

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 852**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011 PCT/US2011/043099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006372**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11736498 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2591103**

54 Título: **Suministro de ARN a diferentes tipos de células**

30 Prioridad:

**06.07.2010 US 361780 P**

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

**24.03.2020**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)**

**Rue de l'Institut 89**

**1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**GEALL, ANDREW;**

**RAMSAUER, KATRIN;**

**OTTEN, GILLIS y**

**MANDL, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 749 852 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

Suministro de ARN a diferentes tipos de células

**Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo del suministro no viral de ARN para inmunización.

**5 Antecedentes de la técnica**

El suministro de ácidos nucleicos para inmunizar animales ha sido un objetivo durante varios años. Se han analizado varios enfoques, que incluyen el uso de ADN o ARN, de vehículos de suministro virales o no virales (o incluso sin vehículo de suministro, en una vacuna "desnuda"), de vectores replicantes o no replicantes, o de vectores virales o no virales.

10 Sigue existiendo la necesidad de vacunas de ácidos nucleicos adicionales y mejoradas y, en particular, de formas mejoradas de suministro de vacunas de ácidos nucleicos.

**Descripción de la invención**

De acuerdo con la invención, el ARN autorreplicante que codifica un inmunógeno se suministra conjuntamente a células no inmunitarias en el sitio de suministro y también a células inmunitarias (que incluyen las células presentadoras de antígeno profesionales) que se infiltran en el sitio de suministro. Las células no inmunitarias (por ejemplo, fibroblastos) responden al ARN mediante la activación de helicasas de ARN citoplasmáticas, lo que conduce a un efecto adyuvante local. Las células inmunitarias infiltrantes responden al ARN mediante la expresión de interferones de tipo I (por ejemplo, interferón  $\alpha$  y/o  $\beta$ ) y citocinas proinflamatorias (por ejemplo, interleucina 6) y la presentación del inmunógeno expresado a las células T. Las respuestas de estos dos tipos de células al mismo ARN suministrado conducen a dos efectos diferentes, que interactúan para producir una respuesta inmunitaria fuerte contra el inmunógeno, y este resultado puede lograrse mediante un solo suministro de un solo ARN, por ejemplo, por una sola inyección.

Por lo tanto, la invención proporciona un ARN autorreplicante que codifica un inmunógeno para su uso en un procedimiento para elevar una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno en un vertebrado, en el que el procedimiento comprende administrar el ARN que codifica un inmunógeno a un sitio de suministro en el tejido del músculo esquelético en el vertebrado y después permitir que las células inmunitarias se infiltren en el sitio de suministro, de modo que el ARN se introduzca por separado tanto (a) en las células no inmunitarias en el sitio de suministro como (b) en las células inmunitarias infiltrantes.

**Administración**

30 La invención implica la administración de una molécula de ARN a un sitio de suministro en el músculo esquelético en un vertebrado.

La administración puede lograrse de varias formas. Se prefiere la administración por inyección, por ejemplo, por medio de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica). La inyección sin aguja puede usarse como alternativa.

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

El sitio de suministro incluye células no inmunitarias, tales como las células musculares (que pueden ser multinucleadas y pueden estar dispuestas en fascículos) y/o fibroblastos. El ARN se introduce al citoplasma de estas células después que (o mientras) se administra al sitio de suministro. La entrada puede ser por medio de endocitosis, por ejemplo, a través del sarcolema de una célula muscular, o a través de la membrana celular de un fibroblasto. Después de la entrada del ARN (y el escape del endosoma), este puede unirse a helicasas de ARN tales como RIG-I (RLR-1), MDA5 (RLR-2) y/o LGP2 (RLR-3). Esta unión puede iniciar la señalización mediada por RLR, para activar de este modo rutas de la inmunidad innata que aumentan el efecto inmunogénico del ARN suministrado. Incluso si el ARN suministrado es monocatenario, este puede formar ARN bicatenario ya sea durante la replicación o debido a su estructura secundaria, lo que significa que el ARN también puede iniciar la señalización mediada por PKR, lo que nuevamente conduce a la activación de rutas de la inmunidad innata. Tanto la señalización mediada por RLR como la mediada por PKR pueden conducir a la secreción de interferones de tipo I (por ejemplo, interferón  $\alpha$  y/o  $\beta$ ) por las células no inmunitarias. Las células no inmunitarias pueden experimentar apoptosis después de la transfección.

50 El sitio de suministro también incluye células inmunitarias, tales como macrófagos (por ejemplo, macrófagos derivados de la médula ósea), células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas plasmocitoides derivadas de la médula ósea y/o células dendríticas mieloides derivadas de la médula ósea), monocitos (por ejemplo, monocitos de sangre periférica humana), etc. Estas células inmunitarias pueden estar presentes en el sitio de suministro en el momento de la administración, pero normalmente se infiltrarán en el sitio de suministro después de la

administración. Por ejemplo, el daño tisular ocasionado por la administración invasiva (por ejemplo, ocasionado en el sitio de suministro por una aguja) puede ocasionar que las células inmunitarias se infiltren en el área dañada. Estas células infiltrantes se encontrarán con el ARN que ahora está en el sitio de suministro y el ARN puede introducirse al citoplasma de estas células inmunitarias, por ejemplo, por medio de endocitosis. Después de la entrada del ARN la respuesta de estas células inmunitarias incluye la secreción de interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias. El ARN puede ocasionar este efecto por medio de receptores de reconocimiento de patrones, tales como los receptores de tipo Toll (por ejemplo, TLR7), helicasas intracelulares (por ejemplo, RIG-I) y PKR (proteína quinasa dependiente de ARNbc). El ARN puede o no traducirse en las células inmunitarias, y por lo tanto las células inmunitarias pueden o no expresar el inmunógeno. Si el inmunógeno se expresa en la célula inmunitaria entonces este puede presentarse mediante el MHC-I y/o el MHC-II de la célula inmunitaria. Si el inmunógeno no se expresa en la célula inmunitaria entonces en lugar de esto la célula inmunitaria puede capturarlo de otras células (por ejemplo, células no inmunitarias) que captaron el ARN y expresaron el inmunógeno, y así el inmunógeno puede presentarse mediante el MHC-II y/o el MHC-I de la célula inmunitaria. La presentación del antígeno generalmente ocurrirá en los ganglios linfáticos drenantes después que las células inmunitarias hayan migrado del sitio de suministro.

La infiltración de células inmunitarias en un sitio de suministro puede observarse directamente, por ejemplo, mediante el uso de células inmunitarias marcadas y después técnicas de captura de imágenes *in vivo* o toma de muestras de biopsia. La capacidad del ARN de introducirse en las células inmunitarias y las células no inmunitarias puede detectarse por técnicas de detección específica de secuencia realizadas *in situ* o en una muestra extirpada.

El ARN se administra en combinación con un sistema de suministro que comprende: (i) liposomas que encapsulan el ARN, (ii) micropartículas de polímeros no tóxicos y biodegradables y/o (iii) emulsiones catiónicas submicrométricas de aceite en agua. Las emulsiones catiónicas submicrométricas de aceite en agua son un sistema de suministro preferido.

#### Liposomas

Varios lípidos anfifílicos pueden formar bicapas en un ambiente acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza hidrofílica aniónica, catiónica o zwitteriónica. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos se remonta a la década de 1960, y los lípidos catiónicos formadores de liposomas se han estudiado desde la década de 1990. Algunos fosfolípidos son aniónicos mientras que otros son zwitteriónicos y otros son catiónicos. Las clases adecuadas de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas y fosfatidilgliceroles, y algunos fosfolípidos útiles se enumeran en la Tabla 1. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero no se limitan a, dioleoil trimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los lípidos zwitteriónicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos zwitteriónicos de acilo y lípidos zwitteriónicos de éter. Los ejemplos de lípidos zwitteriónicos útiles son DPPC, DOPC y dodecilsfosfocolina. Los lípidos pueden ser saturados o insaturados. Se prefiere el uso de al menos un lípido insaturado para preparar los liposomas. Si un lípido insaturado tiene dos colas, ambas colas pueden ser insaturadas, o puede tener una cola saturada y una cola insaturada.

Los liposomas pueden formarse a partir de un solo lípido o a partir de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos (ii) una mezcla de lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos zwitteriónicos (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos zwitteriónicos (vi) una mezcla de lípidos zwitteriónicos y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos zwitteriónicos. De manera similar, una mezcla puede comprender lípidos saturados e insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (zwitteriónico, saturado), DLinDMA (catiónico, insaturado) y/o DMG (aniónico, saturado). Cuando se usa una mezcla de lípidos, no es necesario que todos los lípidos componentes en la mezcla sean anfifílicos, por ejemplo, uno o más lípidos anfifílicos pueden mezclarse con colesterol.

La porción hidrofílica de un lípido puede estar PEGilada (es decir, modificada por unión covalente de un polietilenglicol). Esta modificación puede aumentar la estabilidad y evitar la adsorción no específica de los liposomas. Por ejemplo, los lípidos pueden conjugarse con PEG con el uso de técnicas tales como las descritas en las referencias 1 y 2. Pueden usarse varias longitudes de PEG, por ejemplo, entre 0,5-8 kDa.

En los ejemplos se usa una mezcla de DSPC, DLinDMA, PEG-DMG y colesterol.

