolida de 50:50 y un peso molecular de 48000 Da, (d) RG 752, un PLG que tiene grupos terminales éster alquilo de manera predominante en uno de los extremos de la cadena, una proporción molar de lactida:glicolida de 75:25 y un peso molecular de 22000 Da, (e) RG 755, un PLG que tiene grupos terminales éster alquilo de manera predominante en uno de los extremos de la cadena, una proporción molar de lactida:glicolida de 75:25 y un peso molecular de 68000 Da, (f) RG 502H, un PLG que tiene una proporción molar de lactida:glicolida de 50:50 y que tiene de forma predominante grupos carboxilos libres en los extremos de una cadena, y (g) RG 503H, un PLG que tiene una proporción molar de lactida:glicolida de 50:50 y que tiene de forma predominante grupos carboxilos libres en los extremos de una cadena.

Además de los grupos terminales éster carboxilo y alquilo libres, también se puede proporcionar PLG con grupos amina, hidroxilo, tiol, éster succinimidil o maleimida, entre otros, en al menos uno de los extremos de la cadena.

En ciertas realizaciones, se pueden formar partículas poliméricas cargadas utilizando un polímero biodegradable cargado, ejemplos de los cuales incluyen péptidos y proteínas cargados positivamente, incluidos péptidos de histona y homopolímeros y copolímeros que contienen aminoácidos básicos tales como lisina, arginina, ornitina y combinaciones de los mismos, gelatina, protamina y sulfato de protamina, espermina, espermidina, bromuro de hexadimetreno (polibreno) y polisacáridos policatiónicos tales como el almidón catiónico y el quitosán, entre otros.

Sin embargo, en realizaciones preferidas, las partículas poliméricas están formadas a partir de un polímero sustancialmente no cargado (por ejemplo, seleccionado de los descritos anteriormente) en presencia de una especie cargada o posteriormente un tratamiento con una especie cargada. Ejemplos de tales especies cargadas incluyen moléculas iónicas pequeñas, péptidos iónicos, polímeros iónicos y tensioactivos iónicos, entre otros.

Dichas especies pueden ser proporcionadas, por ejemplo, en una cantidad efectiva para promover una suspensión de partículas aceptable (por ejemplo, durante la formación de partículas y/o resuspensión después de la liofilización).

Dichas especies también pueden ser proporcionadas, por ejemplo, en una cantidad efectiva para promover la adsorción de especies a las superficies de las partículas (por ejemplo, polinucleótidos que incluyen construcciones de vectores que conducen a la expresión de antígenos, antígenos, adyuvantes inmunológicos, etc.). Por ejemplo, en diversas realizaciones de la divulgación, pueden emplearse partículas que tienen una carga neta positiva para mejorar la adsorción del replicón de ARN.

La carga neta de una población de partículas dada puede medirse utilizando técnicas conocidas que incluyen la medición del potencial zeta de las partículas. En ciertas realizaciones, se producen suspensiones de partículas poliméricas cargadas positivamente que tienen un potencial zeta que es mayor a + 20 mV. Dichas suspensiones se pueden utilizar para adsorber especies cargadas positivamente, como polinucleótidos (por ejemplo, construcciones de vectores que conducen a la expresión de antígenos, tales como los replicones de ARN), antígenos, adyuvantes inmunológicos, etc..

En ciertas realizaciones, se proporcionan tensioactivos catiónicos para impartir carga a las partículas. Ejemplos de tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, los siguientes, entre otros: cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), 3-beta-[N-(N',N'-dimetilamino etano) carbamoilo] colesterol (DC-Col), 3-beta-[N-(N',N',N'-trimetilaminoetano) carbamoilo] colesterol (TC-Col), 4-(2-aminoetil)-morfolina-colesterol hemisuccinato (MoCol), hemisuccinato de histaminil-colesterol (HisCol), (1,2-dioleoiloxipropil) -N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), (1,2-dimiristoiloxipropil) -N,N,N-trimetilamonio (DMTAP), (1,2-dipalmitoiloxipropil) sal de N,N,N-trimetilamonio (DPTAP), sal de (1,2-dioleoiloxipropil) -N,N-dimetilamonio

(DODAP), (1,2-dioliloxipropil) -3-Dimetilhidroxietil amonio bromuro (DORIE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DPEPC), 1,2-distearoil- sn glicero-3-etilfosfocolina (DSEPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC), 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DLEPC), cloruro de cetil-piridinio (CPyC), histaminil-colesterol carbamato (CHIM), (1,2-dioleiloxipropil) cloruro de -N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dioctadecilamido-glicil-espermina (DOGS), 4-(2,3-bis-palmito-loxipropil)-1-metil-1H-imidazol (DPIM), sus variantes estructurales y derivados y las combinaciones de los mismos.

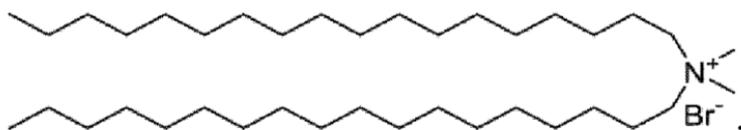
Se puede utilizar cualquier tensioactivo catiónico apropiado. Los tensioactivos catiónicos apropiados incluyen, cloruro de benzalconio (BAK), cloruro de bencetonio, cetrimida (que contiene bromuro de tetradeciltrimetilamonio y posiblemente pequeñas cantidades de bromuro de dedeciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de cetil trimetil amonio (CTAC), aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, incluyendo, pero no limitadas a N,N',N'-polioxietileno (10) -N-sebo-1,3-diaminopropano, y otras sales de aminas cuaternarias, incluyendo, pero no limitadas a bromuro de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de alquil-trimetil-amonio mixto, cloruro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de bencildimetilhexadecil-amonio, Metilóxido de benciltrimetil-amonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDAB), cloruro de metilbencetonio, cloruro de decametonio, cloruro de tetraalquilamonio mixto de metilo, cloruro de metil trioctilamonio, cloruro de N,N-dimetil-N [2 (2-metil-4-(1,1,3,3tetrametilbutil)-fenoxi]-etoxi)etil]-benceno de naminio (DEBDA), sales de dialquildimetilamonio, [1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N, cloruro de trimetilamonio, 1,2-diacil-3-(trimetilamonio) propano (grupo acilo=dimiristoilo, dipalmitoilo, diestearoilo, dioleilo), 1,2-diacil-3 (dimetil-amonio) propano (grupo acilo=dimiristoilo, dipalmitoilo, distearoil, dioleoil), 1,2-dioleoil-3- (4'-trimetil-amonio)butanoil-sn-glicero, éster de 1,2-dioleoil-3-succinil-sn-glicero colina, colesteril (4'-trimetilamonio) butanoato), sales de N-alquil piridinia (por ejemplo, bromuro de cetilpiridinio y cloruro de cetilpiridinio), sales de N-alquilliperidinio, electrolitos de forma esférica dicálica ( $C_{12}Me_6; C_{12}BU_6$ ), dialquiliglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L- $\alpha$  dioleoilfosfatidiletilamina, colesterol hemisuccinato éster de colina, lipopoliaminas, que incluyen, pero no están limitadas a dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), dipalmitoilfosfatidiletanol amidospermina (DPPES), lipopoli-L (o D)lisina (LPLL, LPDL), poli (L (o D)-lisina conjugada con el grupo N-glutarilfosfatidiletanolamina, didodecil glutamato éster con el grupo colgante (C) , éster de glutamato de ditetradecilo con un grupo amino colgante ( $Cl_4GluCnN^+$ ), derivados catiónicos de colesterol, incluyendo pero no limitado a incluye pero no se limita a la sal de colesteril-3- $\beta$ -oxisuccinamidoetilenetrimetilamonio, sal de colesteril-3- $\beta$ -oxisuccinamidoetilendimetilamina, colesteril-3- $\beta$ -carboxi-amidaetilpetrón de la parilla de la perilla de la piel) (DC-Colesterol), 1,2-dioleoiloxi-3- (trimetilamonio) propano (DOTAP), dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-dimiristoil-3- trimetil-amonioPropano (DMTAP), dipalmitoil ( $C_{16:0}$ ) trimetil propano de amonio (DPTAP), propano de distearoiltrimetil-amonio (DSTAP) y combinaciones de los mismos.

Otros tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, los lípidos catiónicos descritos en la Patente EE.UU 2008/0085870 (publicado el 10 de abril del 2008) and 2008/0057080 (publicado el 6 de marzo del 2008).

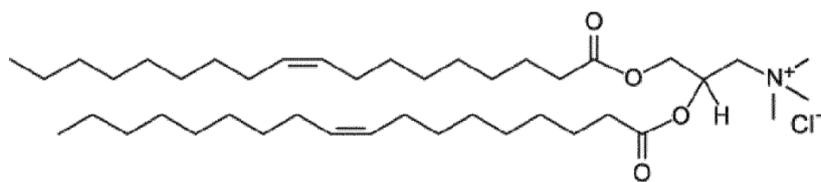
En realizaciones preferidas, el tensioactivo catiónico es seleccionado del grupo que consta de 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio) propano (DOTAP), 3 $\beta$ - [N- (N', N'-Dimetilaminoetano)-carbamoil] Colesterol (DC Colesterol), dimetildioctadecilamonio (DDA), 1,2-Dimiristoil-3-Trimetil Amonio Propano (DMTAP), dipalmitoil( $C_{16:0}$ ) trimetil amonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP), y combinaciones de los mismos.

En este aspecto, se pueden proporcionar diversas formas de sales de los tensioactivos surfactantes anteriores, incluyendo sales de haluro e hidroaluro, tales como, cloro, bromuro, yoduro, hidrocioruro, etc.. Cuando se enlista una sal en particular (por ejemplo, el cloruro), debe entenderse que otras sales (por ejemplo, bromuro, yoduro, etc.) también pueden ser empleadas.

En ciertas realizaciones, el tensioactivo catiónico comprende un grupo amonio y una o más cadenas de hidrocarburo saturadas o insaturadas que tienen de 12 a 20 átomos de carbono, cuyos ejemplos específicos incluyen DDA,



y DOTAP,



entre otros.

Se pueden emplear diversos procedimientos para producir partículas poliméricas de acuerdo con la divulgación.

5 Por ejemplo, en algunas realizaciones, las partículas poliméricas pueden formarse utilizando secado por  
 10 aspersión y coacervación como se describe en, por ejemplo, Thomasin et al., J. Controlled Release (1996)  
 41:131; Patente de los Estados Unidos No. 2,800,457; Masters, K. (1976) Spray Drying 2nd Ed. Wiley, New York;  
 técnicas de recubrimiento de suspensión neumática, como el recubrimiento en bandeja y el recubrimiento  
 Wurster, según lo descrito por Hall et al., (1980) El "Wurster Process" in Controlled Release Technologies:  
 Methods, Theory, and Applications (A. F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida y  
 Deasy, P.B., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. (1988) S (2): 99-139; y la gelificación iónica como se describe,  
 por ejemplo, en Lim et al., Science (1980) 210: 908-910.

En algunas realizaciones, las partículas pueden formarse utilizando un proceso de evaporación de solvente de  
 aceite en agua (o/w) o agua en aceite en agua (w/o/w), o utilizando un procedimiento de nanoprecipitación.

15 El proceso de la evaporación del solvente de w/o/w se describe, por ejemplo, en O'Hagan et al., Vaccine (1993)  
 11:965-969, Jeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10:362, y en WO 00/06123. Por lo general, un polímero de interés,  
 tal y como PLG, se disuelve en un solvente orgánico, como el cloruro de dimetilo (también llamado cloruro de  
 metileno y diclorometano), acetato de etilo, acetonitrilo, acetona, cloroformo y similares, para poder formar una  
 20 solución orgánica. La solución orgánica es entonces combinada con un primer volumen de solución acuosa y es  
 emulsionada para formar una emulsión de agua en aceite. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua  
 desionizada, solución normal salina, solución reguladora, por ejemplo, solución salina regulada con fosfato (PBS)  
 o una solución reguladora de citrato de sodio/ácido etilendiaminotetraacético (citrato de sodio/EDTA), entre otros.  
 Típicamente, la proporción en volumen de solución de polímero a solución acuosa varía en un intervalo de  
 25 aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1, más típicamente de aproximadamente 10:1. La emulsificación  
 se realiza utilizando cualquier equipo apropiado para esta tarea, y es típicamente un dispositivo de alto esfuerzo  
 cortante tal como, por ejemplo, un homogeneizador. Posteriormente se combina un volumen de la emulsión de  
 agua en aceite con un segundo volumen más grande de una solución acuosa, que típicamente contiene un  
 tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo sin carga (por ejemplo, PVA (alcohol de polivinilo), povidona (también  
 conocida como polivinilpirrolidona) o PVP), ésteres de sorbitán, polisorbatos, monoésteres de glicol polioxietilado,  
 30 alquifenoles de polioxietilo, o poloxámeros, entre otros) o un tensioactivo catiónico (por ejemplo, seleccionado de  
 los enumerados anteriormente, entre otros). La proporción de volumen de solución acuosa a la emulsión de agua  
 en aceite varía típicamente de aproximadamente 2:1 a 10:1, más típicamente de aproximadamente 4:1. Esta  
 mezcla se homogeneiza posteriormente para producir una doble emulsión estable w/o/w. Los solventes  
 orgánicos se evaporan para producir partículas. Las partículas fabricadas con polímeros catiónicos y aquellas  
 35 fabricadas en presencia de surfactantes catiónicos generalmente tienen una superficie que tiene una carga neta  
 positiva, que es capaz de adsorber una amplia variedad de moléculas cargadas negativamente.

El proceso de evaporación del solvente de aceite en agua (o/w) es similar al proceso de evaporación del solvente  
 w/o/w descrito en el párrafo anterior. En general, un polímero de interés, tal como PLG, se disuelve en un  
 40 solvente orgánico, como el cloruro de dimetilo (también llamado cloruro de metileno y diclorometano), acetato de  
 etilo, acetonitrilo, acetona, cloroformo, 2,2,2-trifluoroetanol, dimetilsulfóxido y similares, para formar una solución  
 orgánica. En ciertas realizaciones de la divulgación, el polímero se agrega al solvente orgánico en una cantidad  
 con un intervalo de 2 a 20 % p/v (por ejemplo, un intervalo de 2 a 5 a 10 a 15 a 20 % p/v), más típicamente de 5  
 a 15 % p/v en relación con el solvente. En ciertas realizaciones de la divulgación, la solución orgánica  
 45 comprende un tensioactivo catiónico, típicamente en una cantidad en un intervalo de 0,2 a 20 % p/p (por  
 ejemplo, un intervalo de 0,2 a 0,5 a 1 a 2 a 5 a 10 a 15 a 20 % p/w) relativo al polímero, más típicamente del 1 %  
 al 10 % w/w relativo al polímero. La solución orgánica se combina posteriormente con un volumen de solución  
 acuosa y se emulsiona para formar una emulsión o/w. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua para  
 inyección, agua desionizada, solución salina normal, una solución reguladora, por ejemplo, solución salina  
 regulada con fosfato (PBS) o una solución reguladora de citrato de sodio/ácido etilendiaminotetraacético (citrato  
 50 de sodio/EDTA), entre otros. La solución acuosa puede contener un tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo no  
 cargado o un tensioactivo catiónico (como alternativa o además de cualquier tensioactivo catiónico incluido en la  
 fase orgánica). Típicamente, la proporción de volumen de la solución acuosa a la solución de polímero varía de  
 aproximadamente 1:1 a aproximadamente 25:1, más típicamente de aproximadamente 4:1. La emulsificación se  
 realiza utilizando cualquier equipo apropiado para esta tarea, y es típicamente un dispositivo de alto esfuerzo  
 55 cortante tal y como, por ejemplo, un homogeneizador. Los solventes orgánicos se evaporan para producir  
 partículas. Como se mencionó anteriormente, las partículas fabricadas con polímeros catiónicos y aquellas

fabricadas en presencia de tensioactivos catiónicos generalmente tienen una superficie que tiene una carga neta positiva, que puede absorber una amplia variedad de moléculas cargadas negativamente.

El procedimiento de nanoprecipitación, también denominado procedimiento de desplazamiento del solvente es otro ejemplo de un procedimiento adecuado para formar partículas para utilizar en la divulgación. Véase, por ejemplo, Patente Europea No. 0274961B1 titulada "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules," Devissaguet et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,049,322 con el mismo título Fessi et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,118,528, titulado "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of microparticles," y Wendorf et al., WO 2008/051245, titulada "Nanoparticles for use in Immunogenic compositions." En esta técnica, por ejemplo, un polímero puede ser disuelto en un solvente orgánico (por ejemplo, un solvente orgánico hidrófilo como acetona, etanol, etc.). En ciertas realizaciones de la divulgación, el polímero se añade al solvente orgánico en una cantidad que varía de 0,1 a 5 % p/v (por ejemplo, un intervalo que va de 0,1 a 0,2 a 0,5 a 1 a 2 a 5 % p/v) con respecto al solvente. En ciertas realizaciones de la divulgación, la solución orgánica comprende un tensioactivo catiónico, típicamente en una cantidad que varía de 1 % a 10 % p/p (por ejemplo, en un intervalo de 1 a 2 a 5 a 10 % p/p) relativo al polímero. La solución orgánica resultante puede ser combinada con un solvente adicional, que es miscible con el solvente orgánico, mientras que no es un solvente para el polímero, típicamente una solución acuosa. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, una solución reguladora como, por ejemplo, solución salina regulada con fosfato (PBS) o una solución reguladora de citrato de sodio/ácido etilendiaminotetraacético (citrato de sodio/EDTA). La solución orgánica y la solución acuosa se pueden combinar en volúmenes relativos apropiados, típicamente de 1:5 a 5:1 (por ejemplo, de 1:5 a 1:2,5 a 1:1 a 2,5:1 a 5:1), más normalmente alrededor de 1:1. Por ejemplo, la solución orgánica se puede verter, inyectar por goteo en el no solvente mientras se revuelve, o se homogeneiza o se agita, o viceversa. Al seleccionar un sistema en el que el polímero es soluble en el solvente orgánico, mientras que es significativamente menos soluble en la mezcla miscible del solvente orgánico que con el no solvente, se puede formar una suspensión de partículas casi instantáneamente. Posteriormente, el solvente orgánico se puede eliminar de la suspensión, por ejemplo, por evaporación.

Como se indicó anteriormente, las partículas fabricadas con polímeros catiónicos y aquellas fabricadas en presencia de tensioactivos catiónicos, generalmente tienen una superficie que tiene una carga positiva neta, que es capaz de adsorber una amplia variedad de moléculas cargadas negativamente.

Como se indicó previamente, en ciertas realizaciones, es deseable proporcionar una o más especies adicionales (además del polímero), que pueden estar asociadas con el interior (por ejemplo, atrapadas) y/o la superficie (por ejemplo, por adsorción, unión covalente, coliofilización, etc.) de las partículas o pueden no estar asociadas con las partículas. Dichas especies adicionales pueden incluir, por ejemplo, agentes para ajustar la tonicidad o el pH, agentes crioprotectores, adyuvantes inmunológicos, antígenos, replicones de ARN, y así sucesivamente.

Dichas especies adicionales pueden ser proporcionadas durante el proceso de formación de partículas. En las técnicas de formación de partículas descritas anteriormente (por ejemplo, evaporación del solvente w/o/w, evaporación del solvente o/w, nanoprecipitación, etc.), las soluciones orgánicas y/o acuosas empleadas pueden contener además varias especies adicionales, según se desee. Por ejemplo, estas especies adicionales se pueden agregar a una solución orgánica, si está en forma soluble en aceite o dispersable en aceite o (b) en una solución acuosa, si está en forma soluble en agua o dispersable en agua.

En algunas realizaciones, se pueden agregar una o más especies adicionales después de la formación de partículas (típicamente posterior a la eliminación del solvente orgánico, así como subsecuentemente a los pasos de lavado o pasos en los que las partículas son dializadas contra el agua, si así corresponde). Estas especies adicionales se agregan frecuentemente a las partículas como una solución o una dispersión acuosa. Estas especies pueden, por ejemplo, estar en solución y/o acumularse en la interfase partícula-solución, por ejemplo, siendo adsorbidas en la superficie de la partícula.

Una vez que se forma una composición apropiada (por ejemplo, utilizando las técnicas descritas anteriormente u otras), puede liofilizarse para uso en el futuro.

## 2. Replicones de ARN

Una composición inmunogénica de la divulgación puede incluir un replicón de ARN que comprende al menos un polinucleótido que codifica para al menos un antígeno. El replicón de ARN es capaz de dirigir su propia amplificación o su autorreplicación *in vivo*, típicamente dentro de una célula diana.

Un replicón puede, cuando se entrega a la célula de un vertebrado, incluso sin ninguna proteína, conducir a la producción de múltiples ARN hijos mediante la transcripción de sí mismo (a través de una copia antisentido que genera a partir de sí mismo). Por lo tanto, una molécula de ARN autorreplicante es típicamente una molécula de cadena + que puede traducirse directamente después de ser entregada a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que produce la transcripción tanto en antisentido como en sentido del ARN liberado. De esta manera, el ARN administrado conduce a la producción de múltiples ARN hijas.

Estas moléculas hijas de ARN, así como las transcripciones subgenómicas colineales, pueden traducirse a sí mismas para proporcionar la expresión *in situ* de un antígeno codificado, o pueden transcribirse para proporcionar transcripciones con el mismo sentido que el ARN administrado que se traducen para proporcionar la expresión *in situ* del antígeno. Los resultados generales de esta secuencia de transcripciones son una gran  
 5 amplificación en el número de replicones de ARN introducidos y, por lo tanto, el antígeno codificado se convierte en un producto polipéptido principal de las células.

Un sistema adecuado para poder lograr la autorreplicación en esta manera es utilizar un replicón basado en un alfavirus. Los alfavirus apropiados se enumeraron anteriormente. Los replicones de alfavirus son ARN de cadena +- que conducen a la traducción de una replicasa (o replicasa-transcriptasa) después de la entrega a una célula.  
 10 La replicasa se traduce como una poliproteína que se auto-escinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de cadena genómica del ARN entregado con cadena +-. Estas transcripciones de la misma cadena pueden ser transcritas para originar copias adicionales del ARN parental de cadena +- y también para dar una transcripción subgenómica que codifica para el antígeno. La traducción de la transcripción subgenómica conduce entonces a la expresión *in situ* del antígeno por la célula infectada. Los replicones de alfavirus  
 15 apropiados pueden utilizar una replicasa de un virus Sindbis, un virus del bosque Semliki, un virus de la encefalitis equina oriental, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc..

En consecuencia, un replicón preferido codifica para (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN desde el replicón y (ii) un antígeno. La polimerasa puede ser la replicasa de un alfavirus, por ejemplo, que comprende una o más de las proteínas de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. Mientras que los  
 20 genomas de alfavirus naturales codifican para proteínas estructurales de virión además de la poliproteína de replicasa no estructural, se prefiere que el replicón no codifique para proteínas estructurales de alfavirus. Por lo tanto, un replicón preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómicas 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 salvaje, el replicón preferido no puede perpetuarse a sí mismo  
 25 en la forma infecciosa. Las proteínas estructurales del alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus de tipo silvestre están ausentes en el replicón preferido y su lugar es tomado por el o los genes que codifican para el antígeno de interés, de manera que el transcrito subgenómico codifica al antígeno en lugar de las proteínas estructurales del virión alfavirus.

De esta manera, un replicón útil con la divulgación puede tener dos marcos de lectura abiertos. El primer marco de lectura abierto (5') codifica para una replicasa; el segundo marco de lectura abierto (3') codifica para un  
 30 antígeno. En algunas realizaciones, el ARN puede tener marcos de lectura abiertos adicionales (por ejemplo, río abajo), por ejemplo, para codificar a otros antígenos (véase más adelante) o para codificar polipéptidos accesorios.

Un replicón preferido tiene una tapa en 5' (por ejemplo, una 7-metilguanosa). Esta tapa puede mejorar la traducción *in vivo* del ARN. En algunas realizaciones, la secuencia 5' del replicón debe ser seleccionada para  
 35 garantizar la compatibilidad con la replicasa codificada.

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

Los replicones pueden tener diversas longitudes, pero típicamente tienen una longitud de 5000-25000 nucleótidos, por ejemplo. 8000-15000 nucleótidos, o 9000-12000 nucleótidos.  
 40

Típicamente los replicones son de cadena sencilla. Los ARN de cadena sencilla generalmente pueden iniciar un efecto adyuvante mediante la unión a TLR7, TLR8, helicasas de ARN y/o PKR. El ARN administrado en forma de doble cadena (ARNdc) se puede unir a TLR3, y este receptor también puede ser activado por el ARNdc que se  
 45 forma durante la replicación de un ARN de cadena sencilla o dentro de la estructura secundaria de un ARN de cadena sencilla.

El replicón se puede preparar convenientemente mediante transcripción *in vitro* (IVT). La IVT puede utilizar plantilla (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias, o creado sintéticamente (por ejemplo, mediante procedimientos de ingeniería de síntesis de genes y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, se puede utilizar una ARN polimerasa dependiente de ADN (como el bacteriófago T7, T3 o SP6  
 50 ARN polimerasas) para transcribir el replicón de una plantilla de ADN. Se pueden utilizar las funciones apropiadas de tapado y la adición de poli-A según se requiera (aunque el replicón de poli-A generalmente se codifica dentro de la plantilla de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener requerimientos estrictos para los nucleótidos transcritos 5' y, en algunas realizaciones, estos requerimientos deben coincidir con los requerimientos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito con IVT pueda funcionar de  
 55 manera eficiente como un sustrato para su replicasa auto-codificada.

Como se discute en USSN 61/223,347 (y en una solicitud de patente internacional presentada el 6 de julio de 2010 que reivindica la prioridad de las mismas), el replicón puede incluir (además de cualquier estructura de tapa en 5') uno o más nucleótidos que tengan una nucleobase modificada. Por lo tanto, el replicón puede comprender

5 m5C (5-metilcitidina), 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-metiltio-N6-metiladenosina); i6A (N6-isopenteniladenosina); ms2i6A (2-metiltio-N6isopenteniladenosina); io6A (N6- (cis-hidroxiisopentenil) adenosina); ms2io6A (2-metiltio-N6- (cis-hidroxi-pentenil) adenosina); g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina); t6A (N6-treonil carbamoiladenosina); ms2t6A (2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina); m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina); hn6A (N6.-hidroxinorvalilcarbamoil adenosina); ms2hn6A (2-metiltio-N6-hidroxinorvalil carbamoiladenosina); Ar (p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m11 (1-metilinosina); m'Im (1,2'-O-dimetilinosina); m3C (3-metilcitidina); Cm (2T-O-metilcitidina); s2C (2-tiocitidina); ac4C (N4-acetilcitidina); f5C (5-fonilcitidina); m5Cm (5,2-O-dimetilcitidina); ac4Cm (N4acetil2TOMETILCITIDINA); k2C (lisidina); m1G (1-metilguanosina); m2G (N2-metilguanosina); m7G (7-metilguanosina); Gm (2'-O-metilguanosina); m22G (N2, N2-dimetilguanosina); m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanosina); m22Gm (N2, N2,2'-O-trimetilguanosina); Gr (p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)); yW (wybutosina); o2yW (peroxywybutosina); OHyW (hidroxibutosina); OHyW \* (hidroxibwybutosina no modificada); imG (wyosina); mimG (metilguanosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galtactosil-queuosina); manQ (manosil-queuosina); preQo (7-ciano-7-deazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-deazaguanosina); G (arcaeosina); D (dihidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp3U (3- (3-amino-3-carboxipropil) uridina); ho5U (5-hidroxiuridina); mo5U (5-metoxiuridina); cmo5U (uridina 5-ácido oxiacético); mcmo5U (éster metílico del ácido 5-oxiacético de uridina); chm5U (5- (carboxihidroximetil) uridina); mchm5U (éster metílico de 5- (carboxihidroximetil) uridina); mcm5U (5-metoxicarbonil metiluridina); mcm5Um (S-metoxicarbonilmetil-2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxicarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm5U (5-metilaminometiluridina); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metil-aminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetil uridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina); cnmm5Um (5-carboximetilaminometil-2-L-ometiluridina); cmnm5s2U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m62A (N6, N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitidina); m4Cm (N4,2-O-dimetilcitidina); hm5C (5-hidroximetilcitidina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carboximetiluridina); m6Am (N6, T-O-dimetiladenosina); m62Am (N6, N6, O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosina); m2'2'7G (N2, N2,7-trimetilguanosina); m3Um (3,2T-O-dimetiluridina); m5D (5-metildihidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m'Am (1,2-0-dimetil adenosina) irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina); imG-14 (4-demetil guanosina); imG2 (isoguanosina); o ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, sus derivados 7-sustituidos, dihidouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5- (C1-C6) -alquiluracilo, 5-metiluracilo, 5- (C2-C6)-alqueniluracilo, 5- (C2-C6)-alquiniluracilo, 5- (hidroximetil) uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5- (C1-C6)-alquilcitosina, 5-metilcitosina, 5- (C2-C6) -alquenilcitosina, 5- (C2-C6) alquinilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluoro-citosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 7-deazaguanina, 8-azaguanina, 7-deaza-7-guanina sustituida, 7-deaza-7- (C2-C6) alquilguanina, 7-deaza-8 sustituida guanina, 8-hidroxi guanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-deazapurina sustituida, 7-deaza-7-purina sustituida, 7-deaza. Purina 8-sustituida, o un nucleótido abásico. Por ejemplo, un replicón puede incluir una o más nucleobases de pirimidina, como los residuos de pseudouridina y/o 5-metilcitosina. Sin embargo, en algunas realizaciones, el replicón no incluye nucleobases modificadas, y puede incluir nucleótidos no modificados, es decir, todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos estándar A, C, G y U (excepto por cualquier estructura de tapa 5', que puede incluir una 7'-metilguanosina). En otras realizaciones, el replicón puede incluir una tapa en 5' que comprende una 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos en 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

45 En ciertas realizaciones, la cantidad del replicón de ARN en las composiciones de partículas de la presente divulgación puede tener un intervalo de 0,01 % a 1 % (por ejemplo, de 0,01 % a 0,025 % a 0,05 % a 1 %) con respecto al peso del polímero biodegradable dentro de la composición, entre otros valores. La cantidad precisa generalmente va a depender de la proporción de N:P que se seleccione y de la carga de surfactante catiónico en las partículas.

50 En ciertas realizaciones, la cantidad del replicón de ARN en las composiciones de partículas de la presente divulgación está dictada por la cantidad de tensioactivo catiónico en la composición. Esto puede expresarse como la "proporción N:P" que se define en el presente documento como la proporción del número de moles de nitrógeno catiónico en el tensioactivo catiónico y el número de moles de fosfato aniónico en el replicón de ARN.

55 Por ejemplo, la proporción N:P empleada en las composiciones de la divulgación puede variar de 100:1 a 1:100, entre otros valores, por ejemplo, de 100:1 a 80:1 a 60:1 a 50:1 a 40:1 a 30:1 a 25:1 a 20:1 a 15:1 a 12,5:1 a 10:1 a 8:1 a 6:1 a 5:1 a 4:1 a 3:1 a 2,5:1 a 2:1 a 1,5:1 a 1,25:1 a 1:1 a 1:1,25 a 1:2 a 1:2,5 a 1:3 a 1:4 a 1:5 a 1:6 a 1:8 a 1:10 a 1:12,5 a 1:15 a 1:20 a 1:25 a 1:30 a 1:40 a 1:50 a 1:60 a 1:80 a 1:100.

### 3. Antígenos

60 Las composiciones de partículas de acuerdo con la divulgación incluyen moléculas de ARN autorreplicantes que codifican para un antígeno. Después de la administración de las partículas, el antígeno se traduce *in vivo* y puede ocasionar una respuesta inmune en el receptor. El antígeno puede ocasionar 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 de anticuerpos (que usualmente incluye a IgG) y/o una respuesta inmune mediada por células. El antígeno típicamente va a ocasionar una respuesta inmune que reconoce al correspondiente polipéptido bacteriano, viral, fúngico o de un parásito (o alergénico o tumor), pero en algunas realizaciones el antígeno puede actuar como un mimópo para provocar una respuesta inmune que reconoce a un sacárido de bacteria, viral, fúngico o de parásito. El antígeno típicamente será un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glicoproteína envuelta, una glicoproteína de espiga, etc..

Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden codificar a un único antígeno o a múltiples antígenos. Los antígenos múltiples pueden presentarse como un único antígeno polipeptídico (polipéptido de fusión) o como polipéptidos separados. Si los antígenos se expresan como polipéptidos separados, entonces uno o más de estos pueden proporcionarse con un IRES río arriba o un elemento promotor viral adicional. Alternativamente, pueden expresarse múltiples antígenos a partir de una poliproteína que codifica para antígenos individuales fusionados a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo, proteína 2A del virus de la fiebre aftosa) o como inteínas.

Los antígenos producidos por moléculas de ARN autorreplicantes en las composiciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los antígenos que se exponen a continuación, y antígenos derivados de uno o más de los patógenos y tumores que se exponen a continuación.

En ciertas realizaciones, además de las moléculas de ARN autorreplicantes que expresan antígenos, las composiciones de la divulgación pueden comprender además antígenos *per se* (por ejemplo, antígenos proteicos, antígenos de polisacáridos, antígenos conjugados proteína-polisacáridos, etc.), por ejemplo, uno o más de los antígenos establecidos a continuación, y antígenos derivados de uno o más de los patógenos y de los tumores expuestos a continuación. Donde se incluyen los antígenos *per se*, las proporciones típicas peso/peso de antígeno a polímero(s) en las composiciones de la presente divulgación varían de 00005:1 a 10:1 en peso, entre otras posibilidades, por ejemplo, que van de ,00005:1 a 0,10:1 (por ejemplo, que va de 00005:1 a 0,001:1 a 0,0025:1 a 0,005:1 a 0,01:1 a 0,025:1 a 0,05:1 a 0,10:1), más típicamente desde 0,001:1 a 0,05:1.

#### Antígenos Virales

Los antígenos virales apropiados para su uso en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, proteínas y péptidos de un virus. En algunas realizaciones, el antígeno ocasiona una respuesta inmune contra uno de estos virus:

*Orthomyxovirus*: Los agentes virales incluyen pero no se limitan a, aquellos del virus de la influenza A, B o C, tales como las proteínas hemaglutinina, neuraminidasa o matriz M2. Cuando el inmunógeno es un virus de la influenza A, la hemaglutinina puede ser de cualquier subtipo, por ejemplo, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 or H16.

Virus *Paramyxoviridae*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de virus *Paramyxoviridae*, tales como los derivados de neumovirus (por ejemplo, virus respiratorio sincital, RSV), Rubulavirus (por ejemplo, el virus de paperas), Paramyxovirus (por ejemplo, el virus de la parainfluenza) Metapneumovirus y Morbilivirus (por ejemplo, sarampión).

*Neumovirus*: agentes virales que incluyen pero no están limitados a aquellos derivados de un neumovirus, como el virus sincital respiratorio (VSR), el virus sincital bovino, el virus de la neumonía en ratones y el virus de la rinotraqueítis de Turquía. En ciertas realizaciones, los antígenos de neumovirus se seleccionan de una o más de las siguientes proteínas, incluidas las proteínas de superficie Fusión (F), la glicoproteína (G) y la proteína hidrofóbica pequeña (SH), las proteínas de la matriz M y M2, las proteínas nucleocápsidas N, P y L y las proteínas no estructurales NS1 y NS2. En otras realizaciones, los antígenos de neumovirus incluyen F, G y M. En ciertas realizaciones, los antígenos de neumovirus también se derivan de virus quiméricos, tales como, a modo de ejemplo solamente, virus quiméricos RSV/PIV que comprenden componentes tanto de RSV como de PIV.

Paramixovirus: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Paramixovirus, como los virus de parainfluenza tipos 1-4 (PIV), paperas, virus de Sendai, virus Simian 5, virus de parainfluenza en bovinos, Nipahvirus, Henvipavirus y el virus de la enfermedad de Newcastle. En ciertas realizaciones, el Paramixovirus es PIV o paperas. En ciertas realizaciones, los antígenos de paramixovirus se seleccionan de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteínas de fusión F1 y F2, nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de matriz (M). En otras realizaciones, las proteínas de paramixovirus incluyen HN, F1 y F2. En ciertas realizaciones, los antígenos de paramixovirus se derivan de virus quiméricos, tales como, a modo de ejemplo solamente, virus quiméricos RSV/PIV que comprenden componentes tanto de RSV como de PIV. En otras realizaciones, el Paramixovirus es Nipahvirus o Henipavirus y los antígenos se seleccionan de una o más de las siguientes proteínas: proteína de fusión (F), proteína de glicoproteína (G), proteína de matriz (M), proteína de nucleocápside (N), proteína grande (L) proteína y fosfoproteína (P).

*Poxviridae*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de *Orthopoxvirus* como *Variola vera*, incluidos, entre otros, *Variola major* y *Variola minor*.

5 *Metapneumovirus*: los antígenos virales incluyen, pero no están limitados a, *Metapneumovirus*, como el metapneumovirus humano (hMPV) y los metapneumovirus aviáres (aMPV). En ciertas realizaciones, los antígenos de metapneumovirus se seleccionan de una o más de las siguientes proteínas, incluidas las proteínas de superficie Fusion (F), glicoproteínas (G) y proteínas hidrofóbicas pequeñas (SH), las proteínas de matriz M y M2, las proteínas de nucleocápsides N, P y L. En otras realizaciones, los antígenos de metapneumovirus incluyen F, G y M. En ciertas realizaciones, los antígenos de metapneumovirus se derivan de virus quiméricos.

10 *Morbilivirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un *Morbilivirus*, como el sarampión. En ciertas realizaciones, los antígenos de morbilivirus se seleccionan de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina (H), glicoproteína (G), factor de fusión (F), proteína grande (L), nucleoproteína (NP), fosfatasa polimerasa (P) y Matriz (M).

15 *Picornavirus*: los antígenos virales incluyen, entre otros, los derivados de los *Picornavirus*, como los *Enterovirus*, *Rinovirus*, *Heparnavirus*, *Parechovirus*, *Cardiovirus* y *Afftovirus*. En ciertas realizaciones, los antígenos se derivan de *Enterovirus*, mientras que en otras realizaciones el enterovirus es *Poliovirus*. En otras realizaciones más, los antígenos se derivan de los *Rinovirus*.

20 *Enterovirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un *Enterovirus*, como los tipos *Poliovirus* 1, 2 o 3, los virus de *Coxsackie A* de 1 a 22 y 24, los virus de *Coxsackie B* de 1 a 6, el *Echovirus* (ECHO) virus) tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 y *Enterovirus* 68 a 71. En ciertas realizaciones, los antígenos del enterovirus se seleccionan de una o más de las siguientes proteínas de la cápsida VP0, VP1, VP2, VP3 y VP4. En otra realización, el enterovirus es un enterovirus EV71. En otra realización, el enterovirus es un virus *Coxsackie A* o *B*.

25 *Bunyavirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un *Orthobunyavirus*, como el virus de la encefalitis de California, un *Flebovirus*, como el virus de la fiebre del valle de Rift, o *Nairovirus*, tales como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

*Rinovirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados del *rinovirus*. En ciertas realizaciones, los antígenos de *rinovirus* se seleccionan de una o más de las siguientes proteínas de la cápside: VP0, VP1, VP2, VP2 y VP4.

30 *Heparnavirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un *heparnavirus*, como, a manera de ejemplo, el virus de la hepatitis A (VHA).

*Filovirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un *filovirus*, como el virus del Ébola (incluido virus del ébola Zaire, Costa de Marfil, Reston o Sudán) o el virus de Marburg.

35 *Togavirus*: los antígenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un *Togavirus*, como un *Rubivirus*, un *Alphavirus* o un *Arterivirus*. En ciertas realizaciones, los antígenos se derivan de *Rubivirus*, tal como a modo de ejemplo solamente, el virus de la rubéola. En ciertas realizaciones, los antígenos de *togavirus* se seleccionan de E1, E2, E3, C, NSP-1, NSP-2, NSP-3 o NSP-4. En ciertas realizaciones, se seleccionan los antígenos de *togavirus*.

40 *Flavivirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a aquellos derivados de un *Flavivirus*, como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), el virus del dengue (tipo 1, 2, 3 o 4), el virus de la fiebre amarilla y la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis Japonesa, virus del bosque de Kyasanur, virus de la encefalitis del Nilo occidental, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis de primavera-verano ruso, virus de la encefalitis de Powassan. En ciertas realizaciones, los antígenos de *flavivirus* se seleccionan de PrM, M, C, E, NS-1, NS-2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. En ciertas realizaciones, los antígenos de *flavivirus* se seleccionan de PrM, M y E.

45 *Pestivirus*: los antígenos virales incluyen, entre otros, los derivados de *Pestivirus*, como la diarrea viral bovina (BVDV), la peste porcina clásica (CSFV) o la enfermedad de Border (BDV).

50 *Hepadnavirus*: los antígenos víricos incluyen, pero no están limitados a los derivados de un virus *Hepadnavirus*, como el virus de la hepatitis B. En ciertas realizaciones, los antígenos de *hepadnavirus* se seleccionan de antígenos de superficie (L, M y S), antígenos de núcleo (HBc, HBe).

55 *Virus de la hepatitis C*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un virus de la hepatitis C (VHC). En ciertas realizaciones, los antígenos de HCV se seleccionan de uno o más de E1, E2, E1/E2, poliproteína NS345, poliproteína NS 345, núcleo y/o péptidos de las regiones no estructurales. En ciertas realizaciones, los antígenos del virus de la hepatitis C incluyen uno o más de los siguientes: proteínas E1 y E2 del VHC, complejos de heterodímeros E1/E2, proteínas del núcleo y proteínas no estructurales, o

fragmentos de estos antígenos, en el presente documento las proteínas no estructurales se pueden modificar para eliminar la actividad enzimática, pero mantener la inmunogenicidad. *Rhabdovirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Rhabdovirus, como Lyssavirus (virus de la rabia) y Vesiculovirus (VSV). Los antígenos de Rhabdovirus pueden seleccionarse de glicoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína grande (L), proteínas no estructurales (NS).

*Caliciviridae*: Los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Caliciviridae, como el virus de Norwalk, y los virus similares a Norwalk, como el Virus de Hawai y el Virus de la Montaña Nevada.

*Coronavirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Coronavirus, SARS, coronavirus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis del ratón (MHV) y virus de la troenteritis de gas transmisible porcino (TGEV). En ciertas realizaciones, los antígenos de coronavirus se seleccionan de espiga (S), envoltura (E), matriz (M), nucleocápside (N) y glicoproteína de hemaglutinina-esterasa (HE). En ciertas realizaciones, el antígeno de coronavirus se deriva de un virus SARS. En ciertas realizaciones, el coronavirus se deriva de un antígeno viral de SARS como se describe en WO 04/92360.

*Retrovirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Retrovirus, como un Oncovirus, un Lentivirus o un Espumavirus. En ciertas realizaciones, los antígenos de oncovirus se derivan de HTLV-1, HTLV-2 o HTLV-5. En ciertas realizaciones, los antígenos de lentivirus se derivan de VIH-1 o VIH-2. En ciertas realizaciones, los antígenos se derivan de los subtipos (o clados) del VIH-1, incluidos, entre otros, los subtipos (o clados) del VIH-1 A, B, C, D, F, G, H, J, K, O. En otras realizaciones, los antígenos se derivan de formas recombinantes circulantes (CRF) del VIH-1, que incluyen, pero no se limitan a, A/B, A/E, A/G, A/G/I, etc.. En ciertas realizaciones, los antígenos de retrovirus se seleccionan de gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpr y vpr. En ciertas realizaciones, los antígenos de VIH se seleccionan de gag (p24gag y p55gag), env (gp160 y gp41), pol, tat, nef, rev vpr, miniproteínas, (preferiblemente p55 gag y gp140v deleción). En ciertas realizaciones, los antígenos de VIH se derivan de una o más de las siguientes cepas: VIH<sub>IIIB</sub>, VIH<sub>SF2</sub>, VIH<sub>LAV</sub>, VIH<sub>LAI</sub>, VIH<sub>MN</sub>, VIH-1<sub>CM235</sub>, VIH-1<sub>US4</sub>, VIH-1<sub>SF162</sub>, HTV-1<sub>TV1</sub>, VIH-1<sub>MJ4</sub>. En ciertas realizaciones, los antígenos se derivan de retrovirus humanos endógenos, que incluyen, pero no se limitan a, HERV-K (HERV-K "antiguo" y HERV-K "nuevo").

*Reovirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Reovirus, como un Orthoreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus o un Coltivirus. En ciertas realizaciones, los antígenos de reovirus se seleccionan de proteínas estructurales  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$  o  $\sigma 3$ , o proteínas no estructurales  $\sigma NS$ , mNS o  $\sigma 1s$ . En ciertas realizaciones, los antígenos de reovirus se derivan de un Rotavirus. En ciertas realizaciones, los antígenos del rotavirus se seleccionan entre VP1, VP2, VP3, VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4 o NSP5. En ciertas realizaciones, los antígenos del rotavirus incluyen VP4 (o el producto VP5 y VP8 escindido) y VP7.

*Parvovirus*: los antígenos víricos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Bocavirus y Parvovirus, como el Parvovirus B19. En ciertas realizaciones, los antígenos de Parvovirus se seleccionan entre VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 y NS-2. En ciertas realizaciones, el antígeno de Parvovirus es la proteína de cápside VP1 o VP-2.

*Virus de la hepatitis delta* (HDV): los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados del HDV, particularmente el antígeno- $\delta$  de HDV.

*Virus de la hepatitis E* (HEV): los antígenos virales incluyen pero no se limitan a, los derivados de HEV.

*Virus de la hepatitis G* (HGV): los antígenos virales incluyen pero no se limitan a, los derivados de HGV.

*Herpesvirus humano*: los antígenos víricos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de un Herpesvirus Humano, como, a manera de ejemplo, virus de herpes simplex (HSV), virus Varicella-zoster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV), Citomegalovirus (CMV), Herpesvirus humano 6 (HHV6), Herpesvirus humano 7 (HHV7) y Herpesvirus humano 8 (HHV8). En ciertas realizaciones, los antígenos del Herpesvirus humano se seleccionan entre proteínas tempranas inmediatas ( $\alpha$ ), proteínas tempranas ( $\beta$ ) y proteínas tardías ( $\gamma$ ). En ciertas realizaciones, los antígenos de HSV se derivan de cepas de HSV-1 o HSV-2. En ciertas realizaciones, los antígenos de HSV se seleccionan de las glicoproteínas gB, gC, gD y gH, proteína de fusión (gB) o proteínas de escape inmune (gC, gE o gI). En ciertas realizaciones, los antígenos de VZV se seleccionan de proteínas de núcleo, nucleocápside, tegumento o envoltura. En ciertas realizaciones, los antígenos de EBV se seleccionan de proteínas del antígeno (EA) temprano, antígeno de la cápside viral (VCA) y glicoproteínas del antígeno de membrana (MA). En ciertas realizaciones, los antígenos de CMV se seleccionan de proteínas de la cápside, glicoproteínas de la envoltura (tales como gB y gH) y proteínas del tegumento. En otras realizaciones, los antígenos de CMV se pueden seleccionar de una o más de las siguientes proteínas: pp65, IE1, gB, gD, gH, gL, gM, gN, gO, UL128, UL129, gUL130, UL150, UL131, UL33, UL78, US27, US28, RL5A, RL6, RL10, RL11, RL12, RL13, UL1, UL2, UL4, UL5, UL6, UL8, UL9, UL10, UL11, UL14, UL15A, UL16, UL17, UL18A, UL22A, UL38, UL40, UL41A, UL42, UL116, UL119, UL120,

UL121, UL124, UL132, UL147A, UL148, UL142, UL141, UL140, UL135, UL138, UL138, de los objetos, UL138, UL138 US2, US3, US6, US7, US8, US9, US10, US11, US12, US13, US15, US15, US16, US17, US18, US19, US20, US21, US29, US30 y US34A. Los antígenos de CMV también pueden ser fusiones de una o más proteínas de CMV, como, por ejemplo, solo pp65/IE1 (Reap et al., Vaccine (2007) 25: 7441-7449).