Los liposomas normalmente se dividen en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares pequeñas (SUV); y vesículas unilamelares grandes (LUV). Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, que forman varios compartimentos acuosos separados. Las SUV y las LUV tienen una sola bicapa que encapsula un núcleo acuoso; típicamente las SUV tienen un diámetro  $\leq 50$  nm, y las LUV tienen un diámetro  $> 50$  nm. Los liposomas útiles con la invención son idealmente LUV con un diámetro en el intervalo de 50-220 nm. Para una composición que comprende una población de LUV con diferentes diámetros: (i) al menos el 80 % por número debe tener diámetros en el intervalo de 20-220 nm, (ii) el diámetro promedio ( $Z_{av}$ , por intensidad) de la población está

idealmente en el intervalo de 40-200 nm, y/o (iii) los diámetros deben tener un índice de polidispersidad  $<0,2$ . Se espera que los complejos de liposomas/ARN de la referencia 16 tengan un diámetro en el intervalo de 600-800 nm y una polidispersidad alta.

5 Las técnicas para preparar liposomas adecuados se conocen bien en la técnica, por ejemplo, ver las referencias 3 a 5. Un procedimiento útil se describe en la referencia 6 e implica mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) tampón, seguido de mezcla, equilibrio, dilución y purificación. Los liposomas preferidos de la invención pueden obtenerse mediante este proceso de mezcla.

10 El ARN se encapsula preferentemente dentro de los liposomas, y por lo tanto el liposoma forma una capa externa alrededor de un núcleo acuoso que contiene ARN. Se ha descubierto que esta encapsulación protege al ARN de la digestión con RNasa. Los liposomas pueden incluir parte de ARN en el exterior (por ejemplo, en la superficie de los liposomas), pero al menos la mitad del ARN (e idealmente su totalidad) está encapsulado.

#### Micropartículas poliméricas

15 Varios polímeros pueden formar micropartículas para encapsular o adsorber ARN. El uso de un polímero sustancialmente no tóxico significa que un receptor puede recibir las partículas de manera segura, y el uso de un polímero biodegradable significa que las partículas pueden metabolizarse después del suministro para evitar la persistencia prolongada. Los polímeros útiles son además esterilizables, para ayudar a preparar formulaciones de calidad farmacéutica.

20 Los polímeros no tóxicos y biodegradables adecuados incluyen, pero no se limitan a, poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), ácidos polihidroxi-butíricos, polilactonas (que incluyen las policaprolactonas), polidioxanonas, polivalerolactona, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, policarbonatos derivados de la tirosina, polivinilpirrolidinas o poliésteramidas y sus combinaciones.

25 Las micropartículas pueden formarse a partir de poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), tales como unas poli(lactidas) ("PLA"), copolímeros de lactida y glicólido tales como un poli(D,L-lactida-co-glicólido) ("PLG") y copolímeros de D,L-lactida y caprolactona. Los polímeros PLG útiles incluyen aquellos que tienen una relación molar de lactida/glicólido en el intervalo, por ejemplo, de 20:80 a 80:20, por ejemplo, 25:75, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 75:25. Los polímeros PLG útiles incluyen aquellos que tienen un peso molecular entre, por ejemplo, 5000-200.000 Da por ejemplo entre 10.000-100.000, 20.000-70.000, 30.000-40.000, 40.000-50.000 Da.

30 Idealmente las micropartículas tienen un diámetro en el intervalo de 0,02  $\mu\text{m}$  a 8  $\mu\text{m}$ . Para una composición que comprende una población de micropartículas con diferentes diámetros al menos 80 % por número debe tener diámetros en el intervalo de 0,03-7  $\mu\text{m}$ .

Las técnicas para preparar micropartículas adecuadas se conocen bien en la técnica, por ejemplo, ver las referencias 5, 7 (en particular el capítulo 7) y 8. Para facilitar la adsorción de ARN, una micropartícula puede incluir un tensioactivo y/o lípido catiónico, por ejemplo, como se describe en las referencias 9 & 10. Una forma alternativa de fabricar micropartículas poliméricas es por moldeo y curado, por ejemplo, como se describe en la referencia 11.

35 Las micropartículas de la invención pueden tener un potencial zeta de entre 40-100 mV.

Una ventaja de las micropartículas sobre los liposomas es que se liofilizan fácilmente para un almacenamiento estable.

El ARN puede adsorberse a las micropartículas, y la adsorción se facilita mediante la inclusión de materiales catiónicos (por ejemplo, lípidos catiónicos) en la micropartícula.

#### 40 Emulsiones catiónicas de aceite en agua

45 Las emulsiones de aceite en agua se conocen por ser adyuvantes de vacunas contra la influenza, por ejemplo, el adyuvante MF59<sup>TM</sup> en el producto FLUAD<sup>TM</sup> y el adyuvante AS03 en el producto PREPANDRIX<sup>TM</sup>. El suministro de ARN de acuerdo con la presente invención puede utilizar una emulsión de aceite en agua, con la condición de que la emulsión incluya una o más moléculas catiónicas. Por ejemplo, puede incluirse un lípido catiónico en la emulsión para proporcionar una superficie de gota positiva a la que puede unirse el ARN cargado negativamente.

50 La emulsión comprende uno o más aceites. El(Los) aceite(s) adecuado(s) incluye(n), por ejemplo, los de una fuente animal (tal como pescado) o una vegetal. Idealmente el aceite es biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. El aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco y el aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, son ejemplos de los aceites de frutos secos. Puede usarse aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido del frijol jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se producen naturalmente en los aceites de semillas,

pueden prepararse por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados a partir de los aceites de frutos secos y semillas. Las grasas y aceites de la leche de los mamíferos son metabolizables y por lo tanto pueden usarse. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuente animal se conocen bien en la técnica.

5 La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón y el aceite de ballena tal como el espermaceti son ejemplos de varios de los aceites de pescado que pueden usarse en la presente memoria. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y generalmente se denominan terpenoides. Las emulsiones preferidas comprenden escualeno, un aceite de hígado de tiburón que es un terpenoide ramificado insaturado, (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>; [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>))<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; CAS RN 7683-64-9). El escualano, el análogo saturado del escualeno, también puede usarse. Los aceites de pescado, que incluyen el escualeno y el escualano, están disponibles fácilmente de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

10 Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Cuando la fase oleosa de una emulsión incluye un tocoferol, puede usarse cualquiera de los tocoferoles α, β, γ, δ, ε o ξ, pero se prefieren los α-tocoferoles. Puede usarse D-α-tocoferol y DL-α-tocoferol. Un α-tocoferol preferido es el DL-α-tocoferol. Puede usarse una combinación de aceites que comprende escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL-α-tocoferol).

15 El aceite en la emulsión puede comprender una combinación de aceites, por ejemplo, escualeno y al menos un aceite adicional.

20 El componente acuoso de la emulsión puede ser agua corriente (por ejemplo, w.f.i.) o puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, por ejemplo, sales de citrato o fosfato, tales como sales de sodio. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina; o un tampón de citrato. Se prefiere una fase acuosa tamponada, y los tampones se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20 mM.

25 La emulsión incluye además un lípido catiónico. Preferentemente este lípido es un tensioactivo de modo que pueda facilitar la formación y estabilización de la emulsión. Los lípidos catiónicos útiles generalmente contienen un átomo de nitrógeno que se encuentra cargado positivamente en condiciones fisiológicas, por ejemplo, como una amina terciaria o cuaternaria. Este nitrógeno puede estar en el grupo de cabeza hidrofílica de un tensioactivo anfifílico. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero no se limitan a: 1,2-dioleoil-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3'-[N-(N',N'-dimetilamino)etanol]-carbamoilcolesterol (DC colesterol), dimetildioctadecilamonio (DDA, por ejemplo, el bromuro), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio propano (DMTAP), dipalmitoil(C16:0)trimetilamonio propano (DPTAP), diestearoiltrimetilamonio propano (DSTAP). Otros lípidos catiónicos útiles son: cloruro de benzalconio (BAK), cloruro de bencetonio, cetramida (que contiene bromuro de tetradeciltrimetilamonio y posiblemente pequeñas cantidades de bromuro de dedeciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de cetiltrimetilamonio (CATC), N,N',N'-polioxietileno (10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro mixto de alquiltrimetilamonio, cloruro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, metóxido de benciltrimetilamonio, bromuro de cetildimetilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), cloruro de metilbencetonio, cloruro de decametono, cloruro mixto de metiltrialquilamonio, cloruro de metil trietilamonio), cloruro de N,N-dimetil-N-[2 (2-metil-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxi]-etoxi)etil]-bencenometamino (DEBDA), sales de dialquildimetilamonio, cloruro de [1-(2,3-dioleilo)propil]-N,N,N-trimetilamonio, 1,2-diacil-3-(trimetilamonio) propano (grupo acilo=dimiristoilo, dipalmitoilo, diestearoilo, dioleilo), 1,2-diacil-3 (dimetilamonio)propano (grupo acilo=dimiristoilo, dipalmitoilo, diestearoilo, dioleilo), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio)butanoil-sn-glicerol, éster de 1,2-dioleoil 3-succinil-sn-glicerol colina, butanoato de colesteril (4'-trimetilamonio), sales de N-alquilpiridinio (por ejemplo, bromuro de cetilpiridinio y cloruro de cetilpiridinio), sales de N-alquilpiperidinio, electrolitos bolaformes dicatiónicos (C<sub>12</sub>Me<sub>6</sub>; C<sub>12</sub>Bu<sub>6</sub>), dialquiliglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L-α dioleoil-fosfatidiletanolamina, éster de colesterol hemisuccinato colina, lipopoliaminas, que incluyen pero sin limitarse a dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS), dipalmitoil fosfatidiletanolamidoespermina (DPPES), lipopoli-L (o D)- lisina (LPLL, LPDL), poli (L (o D)-lisina conjugada con N-glutarilfosfatidiletanolamina, éster de didodecil glutamato con grupo amino colgante (C<sub>12</sub>GluPhC<sub>n</sub>N<sup>+</sup>), éster de ditetradecil glutamato con grupo amino colgante (C<sub>12</sub>GluPhC<sub>n</sub>N<sup>+</sup>), derivados catiónicos de colesterol, que incluyen pero sin limitarse a sal de colesteril-3 β-oxisuccinamidoetiltrimetilamonio, colesteril-3 β-oxisuccinamidoetilendimetilamina, sal de colesteril-3 β-carboxiamidoetiltrimetilamonio y colesteril-3 β-carboxiamidoetilendimetilamina. Otros lípidos catiónicos útiles se describen en las referencias 12 & 13. El lípido catiónico es preferentemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible.