*Papovavirus*: los antígenos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de los Papovavirus, como los Papilomavirus y los Poliomasvirus. En ciertas realizaciones, los virus del papiloma incluyen los serotipos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 de VPH. y 65. En ciertas realizaciones, los antígenos de VPH se derivan de los serotipos 6, 11, 16 o 18. En ciertas realizaciones, los antígenos de VPH se seleccionan de las proteínas de la cápsida (L1) y (L2), o E1-E7, o fusiones de las mismas. En ciertas realizaciones, los virus de poliomasvirus incluyen al virus BK y al virus JK. En ciertas realizaciones, los antígenos de poliomasvirus se seleccionan de VP1, VP2 o VP3.

*Adenovirus*: Los antígenos incluyen a aquellos derivados de Adenovirus. En ciertas realizaciones, los antígenos de Adenovirus se derivan de Adenovirus serotipo 36 (Ad-36). En ciertas realizaciones, el antígeno se deriva de una proteína o de una secuencia peptídica que codifica para una proteína de cubierta Ad-36 o un fragmento de la misma (WO 2007/120362).

*Arenavirus*: los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de los Arenavirus.

*Virus de peces*: En algunas realizaciones, el antígeno provoca una respuesta inmune contra un virus que infecta a los peces, tales como el virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS), el virus de la enfermedad pancreática del salmón (VEPS), el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), el virus del canal del pez gato (VCP), virus de la enfermedad de la linfocistis del pez (VELP), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), herpesvirus koi, virus similar al picorna del salmón (también conocido como virus similar al picorna del salmón atlántico), virus del salmón encerrado (VSE), el rotavirus del salmón atlántico (RSA), el virus de la enfermedad de la fresa de trucha (ETF), el virus de tumor de salmón coho (VTSC) o el virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV).

#### Antígenos Bacterianos

Los antígenos bacterianos apropiados para la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, proteínas y péptidos de una bacteria. Los antígenos bacterianos apropiados incluyen antígenos derivados de una o más bacterias descritas a continuación, así como los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación. En algunas realizaciones, el antígeno provoca una respuesta inmune contra alguna de estas bacterias:

*Neisseria meningitidis*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de membrana tales como adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro y proteínas de unión al factor H. Una combinación de tres polipéptidos útiles se describe en Giuliani et al. (2006) Proc. Natl Acad Sci. USA 103 (29): 10834-10839.

*Streptococcus pneumoniae*: Los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* incluyen, pero no se limitan a, los antígenos descritos en el documento WO2009/016515. Estos incluyen, pero no se limitan a, la subunidad RrgB del pili, el precursor de beta-N-acetil-hexosaminidasa (spr0057), spr0096, proteína de estrés general GSP-781 (spr2021, SP2216), cinasanserina/treonina StkP (SP1732), y la adhesina de superficie neumocócica PsaA.

*Streptococcus pyogenes (Grupo A Streptococcus)*: Los antígenos del Grupo A de Streptococcus incluyen, pero no se limitan a, una proteína identificada en WO 02/34771 o en WO 2005/032582 (incluyendo GAS 40), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluidas las descritas en WO 02/094851, y Dale (1999) Vaccine 17: 193-200, y Dale (1996) Vaccine 14 (10): 944-948), proteína de unión a fibronectina (Sfb1), proteína asociada a hemo estreptocócica (Shp), y estreptolisina S (Sa-gA).

*Moraxella catarrhalis*: los antígenos de Moraxella incluyen, pero no se limitan a, los antígenos identificados en WO 02/18595 y en WO 99/58562, antígenos de proteínas de membrana externa (HMW-OMP), antígeno C y/o LPS.

*Bordetella pertussis*: Los antígenos de tos ferina incluyen, pero no se limitan a, la holotoxina pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.

*Burkholderia*: Los antígenos Burkholderia incluyen, pero no se limitan a, Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei y Burkholderia cepacia.

*Staphylococcus aureus*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, cinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben el englobamiento fagocítico (cápsula, proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa,

- factor de coagulación y/o toxinas que dañan la membrana (opcionalmente detoxificadas) que lisan las membranas celulares eucariotas (hemolisinas, leucotoxinas, leucocidinas). En ciertas realizaciones, los antígenos útiles pueden seleccionarse de una proteína identificada en WO 02/094868, WO 2008/019162, WO 02/059148, WO 02/102829, WO 03/011899, WO 2005/079315, WO 02/077183, WO 99/27109, WO 01/70955, WO 00/12689, WO 00/12131, WO 2006/032475, WO 2006/032472, WO 2006/032500, WO 2007/113222, WO 2007/113223, WO 2007/113224, PCT/IB2010/000998. En otras realizaciones, los antígenos se pueden seleccionar de IsdA, IsdB, IsdC, SdrC, SdrD, SdrE, ClfA, ClfB, SasF, SasD, SasH (AdsA), Spa, EsaC, EsxA, EsxB, Emp, HlaH35L, hemolisina, proteína de unión a ferricromo (sta006) y/o la lipoproteína sta011.
- 5
- 10 *Staphylococcus epidermis*: Los antígenos de *S. epidermidis* incluyen, pero no se limitan a, antígeno asociado al limo (AAL).
- Clostridium tetani* (Tétanos): Los antígenos del tétanos incluyen, entre otros, el toxoide tetánico (TT).
- Clostridium perfringens*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, la toxina Epsilon de *Clostridium perfringen*.
- 15 *Clostridium botulinums* (Botulismo): Los antígenos del botulismo incluyen, pero no se limitan a, los derivados de *C. botulinum*.
- Corynebacterium diphtheriae* (Difteria): Los antígenos de la difteria incluyen, pero no se limitan a, toxina de la difteria, preferiblemente detoxificada, como CRM<sub>197</sub>.
- 20 *Haemophilus influenzae B* (Hib): Los antígenos Hib incluyen, pero no se limitan a, los antígenos derivados de *Haemophilus influenzae B*.
- Pseudomonas aeruginosa*: Los antígenos de *Pseudomonas* incluyen, pero no se limitan a, los derivados de *Pseudomonas aeruginosa*, como la endotoxina A y la proteína Wzz.
- Coxiella burnetii*. Los antígenos bacterianos derivados de *Coxiella burnetii*.
- 25 *Brucella* Los antígenos bacterianos derivados de *Brucella*, incluyen, pero no se limitan a, *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. pinnipediae*.
- Francisella*. Los antígenos bacterianos derivados de *Francisella*, incluyen, pero no se limitan a, *F. novicida*, *F. philomiragia* y *F. tularensis*.
- 30 *Streptococcus agalactiae* (Grupo B de *Streptococcus*): Los antígenos del Grupo B de *Streptococcus* incluyen, pero no se limitan a, un antígeno proteico identificado en WO 02/34771, WO 03/093306, WO 04/041157 o WO 2005/002619 (incluidas las proteínas GBS 80), GBS 104, GBS 276 y GBS 322).
- Neisseria gonorrhoeae*: Los antígenos de la gonorrea incluyen, pero no se limitan a, la proteína Por (o porina), como PorB (véase Zhu et al., Vaccine (2004) 22: 660-669), una proteína de unión de transferencia, como TbpA y TbpB (véase Price et al., Infect. Immun. (2004) 71 (1): 277-283), una proteína de opacidad (tal y como Opa), una proteína modificable por reducción (Rmp).
- 35 *Chlamydia trachomatis*: Los antígenos de *Chlamydia trachomatis* incluyen, pero no se limitan a, los antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C (agentes del tracoma, una causa de ceguera), serotipos L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> (asociados con *Lymphogranuloma venereum*), y serotipos, D-K. En ciertas realizaciones, los antígenos de tracomas de clamidia incluyen, pero no se limitan a, un antígeno identificado en los WO 00/37494, WO 03/049762, WO 03/068811 ó WO 05/002619, incluyendo PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), DnaK (CT396), CT398, similar a OmpH (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823) y MurG (CT761).
- 40 *Treponema pallidum* (Sífilis): los antígenos de la sífilis incluyen, pero no se limitan a, al antígeno TmpA.
- Haemophilus ducreyi* (causante de chancroide): los antígenos de *Ducreyi* incluyen, pero no se limitan a, proteínas de la membrana externa (DsrA).
- 45 *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*: los antígenos incluyen, pero no se limitan a, una repetición de trisacáridos u otros antígenos derivados de *Enterococcus*.
- Helicobacter pylori*: Los antígenos de *H. pylori* incluyen, pero no se limitan a, los antígenos Cag, Vac, Nap, HopX, HopY y/o ureasa.
- 50 *Staphylococcus saprophyticus*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, la hemaglutinina de 160 kDa del antígeno de *S. saprophyticus*.

Los antígenos de *Yersinia enterocolitica* incluyen, pero no se limitan a, LPS.

5 *E. coli*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, los antígenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagrativa (EAggEC), *E. coli* adherida difusamente (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Las cepas de ExPEC incluyen *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis/sepsis (MNEC). Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, el factor de colonización accesorio (orf3526), orf353, proteína bacteriana del dominio similar a Ig (grupo 1) (orf405), orf1364, transportador de eflujo de la membrana externa de la familia NodT (orf1767), gspK (orf3515), gspJ (orf3516), receptor de sideróforo dependiente de tonB (orf3597), proteína fimbrial (orf3613), upec-948, upec-1232, un precursor de cadena de la proteína fimbrial tipo 1 (upec-1875), homólogo de yap H (upec-2820) y hemolisina A (recp-3768). Los antígenos polipeptídicos UPEC útiles se describen en WO2006/091517 y WO2008/020330. Los antígenos MNEC útiles se describen en WO2006/089264. Un antígeno útil para varios tipos de *E. coli* es AcfD WO2009/104092.

15 *Bacillus anthracis* (ántrax): Los antígenos de *B. anthracis* incluyen, pero no se limitan a, componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA). En ciertas realizaciones, los antígenos de *B. anthracis* se detoxifican opcionalmente.

*Yersinia pestis* (peste): Los antígenos de la peste incluyen, pero no se limitan a, el antígeno capsular F1, LPS, antígeno V de *Yersinia pestis*.

20 *Mycobacterium tuberculosis*: Los antígenos de la tuberculosis incluyen, pero no se limitan a, lipoproteínas, LPS, antígenos BCG, una proteína de fusión del antígeno 85B (Ag85B), ESAT-6 formulado opcionalmente en vesículas lipídicas catiónicas, antígenos asociados a la isocitrato deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y antígenos MPT51.

*Rickettsia*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de la membrana externa, incluida la proteína de la membrana externa A y/o B (OmpB), LPS y antígeno de proteína de superficie (APS).

25 *Listeria monocytogenes*: Los antígenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de *Listeria monocytogenes*.

*Chlamydia pneumoniae*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, los identificados en WO 02/02606.

30 *Vibrio cholerae*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, los antígenos de proteinasa, LPS, particularmente lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos O1 específicos de Inaba-O, *V. cholera* O139, antígenos de la vacuna IEM108 y la toxina de *Zonula occludens* (Zot)

*Salmonella typhi* (fiebre tifoidea): Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de *Salmonella typhi*.

35 *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme): Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, lipoproteínas (como OspA, OspB, Osp C y Osp D), otras proteínas de la superficie como las proteínas relacionadas con OspE (Erps), proteínas de unión a la decorina (como como DbpA), y proteínas antigénicamente variables VI, como los antígenos asociados con P39 y P13 (una proteína de integral de membrana, proteína de variación antigénica VIse).

*Porphyromonas gingivalis*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, la proteína de la membrana externa de *P. gingivalis* (OMP).

40 *Klebsiella*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, un OMP, incluyendo a OMP A.

#### Antígenos Fúngicos

Los antígenos fúngicos pueden derivarse de Dermatophytes, incluyendo: *pidermophyton floccusum*, *Microsporium audouini*, *Microsporium canis*, *Microsporium distortum*, *Microsporium equinum*, *Microsporium gypsum*, *Microsporium na- num*, *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*, and/or *Trichophyton faviforme*; or from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporidia*, *Encephalitozoon* spp., *Septata intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi*; the less common are *Brachiola* spp, *Microsporidium* spp., *Nosema* spp., *Pleistophora*

spp., *Trachipleistophora* spp., *Vittaforma* spp *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporium ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffeii*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Mortierella* spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp, and *Cladosporium* spp.

Antígenos/Patógenos de Protozoarios

Los antígenos/Patógenos de protozoarios para el uso en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de uno o más de los siguientes protozoarios: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayatanensis* y *Toxoplasma*.

Antígenos/Patógenos de Plantas

Los antígenos/Patógenos de plantas para el uso en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de *Ricinus communis*.

Antígenos Tumorales

En ciertas realizaciones, se utiliza un antígeno tumoral, o un antígeno de cáncer, en la divulgación. En ciertas realizaciones, los antígenos tumorales son antígenos tumorales que contienen péptidos, tales como un antígeno tumoral polipeptídico o antígenos tumorales de glicoproteína.

Los antígenos tumorales apropiados para el uso en el presente documento abarcan una amplia variedad de moléculas, tales como (a) antígenos tumorales que contienen polipéptidos, (que pueden variar, por ejemplo, de 8 a 20 aminoácidos de longitud, aunque longitudes fuera de este intervalo también son comunes)), lipopolipéptidos y glicoproteínas.

En ciertas realizaciones, los antígenos tumorales son, por ejemplo, (a) moléculas de longitud completa asociadas con células cancerígenas, (b) homólogos y formas modificadas de las mismas, incluidas moléculas con porciones eliminadas, agregadas y/o sustituidas, y (c) fragmentos de los mismos. Los antígenos tumorales incluyen, por ejemplo, antígenos restringidos de clase I reconocidos por linfocitos CD8+ o antígenos restringidos de clase II reconocidos por linfocitos CD4+.

En ciertas realizaciones, los antígenos tumorales incluyen, pero no se limitan a, (a) antígenos de cáncer de testículo tales como los polipéptidos NY-ESO-1, SSX2, SCP1 así como las familias de polipéptidos RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que se pueden utilizar, por ejemplo, para tratar el melanoma, y tumoración en pulmón, cabeza y cuello, CPCNP, mama, gastrointestinal y vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con varios tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal de pulmón, y de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado con, por ejemplo, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, melanoma), caspasa-8 (asociado con, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina (asociado con, por ejemplo, melanoma), TCR (asociado con, por ejemplo, linfoma no Hodgkin de células T), BCR-*abl* (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), triosafosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT, (c) antígenos sobreexpresados, por ejemplo, Galectina 4 (asociada con, por ejemplo, cáncer colorrectal), Galectina 9 (asociada con, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociada con, por ejemplo, varias leucemias), anhidrasa carbónica (asociada con, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociada con, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociado con, por ejemplo, melanoma), HER-2/*neu* (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), alfa-fetoproteína (asociado con, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, cáncer colorectal), gastrina (asociada con, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica de telomerasa, MUC-1 (asociada con, por ejemplo, cáncer de mama y de ovario), G-250 (asociada con, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama y cáncer de colon) y antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer del tracto gastrointestinal como el cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación melanoma-melanocito tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa-1/TRP1 y proteína relacionada con la tirosinasa-2/TRP2 (asociada con, por ejemplo, melanoma), (e) antígenos asociados a la próstata, tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociada con, por ejemplo, cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, asociados con mieloma y linfomas de células B).

En ciertas realizaciones, los antígenos tumorales 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), incluidos los antígenos E6 y E7, antígenos virales de la hepatitis B y C, antígenos del virus

linfotrópico humano de células T, TSP-180, p185erbB2, p180erbB- 3, c-met, mn-23H1, TAG-72 -4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27,29 \ BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68 \ KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y similares.

#### Antígenos de Parásitos

En algunas realizaciones, el antígeno ocasiona una respuesta inmune contra un parásito del género *Plasmodium*, tal y como *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae* o *P.ovale*. Por lo tanto, la divulgación se puede utilizar para inmunizar contra la malaria.

#### Alérgenos

En algunas realizaciones, el antígeno ocasiona una respuesta inmune contra: alérgenos de polen (alérgenos de árboles, hierbas, malezas y polen); alérgenos de insectos o arácnidos (alérgenos de inhalantes, saliva y veneno, por ejemplo, alérgenos de ácaros, alérgenos de cucarachas y mosquitos, alérgenos del veneno de himenópteros); alérgenos del cabello y la caspa de animales (por ejemplo, de perros, gatos, caballos, ratas, ratones, etc.); y alérgenos en los alimentos (por ejemplo, una gliadina). Los alérgenos polínicos importantes de árboles, pastos y hierbas son originarios de las órdenes taxonómicas de Fagales, Oleales, Pinales y platanaceae, que incluyen, pero no se limitan a, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellana (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), árbol plano (*Platanus*), del orden de Poales, que incluye pastos de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, Órdenes de Asterales y Urticales, incluidas hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros alérgenos por inhalación importantes son los de los ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento, por ejemplo, *Lepidoglyphys*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquitos y pulgas, por ejemplo, *Blattella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalide*, y aquellos de mamíferos como gatos, perros y caballos, alérgenos de veneno, incluidos los originados por insectos que pican o muerden, como los del orden taxonómico *Hymenoptera*, incluidas las abejas (*Apidae*), avispas (*Vespidae*), y hormigas (*formicoidae*).

Es claramente evidente que la presente divulgación se puede utilizar para generar anticuerpos contra una gran cantidad de antígenos con fines de diagnóstico e inmunopurificación, así como para prevenir o tratar una amplia variedad de enfermedades.

#### 4. Adyuvantes Inmunológicos

Como se indicó previamente, las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la divulgación pueden incluir uno o más adyuvantes inmunológicos opcionales. Los adyuvantes inmunológicos para su uso con la divulgación incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes que se exponen a continuación:

##### 1.1.1 A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales apropiadas para el uso de adyuvantes inmunológicos incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio o sales de calcio. La divulgación incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc.. (véase, por ejemplo, *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (Powell, M.F. and Newman, M.J. eds.) (New York: Plenum Press) 1995, Capítulos 8 y 9) (Nueva York: Plenum Press) 1995, Capítulos 8 y 9), o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, la mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso del fosfato), con los compuestos tomando cualquier forma apropiada (por ejemplo, gel, cristalino, amorfo, etc.), y siendo preferida con la adsorción a las sales. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica (documento WO 00/23105).

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse por la fórmula  $AlO(OH)$ , se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, como el hidróxido de aluminio  $Al(OH)_3$ , por espectroscopía infrarroja (EI), en particular por la presencia de una banda de adsorción a  $1070\text{cm}^{-1}$  y un hombro fuerte a  $3090\text{-}3100\text{cm}^{-1}$  [el capítulo 9 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.] El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja en el ancho de la banda de difracción a media altura (AMA), con partículas poco cristalinas que muestran un mayor ensanchamiento de la línea debido a que están presentes tamaños de cristalita más pequeños. El área de superficie aumenta a medida que aumenta la AMA, y se ha observado que los adyuvantes con valores más altos de AMA tienen una mayor capacidad para la adsorción de antígenos. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en micrografías electrónicas de transmisión) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es típicamente de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han reportado capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de  $Al^{+++}$  a pH 7,4 para los adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de la reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos generalmente tienen una relación molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0,2 y 1,2. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir del  $\text{AlPO}_4$  estricto por la presencia de grupos estructurales hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR de  $3164\text{ cm}^{-1}$  (por ejemplo, cuando se calienta a  $200\text{ }^\circ\text{C}$ ) indica la presencia de hidroxilos estructurales [capítulo 9 de Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.].

La proporción molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$  de un adyuvante de fosfato de aluminio, generalmente se encontrará entre 0,2 y 1,2, preferiblemente entre 0,8 y 1,2, y más preferiblemente  $0,95\pm 0,1$ . El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de  $\text{Al}^{3+}/\text{ml}$ . El fosfato de aluminio generalmente será particular (por ejemplo, una morfología similar a una placa como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en un intervalo de 0,5 a  $20\text{ }\mu\text{m}$  (por ejemplo, alrededor de 5 a  $10\text{ }\mu\text{m}$ ) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han reportado capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de  $\text{Al}^{+++}$  a pH 7,4 para los adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PCZ) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución del fosfato por el hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar según las condiciones de la reacción y la concentración de los reactivos utilizados para preparar la sal por precipitación. El PCZ también se altera cambiando la concentración de iones de fosfato libres en la solución (más fosfato = PCZ más ácido) o agregando un regulador como un regulador de histidina (hace que el PCZ sea más básico). Los fosfatos de aluminio utilizados de acuerdo con la divulgación tendrán generalmente un PCZ de entre 4,0 y 7,0, más preferiblemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, alrededor de 5,7.

Las suspensiones de sales de aluminio utilizadas para preparar composiciones de la divulgación pueden contener un regulador (por ejemplo, un regulador de fosfato o de histidina o un regulador de Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones son preferiblemente estériles y libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo, presente en una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferiblemente entre 5 y 15 mM, y más preferiblemente alrededor de 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.

En una realización, un componente adyuvante incluye una mezcla de un hidróxido de aluminio y de un fosfato de aluminio. En este caso, podría haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una proporción en peso de al menos 2:1 por ejemplo,  $\geq 5:1$ ,  $\geq 6:1$ ,  $\geq 7:1$ ,  $\geq 8:1$ ,  $\geq 9:1$ , etc..

La concentración de  $\text{Al}^{+++}$  en una composición para la administración a un paciente es preferiblemente inferior a 10 mg/ml, por ejemplo,  $\leq 5\text{ mg/ml}$ ,  $\leq 4\text{ mg/ml}$ ,  $\leq 3\text{ mg/ml}$ ,  $\leq 2\text{ mg/ml}$ ,  $\leq 1\text{ mg/ml}$ , etc. Un rango preferido es entre 0,2 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de  $<0,85\text{ mg/dosis}$ .

#### 1.1.2 B. Emulsiones de Aceite

Las composiciones y formulaciones de emulsión de aceite apropiadas para uso como adyuvantes inmunológicos (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptidos muramil o componentes de la pared celular bacteriana) incluyen emulsiones de escualeno-agua, como MF59 (5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80, y 0,5 % de Span 85, formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador). Véase WO 90/14837. Véase también, Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680; Frey et al. (2003) Vaccine 21: 4234-4237. MF59 se utiliza como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente del virus de la influenza FLUAD™.

Los adyuvantes para el uso en las composiciones incluyen emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para el uso en el presente documento son emulsiones de escualeno/agua que contienen opcionalmente cantidades variables de MTP-PE, tales como una emulsión de aceite en agua submicrónica que contiene 4-5 % p/v de escualeno, 0,25-1,0 % p/v Tween 80™ (monooleato de polioxietilensorbitan) y/o 0,25 a 1,0 % de Span 85™ (trioleato de sorbitán) y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutinil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión de aceite en agua submicrónica conocida como "MF59" (WO 90/14837; Patente de los Estados Unidos No. 6,299,884; Patente de los Estados Unidos No. 6,451,325; y Ott et al., "MF59 - Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. and Newman, M.J. eds.) (New York: Plenum Press) 1995, pp. 277-296). MF59 contiene 4-5 % p/v de escualeno (por ejemplo, 4,2 %), 0,25-0,5 % p/v de Tween 80™ y 0,5 % p/v de Span 85™ y opcionalmente contiene varias cantidades de MTP-PE, formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500  $\mu\text{g/dosis}$ , más preferiblemente 0-250  $\mu\text{g/dosis}$  y lo más preferiblemente, 0-100  $\mu\text{g/dosis}$ . Como se utiliza en el presente documento, el término "MF59-0" se refiere a la anterior emulsión de aceite en agua submicrónica que carece de MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP denota una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100  $\mu\text{g}$  de MTP-PE por dosis,

y así sucesivamente. MF69, otra emulsión submicrónica de aceite en agua para uso aquí, contiene 4,2 % p/v de escualeno, 0,25 % p/v Tween 80™ y 0,75 % p/v Span 85™ y opcionalmente MTP-PE. Otra emulsión submicrónica de aceite en agua es MF75, también conocida como SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de Tween 80™, 5 % de polímero bloqueado con plurónico L121 y thr-MDP, también microfluidizada en una emulsión de submicrón. MF75-MTP denota una formulación MF75 que incluye MTP, tal como de 100-400 µg de MTP-PE por dosis.

Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas, los procedimientos para preparar las mismas y los agentes inmunoestimulantes, como los péptidos de muramilo, para uso en las composiciones, se describen con detalle en WO 90/14837; Patente de los Estados Unidos No. 6,299,884; y Patente de los Estados Unidos No. 6,451,325.

El adyuvante completo de Freund (ACF) y el adyuvante incompleto de Freund (AIF) también pueden ser utilizados como adyuvantes en la divulgación.

#### 1.1.2 C. Formulaciones de Saponina

Las formulaciones de saponina también son apropiadas para el uso como adyuvantes inmunológicos en la divulgación. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso en las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol de *Quillaia saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. Las saponinas también se pueden obtener comercialmente de *Smilax ornata* (sarsaparilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOMs. Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen adyuvante STIMULON® (Antigenics, Inc., Lexington, MA).

Las composiciones de saponina se han purificado utilizando cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HP-TLC) y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Las fracciones purificadas específicas que utilizan estas técnicas han sido identificadas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,057,540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, como el colesterol (véase WO 96/33739).

Las combinaciones de saponinas y colesterol se pueden utilizar para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMs). Los ISCOMs también incluyen típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede utilizarse en ISCOMs. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de Quil A, QHA y QHC. Los ISCOMs se describen con más detalle en EP 0 109 942, WO 96/11711 y WO 96/33739. Opcionalmente, el ISCOMs puede estar desprovisto de uno o más detergentes adicionales. Véase WO 00/07621.

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en Barr et al. (1998) Adv. Drug Del. Rev. 32: 247-271. Véase también Sjolander et al. (1998) Adv. Drug Del. Rev. 32: 321-338.

#### 1.1.4 D. Virosoma y Partículas Tipo Virus (PTVs)

Los virosomas y las Partículas Tipo Virus (PTVs) son también apropiados como adyuvantes inmunológicos. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus combinado opcionalmente o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patogénicos, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden ser producidas de forma recombinante o ser aisladas de virus completos. Estas proteínas virales apropiadas para el uso en virosomas o PTVs incluyen proteínas derivadas del virus de la influenza (como HA o NA), virus de hepatitis B (como proteínas del núcleo o de la cápside), virus de hepatitis E, virus de sarampión, virus Sindbis, Rotavirus, virus de la enfermedad de pies y boca, Retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago-Qβ (como proteínas de la cubierta), fago-GA, fago-fr, fago AP205 y Ty (como la proteína pI del retrotransposón Ty). Las PTVs se discuten con más detalle en WO 03/024480; WO 03/024481; Niikura et al. (2002) Virology 293:273-280; Lenz et al. (2001) J. Immunol. 166(9):5346-5355; Pinto et al. (2003) J. Infect. Dis. 188:327-338; and Gerber et al. (2001) J. Virol. 75(10):4752-4760. Los virosomas se discuten con más detalle en, por ejemplo, Gluck et al. (2002) Vaccine 20:B10-B16. Los inmunopotenciadores de virosomas de influenza reconstituidos (IVIR) se utilizan como el sistema de entrega de antígenos de subunidad en el producto intranasal trivalente INFLEXAL™ (Mischler and Metcalfe (2002) Vaccine 20 Suppl 5:B17-B23) y el producto INFLUVAC PLUSTM.

#### 1.1.5 E. Derivados Microbianos y Bacterianos

Los adyuvantes inmunológicos apropiados para el uso en la divulgación incluyen derivados microbianos o bacterianos tales como:

(1) Derivados no tóxicos de los lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS): Dichos derivados incluyen el monofosforil lípido A (MPL) y el MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de 3 monofosforil

lípidos A des-O-acilados con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En el documento EP 0 689 454 se describe una "partícula pequeña" preferida formada del monofosforil lípidos A 3 des-O-acilados. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para ser esterilizadas por filtración a través de una membrana de 0,22 micrones (véase EP 0 689 454). Otros derivados no tóxicos de LPS incluyen una forma mimética de monofosforil lípidos A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529. Véase Johnson et al. (1999) *Bioorg. Medicina. Chem. Letón.* 9: 2273-2278.

(2) Derivados del lípidos A: Los derivados del lípidos A incluyen derivados del lípidos A de *Escherichia coli*, como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491; y en Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.

(3) Los oligonucleótidos inmunoestimulantes: Los oligonucleótidos inmunoestimulantes o las moléculas poliméricas apropiadas para el uso como adyuvantes en la divulgación incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia que contiene una citosina no metilada seguida de una guanosina y unida por un enlace fosfato). También se ha demostrado que el ARN de doble cadena bacteriano u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimulantes. Los CpGs pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla. Opcionalmente, la guanosina se puede reemplazar con un análogo como 2'-deoxi-7-deazaguanosina. Véase Kandimalla et al. (2003) *Nucl. Acids Res.* 31 (9): 2393-2400; WO 02/26757; y WO 99/62923 para ejemplos de posibles sustituciones análogas. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se discute más a fondo en Krieg (2003) *Nat. Medicina.* 9 (7): 831-835; McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunol. Medicina. Microbiol.* 32: 179-185; WO 98/40100; Patente de los Estados Unidos 6,207,646; Patente de los Estados Unidos No. 6,239.116; y la Patente de los Estados Unidos No. 6,429.199.

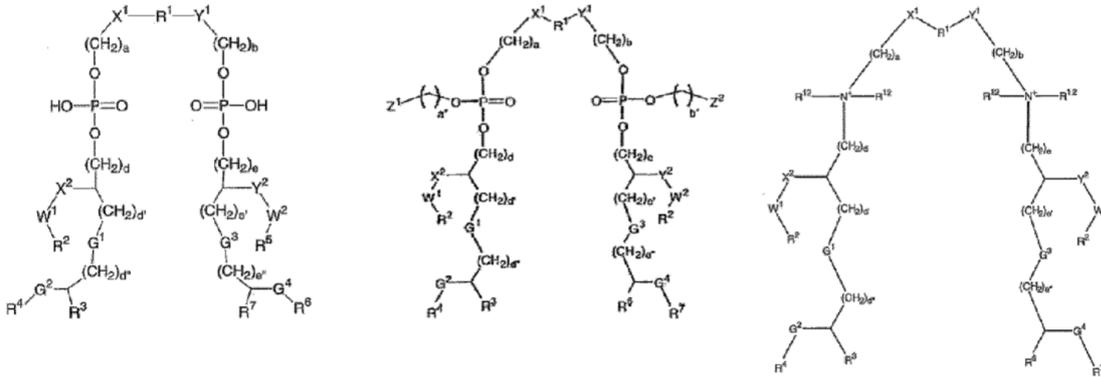
La secuencia de CpG puede ser dirigida a TLR9, como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Véase Kandimalla et al. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* 31 (parte 3): 654-658. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal y como una ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal y como una ODN CpG-B. Los ODN de CpG-A y CpG-B se analizan en Blackwell et al. (2003) *J. Immunol.* 170 (8): 4061-4068; Krieg (2002) *TRENDS Immunol.* 23 (2): 64-65; y WO 01/95935. Preferiblemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306: 948-953; Kandimalla et al. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* 31 (parte 3): 664-658; Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300: 853-861; y WO03/035836.

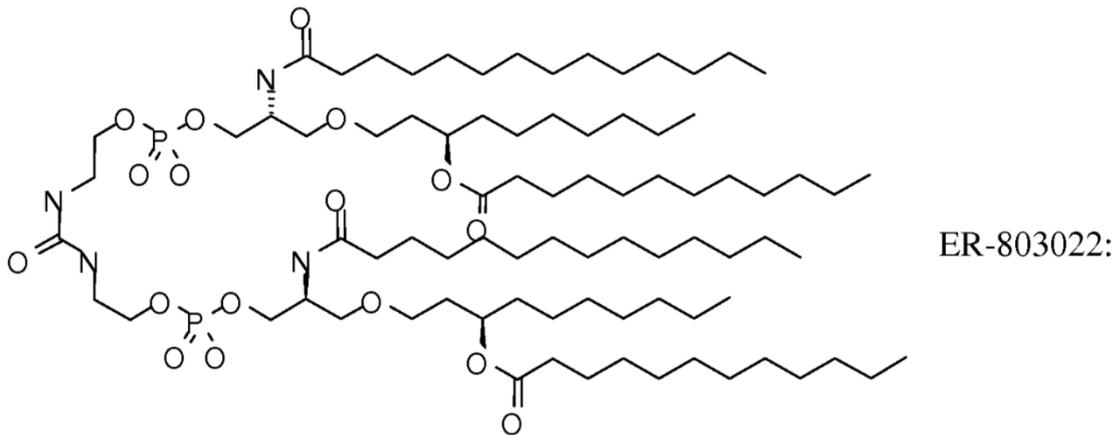
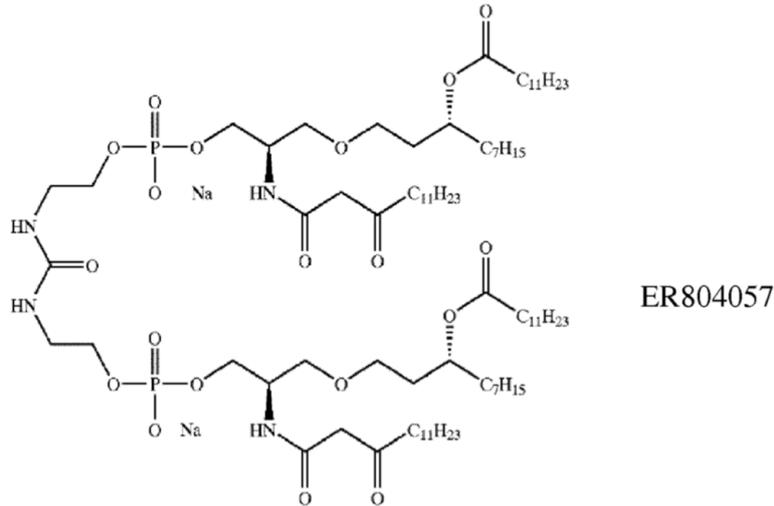
Los oligonucleótidos inmunoestimuladores y las moléculas poliméricas también incluyen estructuras alternativas del esqueleto de polímeros, tales como, pero no limitadas a, esqueletos de polivinilo (Pitha et al. (1970) *Biochem. Biophys. Acta* 204 (1): 39-48; Pitha et al. (1970) *Biopolymers* 9 (8): 965-977) y esqueletos de morfolino (Patente de los Estados Unidos No. 5,142,047; Patente de los Estados Unidos No 5,185,444). Una variedad de otros análogos de polinucleótidos cargados y no cargados son conocidos en la técnica. En la técnica se conocen numerosas modificaciones de la cadena principal, que incluyen, pero no se limitan a, enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos y carbamatos) y enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos y fosforditioatos).

(4) Las toxinas-ADP ribosilantes y derivados destoxificados de las mismas: las bacterianas toxinas ribosilantes-ADP y sus derivados destoxificados se pueden utilizar como adyuvantes en la divulgación. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o tos ferina ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes-ADP destoxificadas como adyuvantes de la mucosa se describe en WO 95/17211 y como adyuvantes parenterales en WO 98/42375. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante LT destoxificada tal y como LT-K63, LT-R72 y LTR192G. El uso de toxinas ribosilantes-ADP y los derivados destoxificados de los mismos, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes, se pueden encontrar en las siguientes referencias: Beignon et al. (2002) *Infect. Immun.* 70 (6): 3012-3019; Pizza et al. (2001) *Vaccine* 19: 2534-2541; Pizza et al. (2000) *Int. J. Med. Microbiol.* 290 (4-5): 455-461; Scharton-Kersten et al. (2000) *Infect. Immun.* 68 (9): 5306-5313; Ryan et al. (1999) *Infect. Immun.* 67 (12): 6270-6280; Partidos et al. (1999) *Immunol. Letón.* 67 (3): 209-216; Peppoloni et al. (2003) *Vaccines* 2 (2): 285-293; y Pine et al. (2002) *J. Control Release* 85 (1-3): 263-270. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas ribosilantes-ADP expuestas en Domenighini et al. (1995) *Mol. Microbiol.* 15 (6): 1165-1167.

Los compuestos de la fórmula I, II o III, o sales de los mismos, se pueden también utilizar como adyuvantes:



como se define en WO03/011223, al igual que en 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 o 'ER 804057' por ejemplo:



5

F. Inmunomoduladores Humanos

Los inmunomoduladores humanos apropiados para el uso como adyuvantes inmunológicos incluye citosinas, como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y el factor de necrosis tumoral (FNT).

10 1.1.6 G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos también pueden ser utilizados como adyuvantes inmunológicos. Los bioadhesivos apropiados incluyen esferas de ácido hialurónico esterificado (Singh et al. (2001) J. Cont. Release 70:267:276) o mucoadhesivos tales como derivados entrecruzados por ácido poliacrílico, alcohol polivinílico,

polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetil celulosa. El quitosán y los derivados de los mismos, también pueden ser utilizados como adyuvantes en la divulgación (véase WO 99/27960).

#### 1.1.7 H. Liposomas

5 Ejemplos de formulaciones de liposomas apropiados para el uso como adyuvantes inmunológicos se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 6,090,406; la Patente de los Estados Unidos No. 5,916,588; y la patente publicada EP No. EP 0 626 169.

#### 1.1.8. I Éter de polioxieteno y éster de polioxietileno

##### Formulaciones

10 Los adyuvantes inmunológicos apropiados para el uso en la divulgación incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (véase, por ejemplo, WO 99/52549). Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con octoxinol (WO 01/21207), así como tensioactivos de éteres o ésteres de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, como el octoxinol (WO 01/21207).

15 Los éteres de polioxietileno son seleccionados del siguiente grupo: polioxietileno-9-lauril éter (lauret9), polioxietileno-9-esteiril éter, polioxietileno-8-esteiril éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter, y polioxietileno-23-lauril éter.

#### 1.1.9. J. Polifosfazeno (PCPP)

20 Las formulaciones de PCPP apropiadas para el uso como adyuvantes inmunológicos se describen, por ejemplo, en Andrianov et al. (1998) Biomaterials 19(1-3):109-115; y en Payne et al. (1998) Adv. Drug Del. Rev. 31(3):185-196.

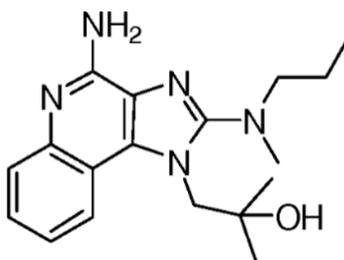
#### 1.1.10 K. Péptidos de Muramilo

25 Los ejemplos de péptidos de muramilo apropiados para el uso como adyuvantes inmunológicos incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-1-alanil-d-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-1-alanil-d-isoglutaminil-1-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

#### 1.1.11 L. Compuestos de Imidazoquinolina

30 Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolina apropiados para el uso como adyuvantes inmunológicos incluyen imiquimod y sus análogos, que se describen con más detalle en Stanley (2002) Clin. Exp. Dermatol. 27 (7): 571-577; Jones (2003) Curr. Opin. Investig. Drugs 4 (2): 214-218; y las Patentes U.S. No. 4,689,238; 5,389,640; 5,268,276; 4,929,624; 5,266,575; 5,352,784; 5,494,916; 5,482,936; 5,346,905; 5,395,937; 5,238,944; y 5,525,612.

Las imidazoquinolinas para la práctica de la presente divulgación incluyen imiquimod, resiquimod y



35 Véase, por ejemplo, Pub. Int. Nos. WO 2006/031878 de Valiante et al. y WO 2007/109810 de Sutton et al. Se sabe que tales compuestos son agonistas de TLR7.

#### M. Compuestos de Tiosemicarbazona

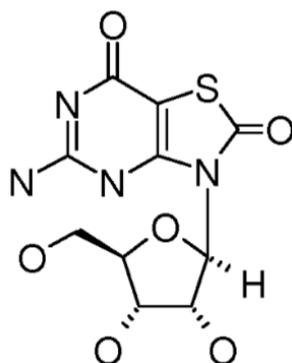
40 Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona apropiados para el uso como adyuvantes inmunológicos, así como los procedimientos para la formulación, manufactura y selección de tales compuestos, incluyen a aquellos descritos en WO 04/60308. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ .

#### N. Compuestos de Triptantrina

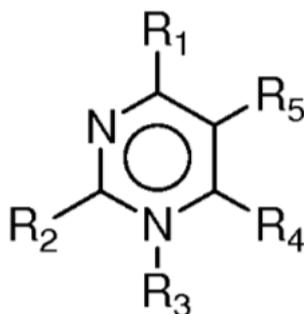
Los ejemplos de compuestos de triptantrina apropiados para el uso como adyuvantes inmunológicos, así como los procedimientos para la formulación, fabricación y selección de tales compuestos, incluyendo los descritos en el WO 04/64759. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ .

5 1.1.12 O. Análogos de Nucleósidos

Se pueden utilizar diversos análogos de nucleósidos como adyuvantes inmunológicos, tales como (a) isatorabina (ANA-245; 7- tia-8-oxoguanosina):



- 10 y sus profármacos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos descritos en la Patente de los Estados unidos No. 6,924,271; Publicación No. 2005/0070556; y la Patente de los Estados unidos No. 5,658,731; (f) un compuesto que tiene la fórmula:

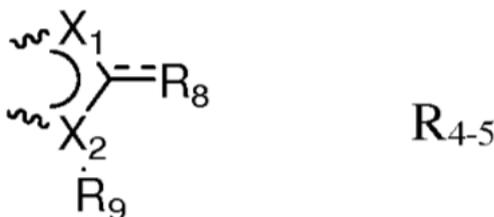


en la que:

- 15  $R_1$  y  $R_2$  son cada independientes H, halo,  $-NR_aR_b$ ,  $-OH$ , alcoxi  $C_{1-6}$ , alcoxi  $C_{1-6}$  sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo  $C_{6-10}$ , arilo  $C_{6-10}$  sustituido, alquilo  $C_{1-6}$ , o alquilo alquilo  $C_{1-6}$  sustituido;

$R_3$  está ausente, H, alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido, arilo  $C_{6-10}$ , arilo  $C_{6-10}$  sustituido, heterocíclico o heterocíclico sustituido;

$R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientes H, halo, heterocíclico, heterocíclico sustituido,  $-C(O)-R_d$ , alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido, o unidos entre sí para formar un anillo de 5 miembros como en  $R_{4-5}$ :

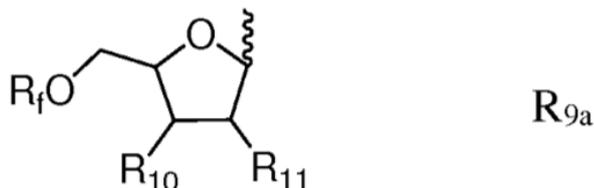


20

La unión que se logra en los enlaces indicados por un  $\sim$   $X_1$  y  $X_2$  son cada uno independientes N, C, O o S;

$R_8$  es H, halo,  $-OH$ , alquilo  $C_{1-6}$ , alqueno  $C_{2-6}$ , alqueno  $C_{2-6}$ ,  $-OH$ ,  $-NR_aR_b$ ,  $-(CH_2)_n-O-R_c$ ,  $-O$ -(alquilo  $C_{1-6}$ ),  $-S(O)_p R_e$ , ó  $-C(O)-R_d$ ;

R<sub>9</sub> es H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido o R<sub>9a</sub>, en donde R<sub>9a</sub> es:



la unión se logra en el enlace indicado por un

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son independientemente H, halo, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, u -OH;

5 cada R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, -C(O)R<sub>d</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>;

cada R<sub>c</sub> es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C<sub>1-6</sub> o alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido;

cada R<sub>d</sub> es independientemente H, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-6</sub>), -NH(alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido), -N(alquilo C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -N(alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido)<sub>2</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, o heterocíclico;

10 cada R<sub>e</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, heterocíclico o heterocíclico sustituido;

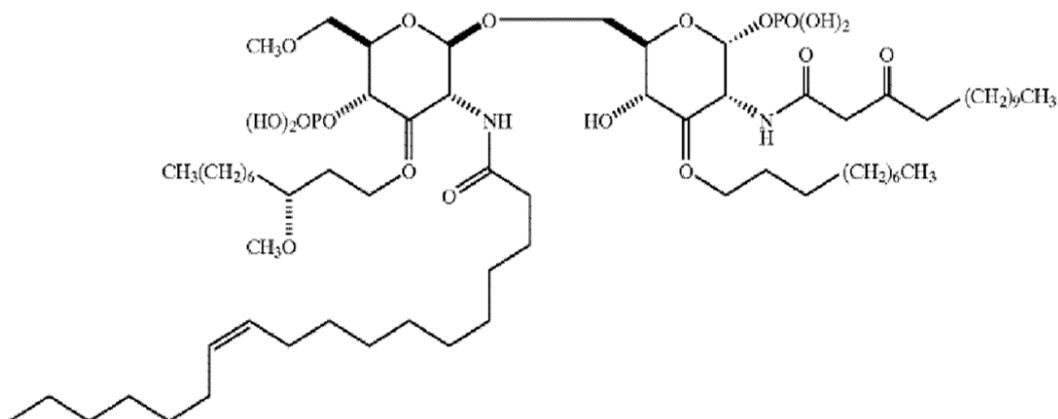
cada R<sub>f</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, -C(O)R<sub>d</sub>, fosfato, difosfato o trifosfato; cada n es independientemente 0, 1, 2 ó 3;

cada p es independientemente 0, 1 ó 2; o

15 o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

#### 1.1.13 P. Lípidos unidos a un esqueleto de fosfato ácido

Los adyuvantes inmunológicos que contienen lípidos unidos a un esqueleto de fosfato ácido incluyen el antagonista de TLR4 E5564 (Wong et al. (2003) J. Clin. Pharmacol. 43 (7): 735-742; US2005/0215517):



20

#### 1.1.14 Q. Moléculas pequeñas inmunopotenciadoras (MPIPs)

Las MPIPs incluyen:

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- 25 • N2, N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;

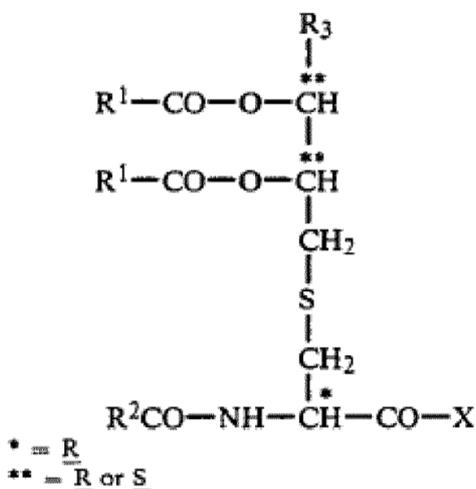
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
  - N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
  - N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c] quinolin-2,4-diamina;
  - N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- 5
- 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tiol] -1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
  - 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
  - 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il] (metil)amino]etanol;
  - 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]acetato de etilo;
  - 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c] quinolin-2-ona;
- 10
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4, N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
  - N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil) -N4, N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
  - N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4, N4-bis (fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
  - N2, N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4, N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
  - 1- {4-amino-2- [metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il} -2-metilpropan-2-ol;
- 15
- 1- [4-amino-2- (propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il] -2-metilpropan-2-ol;
  - N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil) -N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina.