55 Además del aceite y el lípido catiónico, una emulsión puede incluir un tensioactivo no iónico y/o un tensioactivo zwitteriónico. Tales tensioactivos incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitán (comúnmente denominados Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), vendidos bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque de EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiol) repetidos, con octoxinol-9 (Tritón X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos

de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); polioxietileno-9-lauril éter; y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como Spans), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Tritón X-100.

Pueden incluirse mezclas de estos tensioactivos en la emulsión, por ejemplo, mezclas Tween 80/Span 85 o mezclas Tween 80/Tritón-X100. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán tal como el monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como el t-octilfenoxipolietoxietanol (Tritón X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol. Las mezclas útiles pueden comprender un tensioactivo con un valor de HLB en el intervalo de 10-20 (por ejemplo, polisorbato 80, con un HLB de 15,0) y un tensioactivo con un valor de HLB en el intervalo de 1-10 (por ejemplo, trioleato de sorbitán, con un HLB de 1,8).

Las cantidades preferidas de aceite (% en volumen) en la emulsión final están entre 2-20 %, por ejemplo, 5-15 %, 6-14 %, 7-13 %, 8-12 %. Un contenido de escualeno de aproximadamente 4-6 % o aproximadamente 9-11 % es particularmente útil.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) en la emulsión final están entre 0,001 % y 8 %. Por ejemplo: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como polisorbato 80) 0,2 a 4 %, en particular entre 0,4-0,6 %, entre 0,45-0,55 %, aproximadamente 0,5 % o entre 1,5-2 %, entre 1,8-2,2 %, entre 1,9-2,1 %, aproximadamente 2 % o 0,85-0,95 %, o aproximadamente 1 %; ésteres de sorbitán (tales como trioleato de sorbitán) 0,02 a 2 %, en particular aproximadamente 0,5 % o aproximadamente 1 %; octil o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Tritón X-100) 0,001 a 0,1 %, en particular 0,005 a 0,02 %; ésteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 8 %, preferentemente 0,1 a 10 % y en particular 0,1 a 1 %, o aproximadamente 0,5 %.

Las cantidades absolutas de aceite y tensioactivo y su relación, pueden variarse dentro de amplios límites mientras que aún formen una emulsión. Un experto puede variar fácilmente las proporciones relativas de los componentes para obtener una emulsión deseada, pero es típica una relación en peso de entre 4:1 y 5:1 para aceite y tensioactivo (exceso de aceite).

Un parámetro importante para garantizar la actividad inmunoestimulante de una emulsión, particularmente en animales grandes, es el tamaño de gota del aceite (diámetro). Las emulsiones más eficaces tienen un tamaño de gota en el intervalo submicrométrico. Adecuadamente, los tamaños de gota estarán en el intervalo de 50-750 nm. De forma más útil el tamaño de gota promedio es menor que 250 nm, por ejemplo, menor que 200 nm, menor que 150 nm. El tamaño de gota promedio es útil en el intervalo de 80-180 nm. Idealmente, al menos 80 % (por número) de las gotas de aceite de la emulsión tienen menos de 250 nm de diámetro y preferentemente al menos 90 %. Los aparatos para determinar el tamaño de gota promedio en una emulsión y la distribución de tamaño, se comercializan en el mercado. Estos usan típicamente las técnicas de dispersión dinámica de luz y/o detección óptica de partículas individuales, por ejemplo, las series de instrumentos Accusizer™ y Nicomp™ comercializadas por Particle Sizing Systems (Santa Bárbara, Estados Unidos) o los instrumentos Zetasizer™ de Malvern Instruments (Reino Unido) o los instrumentos analizadores de la distribución de tamaño de partículas de Horiba (Kioto, Japón).

Idealmente, la distribución de los tamaños de gota (por número) solo tiene un máximo, es decir, hay una sola población de gotas distribuidas alrededor de un promedio (moda), en lugar de tener dos máximos. Las emulsiones preferidas tienen una polidispersidad de <0,4 por ejemplo 0,3, 0,2 o menos.

Pueden obtenerse emulsiones adecuadas con gotas submicrométricas y una distribución de tamaño estrecha mediante el uso de la microfluidización. Esta técnica reduce el tamaño de gota de aceite promedio al impulsar corrientes de componentes de entrada a través de canales geoméricamente fijos a alta presión y alta velocidad. Estas corrientes entran en contacto con las paredes de los canales, las paredes de la cámara y entre sí. Las fuerzas de cizallamiento, impacto y cavitación resultantes ocasionan una reducción en el tamaño de gota. Pueden realizarse etapas repetidas de microfluidización hasta que se logre una emulsión con un promedio y distribución de tamaño de gota deseados.

Como alternativa a la microfluidización, pueden usarse procedimientos térmicos para ocasionar la inversión de fase, como se describe en la referencia 14. Estos procedimientos también pueden proporcionar una emulsión submicrométrica con una distribución de tamaño de partícula estrecha.

Las emulsiones preferidas pueden esterilizarse por filtración, es decir, sus gotas pueden atravesar un filtro de 220 nm. Además de proporcionar una esterilización, este procedimiento también elimina cualquier gota grande en la emulsión.

El lípido catiónico en la emulsión puede ser DOTAP. La emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml de DOTAP. Por ejemplo, la emulsión catiónica de aceite en agua puede comprender DOTAP de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0,9 mg/ml a



Ciertas composiciones preferidas de la invención para la administración a un paciente comprenden escualeno, span 85, polisorbato 80 y DOTAP. Por ejemplo: el escualeno puede estar presente a 5-15 mg/ml; el span 85 puede estar presente a 0,5-2 mg/ml; el polisorbato 80 puede estar presente a 0,5-2 mg/ml; y el DOTAP puede estar presente a 0,1-10 mg/ml. La emulsión puede incluir la misma cantidad (en volumen) de span 85 y polisorbato 80. La emulsión puede incluir más escualeno que tensioactivo. La emulsión puede incluir más escualeno que DOTAP.

#### El ARN

La invención implica el suministro *in vivo* de ARN autorreplicante que codifica un inmunógeno. El ARN se traduce en células no inmunitarias en el sitio de suministro, lo que conduce a la expresión del inmunógeno, y además ocasiona que las células inmunitarias secreten interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias que proporcionan un efecto adyuvante local. Las células no inmunitarias también pueden secretar interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias en respuesta al ARN.

El ARN es de cadena +, y por lo tanto puede traducirse en las células no inmunitarias sin necesidad de ninguna etapa de replicación intermedia tal como la transcripción inversa. También puede unirse a los receptores TLR7 expresados por las células inmunitarias, para iniciar de este modo un efecto adyuvante.

Una molécula de ARN autorreplicante (replicón), cuando se suministra a una célula de vertebrado incluso sin ninguna proteína, puede conducir a la producción de múltiples ARN hijos mediante su propia transcripción (por medio de una copia antisentido que se genera a partir de ella). Una molécula de ARN autorreplicante es por lo tanto una molécula de cadena + que puede traducirse directamente después del suministro a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que produce después transcritos sentido y antisentido del ARN suministrado. Por lo tanto, el ARN suministrado conduce a la producción de múltiples ARN hijos. Estos ARN hijos, así como los transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse para proporcionar la expresión *in situ* de un inmunógeno codificado, o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que se traducen para proporcionar la expresión *in situ* del inmunógeno. Los resultados generales de esta secuencia de transcripciones es una gran amplificación en el número de replicones de ARN introducidos y por lo tanto el inmunógeno codificado se convierte en un producto polipeptídico principal de las células.

Como se muestra a continuación, no se requiere una actividad de autorreplicación para que un ARN proporcione un efecto adyuvante, aunque esta puede aumentar la secreción de citocinas después de la transfección. La actividad de autorreplicación es particularmente útil para lograr un alto nivel de expresión del inmunógeno en células no inmunitarias. Además, puede aumentar la apoptosis de las células no inmunitarias.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación es el uso de un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones de cadena + se traducen después del suministro a una célula para proporcionar una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias genómicas de cadena - del ARN de cadena + suministrado. Estos transcritos de cadena - pueden transcribirse para proporcionar copias adicionales del ARN progenitor de cadena + y también para proporcionar un transcrito subgenómico que codifica el inmunógeno. Por lo tanto, la traducción del transcrito subgenómico conduce a la expresión *in situ* del inmunógeno en la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de un virus Sindbis, un virus del bosque Semliki, un virus de la encefalitis equina del este, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc. Pueden usarse secuencias de virus mutantes o de tipo silvestre, por ejemplo, el mutante TC83 atenuado de VEEV se ha usado en replicones (ver la referencia 15).

Una molécula de ARN autorreplicante para su uso de acuerdo con la invención codifica por lo tanto (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir el ARN de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un inmunógeno. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, por ejemplo, que comprende una o más de las proteínas de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4.

Si bien los genomas de alfavirus naturales codifican proteínas viriónicas estructurales además de la poliproteína replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN autorreplicante de la invención no codifique proteínas estructurales de alfavirus. Por lo tanto, un ARN autorreplicante preferido puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contienen ARN. La incapacidad de producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN autorreplicante no puede autopropagarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus de tipo silvestre están ausentes de los ARN autorreplicantes de la invención y su lugar lo ocupa(n) el(los) gen(es) que codifica(n) el inmunógeno de interés, de modo que el transcrito subgenómico codifique el inmunógeno en lugar de las proteínas viriónicas estructurales de alfavirus.

Por lo tanto, una molécula de ARN autorreplicante útil con la invención puede tener dos marcos abiertos de lectura. El primer marco abierto de lectura (5') codifica una replicasa; el segundo marco abierto de lectura (3') codifica un inmunógeno. En algunas realizaciones el ARN puede tener marcos abiertos de lectura adicionales (por ejemplo,



corriente abajo), por ejemplo, para codificar inmunógenos adicionales (ver a continuación) o para codificar polipéptidos auxiliares.

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

5 Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden tener varias longitudes, pero típicamente tienen una longitud de 5.000-25.000 nucleótidos, por ejemplo, 8.000-15.000 nucleótidos o 9.000-12.000 nucleótidos. Por lo tanto, el ARN es más largo de lo que se observa en el suministro de ARNip.

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

10 El nucleótido 5' de una molécula de ARN útil con la invención puede tener un grupo trifosfato 5'. En un ARN con caperuza este puede enlazarse a una 7-metilguanosina por medio de un puente de 5' a 5'. Un trifosfato 5' puede aumentar la unión a RIG-I y por lo tanto promover efectos adyuvantes.

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

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

20 Una molécula de ARN útil con la invención puede prepararse convenientemente por transcripción *in vitro* (IVT). La IVT puede usar una plantilla (ADNc) creada y propagada en forma de plásmido en bacterias, o creada por síntesis (por ejemplo, mediante procedimientos de ingeniería de síntesis de genes y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, puede usarse una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como las ARN polimerasas de bacteriófago T7, T3 o SP6) para transcribir el ARN a partir de una plantilla de ADN. Pueden usarse las reacciones de adición de caperuza y poli-A adecuadas según se requiera (aunque la poli-A del replicón normalmente se codifica dentro de la plantilla de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener requisitos estrictos para el(los) nucleótido(s) 5' transcrito(s) y en algunas realizaciones estos requisitos deben coincidir con los requisitos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito por IVT pueda funcionar de manera eficiente como un sustrato para su replicasa autocodificada.

30 Como se analizó en la referencia 15, el ARN autorreplicante puede incluir (además de cualquier estructura de caperuza 5') uno o más nucleótidos que tienen una nucleobase modificada. Sin embargo, el ARN para su uso de acuerdo con la presente invención no incluye nucleótidos modificados, es decir, todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos A, C, G y U estándar (a excepción de cualquier estructura de caperuza 5', que puede incluir una 7'-metilguanosina). En una realización preferente, el ARN incluye una caperuza 5', que comprende preferentemente una 7'-metilguanosina. Los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' pueden metilarse en la posición 2' de la ribosa.

35 Idealmente un ARN usado con la invención solo incluye enlaces fosfodiéster entre los nucleósidos, pero en algunas realizaciones puede contener enlaces fosforamidoato, fosforotioato y/o metilfosfonato.

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

El inmunógeno

45 Las moléculas de ARN que se usan con la invención codifican un inmunógeno polipeptídico. Después de la administración del ARN el inmunógeno se traduce *in vivo* y puede provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta de anticuerpos (que incluye normalmente IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. El inmunógeno polipeptídico típicamente provocará una respuesta inmunitaria que reconoce al polipéptido bacteriano, viral, fúngico o de parásito (o alérgeno o tumor) correspondiente, pero en algunas realizaciones el polipéptido puede actuar como un mimotopo para provocar una respuesta inmunitaria que reconoce a un sacárido bacteriano, viral, fúngico o de parásito. El inmunógeno será típicamente un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glicoproteína de envoltura, una glicoproteína de la espiga, etc.

55 Las moléculas de ARN pueden codificar un solo inmunógeno polipeptídico o múltiples polipéptidos. Los múltiples inmunógenos pueden presentarse como un solo inmunógeno polipeptídico (polipéptido de fusión) o como polipéptidos separados. Si los inmunógenos se expresan como polipéptidos separados entonces uno o más de estos pueden proporcionarse con una IRES corriente arriba o un elemento promotor viral adicional. Alternativamente,

pueden expresarse múltiples inmunógenos a partir de una poliproteína que codifica inmunógenos individuales fusionados a una proteasa autocatalítica corta (por ejemplo, la proteína 2A del virus de la fiebre aftosa) o como inteínas.

- 5 A diferencia de las referencias 16 y 17, el ARN codifica un inmunógeno. Para evitar dudas, la invención no abarca el ARN que codifica una luciferasa de luciérnaga o que codifica una proteína de fusión de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* o que codifica una proteína verde fluorescente (GFP). Además, el ARN no es ARN total de timo de ratón.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una de estas bacterias:

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

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

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

*Moraxella catarrhalis*.

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

- 20 *Staphylococcus aureus*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos descritos en la referencia 22, tales como una hemolisina, esxA, esxB, proteína de unión a ferricromo (sta006) y/o la lipoproteína sta011.

*Clostridium tetani*: el inmunógeno típico es el toxoide tetánico.

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

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

*Pseudomonas aeruginosa*

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

- 30 *Chlamydia trachomatis*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, similar a OmpH, L7/L12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (por ejemplo, como se describe en la referencia 25). LcrE (como se describe en la referencia 26) y HtrA (como se describe en la referencia 27) son dos inmunógenos preferidos.

- 35 *Chlamydia pneumoniae*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos descritos en la referencia 28.

*Helicobacter pylori*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, CagA, VacA, NAP y/o ureasa como se describe en la referencia 29.

- 40 *Escherichia coli*: los inmunógenos útiles incluyen, pero no se limitan a, inmunógenos derivados de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* de adherencia difusa (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 inmunógenos polipeptídicos de UPEC útiles se describen en las referencias 30 y 31. Los inmunógenos de MNEC útiles se describen en la referencia 32. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es AcfD (como se describe en la referencia 33).

- 45 *Bacillus anthracis*

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

*Staphylococcus epidermis*

*Clostridium perfringens* o *Clostridium botulinums*

*Legionella pneumophila*

*Coxiella burnetii*

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

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

5 *Neisseria gonorrhoeae*

*Treponema pallidum*

*Haemophilus ducreyi*

*Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*

*Staphylococcus saprophyticus*

10 *Yersinia enterocolitica*

*Mycobacterium tuberculosis*

*Rickettsia*

*Listeria monocytogenes*

*Vibrio cholerae*

15 *Salmonella typhi*

*Borrelia burgdorferi*

*Porphyromonas gingivalis*

*Klebsiella*

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra uno de estos virus:

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

25 *Virus Paramyxoviridae*: Los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Pneumovirus (por ejemplo, virus sincitial respiratorio, RSV, Rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), Paramixovirus (por ejemplo, virus de parainfluenza), Metapneumovirus y Morbillivirus (por ejemplo, sarampión).

*Poxviridae*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de *Ortopoxvirus* tales como *Variola vera* que incluye pero sin limitarse a, *Variola major* y *Variola menor*.

30 *Picornavirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Picornavirus, tales como Enterovirus, Rinovirus, Heparnavirus, Cardiovirus y Aftovirus. El enterovirus puede ser un poliovirus, por ejemplo, un poliovirus de tipo 1, tipo 2 y/o tipo 3. El enterovirus puede ser un enterovirus EV71. El enterovirus puede ser un virus coxsackie A o B.

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

*Heparnavirus*: Los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un heparnavirus, tal como el virus de la hepatitis A (HAV).

*Filovirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un filovirus, tal como un virus del Ébola (que incluye un virus del Ébola de Zaire, Costa de Marfil, Reston o Sudán) o un virus de Marburgo.

40 *Togavirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Togavirus, tal como un Rubivirus, un Alfavirus o un Arterivirus. Esto incluye el virus de la rubéola.

*Flavivirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Flavivirus, tal como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), el virus del dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus del bosque de Kyasanur, el virus de la encefalitis del Nilo

occidental, el virus de la encefalitis de San Luis, el virus de la encefalitis rusa de primavera-verano, el virus de la encefalitis de Powassan.

*Pestivirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Pestivirus, tal como la diarrea viral bovina (BVDV), la fiebre porcina clásica (CSFV) o la enfermedad de Border (BDV).

5 *Hepadnavirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Hepadnavirus, tal como el virus de la hepatitis B. Una composición puede incluir el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

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

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

*Caliciviridae*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de Caliciviridae, tales como el virus de Norwalk (Norovirus) y los virus de tipo Norwalk, tales como el virus de Hawaii y el virus de Snow Mountain.