#### 1.1.15 R. Proteosomas

- 20 Un adyuvante es una preparación de proteosoma de una proteína de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de liposacárido derivada de una segunda bacteria Gram-negativa, en la que el proteosoma de proteína de membrana externa y las preparaciones de liposacáridos forman un complejo adyuvante estable no covalente. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo que comprende la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Se han utilizado como adyuvantes para las vacunas contra la influenza (WO02/072012).

#### 1.1.16 S. Lipopéptidos

- 25 Se ha demostrado que los lipopéptidos (es decir, compuestos que comprenden uno o más residuos de ácidos grasos y dos o más residuos de aminoácidos) tienen carácter inmunoestimulante. Los lipopéptidos basados en glicerilcisteína son particularmente adecuados para el uso como adyuvantes. Ejemplos específicos de tales péptidos incluyen compuestos de la siguiente fórmula

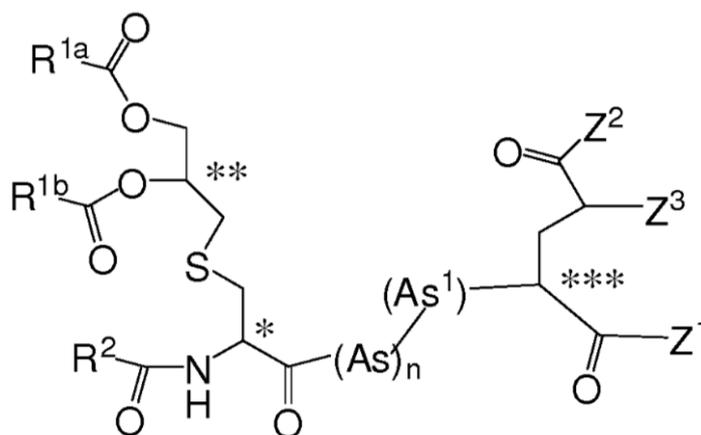


- 30 en el que cada uno de  $R_1$  y  $R_2$  representa un hidrocarburo saturado o insaturado, alifático o mixto de alifático-cicloalifático, que contiene de 8 a 30, preferiblemente de 11 a 21 átomos de carbono que opcionalmente también están sustituidos con funciones de oxígeno,  $R_3$  representa hidrógeno o a el radical  $R_1\text{-CO-O-CH}_2$  en el que  $R_1$

tiene el mismo significado que se mencionó anteriormente, y X representa a un aminoácido unido por un enlace peptídico y que tiene un grupo carboxilo libre, esterificado o tiene un grupo amida, o una secuencia de aminoácidos de 2 a 10 aminoácidos de los cuales el grupo carboxilo terminal está en forma libre, esterificada o tiene un grupo amida. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos comprende un D-aminoácido, por ejemplo, ácido D-glutámico (D-Glu) o ácido D-gamma-carboxi-glutámico (D-Gla).

Los lipopéptidos bacterianos generalmente reconocen a TLR2, sin requerir la participación de TLR6. (Los TLR operan de manera cooperativa para brindar un reconocimiento específico de diversos desencadenantes, y TLR2 más TLR6 juntos reconocen a los peptidoglicanos, mientras que TLR2 reconoce a los lipopéptidos sin TLR6). Estos a veces se clasifican como lipopéptidos naturales y como lipopéptidos sintéticos. Los lipopéptidos sintéticos tienden a comportarse de manera similar, y son reconocidos principalmente por TLR2.

Los lipopéptidos apropiados para el uso como adyuvantes incluyen compuestos de Fórmula I:



donde el centro quiral etiquetado \* y el etiquetado \*\*\* están ambos en la configuración R;

el centro quiral etiquetado \*\*\* está en la configuración R o S;

cada R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup> es independientemente un grupo hidrocarburo alifático o cicloalifático-alifático que tiene de 7 a 21 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con funciones de oxígeno, o uno de R<sup>1a</sup> y R<sup>1b</sup>, pero no ambos, es H;

R<sup>2</sup> es un grupo hidrocarburo alifático o cicloalifático que tiene de 1 a 21 átomos de carbono y está opcionalmente sustituido con funciones de oxígeno;

n es 0 o 1;

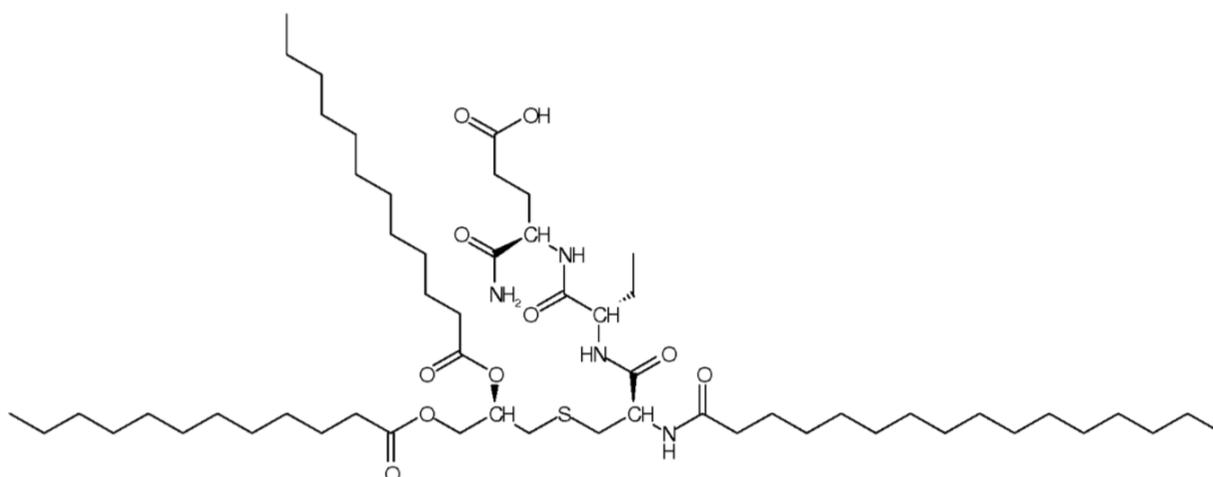
As representa -O-Kw-CO- ó -NH-Kw-CO-, donde Kw es un grupo hidrocarburo alifático que tiene de 1 a 12 átomos de carbono;

As<sup>1</sup> es un D-o L-alfa-aminoácido;

Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> representan cada uno independientemente un -OH o el radical N-terminal de un D- o L-alfa aminoácido de un aminoácido (alcano inferior) de ácido sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados de los ácidos D- y L- alfa aminocarboxílicos y ácidos amino-alquil-sulfónicos inferiores; y

Z<sup>3</sup> es H o -CO-Z<sup>4</sup>, donde Z<sup>4</sup> es -OH o el radical N-terminal de un D- o L-alfa-aminoácido de un ácido amino-(alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados entre los ácidos aminocarboxílicos D y L-alfa y los ácidos amino-alquil-sulfónicos inferiores; o un éster o amida formada a partir del ácido carboxílico de tales compuestos. Las amidas apropiadas incluyen -NH<sub>2</sub> y NH (alquilo inferior), y los ésteres apropiados incluyen ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. (alquilo inferior o alcano inferior, como se utiliza en el presente documento, se refiere a los alquilos de la cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).

Dichos compuestos se describen con mayor detalle en US 4,666,886, En una realización preferida, el lipopéptido es de la siguiente fórmula:



Otro ejemplo de una especie de lipopéptido se llama LP40, y es un agonista de TLR2. Akdis, et al., Eur. J. Immunology, 33: 2717-26 (2003).

- 5 Estos están relacionados con una clase conocida de lipopéptidos de *E. coli*, denominados lipoproteínas de mureína. Ciertos productos de degradación parcial de esas proteínas llamadas lipopéptidos de mureína se describen en Hantke, et al., Eur. J. Biochem., 34: 284-296 (1973). Estos comprenden un péptido unido al ácido N-acetil murámico y, por lo tanto, están relacionados con los péptidos muramilo, los cuales se describen en Baschang, et al., Tetrahedron, 45 (20): 6331-6360 (1989).

#### T. Benzopiridinas

- 10 Ejemplos de compuestos de benzopiridina apropiados para el uso de adyuvantes en la divulgación se describen en WO 2009/111337.

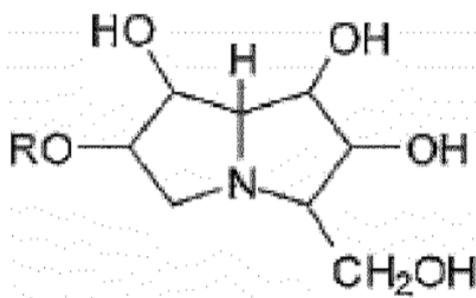
#### 1.1.17 U. Otros Adyuvantes

- 15 Otras sustancias que actúan como adyuvantes inmunológicos se describen en Burdman, J.R. et al. (eds) (1995) (Vaccine Design: Subunit and Adjuvant Approach (Springer) (Capítulo 7) y O'Hagan, DT (2000) (Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Humana Press) (Volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series)).

Otras sustancias adyuvantes útiles incluyen:

- Metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") (Signorelli y Hadden (2003) Int. Immunopharmacol. 3 (8): 1177-1186).
- Un compuesto polihidroxilado de pirrolizidina (WO2004/064715), tal como uno que tiene la fórmula:

20



- 25 donde R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo, lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, saturados o insaturados o una sal o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- $\alpha$ -D-glucopiranos, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc..

- Una inulina gamma (Cooper (1995) Pharm. Biotechnol. 6: 559-580) o un derivado del mismo, tal como alammulina.

• Compuestos descritos en PCT/US2005/022769.

• Compuestos descritos en WO2004/87153, que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoleidona, tetrahidroquinolina (THIQ), Compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilO, compuestos de aminobenzimidazol quinolinona (ABIQ) (Patente de U.S No. 6,605,617; WO 02/18383), compuestos de hidraptalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de estero, compuestos de quinazolinona, Compuestos de pirrol (WO2004/018455), compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol (WO03/082272).

• Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) (Patente de los Estados unidos No. 5,011,828).

10 • La formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (generalmente neutro), como el bromuro de aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-pro-panaminio-difitoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o aminopropil-dimetil-bis-duodeciloil-propanaminin bromuro-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE: DOPE"). Se prefieren las formulaciones que contienen sales de (6)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(sin-9-tetradeceniloxi)-1-propanaminio (Patente de los Estados unidos No. 6,586,409).

15 La divulgación también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes inmunológicos identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones adyuvantes se pueden utilizar en la divulgación: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (WO 99/11241); (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) (véase WO 94/00153); (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un estero) (WO 98/57659); (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véase EP 0 835 318; EP 0 735 898; y EP 0 761 231); (6) SAF, que contiene 10 % de escualano, 0,4 % de Tween 80, 5 % de polímero de bloque plurónico L121 y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrónica o agitado con vórtex para generar una emulsión con partículas de mayor tamaño; (7) Sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilipido A (MPL), dimalolato de trehalosa (TDM), y el esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); (8) una o más sales minerales (como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (como 3dMPL); (9) una o más sales minerales (como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulador (como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

### 5. Componentes Adicionales

Como se describió anteriormente, las composiciones de partículas de acuerdo con la divulgación pueden incluir componentes adicionales. Tales componentes adicionales incluyen, por ejemplo, componentes que evitan que se produzca una aglomeración sustancial de partículas cuando las suspensiones de micropartículas de acuerdo con la divulgación se liofilizan y posteriormente se resuspenden.

Los componentes adicionales incluyen (a) aminoácidos tales como ácido glutámico y arginina, entre otros; (b) polioles, incluidos dioles como etilenglicol, propanodioles como 1,2-propilenglicol y 1,3-propilenglicol, y dioles de butano como 2,3-butilenglicol, entre otros, trioles como el glicerol, entre otros, así como otros polioles superiores; (c) carbohidratos que incluyen, por ejemplo, (i) monosacáridos (por ejemplo, glucosa, galactosa y fructosa, entre otros), (ii) polisacáridos que incluyen disacáridos (por ejemplo, sacarosa, lactosa, trehalosa, maltosa, gentiobiosa, celobiosa, carboximetil celulosa y sorbitol, entre otros), trisacáridos (por ejemplo, rafinosa, entre otros), tetrasacáridos (por ejemplo, estaquiosa entre otros), pentasacáridos (por ejemplo, verbascosa entre otros), así como numerosos otros polisacáridos superiores y (iii) alditoles como xilitol, sorbitol y manitol, entre otros (en este sentido, se observa que los alditoles son polioles superiores, además de ser carbohidratos); y (d) tensioactivos no iónicos como el alcohol polivinílico (PVA), povidona (también conocida como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitán, polisorbatos, monoéteres polioxoetilados de glicol, fenoles alquilo polioxiethylados, poloxámeros, polietilenglicol, propilenglicol, entre otros.

Las composiciones de acuerdo con la divulgación pueden contener cantidades variables de tales componentes adicionales, cuando se proporcionan, dependen típicamente de la cantidad que sea efectiva para evitar que se produzca una aglomeración sustancial de partículas cuando las composiciones liofilizadas de la divulgación se vuelven a suspender sin afectar la adsorción de ARN y su integridad.

En ciertas realizaciones preferidas, las composiciones de acuerdo con la divulgación contendrán uno, dos o todos los siguientes componentes adicionales en las siguientes cantidades: (a) surfactante no iónico (por ejemplo, PVA) en una cantidad que varía de 0,5 a 20 % p/p (por ejemplo, que varía de 0,5 a 1 a 2 a 10 a 15 a 20 % p/p) con respecto a la cantidad del polímero (por ejemplo, PLG) en la composición; (b) polioli (por ejemplo, un alditol como manitol) en una cantidad que oscila entre el 0,5 y el 10 % p/v (por ejemplo, un intervalo de 0,5 a 1 a 2 a 5 a 10 % p/v) en relación con el volumen reconstituido de la composición, y (c) carbohidrato (por ejemplo, un sacárido como la sacarosa) en una cantidad que varía de 0,5 a 10 % p/v (por ejemplo, que varía de 0,5 a 1 a 2 a

5 a 10 % p/v) relativo al volumen reconstituido de la composición. Como se indica a continuación, las composiciones liofilizadas de acuerdo con la presente divulgación pueden proporcionarse con instrucciones con respecto al volumen apropiado de fluido (por ejemplo, agua para inyectar, etc.) para ser utilizada para la resuspensión/reconstitución de la composición.

## 5 6. Excipientes adicionales

Como se discutió anteriormente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como sustancias de regulación biológica, agentes de ajuste de tonicidad, y similares, también pueden estar también presentes en las composiciones de partículas de la presente divulgación.

## 7. Administración

10 Una vez formuladas (y resuspendidas según sea necesario), las composiciones de partículas de la divulgación pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección (que puede ser sin aguja), entre otras vías de administración. En este aspecto, las composiciones de partículas se suministran típicamente liofilizadas en un vial u otro recipiente que se suministra con un septo u otro medio adecuado para suministrar un medio de resuspensión (por ejemplo, agua para inyección) y para retirar la suspensión resultante. También se puede  
15 suministrar una jeringa adecuada para inyección. Las composiciones pueden inyectarse por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal, por ejemplo. Otros modos de administración incluyen administración nasal, mucosa, intraocular, rectal, vaginal, oral y pulmonar, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas.

20 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente divulgación se pueden utilizar para la administración dirigida específica al sitio diana. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones puede utilizarse para dirigirse al pulmón, al hígado, al bazo, a la circulación sanguínea o a la médula ósea.

25 El tratamiento puede llevarse a cabo de acuerdo con un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. Un esquema de dosis múltiple es uno en el que se puede administrar un curso primario de administración, por ejemplo, con 1-10 dosis separadas, seguidas de otras dosis administradas en intervalos de tiempo subsiguientes, elegidas para mantener y/o para reforzar la respuesta terapéutica, por ejemplo a los 1-4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una dosis posterior después de varios meses. El régimen de dosificación también estará, al menos en parte, determinado por la necesidad del sujeto y dependerá del juicio del médico.

30 Además, si se desea la prevención de la enfermedad, las composiciones se administran generalmente antes de la llegada de la aparición primaria de la infección o el trastorno de interés. Si se desean otras formas de tratamiento, por ejemplo, la reducción o eliminación de los síntomas o las recurrencias, las composiciones se administran generalmente después de la llegada de la aparición primaria de la infección o el trastorno de interés.

## 7. Kits

35 Esta divulgación abarca kits que pueden simplificar la administración de cantidades apropiadas de composiciones inmunológicas a un sujeto.

Un kit típico de la divulgación comprende una forma de dosificación unitaria de una composición de partículas liofilizadas de acuerdo con la divulgación (es decir, una que comprende, entre otros, un replicón de ARN adsorbido a partículas cargadas positivamente), preferiblemente en un recipiente sellado.

40 En ciertas realizaciones, tal contenedor sellado se puede proporcionar junto con una etiqueta que indique uno o más miembros del grupo que consiste en lo siguiente: (a) información de almacenamiento, (b) información de dosificación, e (c) instrucciones sobre cómo administrar la formación de micropartículas. Para composiciones liofilizadas, las instrucciones incluirán típicamente el volumen de fluido (por ejemplo, agua para inyección, etc.) que se utilizará para la resuspensión/reconstitución de la composición. En algunos casos, el contenedor sellado y la etiqueta pueden estar contenidos dentro de un material de embalaje apropiado.

45 Los kits de la divulgación pueden comprender, además, un recipiente sellado que contiene uno o más adyuvantes inmunológicos. Los adyuvantes pueden estar en forma liofilizada o proporcionarse en forma de un fluido acuoso.

50 Los kits de la divulgación pueden comprender, además, un recipiente sellado que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable que puede utilizarse para suspender y administrar la composición de partículas liofilizadas y en algunas realizaciones para suspender/disolver cualquier composición adyuvante que se suministre.

El kit puede incluir, además, uno o más dispositivos que pueden utilizarse para administrar las composiciones de la divulgación a un sujeto vertebrado. Ejemplos de dichos dispositivos incluyen, entre otros, jeringas, bolsas de goteo e inhaladores.

Por ejemplo, se puede utilizar una jeringa para introducir un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado (por ejemplo, agua para inyectar) en una composición de partículas liofilizadas de acuerdo con la divulgación (es decir, una que comprende, entre otros, un replicón de ARN adsorbido a partículas cargadas positivamente). La suspensión resultante que contiene partículas puede retirarse del recipiente y administrarse a un sujeto.

### 5 C. Experimental

A continuación, se muestran ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente divulgación. Ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación de ninguna manera.

10 Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se deben permitir algunos errores y desviaciones experimentales.

#### Ejemplo 1. Síntesis de ARN

15 El ADN de plásmido que codifica los replicones de alfavirus sirvió como plantilla para la síntesis de ARN *in vitro*. El plásmido que codifica para pT7-mVEEV-FL.RSVF (A317) se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1); el plásmido que codifica pT7-mVEEV-FASE (A306) se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2); y el plásmido que codifica para el ARN autorreplicante de VEE/SIN que contiene RSV-F de longitud completa y a el promotor SP6 (A4) se muestra en la Figura 3 (SEQ ID NO: 3). Los replicones contienen los elementos genéticos necesarios para la replicación del ARN, pero carecen de los que codifican para los productos genéticos necesarios para el ensamblado de partículas; Los genes estructurales del genoma del alfavirus se reemplazan por secuencias que codifican para una proteína heteróloga. Después de la entrega de los replicones a las células eucariotas, el ARN de cadena positiva se traduce para producir cuatro proteínas no estructurales, que juntas replican el ARN genómico y transcriben ARNm subgenómico de manera abundante codificando para el producto génico heterólogo. Debido a la falta de expresión de las proteínas estructurales del alfavirus, los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. El promotor de bacteriófagos (T7 ó SP6) río arriba del ADNc del alfavirus facilita la síntesis del ARN replicón *in vitro* y la ribozima del virus de la hepatitis delta (VHD) inmediatamente río abajo de la cola poli (A) genera el extremo 3' correcto a través de su actividad de autoescisión.

30 Posterior a la linealización del ADN plasmídico río abajo de la ribozima VHD con una endonucleasa de restricción apropiada, se sintetizaron transcripciones de escorrentía *in vitro* utilizando UNA ARN polimerasa 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 (de ARN polimerasa T7) o 5 mM (de ARN polimerasa SP6) de cada uno de los nucleósidos trifosfato (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion, Austin, TX). Después de la transcripción, la plantilla de ADN fue direccionada con DNasa TURBO (Ambion, Austin, TX). El replicón de ARN se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. Para generar ARN 35 bloqueados, las reacciones de transcripción *in vitro* se complementaron con 6 mM (de ARN polimerasa T7) o 4 mM (de ARN polimerasa SP6) análogos de la estructura de la cubierta de ARN (New England Biolabs, Beverly, MA) mientras que disminuía la concentración de GTP a 1,5 mM (ARN polimerasa T7) o 1 mM (ARN polimerasa SP6). Alternativamente, el ARN sin tapa se cubrió postranscripcionalmente con Vaccinia Capping Enzyme (VCE) utilizando el ScriptCap m7G Capping System (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) como se describe en el manual del usuario. El ARN cubierto postranscripcionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiéndolas a una densidad óptica a 40 260 nm. La integridad de las transcripciones *in vitro* se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa desnaturizante.

#### Ejemplo 2. Formación de liposomas de DOTAP.

45 Para la formación de liposomas de DOTAP, se disolvieron 24 mg de DOTAP (Lipoid, Ludwigshafen Alemania) en 10 ml de diclorometano y se agregaron a 40 ml de agua con PVA al 0,25 % p/v. La mezcla se homogeneizó utilizando el homogeneizador Omni Macro (Omni International) a 12,900 rpm durante 10 minutos. La emulsión resultante se agitó a 1000 rpm durante 2 horas en una campana de ventilación para evaporar el diclorometano. Se dializaron 10 ml de liposomas contra 2L de agua durante la noche a temperatura ambiente utilizando 50 membranas de corte de peso molecular de 100 kDa (Spectrum Laboratories, EE.UU). Los liposomas dializados se almacenaron a 2-8 °C.

#### Ejemplo 3. Formación de micropartículas de PLG.

55 Para la formación de micropartículas de PLG, 0 mg (0 % p/p), 6 mg (1 % p/p), 24 mg (4 % p/p) o 60 mg (10 % p/p) de DOTAP se disolvieron junto con 600 mg de RG503 PLG (Boehringer Ingelheim, EE.UU) En 10 ml de diclorometano y se añadió a 40 ml de agua con 0,25 % p/v de PVA. La mezcla se homogeneizó utilizando un homogeneizador Omni Macro (Omni International) a 12,900 rpm durante 10 minutos. La emulsión resultante se agitó a 1000 rpm durante 2 horas en una campana de ventilación para evaporar el diclorometano. Se dializaron 10 ml de micropartículas de PLG contra 2L de agua durante la noche a temperatura ambiente utilizando

membranas de corte de peso molecular de 100 kDa (Spectrum Laboratories, EE.UU). Las micropartículas de PLG dializadas se almacenaron a 2-8 °C.