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

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

20 *Reovirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un Orthoreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus o un Coltivirus.

*Parvovirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados del Parvovirus B19.

25 *Herpesvirus*: los inmunógenos virales incluyen, pero no se limitan a, los derivados de un herpesvirus humano, tal como, a modo de ejemplo solamente, los virus del herpes simple (HSV) (por ejemplo, HSV de tipos 1 y 2), virus de varicela-zóster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HHV6), herpesvirus humano 7 (HHV7) y herpesvirus humano 8 (HHV8).

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

30 *Adenovirus*: los inmunógenos virales incluyen los derivados del serotipo 36 de adenovirus (Ad-36).

En algunas realizaciones, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria contra un virus que infecta a los peces, tal como: virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus del bagre de canal (CCV), virus de la linfocistis de los peces (FLDV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), herpesvirus de Koi, virus tipo picorna del salmón (también conocido como virus tipo picorna del salmón del Atlántico), virus del salmón encerrado (LSV), rotavirus del salmón del Atlántico (ASR), virus de la enfermedad de la frutilla de la trucha (TSD), virus del tumor de salmón coho (CSTV) o virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV).

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

*Mortierella spp., Cunninghamella spp., Saksenaia spp., Alternaria spp., Curvularia spp., Helminthosporium spp., Fusarium spp., Aspergillus spp., Penicillium spp., Monolinia spp., Rhizoctonia spp., Paecilomyces spp., Pithomyces spp., y Cladosporium spp.*

- 5 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un parásito del género *Plasmodium*, tal como *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae* o *P.ovale*. Por lo tanto, la invención puede usarse para inmunizar contra la malaria. El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un parásito de la familia *Caligidae*, particularmente los de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus*, por ejemplo, piojos de mar tales como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.

Composiciones farmacéuticas

- 10 El ARN puede administrarse como un componente en una composición farmacéutica para inmunizar sujetos contra varias enfermedades. Estas composiciones típicamente incluirán un portador farmacéuticamente aceptable además del ARN, con frecuencia como parte de un sistema de suministro como se describió anteriormente. Un análisis detallado de los portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 36.

- 15 Una composición farmacéutica puede incluir uno o más inmunopotenciadores de molécula pequeña. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (por ejemplo, Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (por ejemplo, un fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como E6020), un agonista de TLR7 (por ejemplo, imiquimod), un agonista de TLR8 (por ejemplo, resiquimod) y/o un agonista de TLR9 (por ejemplo, IC31). Cualquier agonista de este tipo tiene idealmente un peso molecular de <2.000 Da. Cuando se encapsula un ARN, tal(es) agonista(s) también puede(n) encapsularse con el ARN, o alternativamente puede(n) no encapsularse. Cuando un ARN se adsorbe a una partícula, tal(es) agonista(s) también puede(n) adsorberse con el ARN, o alternativamente pueden no adsorberse.

- 25 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir las partículas en agua corriente (por ejemplo, w.f.i.) o en un tampón, por ejemplo, un tampón de fosfato, un tampón Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato, un tampón de histidina o un tampón de citrato. Las sales del tampón se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20 mM.

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

Las composiciones pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para proporcionar tonicidad. Una concentración de  $10 \pm 2$  mg/ml de NaCl es típica, por ejemplo, aproximadamente 9 mg/ml.

- 30 Las composiciones pueden incluir quelantes de iones metálicos. Estos pueden prolongar la estabilidad del ARN mediante la eliminación de iones que pueden acelerar la hidrólisis del fosfodiéster. Por lo tanto una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, etc. Tales quelantes están típicamente presentes entre 10-500  $\mu$ M, por ejemplo, 0,1 mM. Una sal de citrato, tal como citrato de sodio, también puede actuar como quelante, mientras que ventajosamente proporciona además actividad tamponante.

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

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Las composiciones libres de mercurio son ideales, y pueden prepararse vacunas libres de conservantes.

Idealmente las composiciones farmacéuticas son estériles.

- 40 Idealmente las composiciones farmacéuticas son no pirogénicas, por ejemplo, contienen <1 EU (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis e idealmente <0,1 EU por dosis.

Idealmente las composiciones farmacéuticas están libres de gluten.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en forma de dosis unitaria. Por ejemplo, una dosis unitaria puede tener un volumen de entre 0,1-1,0 ml, por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml.

- 45 Las composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones. Los inyectables para la administración intramuscular son típicos.

- 50 Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de ARN, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía en dependencia de la salud y la condición física del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico de los individuos a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo de sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante sobre la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos establecidos. El

contenido de ARN de las composiciones generalmente se expresará en términos de la cantidad de ARN por dosis. Una dosis ideal tiene  $\leq 10 \mu\text{g}$  de ARN, y la expresión puede observarse a niveles mucho más bajos, por ejemplo,  $\leq 1 \mu\text{g/dosis}$ ,  $\leq 100 \text{ ng/dosis}$ ,  $\leq 10 \text{ ng/dosis}$ ,  $\leq 1 \text{ ng/dosis}$ , etc.

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

### Procedimientos de tratamiento y usos médicos

De acuerdo con la invención, el ARN se usa en un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* contra un inmunógeno de interés. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos y/o la inmunidad mediada por células. El procedimiento puede elevar una respuesta de refuerzo.

- 10 Al elevar la respuesta inmunitaria, el vertebrado puede protegerse contra varias enfermedades y/o infecciones, por ejemplo, contra enfermedades bacterianas y/o virales como se analizó anteriormente. Las composiciones que contienen ARN son inmunogénicas, y con mayor preferencia son composiciones vacunales. Estas vacunas pueden ser profilácticas (es decir, para evitar la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas.

- 15 El vertebrado es preferentemente un mamífero, tal como un ser humano o un mamífero veterinario grande (por ejemplo, caballos, reses, venados, cabras, cerdos). Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, la dosis, la inmunogenicidad, etc.

- 20 Las vacunas pueden usarse para tratar a niños y adultos. Por lo tanto, un paciente humano puede ser menor de 1 año de edad, menor de 5 años de edad, de 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo,  $\geq 50$  años de edad,  $\geq 60$  años de edad y preferentemente  $\geq 65$  años), los jóvenes (por ejemplo,  $\leq 5$  años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal militar y del servicio armado, mujeres embarazadas, los pacientes  
25 con enfermedades crónicas o inmunodeficientes. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, y pueden usarse más generalmente en una población.

- 30 Generalmente las composiciones se administrarán directamente a un paciente. El suministro directo puede llevarse a cabo por inyección parenteral (por ejemplo, por vía intramuscular en el tejido del músculo esquelético. La inyección puede ser por medio de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

La invención se puede usar para provocar inmunogenicidad sistémica y/o de la mucosa, preferentemente para provocar una inmunidad sistémica y/o de la mucosa aumentada.

- 35 La dosificación puede ser por un esquema de dosis única o un esquema de múltiples dosis. Las múltiples dosis se pueden usar en un esquema de inmunización primario y/o en un esquema de inmunización de refuerzo. En un esquema de múltiples dosis las diversas dosis pueden administrarse por la misma o diferentes vías, por ejemplo, una sensibilización parenteral y refuerzo mucosal, una sensibilización mucosal y refuerzo parenteral, etc. Las múltiples dosis típicamente se administrarán con al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16  
40 semanas, etc.). Pueden administrarse múltiples dosis aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del nacimiento, por ejemplo, a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se usa con frecuencia en el Programa Ampliado de Inmunización ("EPI", por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud. Alternativamente, pueden administrarse dos dosis primarias con aproximadamente dos meses de diferencia, por ejemplo, aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguido de una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, por ejemplo aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. Alternativamente, se administran tres dosis primarias con aproximadamente dos meses de diferencia, por ejemplo, aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguido de una o más dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses a 1 año después de la tercera dosis primaria, por  
45 ejemplo, aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

### 50 General

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, las referencias 37-43, etc.

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

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

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

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

TLR3 es el receptor 3 de tipo Toll. Es un receptor de un solo segmento transmembrana que desempeña un papel fundamental en el sistema inmunitario innato. Los agonistas de TLR3 conocidos incluyen poli(I:C). "TLR3" es el nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica este receptor, y su ID de HGNC única es HGNC: 11849. La secuencia RefSeq para el gen de TLR3 humano es GI:2459625.

10 TLR7 es el receptor 7 de tipo Toll. Es un receptor de un solo segmento transmembrana que desempeña un papel fundamental en el sistema inmunitario innato. Los agonistas de TLR7 conocidos incluyen, por ejemplo, imiquimod. "TLR7" es el nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica este receptor, y su ID de HGNC única es HGNC:15631. La secuencia RefSeq para el gen de TLR7 humano es GI:67944638.

15 TLR8 es el receptor 8 de tipo Toll. Es un receptor de un solo segmento transmembrana que desempeña un papel fundamental en el sistema inmunitario innato. Los agonistas de TLR8 conocidos incluyen, por ejemplo, resiquimod. "TLR8" es el nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica este receptor, y su ID de HGNC única es HGNC:15632. La secuencia RefSeq para el gen de TLR8 humano es GI:20302165.