Para la evaluación de diferentes tensioactivos catiónicos, se utilizaron 24 mg de DDA (Avanti Polar Lipids, EE.UU. ó DC-Colesterol (Avanti Polar Lipids, EE.UU) En lugar de DOTAP como se describe para la formulación anterior del 4 % p/p.

#### **Ejemplo 4. Adsorción de ARN a Micropartículas y Liposomas.**

Para la adsorción de ARN en el Ejemplo 10 a continuación, se agregaron gota a gota 100 µl de 100 µg/ml de ARN A306 (Ejemplo 1, Figura 2, SEQ ID NO: 2) a 1,4 ml (1 % p/p), 350 µL (4 % p/p), o 140 µL (10 % p/p) de micropartículas de PLG. En el caso del 0 % p/p de micropartículas de PLG, se preincubaron 350 µl de micropartículas de PLG con 350 µl de liposomas de DOTAP (véase el Ejemplo 2 anterior) durante 30 minutos, seguido por la adición de ARN. La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. A cada vial, se le agregaron 300 µl de manitol al 15 % p/v y 100 µl de sacarosa al 15 % p/v, y la muestra se liofilizó durante la noche utilizando un liofilizador de mesa (LabConco, EE.UU). Los viales liofilizados se almacenaron a 2-8 °C.

La proporción N:P (nitrógeno a fosfato) se calcula de la siguiente forma: el nitrógeno protonado en el tensioactivo catiónico (es decir, DOTAP, DDA ó DC-Colesterol) y los fosfatos en el ARN se utilizan para este cálculo. Se asumió que cada 1 µg de molécula de ARN autorreplicante contenía 3 nanomoles de fosfato aniónico, se asumió que cada microgramo de DOTAP contenía 1,4 nanomoles de nitrógeno catiónico, y se asumió que cada microgramo de DDA contenía 1,6 nanomoles de nitrógeno catiónico y se asumió que cada microgramo de DC-Colesterol contenía 1,9 nanomoles de nitrógeno catiónico.

Según el PLG recuperado, en el Ejemplo 13, se adsorbieron 12 µg de ARN A4 (Ejemplo 1, Figura 3, SEQ ID NO: 3) a micropartículas de PLG en diferentes proporciones N:P utilizando 470 µL (N:P = 10:1) , 187 µl (N:P = 4:1) ó 12 µl (N:P = 1:4) de 4 % p/p de PLG/DOTAP; utilizando 346 µl (N:P = 10:1), 138 µl (N:P = 4:1) o 9 µl (N:P = 1:4) de 4 % p/p de PLG/DDA; y utilizando 335 µl (N:P = 10:1), 134 µl (N:P = 4:1) u 8 µl (N: P = 1: 4) de 4 % p/p de PLG/DC-Colesterol. Las formulaciones se liofilizaron como se describió anteriormente.

Para la adsorción de ARN en una proporción N:P de 10:1 utilizando liposomas de DOTAP como en el Ejemplo 10, se agregaron gota a gota 100 µl de 100 µg/ml de ARN a 350 µl de liposomas de DOTAP (véase el Ejemplo 2 anterior). La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. A cada vial, se le agregaron 300 µl de manitol al 15 % p/v y 100 µl de sacarosa al 15 % p/v, y la muestra se liofilizó durante la noche utilizando un liofilizador de mesa (LabConco,EE.UU). Los viales liofilizados se almacenaron a 2-8 °C.

#### **Ejemplo 5. Formación de Nanopartículas de PLG.**

Se formaron nanopartículas de PLG cargadas positivamente que contenían un polímero biodegradable y un agente tensioactivo catiónico utilizando el procedimiento de extracción con solvente. Específicamente, se disolvieron 500 mg de RG503 PLG y 5 mg (1 % p/p) o 20 mg (4 % p/p) de DOTAP en 50 ml de acetona (Tipo I). Para nanopartículas de PLG basadas en acetato de etilo (Tipo II), se disolvieron 500 mg de RG503 PLG y 20 mg (4 % p/p) de DOTAP en 50 ml de acetato de etilo. La solución de PLG/DOTAP se añadió gota a gota a 50 ml de agua con un homogeneizador utilizando Omni Macro Homogenizer (Omni International) a 1000 rpm. Después de completar la adición, la velocidad de homogeneización se incrementó a 6000 rpm durante 30 segundos. La suspensión de partículas se agitó a 150 rpm durante la noche en un agitador orbital DS-500 (VWR International, EE.UU) para evaporar la acetona o el acetato de etilo. La suspensión de partículas se filtró utilizando un filtro de células estériles de 40 µm (BD Biosciences, EE.UU) para eliminar los agregados grandes.

Se prepararon dos lotes de nanopartículas de PLG/DOTAP al 4 % p/p utilizando el procedimiento descrito anteriormente con solvente de acetona. Cada lote se caracterizó por el tamaño de partícula y el potencial zeta como se describe en el Ejemplo 7, a continuación. El Lote #1 (utilizado en el Ejemplo 10) y el Lote #2 (utilizado en el Ejemplo 11) tenían tamaños de partícula Z promedio de 220 y 194 nm, respectivamente, y potenciales zeta de +57,7 y +66,8 mV, respectivamente.

#### **Ejemplo 6. Adsorción de ARN a Nanopartículas**

Basado en la recuperación de nanopartículas de PLG, para la adsorción de ARN en los Ejemplos 10 y 11 a una proporción N:P de 10:1, se agregaron gota a gota 100 µl de 100 µg/ml de ARN a 3,2 ml (1 % p/p) u 800 µl (4 % p/p) de nanopartículas de PLG del Ejemplo 5. Para cada vial, se añadieron 300 µl de 15 % p/v de manitol, 100 µl, 15 % p/v de sacarosa y 25 µl (1 % p/p) o 6 µl (4 % p/p) de PVA al 4 % p/v, y la muestra se liofilizó durante la noche utilizando un liofilizador de mesa (LabConco, EE. UU.). Los excipientes corresponden al 4,5 % p/v de manitol y 1,5 % p/v de sacarosa en el volumen de reconstitución final, y 10 % p/p de PVA. Los viales liofilizados se almacenaron a 2-8 °C.

#### **Ejemplo 7. Medición del tamaño de partícula y del potencial Zeta.**

El tamaño de partícula de los liposomas y de las nanopartículas de DOTAP se midió utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los tamaños de partícula se reportaron como Z-Promedio (ZProm), junto con el índice de polidispersión (pdi). Todas las muestras se diluyeron 50 veces en agua antes de las mediciones.

- 5 El tamaño de partícula de las micropartículas se midió usando un medidor de partículas Horiba LA-930 (Horiba Scientific, EE. UU.). Las muestras de micropartículas se diluyeron 200 veces antes de las mediciones. El tamaño de partícula se indica como D (v, 0,5) (designado como "D50" en la Tabla 2, que se muestra a continuación) y D (v, 0,9) (designado como "D90" en la Tabla 2, que se muestra a continuación).

- 10 El potencial Zeta para micropartículas y para nanopartículas se midió utilizando Zetasizer Nano ZS utilizando muestras diluidas 50 veces de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Ejemplo 8. Electroforesis en Gel.

- 15 La electroforesis en gel desnaturalizante se realizó para evaluar la integridad del ARN después del proceso de formulación y para evaluar la protección de la ARNasa del ARN adsorbido. El gel se moldeó de la siguiente manera: se agregaron 0,4 g de agarosa (Bio-Rad, Hercules, CA) a 36 ml de agua tratada con DEPC y se calentó en un microondas hasta que se disolvió y posteriormente se enfrió hasta que solamente estuvo caliente. Posteriormente se agregaron 4 ml de un regulador de gel desnaturalizante 10x (Ambion, Austin, TX) a la solución de agarosa. El gel se vertió y se dejó reposar durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, el gel se colocó en un tanque de gel, y se agregó 1x de regulador Northernmax (Ambion, Austin, TX) para cubrir el gel por unos pocos milímetros.

### 20 Ejemplo 9. Ensayo de Protección de ARNasa

- Se realizó un ensayo de protección de ARNasa para micropartículas y para nanopartículas con ARN A4 adsorbido (Ejemplo 1, Figura 3, SEQ ID NO: 3) y ARN A306 (Ejemplo 1, Figura 2, SEQ ID NO: 2), respectivamente. La digestión con ARNasa se logró mediante la incubación de micropartículas de PLG del Ejemplo 4 (utilizadas en el Ejemplo 13) y las nanopartículas de PLG del Ejemplo 6 (utilizadas en el Ejemplo 11) con 3,8 mAU de ARNasa A por microgramo de ARN (Ambion, Hercules y CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La ARNasa se inactivó con proteasa K (Novagen, Darmstadt, Alemania) incubando la muestra a 55 °C durante 10 minutos. Después de la inactivación de la ARNasa, se agregaron 1000 µg de sulfato de heparina por microgramo de ARN para desorber el ARN de las partículas de PLG a la fase acuosa. Como control para cada muestra, el ARN se desorbió de las partículas de PLG no tratadas utilizando 1000 µg de sulfato de heparina por µg de ARN para determinar la integridad del ARN adsorbido. Las muestras se mezclaron mediante agitación con vórtex durante unos segundos y luego se colocaron en una centrífuga durante 15 minutos a 12000 rpm.

Para determinar la eficacia de adsorción de ARN, las partículas de PLG sin ningún tratamiento se centrifugaron durante 15 minutos a 12000 rpm.

En todos los casos, el sobrenadante se eliminó y se utilizó para analizar el ARN.

- 35 Antes de la carga (400 ng de ARN por pozo) (cantidad teórica suponiendo que todo el ARN está adsorbido y todo está desorbido), todas las muestras se incubaron con colorante de carga con formaldehído, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65°C y se enfriaron a temperatura ambiente. Se utilizaron los marcadores Ambion Millennium para aproximar el peso molecular del constructo de ARN. El gel se corrió a 90 V. El gel se tiñó con 0,1 % de SYBR Gold de acuerdo con las pautas del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) en agua oscilando a temperatura ambiente durante 1 hora. Las imágenes de gel se tomaron en un sistema de imágenes Bio-Rad Chemidoc XRS (Hercules, CA). Se muestran los geles de ensayo de protección de ARNasa para nanopartículas y micropartículas de PLG, en las Figuras 4 y 5, respectivamente. En la Figura 4, las nanopartículas de PLG se evaluaron a una proporción de N:P de 10:1. En la Figura 5, las micropartículas se evaluaron a proporciones de N:P de 10:1, 4:1 y 1:4.

- 45 Los resultados en la Figura 4 muestran que el ARN está completamente adsorbido a las nanopartículas de PLG (Tipo I) y permanece intacto como se muestra por desorción usando sulfato de heparina y que las nanopartículas de PLG (Tipo I) protegen el ARN adsorbido de la degradación por ARNasa. Se observó que el ARN estaba completamente adsorbido a las nanopartículas de PLG (Tipo II), pero no se desorbía completamente de las nanopartículas de PLG utilizando sulfato de heparina, lo que sugiere una mayor adsorción de ARN a las nanopartículas de Tipo II. Estos resultados demuestran que las nanopartículas de PLG (Tipo I) adsorben el ARN y protegen al ARN de la degradación por ARNasas.

- 55 La Figura 5 muestra que el ARN está completamente adsorbido a micropartículas de PLG en N:P a 10:1, parcialmente adsorbido en N:P a 4:1 y casi completamente sin adsorber en N:P a 1:4. Tras la desorción de ARN de micropartículas de PLG, se muestra que el ARN está intacto en todas las proporciones de N:P. El ARN adsorbido a las micropartículas de PLG en N:P a 10:1 y 4:1 mostró protección cuando se trató con ARNasa, mientras que el ARN adsorbido a las micropartículas de PLG en N:P a 1:4 fue digerido por ARNasa. Estos

resultados demuestran que la adsorción de ARN a micropartículas de PLG es necesaria para proporcionar protección contra la degradación por ARNasa.

#### **Ejemplo 10. Ensayo 1 de la Fosfatasa Alcalina secretada (FASE).**

5 Para evaluar la cinética y la cantidad de producción de antígeno in vivo, 1 µg (microgramo) de un replicón de ARN que expresa fosfatasa alcalina secretada (FASE) (Ejemplo 1, SEQ ID NO: 2, también denominado "A306" o "vA306") se administró con y sin formulación a ratones mediante inyección intramuscular. Se inmunizaron grupos de 5 ratones hembras BALB/c de 8 a 10 semanas que pesaban aproximadamente 20 gramos.

10 Como control positivo, un grupo fue inyectado con partículas del replicón viral (PRV) a una dosis de  $5 \times 10^5$  unidades infecciosas (UI) (véase el Ejemplo 12) (designado "5x10<sup>5</sup> UI FASE PRV" en las Figuras 6A-6B y "PRV" en la Tabla 1).

En otro grupo, el ARN autorreplicante desnudo se administró en PBS IX libre de ARNasa (designado "vA306" en las Figuras 6A-6B y "ARN A306 desnudo" en la Tabla 1).

15 En otro grupo, el ARN autorreplicante se adsorbió a los liposomas DOTAP preparados como se describe en el Ejemplo 4 con una relación N: P de 10: 1 (designada como "1µg vA306 + DOTAP Liposomas" en las figuras 6A-6B y "Liposomas DOTAP" en las Tablas 1 y 2).

Para evaluar el efecto de las micropartículas de PLG administradas juntamente con liposomas de DOTAP, los liposomas de DOTAP se incubaron previamente con 0 % p/p de micropartículas de PLG (sin DOTAP) seguido de la adición de ARN como se describe en el Ejemplo 4 (designado "0 % de PLG Liposomas MP + DOTAP" en la Tabla 1 y "0 % PLG MP" en la Tabla 2).

20 En otros grupos, se utilizaron micropartículas de PLG que contenían DOTAP en diferentes proporciones en peso con respecto a PLG, específicamente, 1 %, 4 % y 10 % p/p. También se utilizaron nanopartículas de PLG que contenían DOTAP en proporciones en peso a PLG de 1 % y 4 % p/p.

25 En particular, los grupos de ratones a los se les inyectó lo siguiente: (1) ARN autorreplicante adsorbido en micropartículas de PLG/DOTAP al 1 % p/p preparadas como se describe en el Ejemplo 4 con una proporción N:P de 10:1 (designado "1 % PLG MP" en las Tablas 1 y 2); (2) ARN autorreplicante adsorbido al 4 % p/p de micropartículas PLG/DOTAP preparadas como se describe en el Ejemplo 4 con una proporción N:P de 10:1 (designada como "1µg vA306 + PLG 4 % DOTAP MP" en las Figuras 6A y 6B y "4 % PLG MP" en las Tablas 1 y 2); (3) ARN autorreplicante adsorbido a 10 % p/p de micropartículas de PLG/DOTAP preparadas como se describe en el Ejemplo 4 con una proporción N:P de 10:1 (designada "10 % de PLG MP" en las Tablas 1 y 2); (4) ARN adsorbido a 1 % p/p de nanopartículas de PLG/DOTAP preparadas como se describe en el Ejemplo 6 con una proporción N:P de 10:1 utilizando acetona como solvente (designado "1 % de PLG NP" en las Tablas 1 y 2); y (5) ARN adsorbido a 4 % p/p de nanopartículas de PLG/DOTAP preparadas como se describe en el Ejemplo 6 con una proporción N:P de 10:1 utilizando acetona como solvente (designado "terminal vA306 + PLG 4 % DOTAP NP" en las Figuras 6A y 6B y "4 % PLG NP" en las Tablas 1 y 2).

35 Se administró una dosis de 100 µl a cada ratón (50 µl por sitio) en el músculo cuádriceps. Se tomaron muestras de sangre 1, 3 y 6 días después de la inyección. El suero se separó de la sangre inmediatamente después de la recolección y se almacenó a -30 °C hasta su uso.

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

50 Los resultados se muestran en las Figuras 6A y 6B y en la Tabla 1. Como se observa en estos datos, los niveles séricos de FASE aumentaron cuando el ARN se adsorbió a las nanopartículas de PLG en relación con el control de ARN desnudo y las micropartículas de PLG. La expresión de FASE en el día 6 aumentó cuando el ARN se adsorbió a las nanopartículas de PLG en relación con el control de PRV, pero la cinética de la expresión fue muy diferente.

Tabla 1.

Grupo	Dosis	Día 1	Día 3	Día 6
PRV	5x10 <sup>5</sup> UI	105,829	38,546	56,155
ARN desnudo A306	1	1,212	6,007	95,380
1 % PLG MP	1	1,103	10,083	109,168
4 % PLG MP	1	950	5,208	46,920
10 % PLG MP	1	1,222	6,775	137,121
Liposomas de DOTAP	1	1,131	11,800	206,007
0 % PLG MP + Liposomas de DOTAP	1	1,179	4,740	35,194
1 % PLG NP	1	990	4,117	64,765
4 % PLG NP	1	1,528	49,233	600,080

El tamaño de las partículas y el potencial zeta para varias de las formulaciones también se midieron como se describe en el Ejemplo 7 y los resultados se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2.

Grupo	ZProm para nanopartículas (nm)	D50/D90 (µm) (para micropartículas)	PDI (para nanopartículas)	Potencial Zeta (mV)
0 % PLG MP	N/A	0,74/1,84	N/A	N/A
1 % PLG MP	N/A	0,60/0,92	N/A	48,9
4 % PLG MP	N/A	0,87/3,11	N/A	62,2
10 % PLG MP	N/A	0,77/2,66	N/A	66,2
Liposomas de DOTAP	179,2		0,203	43,8
1 % PLG NP	297,6		0,201	26,4
4 % PLG NP	244,5		0,127	57,7

Como puede observarse en los datos anteriores, el proceso de formulación produjo nanopartículas de PLG con un tamaño de partícula promedio típico de ~200 nm y micropartículas de PLG con un tamaño de partícula medio de ~1 µm.

#### 10 Ejemplo 11. Ensayo 2 de la Fosfatasa Alcalina secretada (FASE).

Como se muestra en el Ejemplo 9, se administró 1 µg (microgramo) de un replicón de ARN que expresa fosfatasa alcalina secretada (SEAP) con y sin formulación a ratones mediante una inyección intramuscular. Se inmunizaron grupos de 5 ratones hembras BALB/c de 8 a 10 semanas que pesaban aproximadamente 20 gramos.

15 Como control, se inyectó a un grupo de ratones con ARN autorreplicante desnudo en PBS IX sin ARNasa (denominado "ARN A306 desnudo" en la Tabla 3). En otros grupos, las formulaciones contenían ARN adsorbido a las nanopartículas de PLG con DOTAP en una proporción en peso a PLG de 4 % p/p (véase Ejemplo 6). Las

nanopartículas de PLG que se evaluaron en este estudio se sintetizaron utilizando acetona (Tipo I) o acetato de etilo (Tipo II) como solvente orgánico. El ARN se adsorbió en todas las formulaciones evaluadas a N:P de 10:1.

- 5 Se administró una dosis de 100  $\mu$ l a cada ratón (50  $\mu$ l por sitio) en el músculo cuádriceps. Se tomaron muestras de sangre 1, 3 y 6 días después de la inyección. El suero fue separado de la sangre inmediatamente después de la recolección y se almacenó a -30 °C hasta su uso. Para analizar el suero se usó un sistema Phospha-Light SEAPE (Applied Biosystems, Bedford, MA) quimioluminiscente para analizar el suero. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 7.

**Tabla 3.**

Grupo	Dosis ( $\mu$ g)	Día 1	Día 3	Día 6
ARN desnudo A306	1	1,164	6,435	41,668
4 % PLG NP Tipo I	1	998	9,423	108,888
4 % PLG NP Tipo II	1	1,206	2,091	3,069

- 10 Como se puede observar en la Tabla 3 y en la Figura 7, los niveles de FASE en suero aumentaron cuando el ARN se adsorbió a las nanopartículas de PLG de Tipo I en relación con el control de ARN desnudo y las nanopartículas de PLG de Tipo II.

El tamaño de partícula y el potencial zeta para las formulaciones de nanopartículas también se midieron como se describe en el Ejemplo 7 y los resultados se muestran en la Tabla 4.

15

**Tabla 4.**

Grupo	Zprom para nanopartículas (nm)	PDI (para nanopartículas)	Potencial Zeta (mV)
PLG Tipo I (acetona)	215,5	0,121	66,8
PLG Tipo II (acetato de etilo)	547,8	0,527	41,0

- 20 Como se observa en la Tabla 4, el proceso de formulación produjo nanopartículas de PLG (sintetizadas utilizando acetona) con un tamaño de partícula de 200 nm (Tipo I). Las nanopartículas de PLG sintetizadas utilizando acetato de etilo tenían un tamaño de partícula inicial de 200 nm preliofilización, pero se agregaban a un tamaño de partícula de 600 nm después de la adsorción y de la liofilización de ARN (Tipo II).

#### **Ejemplo 12. Partículas de replicones virales (PRV)**

- 25 Para comparar las vacunas de ARN con las metodologías tradicionales de vectores de ARN para lograr la expresión *in vivo* de genes o antígenos reporteros, se utilizaron partículas de replicón viral (PRV) producidas en células BHK mediante los procedimientos descritos por Perri et al., "An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector" *J Virol* 77: 10394-10403 (2003). En este sistema, los replicones del antígeno (o gen reportero) consistían en replicones quiméricos de alfavirus (PRV) derivados del genoma del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) diseñados para contener las secuencias del extremo 3' (3'UTR) del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento del virus Sindbis (ES) (véase la Figura 2 de Perri et al). Estos replicones se empaquetaron en PRVs al co-electroporarlos en células de riñón de hámster cachorro junto con los ARN auxiliares defectuosos que codifican para los genes de la cápside y la glicoproteína del virus Sindbis (véase la Figura 2 de Perri et al). Los PRV se colectaron y se valoraron por procedimientos estándar y se inocularon en animales en un fluido de cultivo u en otros tampones isotónicos.

#### **Ejemplo 13. Estudios de inmunogenicidad murina.**

- 35 El replicón A4 que expresa la glicoproteína de fusión superficial del virus sincitial respiratorio (RSV-F) se utilizó para este experimento (Ejemplo 1, SEQ ID NO: 3) también denominado "A4". Los ratones BALB/c, 10 animales por grupo, se les administraron vacunas bilaterales intramusculares (50  $\mu$ l por pierna) en los días 0 y 14 con lo siguiente: (1) ARN autorreplicante desnudo (A4, 1  $\mu$ g y 10  $\mu$ g), y (2) Formulaciones de micropartículas de PLG (1

µg de ARN/dosis) preparadas utilizando partículas sintetizadas utilizando DOTAP, DDA o DC-Colesterol en una proporción en peso a PLG de 4 % p/p (véase el Ejemplo 3), seguido por la adsorción de ARN A4 a estas micropartículas de PLG en proporciones N:P de 10:1, 4:1 y 1:4 (véase el Ejemplo 4). El suero se recogió para el análisis de anticuerpos en los días 13 (2wp1) y 28 (2wp2).