La familia de receptores de tipo RIG-I ("RLR") incluye varias helicasas de ARN que desempeñan papeles fundamentales en el sistema inmunitario innato (ver la referencia 44). RLR-1 (también conocido como RIG-I o gen I inducible por ácido retinoico) tiene dos dominios de reclutamiento de caspasas cerca de su extremo N-terminal. El nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-1 es "DDX58" (por polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 58) y la ID de HGNC única es HGNC:19102. La secuencia RefSeq para el gen de RLR-1 humano es GI:77732514. RLR-2 (también conocido como MDA5 o gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma) también tiene dos dominios de reclutamiento de caspasas cerca de su extremo N-terminal. El nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-2 es "IFIH1" (por interferón inducido con el dominio 1 de helicasa C) y la ID de HGNC única es HGNC:18873. La secuencia RefSeq para el gen de RLR-2 humano es GI: 27886567. RLR-3 (también conocido como LGP2 o laboratorio de genética y fisiología 2) no tiene dominios de reclutamiento de caspasas. El nombre de HGNC aprobado para el gen que codifica la helicasa RLR-3 es "DHX58" (por polipéptido de caja DEXH (Asp-Glu-X-His) 58) y la ID de HGNC única es HGNC:29517. La secuencia RefSeq para el gen de RLR-3 humano es GI:149408121.

20  
25  
30

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

35 **Breve descripción de los dibujos**

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

La Figura 2 es una micrografía electrónica de liposomas.

40 La Figura 3 muestra la expresión de proteínas (como unidades de luz relativas, RLU) en los días 1, 3 y 6 después del suministro de ARN como un replicón empaquetado en viriones (cuadrados), ARN desnudo (triángulos) o como micropartículas (círculos).

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

La Figura 5 muestra la expresión de proteínas en los días 1, 3 y 6 después del suministro de ARN como un replicón empaquetado en viriones (cuadrados), como ARN desnudo (rombos) o en liposomas (+ = 0,1  $\mu$ g, x = 1  $\mu$ g).

50 La Figura 6 muestra la expresión de proteínas en los días 1, 3 y 6 después del suministro de cuatro dosis diferentes de ARN encapsulado en liposomas.

La Figura 7 muestra los títulos de IgG anti-F en animales que recibieron replicón empaquetado en viriones (VRP o VSRP), 1  $\mu$ g de ARN desnudo y 1  $\mu$ g de ARN encapsulado en liposomas.

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

La Figura 9 muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes en animales que recibieron VRP o bien 0,1 g o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas.

5 La Figura 10 muestra los niveles de expresión después del suministro de un replicón como ARN desnudo (círculos), ARN encapsulado en liposomas (triángulo & cuadrado), o como un lipoplex (triángulo invertido).

La Figura 11 muestra los títulos de IgG específica de F (2 semanas después de la segunda dosis) después del suministro de un replicón como ARN desnudo (0,01-1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,01-10 µg), o empaquetado como un virión (VRP, 10<sup>6</sup> unidades infecciosas o IU).

10 La Figura 12 muestra los títulos de IgG específica de F (círculos) y los títulos de PRNT (cuadrados) después del suministro de un replicón como ARN desnudo (1 µg), ARN encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg), o empaquetado como un virión (VRP, 10<sup>6</sup> IU). Se muestran además los títulos en ratones no tratados. Las líneas continuas muestran las medias geométricas.

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

20 La Figura 14 muestra los títulos de IgG específica de F (log<sub>10</sub> títulos promedio + desviación estándar) durante 63 días (Figura 14A) y 210 días (Figura 14B) después de la inmunización de terneros. Las cuatro líneas se distinguen fácilmente en el día 63 y son, de abajo hacia arriba: Control negativo de PBS; ARN suministrado en liposomas; ARN suministrado en emulsión; y el producto "Triángulo 4".

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

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

### **Modos para llevar a cabo la invención**

#### **Replicones de ARN**

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

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

45 Después de la linealización del ADN plasmídico corriente abajo de la ribozima de HDV con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron transcritos de escape *in vitro* con el uso de ARN polimerasa dependiente de ADN derivada de bacteriófago T7 o SP6. Las transcripciones se realizaron durante 2 horas a 37 °C en presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa T7) o 5 mM (ARN polimerasa SP6) de cada uno de los nucleósidos trifosfatos (ATP, CTP, GTP y UTP) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion). Después de la transcripción la plantilla de ADN se digirió con TURBO DNasa (Ambion). El replicón de ARN se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. El ARN sin caperuza se modificó postranscripcionalmente con caperuza con la enzima de adición de caperuza de vaccinia (VCE) con el uso del sistema de adición de caperuza de m7G ScriptCap (Epicenter Biotechnologies) como se explica en el manual del usuario; a los replicones que de esta forma se les añade la caperuza se les asigna el prefijo "v", por ejemplo, vA317 es el replicón A317 con caperuza añadida por VCE. El ARN modificado postranscripcionalmente con caperuza se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre



de nucleasas. La concentración de las muestras de ARN se determinó mediante la medición de la OD<sub>260 nm</sub>. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante.

#### Adsorción de PLG

5 Las micropartículas se fabricaron con el uso de 500 mg de PLG RG503 (relación molar lactida/glicólido 50:50, MW ~30 kDa) y 20 mg de DOTAP con el uso de un instrumento Omni Macro Homogenizer. La suspensión de partículas se agitó a 150 rpm durante toda la noche y después se filtró a través de un filtro estéril de 40 µm para el almacenamiento a 2-8 °C. El ARN autorreplicante se adsorbió en las partículas. Para preparar 1 ml de suspensión de PLG/ARN se añadió el volumen requerido de suspensión de partículas de PLG a un frasco y se añadió agua libre de nucleasas para llevar el volumen a 900 µl. Se añadió gota a gota 100 µl de ARN (10 µg/ml) a la suspensión de PLG, con agitación constante. El PLG/ARN se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Para 1 ml de suspensión reconstituida, se añadieron 45 mg de manitol, 15 mg de sacarosa y 250-500 µg de PVA. Los frascos se congelaron a -80 °C y se liofilizaron.

15 Para evaluar la adsorción de ARN, se centrifugó 100 µl de suspensión de partículas a 10.000 rpm durante 5 minutos y se recolectó el sobrenadante. El PLG/ARN se reconstituyó con el uso de 1 ml de agua libre de nucleasas. A 100 µl de suspensión de partículas (1 µg de ARN), se añadió 1 mg de sulfato de heparina. La mezcla se agitó con un agitador vorticial y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min para la desorción del ARN. La suspensión de partículas se centrifugó y se recolectó el sobrenadante.

20 Para la estabilidad de la RNasa, se incubó 100 µl de suspensión de partículas con 6,4 mAU de RNasa A a temperatura ambiente durante 30 minutos. La RNasa se inactivó con 0,126 mAU de proteinasa K a 55 °C durante 10 min. Se añadió 1 mg de sulfato de heparina para desorber el ARN seguido de centrifugación. Las muestras de sobrenadante que contenían ARN se mezclaron con colorante de aplicación con formaldehído, se calentaron a 65 °C durante 10 min y se analizaron con el uso de un gel desnaturalizante al 1 % (460 ng de ARN aplicados por carril).

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

#### Nanoemulsión catiónica

30 Se preparó una emulsión de aceite en agua mediante microfluidización de escualeno, span 85, polisorbato 80 y cantidades variables de DOTAP. Brevemente, los componentes solubles en aceite (escualeno, span 85, lípidos catiónicos, tensioactivos lipídicos) se combinaron en un vaso de precipitados, los componentes lipídicos se disolvieron en solvente orgánico. La solución lipídica resultante se añadió directamente a la fase oleosa. El disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 2 horas en una campana de extracción antes de combinar con la fase acuosa y homogeneizar la muestra para proporcionar una materia prima homogénea. Las emulsiones primarias se pasaron de tres a cinco veces a través de un microfluidizador con un serpentín de enfriamiento de baño de hielo. Las muestras de lotes se retiraron de la unidad y se almacenaron a 4 °C.

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

45 El ARN se adsorbe a la superficie de las gotas de aceite en estas emulsiones catiónicas. Para adsorber el ARN una solución de ARN se diluye a la concentración adecuada en agua libre de RNasa y después se añade directamente a un volumen igual de emulsión mientras se agita ligeramente con un agitador vorticial. La solución se deja reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas para permitir la adsorción. La solución resultante se diluye a la concentración de ARN requerida antes de la administración.

#### Encapsulación liposomal

El ARN se encapsuló en liposomas fabricados por el procedimiento de las referencias 6 y 45. Los liposomas estaban compuestos por 10 % de DSPC (zwitteriónico), 40 % de DlinDMA (catiónico), 48 % de colesterol y 2 % de DMG conjugado con PEG (PEG de 2 kDa). Estas proporciones se refieren al % de moles en el liposoma total.

50 El DlinDMA (1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) se sintetizó con el uso del procedimiento de la referencia 1. La DSPC (1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfocolina) se adquirió de Genzyme. El colesterol se obtuvo de Sigma-Aldrich. El DMG conjugado con PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)], sal de amonio), el DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, sal de cloruro) y el DC-col (clorhidrato de 3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol) eran de Avanti Polar Lipids.

Brevemente, los lípidos se disolvieron en etanol (2 ml), un replicón de ARN se disolvió en tampón (2 ml, citrato de sodio 100 mM, pH 6) y estos se mezclaron con 2 ml de tampón seguido de 1 hora de equilibrio. La mezcla se diluyó con 6 ml de tampón y después se filtró. El producto resultante contenía liposomas, con ~95 % de eficiencia de encapsulación.

5 Por ejemplo, en un procedimiento particular, se prepararon soluciones de reserva de lípidos nuevas en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG-DMG y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución de reserva de lípidos recién preparada se balanceó suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Después, se añadió 755 µl de la reserva a 1,245 ml de etanol para preparar una solución de reserva de lípidos de trabajo de 2 ml. Esta cantidad de lípidos se usó  
10 para formar liposomas con 250 µg de ARN. Se preparó además una solución de trabajo de ARN de 2 ml a partir de una solución de reserva de ~1 µg/µl en tampón de citrato 100 mM (pH 6). Se enjuagaron tres frascos de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con solución RNase Away (Molecular BioProducts) y se lavaron con abundante agua MilliQ antes de usarlos para descontaminar los frascos de RNasas. Uno de los frascos se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recolectar las mezclas de lípidos y ARN (como se describe más adelante). Las  
15 soluciones de trabajo de lípidos y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en jeringas luerlok de 3 cc.

Se cargó 2 ml de tampón de citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contenían el ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador T (unión de ID de 500 µm PEEK™, IDEX Health Science) con el uso de tubos de FEP (etileno-propileno fluorado; todos los tubos de FEP usados tenían un diámetro interno de 2 mm y un diámetro  
20 externo de 3 mm; obtenidos de IDEX Health Science). La salida del mezclador T también era un tubo de FEP. La tercera jeringa que contenía el tampón de citrato se conectó a un pedazo de tubo separado. Después todas las jeringas se accionaron a una velocidad de flujo de 7 ml/min con el uso de una bomba de jeringa. Las salidas de los tubos se colocaron para recolectar las mezclas en un frasco de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). La barra de agitación se retiró y el etanol/solución acuosa se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 1 h. Se cargó 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cc, que se conectó a un pedazo de tubo de FEP y en otra jeringa de 5 cc conectada  
25 a un tubo de FEP de igual longitud, se cargó una cantidad igual de tampón de citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a una velocidad de flujo de 7 ml/min con el uso de la bomba de jeringa y la mezcla final se recolectó en un frasco de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, la mezcla recolectada de la segunda etapa de mezcla (liposomas) se pasó a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que se une a y elimina las moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation). Antes de usar esta membrana para los liposomas, se hizo pasar sucesivamente a través de esta 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón de citrato 100 mM (pH 6). Los liposomas se calentaron durante 10 minutos a 37 °C antes de pasarlos a través de la membrana. A continuación, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de PBS IX con el uso de filtración de flujo tangencial antes de recuperar el producto final. El sistema TFF  
30 y las membranas de filtración de fibra hueca se adquirieron en Spectrum Labs (Rancho Dominguez) y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de polisulfona con un corte de tamaño de poro de 100 kD y 8 cm<sup>2</sup> de área superficial. Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con PBS IX.  
35

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

El porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN se determinaron mediante el kit de reactivo de ARN RiboGreen Quant-iT (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. El estándar de ARN ribosomal proporcionado en el kit se usó para generar una curva estándar. Los liposomas se diluyeron 10x o 100x en tampón  
45 TE IX (del kit) antes de la adición del colorante. Por separado, los liposomas se diluyeron 10x o 100x en tampón TE IX que contenía Tritón X al 0,5 % antes de la adición del colorante (para romper los liposomas y así analizar el ARN total). Posteriormente se añadió una cantidad igual de colorante a cada solución y después ~180 µl de cada solución después de la adición del colorante se aplicó por duplicado en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. La fluorescencia (Ex 485 nm, Em 528 nm) se leyó en un lector de microplacas. Todas las formulaciones de liposomas se dosificaron *in vivo* en base a la cantidad de ARN encapsulado.  
50

Se demostró que la encapsulación en liposomas protege al ARN de la digestión con RNasa. Los experimentos usaron 3,8 mAU de RNasa A por microgramo de ARN, incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. La RNasa se inactivó con Proteínasa K a 55 °C durante 10 minutos. Después se añadió una mezcla 1:1 v/v de muestra a 25:24:1 v/v/v, de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para extraer el ARN de los lípidos hacia la fase acuosa. Las  
55 muestras se mezclaron por agitación con un agitador vortical durante unos segundos y después se colocaron en una centrifuga durante 15 minutos a 12k RPM. La fase acuosa (que contenía el ARN) se retiró y se usó para analizar el ARN. Antes de aplicarlas (400 ng de ARN por pocillo) todas las muestras se incubaron con colorante de aplicación con formaldehído, se desnaturalizaron durante 10 minutos a 65 °C y se enfriaron a temperatura ambiente.

Se usaron marcadores Millennium de Ambion para detectar el peso molecular aproximado del constructo de ARN. El gel se corrió a 90 V. El gel se tiñó con el uso de SYBR Gold al 0,1 % de acuerdo con las instrucciones del fabricante en agua por balanceo a temperatura ambiente durante 1 hora. La Figura 1 muestra que la RNasa digiere  
60

completamente el ARN en ausencia de encapsulación (carril 3). El ARN es indetectable después de la encapsulación (carril 4), y no se observa ningún cambio si estos liposomas se tratan con RNasa (carril 4). Después de someter los liposomas tratados con RNasa a extracción con fenol, se observa el ARN no digerido (carril 6). Incluso después de 1 semana a 4 °C pudo observarse el ARN sin fragmentación alguna (Figura 4, flecha). La expresión de proteínas *in vivo* no cambió después de 6 semanas a 4 °C y un ciclo de congelación y descongelación. Por lo tanto el ARN encapsulado en liposomas es estable.

Para evaluar la expresión *in vivo* del ARN se codificó una enzima reportera (SEAP; fosfatasa alcalina secretada) en el replicón, en lugar de un inmunógeno. Los niveles de expresión se midieron en sueros diluidos 1:4 en tampón de dilución Phospha-Light IX con el uso de un sustrato de fosfato alcalino quimioluminiscente. Se inyectaron ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad (5/grupo) por vía intramuscular en el día 0, 50 µl por pata con una dosis de ARN de 0,1 µg o 1 µg. El mismo vector también se administró sin los liposomas (en PBS IX libre de RNasa) a 1 µg. También se analizaron replicones empaquetados en viriones. Los replicones empaquetados en viriones usados en la presente memoria (denominados "VRP") se obtuvieron por los procedimientos de la referencia 46, donde el replicón de alfavirus se deriva del VEEV mutante o una quimera derivada del genoma de VEEV modificado genéticamente de modo que contenga la 3' UTR del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento (PS) del virus Sindbis, empaquetados mediante electroporación simultánea en células BHK con ARN auxiliares defectuosos que codifican los genes de la cápside y las glicoproteínas del virus Sindbis.

Como se muestra en la Figura 5, la encapsulación aumentó los niveles de SEAP en aproximadamente ½ log a la dosis de 1 µg y en el día 6 la expresión de una dosis encapsulada de 0,1 µg igualó los niveles observados con 1 µg de dosis no encapsulada. En el día 3 los niveles de expresión superaron los logrados con VRP (cuadrados). Por lo tanto, la expresión aumentó cuando el ARN se formuló en los liposomas en relación con el control de ARN desnudo, incluso a una dosis 10x más baja. La expresión también fue mayor en relación con el control de VRP, pero la cinética de expresión fue muy diferente (ver la Figura 5). El suministro del ARN con electroporación dio como resultado un aumento en la expresión en relación con el control de ARN desnudo, pero estos niveles fueron más bajos que con los liposomas.

Para evaluar si el efecto observado en los grupos con liposomas se debió simplemente a los componentes del liposoma, o si se relacionaban con la encapsulación, el replicón se administró en forma encapsulada (con dos protocolos de purificación diferentes, 0,1 µg de ARN) o se mezcló con los liposomas después de su formación (un "lipoplex" no encapsulado, 0,1 µg de ARN) o como ARN desnudo (1 µg). La Figura 10 muestra que el lipoplex proporcionó los niveles de expresión más bajos, lo que demuestra que la encapsulación es esencial para una expresión potente.

Experimentos de SEAP adicionales mostraron una clara respuesta a la dosis *in vivo*, con expresión observada después del suministro de tan solo 1 ng de ARN (Figura 6). Experimentos adicionales que comparan la expresión de replicones encapsulados y desnudos indicaron que 0,01 µg de ARN encapsulado era equivalente a 1 µg de ARN desnudo. A una dosis de 0,5 µg de ARN el material encapsulado proporcionó una expresión 12 veces mayor en el día 6; a una dosis de 0,1 µg los niveles fueron 24 veces mayores en el día 6.

En lugar de mirar los niveles promedio en el grupo, también se estudiaron los animales individuales. Mientras que varios animales no respondieron a los replicones desnudos, la encapsulación eliminó a los no respondedores.

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

Para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* se construyó un replicón para expresar la proteína F de longitud completa del virus sincitial respiratorio (VSR). Este se suministró desnudo (1 µg), encapsulado en liposomas (0,1 o 1 µg), o empaquetado en viriones (10<sup>6</sup> IU; "VRP") en los días 0 y 21. La Figura 7 muestra los títulos de IgG anti-F 2 semanas después de la segunda dosis, y los liposomas aumentan claramente la inmunogenicidad. La Figura 8 muestra los títulos 2 semanas después, momento en el cual no hubo diferencia estadística entre el ARN encapsulado a 0,1 µg, el ARN encapsulado a 1 µg o el grupo con VRP. Los títulos de neutralización (medidos como 60 % de reducción de placa, "PRNT60") no fueron significativamente diferentes en estos tres grupos 2 semanas después de la segunda dosis (Figura 9). La Figura 12 muestra los títulos de IgG y PRNT 4 semanas después de la segunda dosis.