- 5 Las muestras de suero individuales se analizaron para determinar la presencia de IgG específica de RSV F mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Las placas de ELISA (MaxiSorp 96-pozos, Nunc) se recubrieron durante la noche a 4°C con 1 µg/ml de RSV F purificado (delp23-furdel-trunc no escindido) en PBS. Después del lavado (PBS con Tween-20 al 0,1 %), las placas se bloquearon con el regulador Superblock Blocking en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1,5 horas a 37 °C. Posteriormente, cuando se lavaron las placas, se añadieron diluciones seriadas de suero en el diluyente del ensayo (PBS con Tween-20 al 0,1 % y suero de cabra al 5 %) de ratas control y de ratas experimentales, y las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Después del lavado, las placas se incubaron con IgG de rata de algodón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Immunology Consultants Laboratory, Inc, diluida 1:5000 en diluyente de ensayo) durante 1 hora a 37 ° C. Finalmente, las placas se lavaron y se agregaron a cada pozo 100 µl de solución de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de H3PO4 1 M y se leyó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas. Para cada muestra de suero, se generó una gráfica de la densidad óptica (DO) frente al logaritmo de la dilución recíproca del suero mediante una regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos se definieron como la dilución de suero recíproco a una DO de aproximadamente 0,5 (sueros agrupados normalizados al estándar de ratas de algodón infectadas con RSV con un título definido de 1:2500 que se incluyó en cada placa).
- 10
- 15
- 20

Los títulos de IgG en suero específicos a F de los días 13 y 28 para ratones inmunizados con ARN desnudo y ARN adsorbido a micropartículas de PLG que contienen DOTAP, DDA y colesterol DC en proporciones N:P de 10:1, 4:1 y 1:4 se observan en la figura 7A. Los títulos de IgG en suero normalizados a los títulos de 1 µg de ARN desnudo en el día 28 se muestran en la figura 7B.

- 25 Las micropartículas de PLG mostraron un aumento de 1 a 4 veces en los títulos de IgG específicos a F sobre el ARN desnudo. Los resultados demuestran que las formulaciones de PLG se pueden utilizar para administrar ARN autorreplicante en proporciones N:P que varían de 1:4 a 10:1.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende (a) nanopartículas cargadas positivamente que comprenden un polímero biodegradable y un tensioactivo catiónico, en la que el polímero biodegradable es un poli ( $\alpha$ -hidroxiácido) y las nanopartículas tienen un valor promedio de Z del tamaño de partícula promedio entre 50 y 500 nanómetros; (b) un replicón de ARN que comprende al menos un polinucleótido que codifica al menos para un antígeno adsorbido en dichas nanopartículas cargadas positivamente; y (c) un tensioactivo no iónico.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que la composición comprende del 1 % al 10 % (p/p) de un tensioactivo catiónico en relación con el polímero.
- 10 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que las nanopartículas tienen un valor de tamaño de partícula medio Z entre 100 y 500 nanómetros, o entre 250 y 500 nanómetros.
4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las nanopartículas tienen un potencial zeta que es mayor que +20 mV, por ejemplo, que van desde +20 mV a +25 mV a +30 mV a +35 mV a + 40 mV a +45 mV a +50 mV a +55 mV a +60 mV o más.
- 15 5. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polímero biodegradable es:
- (i) una poli(lactida-co-glicolida); y/o (ii) una poli(lactida-co-glicolida) que tiene una proporción molar de lactida:glicolida que varía de 40:60 a 60:40.
- 20 6. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que: (i) el tensioactivo catiónico se selecciona de sal de (1,2-dioleoiloxipropilo)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), sal de dimetil dioctadecilamonio (DDA) y 3-beta-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil] colesterol (DC-Col); y/o (ii) el tensioactivo catiónico comprende un grupo amonio y una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada que tiene entre 12 y 20 átomos de carbono.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho tensioactivo no iónico es un poli(alcohol vinílico).
- 25 8. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición comprende, además, al menos un componente adicional seleccionado de polioles, carbohidratos y combinaciones de los mismos, por ejemplo en el que dicho al menos un componente adicional comprende (i) un poliol y un carbohidrato; o (ii) un alditol y un sacárido.
- 30 9. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho replicón de ARN es un replicón de alfavirus, opcionalmente en el que el replicón de alfavirus se deriva de un alfavirus seleccionado del grupo que consiste en: Sindbis (SIN), encefalitis equina venezolana (VEE), Virus de Semliki Forest (SFV) y combinaciones de los mismos.
10. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el al menos un antígeno se selecciona de un antígeno vírico, un antígeno bacteriano y un antígeno tumoral.
- 35 11. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el al menos un antígeno es seleccionado de un virus de la gripe, un virus sincicial respiratorio (RSV), un virus de parainfluenza (PIV), el virus de la hepatitis B (HBV), un virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple (VHS) y el virus del papiloma humano (VPH), fiebre amarilla, gripe pandémica, tuberculosis, dengue, norovirus, sarampión, rinovirus, virus del Nilo occidental, polio, hepatitis A y
- 40 citomegalovirus (CMV).
12. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que además muestra un adyuvante inmunológico, opcionalmente en el que: (i) el adyuvante inmunológico se selecciona de pequeños potenciadores inmunitarios de molécula, ligandos de receptores similares a Toll y oligonucleótidos inmunoestimulantes; y/o (ii) el adyuvante inmunológico está adsorbido o atrapado dentro de nanopartículas que pueden ser iguales o diferentes de las nanopartículas cargadas positivamente que comprenden al replicón de ARN adsorbido.
- 45 13. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que: (i) la composición inmunogénica es una composición inyectable; y/o (ii) la composición inmunogénica está liofilizada.
- 50 14. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en un procedimiento para estimular una respuesta inmune en un animal huésped vertebrado que comprende la administración al animal de dicha composición inmunogénica.
15. Un procedimiento para conformar la composición inmunogénica definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende: (a) combinar (i) un primer líquido que comprende un polímero

- 5 biodegradable de poli( $\alpha$ -hidroxiácido) y un tensioactivo catiónico, disuelto en un solvente orgánico con (ii) un segundo líquido que comprende agua, tras lo cual se forma una primera suspensión de nanopartículas que comprende al polímero biodegradable y al tensioactivo catiónico, (b) adsorber un replicón de ARN que comprende al menos un polinucleótido que codifica al menos un antígeno a las nanopartículas en la primera suspensión para formar una segunda suspensión, (c) agregar al menos un componente adicional que comprende un tensioactivo no iónico a la segunda suspensión para formar una tercera suspensión, opcionalmente en el que al menos un componente adicional se selecciona entre polioles, carbohidratos y combinaciones de los mismos, y (d) liofilizar la tercera suspensión.

## Figura 1A

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTT  
 GACATCGAGGAAGACAGCCATTCCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGT  
 AGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTT  
 CAAAACCTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCC  
 GCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGA  
 TCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATA  
 AGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCCGTTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAACT  
 GAGACTATGTGCCCTCCACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTACCA  
 GGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAG  
 TCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTAAGAACTTGGCTGGAGCATAT  
 CCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATG  
 CAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGA  
 AACCATCCAACAATGTTCTATTCTGTGTTGGCTCGACCATCTACCAAGAGAAGAGGGACTTA  
 CTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAAATTACACATGTCG  
 GTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCC  
 TGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGGAGGGATTCTTGTGCTGCAA  
 GTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTAC  
 ATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGGGACGACGCGCAAAAAC  
 TGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTGCACCCAGAGAAAACCAATAACC  
 ATGAAAAATTACCTTTGCCCAGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAA  
 GGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTT  
 GTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATC  
 ATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGA  
 GATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCA  
 TTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA  
 GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGA  
 AGCCGATGTAGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCT  
 TGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG  
 CAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGTGAACAAGTCATAGT  
 GATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACATGGTAAAGTAGTGG  
 TGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT  
 GTGTACAACGAACGTGAGTTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGC  
 GCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACCTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATAAC  
 TGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCCTCAAGAA

## Figura 1B

AGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCCG  
 CCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTAT  
 GGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGT  
 GGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACGTGTCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGC  
 TGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAAACCCCGTAGAG  
 ACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGTCTGTATGCAGGTAATCTCAGAGCGCTCATAGCCAT  
 TATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTTAACATGA  
 TGTGCCTGAAAGTGCATTTTAAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCT  
 CGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAG  
 AACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGC  
 AGGACGATCTCATTCTCACTTGTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAA  
 GGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGT  
 TCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAATGTGAACGTCTTAC  
 TGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAAACA  
 CTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGA  
 TGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAA  
 ACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACT  
 GAACAATGGAACACTGTGGATTATTTGAAACGGACAAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATT  
 GAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCA  
 CTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCGTCGCCTAACATGTACGGG  
 CTGAATAAAGAAGTGGTCCGTGAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAATGCCTCGGGCAGTTGC  
 CACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACC  
 TAGTACCTGTAACAGAAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCTCCACCATAATGAACACCCACAG  
 AGTGACTTTTCTTATTTCGTGAGCAATGAAAGGGCAGAACTGTCTGGTGGTTCGGGGAAAA  
 GTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTGACACCGCCTGAGGCTACCTTCAGAG  
 CTGCGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTG  
 AGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCAT  
 GTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTGAGCATAGGTTATG  
 GTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGTCTATAGCGCGCAGTTCAAGTTTTCC  
 CGGGTATGCAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTATTGGGTA  
 CGATCGCAAGGCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATA  
 CAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGGATATT  
 GCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGG  
 GGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCTCGGAA

## Figura 1C

AGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACA  
 TATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTCAACAAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGT  
 TGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCG  
 ATTCCACTGTTGTCCACCCGGCATCTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAA  
 CCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGA  
 AATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATA  
 TCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTC  
 TTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGA  
 CCAAGTTTCACCAGGCGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACG  
 GAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAA  
 ATGCCCCGTGCAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCC  
 ATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTAAGTGTG  
 TGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCA  
 GCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGAAA  
 CACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCT  
 GAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCAT  
 CGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGC  
 AAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCCCTCAT  
 GCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGAC  
 CAGCGGGGCAACGTGAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGC  
 GACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAAGA  
 ACACCGTCACTTGACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCGCCAGG  
 CGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCA  
 GGTCCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGA  
 GAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTT  
 TTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTAACAACAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCG  
 AAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGAGATTTCTGTATGCCCCGCGCTCGACCAAGAAAAA  
 GAAGAATTAACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCA  
 GTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGC  
 ATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCTTTGTAT  
 TCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGAGTGAAGCCTGTAACGCCAT  
 GTTGAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCTATT  
 TGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCTGCAAAGCTG  
 CGCAGCTTTCAAAGAAACACTCCTATTTGGAAC

## Figura 1D

CCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCTGGCAGCT  
 GCCACAAAAAGAAATTGCAATGTACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTTCGGCGGC  
 CTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAG  
 AAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTTAAAAGGACCA  
 AAAGCTGCTGCTCTTTTTCGGAAGACACATAAATTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGA  
 CAGGTTTGTAAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGAATCCAGGAACAAAAATACTGAAG  
 AACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGA  
 ATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTT  
 TGATATGTCCGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTG  
 TTCTGGAACATGACATCGCGTCTTTGATAAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCG  
 TTAATGATTCGGAAGACTTAGGTGTGGACGAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTT  
 CGGCGAAATTCATCAATACATTTGCCACTAAAATAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGA  
 AATCTGGAATGTTCCCTCACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGA  
 GTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTTCATTGGAGATGACAATATCGT  
 GAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAG  
 TCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAAGCGCCTATTTCTGTGGAGGTTTATTTTG  
 TGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTCCGCTGTGGCAGACCCCTAAAAAGGCTGTTTAAAGCT  
 TGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAG  
 AGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGG  
 TATGAAACCGTAGGAACTTCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAA  
 ATCATTACAGTACCTGAGAGGGGCCCCATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGA  
 CATAGTCTAGTCGACGCCACCATGGAACTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCAT  
 CCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCGCGAGCGCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGA  
 GCACCTGCAGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGCGGACCGGCTGGTACACCAGC  
 GTGATCACCATCGAGCTGTCCAACATCAAAGAAAACAAGTGAACCGGCACCGACGCCAAGGT  
 GAAACTGATCAAGCAGGAACTGGACAAGTACAAGAACCGCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGA  
 TGCAGAGCACCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGAAGAGAGCTGCCCGGTTTCATGAACTAC  
 ACCCTGAACAACGCCAAGAAAACCAACGTGACCCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGTTCTCT  
 GGGCTTCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATCGCCAGCGGGTGGCCGTGTCCAAGGTGCTGC  
 ACCTGGAAGGCGAGGTGAACAAGATCAAGTCCGCCCTGCTGTCCACCAACAAGGCCGTGGT  
 TCCCTGAGCAACGGCGTGAGCGTCTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGA  
 CAAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAAACAAGCAGAGCTGCAGCATCAGCAACATCGAGACCGTGA  
 TCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGTGGAAATCACCCGGGAGTTCAGCGTGAACGCC  
 GGCGTGACCACCCCGTGAGCACCTACATGCTGA

## Figura 1E

CCAACAGCGAGCTGCTGTCCCTGATCAATGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTG  
 ATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATCATCAAAGA  
 AGAGGTGCTGGCTACGTGGTGCAGCTGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGA  
 AGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACC  
 CGGACCGACCGGGGCTGGTACTGCGACAACGCGCGCAGCGTGAGCTTCTTCCCCCAAGCCGA  
 GACCTGCAAGGTGCAGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCCTGCCCT  
 CCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCATGACC  
 TCCAAGACCGACTGAGCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGG  
 CAAGACCAAGTGCAACGCCAGCAACAAGAACCAGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCT  
 GCGACTACGTGAGCAACAAGGGCGTGGACACCGTGAGCGTGGGCAACACACTGTACTACGTG  
 AATAAGCAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCC  
 CCTGGTGTTCCCAGCGCAGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAAAGAGAAGATCAACC  
 AGAGCCTGGCCTTCATCCGGAAGAGCGACGAGCTGCTGCACAATGTGAATGCCGGCAAGAGC  
 ACCACCAATATCATGATCACCAATCATCATCGTGATCATTGTGATCCTGCTGTCTCTGAT  
 TGCCGTGGGCCTGCTGCTGACTGCAAGGCCCGCAGCACCCCTGTGACCCTGTCCAAGGACC  
 AGCTGTCGGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAACCTGAAGTCTAGACGGCGCGCCACCAG  
 CGGCCGCATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCG  
 CCTTAAAAATTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTGTTTTTAATATTTT  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTC  
 GCGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCACGTCCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGCCA  
 CGTTTTAAACCAGCTCCAATTGCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTG  
 TTTTACAACGTGCTGACTGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACAT  
 CCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTT  
 GCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGG  
 TGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTC  
 TTCCCTTCCTTCTCGCCAGTTTCGCGGCTTTCGCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCC  
 TTTAGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATG  
 GTTACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACG  
 TTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTC  
 TTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC  
 AAAAAATTAACGCGAATTTTAACAAAAATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGG  
 GAAATGTGCGCGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC  
 ATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCA  
 ACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTTGCG

## Figura 1F

GCATTTTGCCTTCTCTGTTTTTGTCTCACCCAGAAAAGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA  
 TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA  
 GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCG  
 GTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCATACACTATTCTCAGAA  
 TGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG  
 AATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTGGCCAACTTACTTCTGACAACG  
 ATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCT  
 TGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC  
 CTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC  
 CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCCTTCTGCGCTCGGC  
 CCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTA  
 TCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGG  
 AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAA  
 GCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTATT  
 TTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAA  
 CGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGA  
 TCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGG  
 TTTGTTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCG  
 CAGATACCAAACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT  
 AGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA  
 AGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGC  
 TGAAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATA  
 CCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATC  
 CGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGG  
 TATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC  
 GTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCTTGGCCT  
 TTTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGT  
 ATTACCGCTTTGAGTGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTC  
 AGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCTTCTCCCGCGCGTTGGCCGA  
 TTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCA  
 ATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACTTTATGCTCCCGGCTCG  
 TATGTTGTGTGGAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATT  
 ACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCACGCGT  
 AATACGACTCACTATAG

## Figura 2A

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAAGTTCACGTT  
 GACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGT  
 AGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTT  
 CAAAACCTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAAGTGCGCC  
 GCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGA  
 TCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATA  
 AGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCCGCTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAACT  
 GAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTACCA  
 GGATGTATACCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAG  
 TCGCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATAT  
 CCATCATACTTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTAAACGGCTCGTAACATAGGCCTATG  
 CAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAAGAAGTATTTGA  
 AACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTA  
 CTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCG  
 GTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCC  
 TGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCAGGGATTCTTGTGCTGCAA  
 GTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTAC  
 ATTGTGTGACCAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTGAGTGCAGACGACGCGCAAAAC  
 TGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACC  
 ATGAAAAATTACCTTTTGCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAA  
 GGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGT  
 GTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATC  
 ATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGA  
 GATCGGGCTGAGAAACAAGAAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAAGGAGCCGTCACCTCTCA  
 TTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA  
 GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGA  
 AGCCGATGTAGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCT  
 TGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG  
 CAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGT  
 GATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGG  
 TGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAGTGCCACCATT  
 GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGC  
 GCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAC

## Figura 2B

GTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCCTCAA  
 GAAAGAAGTACTACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAAT  
 TCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTG  
 TATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAGATCT  
 AGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACGTGTCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAG  
 GGCTGGACGTCAATGCCAGAAGTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAAACCCCGTA  
 GAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTATGCAGGTAAGTCTCAGAGCGCTCATAGC  
 CATTATAAGACCTAAAAGGCAGTGTCTGCGGGATCCCAAACAGTGCCTTTTTTTAAACA  
 TGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAAACCAGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATC  
 TCTCGCGTGTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAAT  
 GAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTA  
 AGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTCAGAGGGTGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTAC  
 AAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGC  
 CGTTCCGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCC  
 TACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAA  
 ACACTGACTGCCAAGTACCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCA  
 TGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGG  
 CAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACC  
 ACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGT  
 ATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCAC  
 CCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCGTTCGCTAACATGTAC  
 GGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTACGCTCTCTCGCAGGTACCCACAAGTGCCTCGGGCAGT  
 TGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAA  
 ACCTAGTACCTGTAACAGAAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCTCCACCATAATGAACACCCA  
 CAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTGAGCAAAATGAAGGGCAGAACTGTCTGGTGGTTCGGGA  
 AAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTGAGACCGGCTGAGGCTACCTTCA  
 GAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCAAATATGACATAATATTTGTTAAT  
 GTGAGGACCCCATATAAATAACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAG  
 CATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTGAGCATAGGTT  
 ATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGTATAGCGCGGAGTTCAAGTTT  
 TCCCGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCAATGG  
 GTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTTCATCAACCTTGACCAACATTT  
 ATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATG

## Figura 2C

TGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAA  
 ATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTC  
 CCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGC  
 TAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACA  
 AACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA  
 GTAGCGATTCCACTGTGTCCACCCGCATCTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATC  
 ATTGAACCATTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGG  
 ACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATA  
 TGCATATCCGACGACTCTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAA  
 GAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGG  
 AAGGGACCAAGTTTCACCGAGCGGCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTT  
 GCAACGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAAGCATGAGCAGTATTAG  
 GTCGAAATGCCCGTCAAGAGTCCGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGT  
 GCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAT  
 ACTGTGTGCTCATCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATG  
 CTCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCG  
 TGAAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGG  
 ACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCTGAGCCGAT  
 CATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTGATGGCCCCGACCCACCAGG  
 TGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCTGGTCCATT  
 CCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAG  
 CGTGACCAGCGGGCAACGTGAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTC  
 TGGCGGACCCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTACAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGC  
 ACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCC  
 GCCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTACGCACTC  
 CTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATT  
 ACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTTCGTAGCACAAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATA  
 CATCTTTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGC  
 TATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAA  
 GAAAAAGAAGAATTAACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCACACCTGCTAACAGAAGCAG  
 ATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCC  
 TAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCTT  
 TTGTATTATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCAAGGTCGAGTGAAGCCTGTAA  
 CGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCT

## Figura 2D

TCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTG  
 CTTAGACTGTCAGTTTTTGCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATT  
 TGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTG  
 GCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTG  
 GGCGGCCTTAAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAAATAATGAATATTGGGAAACGT  
 TTAAAGAAAAACCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTA  
 GGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACC  
 AATGGACAGGTTTGTAAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTACTCCAGGAACAAAACATA  
 CTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTG  
 TCGGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCTGCTTCCGAACATTATAC  
 ACTGTTTGATATGTGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCAGCCTGGGG  
 ATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTG  
 ACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGC  
 GGCTTTCGGCGAAATTTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCA  
 TGATGAAATCTGGAATGTTCTCACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCA  
 AGCAGAGTGTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTTCATTGGAGATGACAA  
 TATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATA  
 TGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTCTGTGGAGGTTT  
 ATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTCCGTGTGGCAGACCCCTAAAAAGGCTGTT  
 TAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGC  
 ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATCTTTTCAGAGCTGTGCAAGGAGTAGAA  
 TCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAG  
 TGTTAAATCATTAGCTACCTGAGAGGGGCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGA  
 CTACGACATAGTCTAGTCGACGCCACCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCTGAGGCT  
 ACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCCAGTTGAGGAGGAGAACCCGGACTTCTGGAACCGCGAGG  
 CAGCCGAGGCCCTGGGTGCCGCAAGAAGCTGCAGCCTGCACAGACAGCCGCCAAGAACCCTC  
 ATCATCTTCTGGGCGATGGGATGGGGGTGTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAAGG  
 GCAGAAGAAGGACAAACTGGGGCCTGAGATACCCCTGGCCATGGACCGCTTCCCATATGTGG  
 CTCTGTCCAAGACATAACAATGTAGACAAACATGTGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCACGGCC  
 TACCTGTGCGGGTCAAGGGCAACTTCCAGACCAATTGGCTTGAGTGCAGCCGCCCGCTTTAA  
 CCAGTGCAACACGACACGCGGCAACGAGGTATCTCCGTGATGAATCGGGCCAAGAAAGCAG  
 GGAAGTCAGTGGGAGTGGTAAACCACACGAGTGCAGCACGCCTCGCCAGCCGGCACCTAC  
 GCCCACACGGTGAACCGCAACTGGTACTCGGACGCCGACGTCCTGCCTCGGCCCGCCAGGA  
 GGGGTGCCAGGACATCGCTACGCAGCTCATCTCC

## Figura 2E

AACATGGACATTGACGTGATCCTAGGTGGAGGCCGAAAGTACATGTTTTCGCATGGGAACCCC  
 AGACCCGTGAGTACCAGATGACTACAGCCAAGGTGGGACCAGGCTGGACGGGAAGAATCTGG  
 TGCAGGAATGGCTGGCGAAGCGCCAGGGTGCCCGGTATGTGTGGAACCGCACTGAGCTCATG  
 CAGGCTTCCCTGGACCCGTCTGTGACCCATCTCATGGGTCTCTTTGAGCCTGGAGACATGAA  
 ATACGAGATCCACCGAGACTCCACACTGGACCCTCCTGATGGAGATGACAGAGGCTGCC  
 TCGCCTGTGAGCAGGAACCCCGCGGCTTCTTCTTCTCGTGGAGGGTGGTGCATCGAC  
 CATGGTCATCATGAAAGCAGGGCTTACCGGGCACTGACTGAGACGATCATGTTGACGACGC  
 CATTGAGAGGGCGGGCCAGCTCACCAGCGAGGAGGACACGCTGAGCCTCGTCACTGCCGACC  
 ACTCCCACGTCTTCTCCTTCGGAGGCTACCCCTGCGAGGGAGCTCCATCTTCGGGTGGCC  
 CCTGGCAAGGCCCGGGACAGGAAGGCTACACGGTCTCCTATAACGAAAACGGTCCAGGCTA  
 TGTGCTCAAGGACGGCGCCCGGCGGATGTTACCGAGAGCGAGAGCGGGAGCCCCGAGTATC  
 GGCAGCAGTCAGCAGTGCCCTGGACGAAGAGACCCACGCAGGCGAGGACGTGGCGGTGTT  
 GCGCGGGCCCGCAGGCGCACCTGGTTACGGCGTG CAGGAGCAGACCTTCATAGCGCACGT  
 CATGGCCTTCGCCCTGCTGGAGCCCTACCCGCTGCGACCTGGCGCCCCCGCCGGCA  
 CCACCGACCGCGCACCCGGTTACTCTAGAGTCGGGGCGGCGCGCTTCGAGCAGACA  
 TGA<sup>A</sup>ACTAGACGGCGCGCCACCCAGCGCCGATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACAT  
 AGAACTCGCGCGATTGGCATGCCGCTTAAAATTTTTATTTTTTTTTCTTTTCTTTTCCG  
 AATCGGATTTGTTTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAGGTTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGC  
 ACGTCCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGCCACGTTTAAACCAGCTCCAATTGCGCCTATAGTG  
 AGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCTGACTGGGAAAACCTGGC  
 GTTACCCAACCTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA  
 GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCT  
 GTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACTTGCC  
 AGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTT  
 TCCCCGTC AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC  
 TCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACG  
 GTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACCTGG  
 AACAACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGATTTGCGGATTTGCG  
 CCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGGAATTTTAAACAAAATATTA  
 ACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTT  
 TTCTAAATACATTC AAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATA  
 ATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTG  
 CGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGA

## Figura 2F

AACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAC  
TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATG  
AGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCCTATGACGCCGGGCAAGAGCA  
ACTCGGTGCGCCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAA  
AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGAT  
AACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT  
GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA  
TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTA  
TTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA  
TAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAAT  
CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCC  
TCCCCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA  
GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGAGACCAAGTTTACTCAT  
ATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTT  
TTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC  
CGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC  
AAACAAAAAACCAACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTT  
TTCCGAAGGTAAGTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCC  
GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCC  
TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCAGGGTTGGACTCAAGACGA  
TAGTTACCGGATAAAGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTT  
GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGC  
TTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC  
ACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCT  
CTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA  
GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCT  
GCGTTATCCCCTGATTCTGTGATAACCGTATTACCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCG  
CCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC  
GCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCC  
GACTGGAAAGCGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC  
CCAGGCTTTTACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGG  
GAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCACGCGTAATACGACTCACTATAG

## Figura 3A

ATGGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAAGTTCACGTT  
 GACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGT  
 AGAAGCCAAGCAGGTCACGTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTT  
 CAAAACCTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCC  
 GCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGA  
 TCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATA  
 AGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTATGAGCGACCCCTGACCTGGAAACT  
 GAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCTACGAAGGGCAAGTCTGTGTTACCA  
 GGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAG  
 TCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATAT  
 CCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTAAACGGCTCGTAACATAGGCCATG  
 CAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAAGAAGTATTTGA  
 AACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTA  
 CTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCG  
 GTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCTGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCC  
 TGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAA  
 GTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTAC  
 ATTGTGTGACCAAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTGAGTGGGACGACGCGCAAAAAC  
 TGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCTCAACGGTTCGACCCAGAGAAACACCAATACC  
 ATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAA  
 GGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTT  
 GTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATC  
 ATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGA  
 GATCGGGCTGAGAAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAAGGAGCCGTCACCTCTCA  
 TTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA  
 GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTGAGGAGCCACTCTGGA  
 AGCCGATGTGCACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCT  
 TGATAAAGGTTACCAGCTACGCTGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCG  
 CAGGCTGTAACAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGT  
 GATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGG  
 TGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT  
 GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGC  
 GCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAC

## Figura 3B

GTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGCATCGACAGGAAACAGTGCCTCAA  
 GAAAGAAGTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAAT  
 TCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTG  
 TATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTACCAAAAAAGATCT  
 AGTGGTGAGCGCCAAGAAAAGAAAAGTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAG  
 GGCTGGACGTCAATGCCAGAAGTGTGGACTCAGTGTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTA  
 GAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGTCTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGC  
 CATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAAACA  
 TGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCAAAAAGCATC  
 TCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAAT  
 GAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTA  
 AGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTAC  
 AAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGC  
 CGTTCCGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCC  
 TACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAA  
 ACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTCACCTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCA  
 TGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCAGAATAAGG  
 CAAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACC  
 ACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGT  
 ATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCAC  
 CCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAAATCCCCGTGCGCTAACATGTAC  
 GGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTGAGTCTCTCGCAGGTACCCAACTGCCTCGGGCAGT  
 TGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAA  
 ACCTAGTACCTGTAAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCTCCACCATAATGAACACCCA  
 CAGAGTGACTTTTCTTCATTTCGTGAGCAAAATGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCCGGGA  
 AAAGTTGTCGGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTGAGCCGGCCTGAGGCTACCTTCA  
 GAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCAAATATGACATAATATTTGTTAAT  
 GTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAG  
 CATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTGAGCATAGGTT  
 ATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGTATAGCGCGGAGTTCAAGTTT  
 TCCCGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTGTATTTCATTGG  
 GTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTT  
 ATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGAT  
 ATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATG

## Figura 3C

CTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATCCCG  
 GAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAA  
 ACATATCATTATGCGCTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAAC  
 AGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTA  
 GCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATT  
 GAACCATTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACA  
 AGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGC  
 ATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAG  
 TTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGGAAG  
 GGACCAAGTTTACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCA  
 ACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTC  
 GAAATGCCCCGTGCAAGAGTTCGGAAGCCTCCTCACCACTAGCACGCTGCCTTGCTGTGCA  
 TCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAATTA  
 GTGTGCTCATCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTC  
 CCAGCCTATATTTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGG  
 AAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACA  
 CCTGAAACAACCACCTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCAT  
 CATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGTGTGTCAGATGGCCCGACCCACCAGGTGC  
 TGCAAGTCGAGGCAGACATTACGGGCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCTGGTCCATTCTCT  
 CATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGT  
 GACCAGCGGGCAACGTGAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGG  
 CGGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGACA  
 AGAACACCGTCACTTGCAACCAGCAGGGCCTGCTCGAGAGGGATCACGGGAGAAACCGTGGG  
 ATACGCGGTTACACACAATAGCGAGGGCTTCTTGCTATGCAAAGTTACTGACACAGTAAAAG  
 GAGAACGGGTATCGTTCCCTGTGTGCACGTACATCCCGCCACCATAAACTCGAGAACCAGC  
 CTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGT  
 AGCACAACAACAATGACGGTTTGTGCGGGTGCATACATCTTTTCTCCGACACCGGTCAAG  
 GGCATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGTATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACC  
 GAATTGGAGATTTCTGATGCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGAAATTA  
 ATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACA  
 TGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGA  
 AAAGTGGAGTGCTACCGAACCTGCATCCTGTTCTTTGTATTCTAGTGTGAACCGTGC  
 CTTTTCAAGCCCCAAGTTCGAGTGAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGA  
 CTGTGGCTTCTTACTGTATTATCCAGAGTACGA

## Figura 3D

TGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCCTG  
 CAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTG  
 CCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATGCAA  
 TGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTTCGGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCA  
 AGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACT  
 GAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTTAAAGGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTGGC  
 GAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAAATGGACTTAA  
 AGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTG  
 ATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAG  
 GAGATTAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACT  
 TTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCG  
 TCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTT  
 AGGTGTGGACGAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTCAATCAATAC  
 ATTTGCCCACTAAAACATAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCTCACA  
 CTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTGAGAGAACGGCTAAC  
 CGGATCACCATGTGCAGCATTCAATGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACA  
 AATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTG  
 GTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCAC  
 AGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCTAAAAGGCTGTTTAAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAG  
 ACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGA  
 GTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTC  
 CATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTAAATCATTAGCTACCTGAGAG  
 GGGCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGC  
 CTCAGCGTCGACGCCACCATGAACTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCT  
 GACCGCGTGACTTCTGCTTCGCCAGCGGCCAGAATCACCAGGAATTTCTACCAGAGCA  
 CCTGCAGCGCGTGAGCAAGGGCTACCTGAGCGCCTGCGGACCGGCTGGTACACCAGCGTG  
 ATCACCATCGAGCTGTCCAAATCAAAGAAAACAAGTGAACGGCACCGACGCCAAGGTGAA  
 ACTGATCAAGCAGGAACCTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGC  
 AGAGCACCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGAAGAGAGCTGCCCGGTTTCAATGAACTACACC  
 CTGAACAACGCCAAGAAAACAACGTGACCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTTGGG  
 CTTCTGCTGGGCGTGGGCGAGCGCCATCGCCAGCGGGTGGCCGTGTCCAAGGTGCTGCACC  
 TGAAGGCGAGGTGAACAAGATCAAGTCCGCCCTGCTGTCCACCAACAAGGCCGTGGTGTCC  
 CTGAGCAACGGCGTGAGCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAATAACATCGACAA  
 GCAGCTGCTGCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGC

## Figura 3E

AGCATCAGCAACATCGAGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAAT  
 CACCCGGGAGTTCAGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCA  
 ACAGCGAGCTGCTGTCCCTGATCAATGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATG  
 AGCAACAACGTGCAGATCGTGGCAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATCATCAAAGAAGA  
 GGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGC  
 TGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGG  
 ACCGACCGGGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTGAGCTTCTTCCCCAAGCCGAGAC  
 CTGCAAGGTGCAGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCG  
 AGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCC  
 AAGACCGACGTGAGCAGCTCCGTGATCACCTCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAA  
 GACCAAGTGCACCCGACCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCG  
 ACTACGTGAGCAACAAGGGCGTGGACACCGTGAGCGTGGCAACACACTGTACTACGTGAAT  
 AAGCAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCATCATCAACTTCTACGACCCCT  
 GGTGTTCCCCAGCGACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGA  
 GCCTGGCCTTCATCCGGAAGAGCGACGAGCTGCTGCACAATGTGAATGCCGGAAGAGCACC  
 ACCAATATCATGATCACCACAATCATCATCGTGATCATTGTGATCCTGCTGTCTCTGATTGC  
 CGTGGCCTGTGCTGTACTGCAAGGCCCGCAGCACCCCTGTGACCCTGTCCAAGGACCAGC  
 TGTCCGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAAGTCTAGAGCGCCGCGCTACGCCCC  
 AATGATCCGACCAGCAAACTCGATGTAATTCGAGGAACTGATGTGCATAATGCATCAGGC  
 TGGTACATTAGATCCCGCTTACCGCGGCAATATAGCAACACTAAAACTCGATGTAATTC  
 CGAGGAAGCGCAGTGCATAATGCTGCGCAGTGTGCCACATAACCACTATATTAACCATTTA  
 TCTAGCGGACGCCAAAACTCAATGTATTTCTGAGGAAGCGTGGTGCATAATGCCACGCAGC  
 GTCTGCATAACTTTTATTATTTCTTTTATTAATCAACAAAATTTGTTTTAAACATTTCAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCC  
 TCGCGTCCGACTGGGCATCCGAAGGAGGACGCACGTCCAACCTCGGATGGCTAAGGGAGAGC  
 CACGAGCTCCTGTTTAAACCAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGGCTCA  
 CTGGCCGTGTTTTACAACGTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCT  
 TGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT  
 CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCG  
 GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCC  
 TTTTCGCTTTCTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATC  
 GGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGAT  
 TAGGGTGTAGGTTACAGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTT  
 GGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTTC

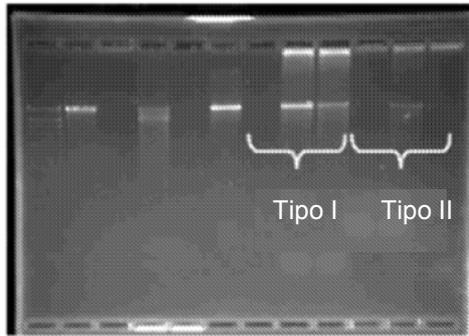
### Figura 3F

CAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCC  
 GATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACA  
 AAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTT  
 GTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATG  
 CTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTC  
 CTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAG  
 ATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG  
 ATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCT  
 ATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACT  
 ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATG  
 ACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACT  
 TCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATG  
 TAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGAC  
 ACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTAC  
 TCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTC  
 TGCCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGG  
 TCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTA  
 CACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCT  
 CACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGAGCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTA  
 AAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAA  
 AATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT  
 CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTA  
 CCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTT  
 CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCA  
 AGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCC  
 AGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCA  
 GCGGTGCGGGTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG  
 AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCG  
 GACAGGTATCCGTAAGCGGCGAGGTGCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG  
 AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTT  
 TGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGG  
 TTCTTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGT  
 GGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGGAGC  
 GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCG

## Figura 3G

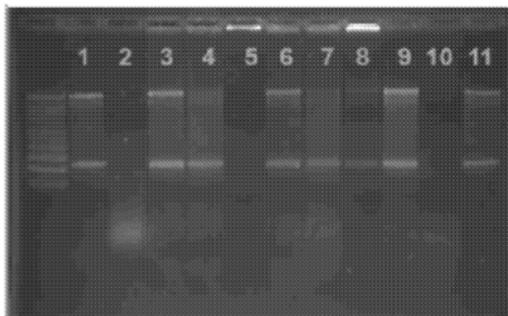
CCCAATACGAAACCGCCTCTCCCCGGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGACA  
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCAT  
TAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG  
ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTC  
ACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCACGCGTCGGCTACAATTAATACATAACCTT  
ATGTATCATAACATACGATTTAGGTGACACTATAG

Figura 4



- 1. Sobrenadante
- 2. ARN desorbido
- 3. Estabilidad de la RNAsa

Figura 5



Carril	Proporción N:P	Muestra
1-2	-	Control: ARN sin digerir Control: ARN digerido
3	10:1	Control Descomplejado
4		Tratado con RNAsa
5		Solamente sobrenadante
6	4:1	Control Descomplejado
7		Tratado con RNAsa
8		Solamente sobrenadante
9	1:4	Control Descomplejado
10		Tratado con RNAsa
11		Solamente sobrenadante

Figura 6A

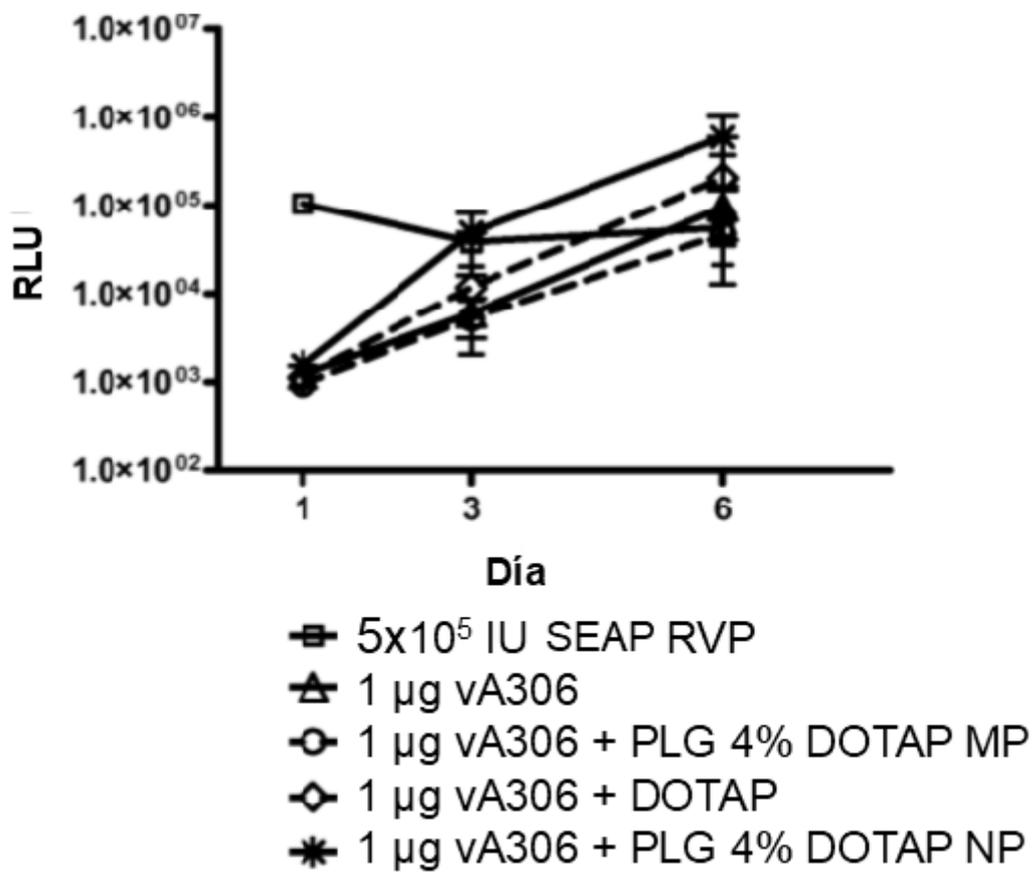


Figura 6B

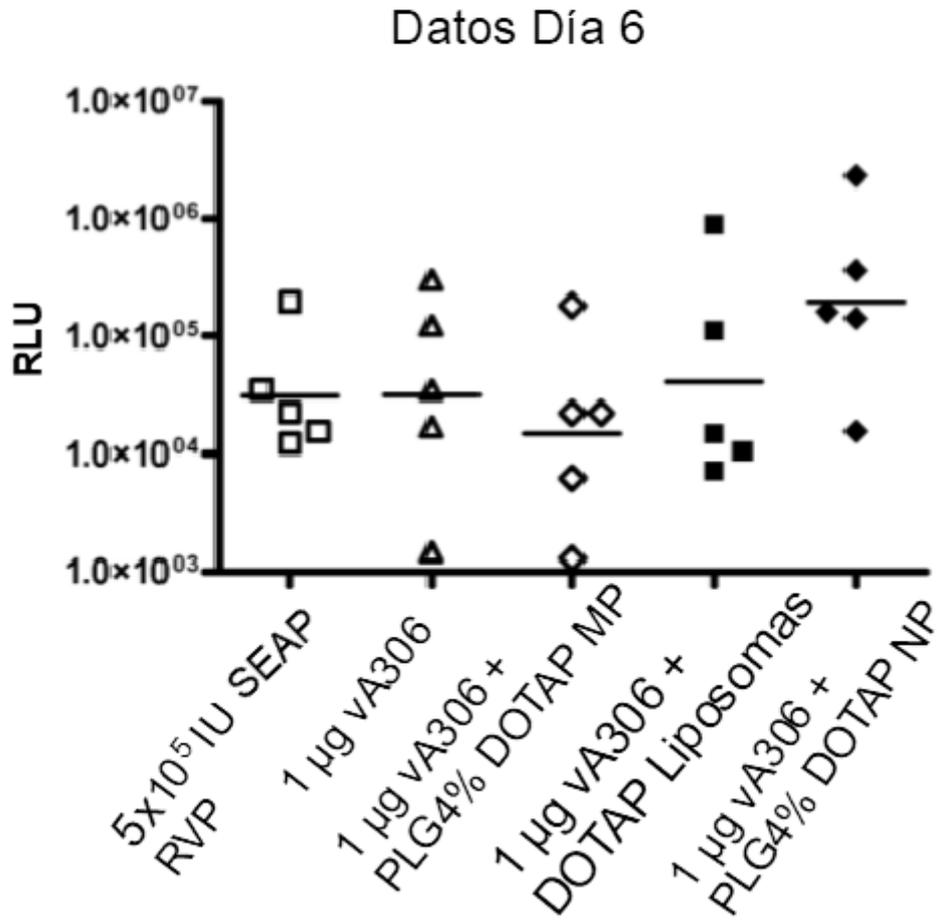
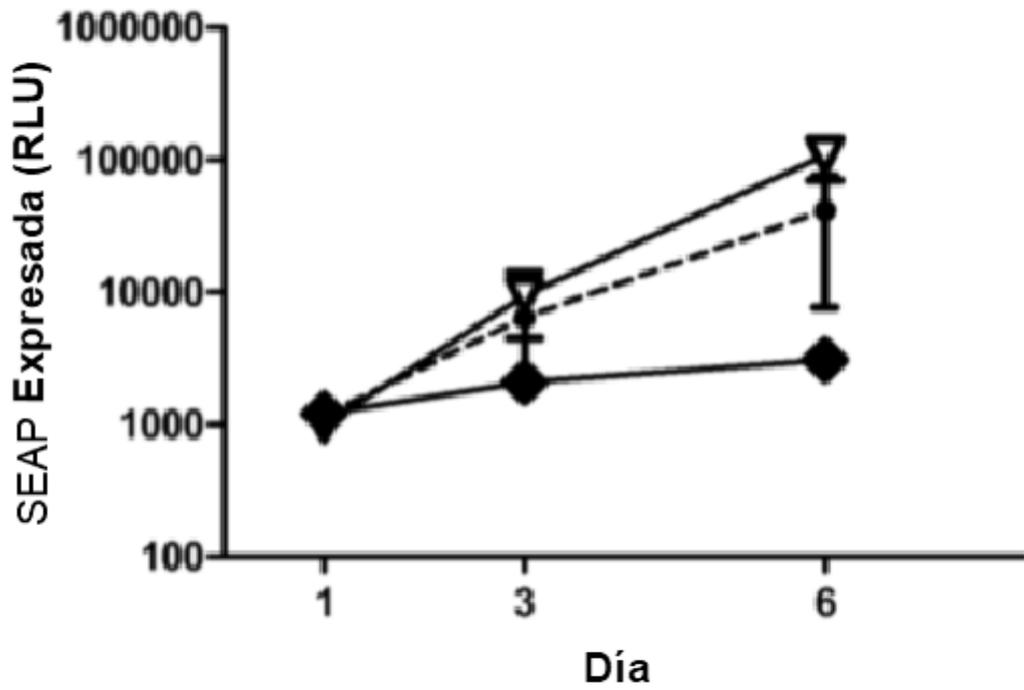
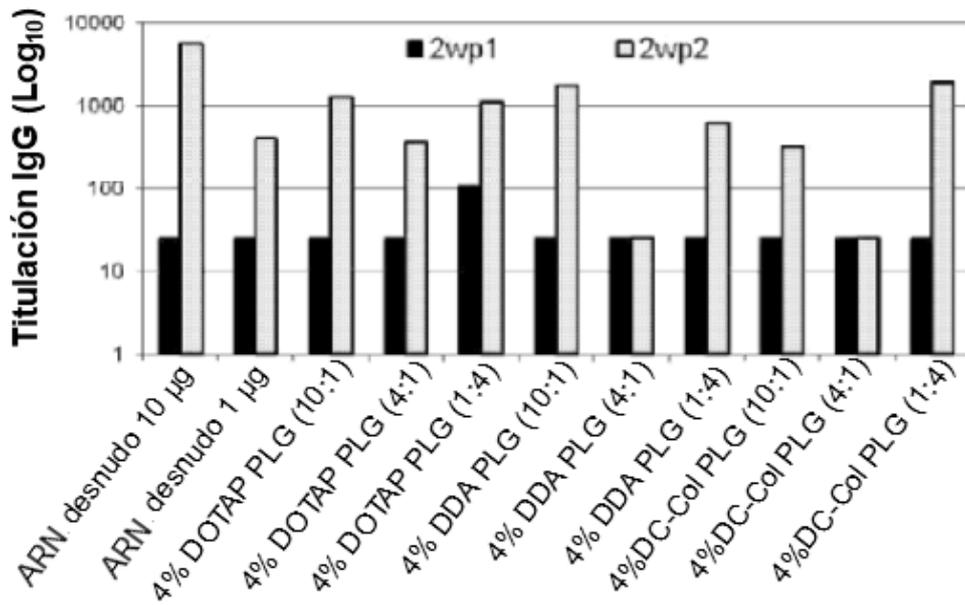


Figura 7



- 1 µg vA306
- ▽ 1 µg vA306 + 4% DOTAP PLG NP I
- ◆ 1 µg vA306 + 4% DOTAP PLG NP I

Figura 8A



Aumento de plegamiento sobre desnudo 1µg

Figura 8B