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

Experimentos adicionales compararon los títulos de IgG específica de F en ratones que recibieron VRP, 0,1 µg de ARN encapsulado en liposomas o 1 µg de ARN encapsulado en liposomas. Las relaciones de los títulos (VRP:liposoma) a varios tiempos después de la segunda dosis fueron las siguientes:

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

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

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

Experimentos adicionales mostraron respuestas de IgG específica de F superiores con una dosis de 10 µg, respuestas equivalentes para dosis de 1 µg y 0,1 µg y una respuesta más baja con una dosis de 0,01 µg. La Figura 11 muestra los títulos de IgG en ratones que recibieron el replicón en forma desnuda a 3 dosis diferentes, en liposomas a 4 dosis diferentes o como VRP (10<sup>6</sup> IU). La respuesta observada con 1 µg de ARN encapsulado en liposomas fue estadísticamente insignificante (ANOVA) en comparación con VRP, pero la respuesta mayor observada con 10 µg de ARN encapsulado en liposomas fue estadísticamente significativa (p<0,05) en comparación con ambos grupos.

Un estudio adicional confirmó que los 0,1 µg de ARN encapsulado en liposomas proporcionaron respuestas de IgG anti-F mucho mayores (15 días después de la segunda dosis) que 0,1 µg de ADN suministrado, e incluso fueron más inmunogénicos que 20 µg de ADN plasmídico que codifica el antígeno F, suministrado por electroporación (sistema de suministro de ADN Elgen™, Inovio).

Se realizó un estudio adicional en ratas algodoneras (*Sigmodon hispidis*) en lugar de ratones. A una dosis de 1 µg la encapsulación de liposomas aumentó los títulos de IgG específica de F en 8,3 veces en comparación con el ARN desnudo y aumentó los títulos de PRNT en 9,5 veces. La magnitud de la respuesta de anticuerpos fue equivalente a la inducida por 5x10<sup>6</sup> IU de VRP. Tanto el ARN desnudo como el encapsulado en liposomas pudieron proteger a las ratas algodoneras del reto con RSV (1x10<sup>5</sup> unidades formadoras de placa), con reducción de la carga viral pulmonar en al menos 3,5 logaritmos. La encapsulación aumentó la reducción en aproximadamente 2 veces.

Se realizó un estudio con animales grandes en reses. Las vacas se inmunizaron con 66 µg de replicón que codifica la proteína F de RSV de longitud completa en los días 0 y 21, formulado dentro de los liposomas o con la emulsión CNE17. Se usó PBS solo como control negativo, y se usó una vacuna autorizada como control positivo ("Triángulo 4" de Fort Dodge, que contiene el virus muerto). La Figura 14 muestra los títulos de IgG específica de F durante un período de 63 días a partir de la primera inmunización. El replicón de ARN fue inmunogénico en las vacas con el uso de ambos sistemas de suministro, aunque proporcionó títulos más bajos que la vacuna autorizada. Todas las vacas vacunadas mostraron anticuerpos específicos de F después de la segunda dosis, y los títulos fueron muy estables a partir del período de 2 a 6 semanas después de la segunda dosis (y fueron particularmente estables para las vacunas de ARN). Los títulos con el sistema de suministro de liposomas se agruparon de manera más estrecha que con la emulsión.

### Mecanismo de acción

Se obtuvieron células dendríticas derivadas de la médula ósea (pDC) a partir de ratones de tipo silvestre o la cepa mutante "Resq" (*rsq1*). La cepa mutante tiene una mutación puntual en el extremo amino de su receptor TLR7 que suprime la señalización de TLR7 sin afectar la unión al ligando [47]. Las células se estimularon con replicón de ARN formulado con DOTAP, lipofectamina 2000 o dentro de un liposoma. Como se muestra en la Figura 16, se indujo IL-6 e INFα en células WT pero esta respuesta se anuló casi completamente en ratones mutantes. Estos resultados muestran que el TLR7 se requiere para el reconocimiento del ARN en las células inmunitarias, y que los replicones encapsulados en liposomas pueden ocasionar que las células inmunitarias secreten altos niveles de interferones y citocinas proinflamatorias.

La implicación de TLR7 se investigó adicionalmente mediante la comparación de las respuestas en ratones C57BL/6 de tipo silvestre (WT) y en la cepa mutante "Resq". Los ratones (5 por grupo) recibieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con 1 µg de ARN autorreplicante ("vA317", que codifica la glicoproteína de fusión superficial de RSV) formulado en liposomas (40 % de DlinDMA, 10 % de DSPC, 48 % de colesterol, 2 % de conjugado PEG-DMG) o con una nanoemulsión catiónica submicrométrica de aceite en agua (escualeno, span 85, polisorbato 80, DOTAP). Para la comparación, se administró 2 µg de proteína RSV-F con hidróxido de aluminio como adyuvante. Con la vacuna proteica, los títulos de IgG sérica específica de F fueron comparables entre los ratones de tipo silvestre y C56BL/6 Resq, es decir, la inmunogenicidad de la vacuna proteica no dependía de TLR7. Por el contrario, el ARN autorreplicante formulado en liposomas mostró una disminución de 7 veces en los títulos de IgG sérica específica de F después de ambas vacunaciones, lo que indica una dependencia al menos parcial de TLR7 para la inmunogenicidad de la vacuna de ARN.

De manera similar, los replicones vA317 suministrados con Lipofectamina pueden estimular los fibroblastos de ratón de tipo silvestre para que secreten altos niveles de IFN-β e IL-6, pero los replicones estimulan niveles mucho más bajos de estas citocinas en los fibroblastos que carecen de MDA5 o RIG-I, es decir, de receptores de ARN citoplasmáticos (ver la Figura 15). Estos fibroblastos son células no inmunitarias que no responden a los ligandos de TLR7. Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de ratones con desactivación génica de RIG-I y MDA5 (-/-) se estimularon con replicón de ARN formulado con lipofectamina 2000. Se usaron camadas heterocigóticas (+/-) como

controles. El ARN estimula la IL-6 y el IFN- $\beta$  en los ratones heterocigóticos pero en los ratones con desactivación génica la activación se anula casi completamente. Por lo tanto, estas helicasas son importantes para el reconocimiento del ARN en células no inmunitarias.

5 En general, se demostró que los replicones de ARN suministrados en liposomas inducen varias citocinas séricas dentro de las 24 horas posteriores a la inyección intramuscular (IFN- $\alpha$ , IP-10 (CXCL-10), IL-6, KC, IL-5, IL-13, MCP-1 y MIP-a), mientras que el ARN desnudo indujo solamente MIP-1 y el liposoma por sí solo indujo solamente IL-6.

Se demostró que el IFN- $\alpha$  contribuye a la respuesta inmunitaria al replicón que codifica RSV-F encapsulado en liposomas debido a que un anticuerpo contra el receptor de IFN $\alpha$  (IFNAR1) redujo la IgG sérica específica de F en una reducción de 10 veces después de 2 vacunaciones.

10 **Biodistribución de los vehículos de suministro**

Las nanoemulsiones catiónicas pueden marcarse con fluoróforos de modo que sean intrínsecamente fluorescentes. El suministro de tales emulsiones muestra que la fluorescencia cae durante las primeras 6 horas, y después se mantiene a un nivel bajo (~10 veces mayor que la señal de fondo) durante al menos 48 horas. Por lo tanto al menos parte de la emulsión permanece en el sitio de inyección.

15 De manera similar, el ARN puede marcarse por fluorescencia (pero de manera menos eficiente) y después seguirse tras el suministro con una nanoemulsión catiónica. Estos experimentos muestran un patrón de eliminación similar al de la emulsión fluorescente, pero las cantidades más bajas de fluoróforo proporcionan resultados más pobres.

20 La GFP puede suministrarse por medio de emulsiones o liposomas para estudiar el destino de los contenidos suministrados. 24 horas después de la inyección pueden prepararse y analizarse extractos de músculo y ganglios linfáticos para detectar la señal de GFP. Se descubrió que las nanoemulsiones catiónicas proporcionaban un fuerte reclutamiento de neutrófilos dentro de las 24 horas posteriores a las inyecciones. Por el contrario, el suministro basado en liposomas condujo a un reclutamiento más débil con un enfoque en monocitos.

25 Los estudios *in vivo* de los materiales suministrados muestran que el ARN se expresa en el sitio de inyección cuando se suministra ya sea por emulsión o por liposoma. El material suministrado en emulsión ya no se expresa 35 días después de la inyección, mientras que el material suministrado en liposomas puede expresarse durante hasta 63 días.

**Volumen de suministro**

30 El suministro hidrodinámico emplea la fuerza generada por la inyección rápida de un gran volumen de solución para superar las barreras físicas de las membranas celulares que evitan que los compuestos grandes e impermeables a la membrana se introduzcan en las células. Anteriormente se ha demostrado que este fenómeno es útil para el suministro intracelular de vacunas de ADN.

35 Un volumen típico de suministro a ratón para inyección intramuscular es de 50  $\mu$ l en la pata trasera, que es un volumen relativamente alto para un músculo de la pata del ratón. Por el contrario, una dosis intramuscular humana de ~0,5 ml es relativamente pequeña. Si la inmunogenicidad en ratones dependiera del volumen entonces la eficacia de las vacunas de replicón podría deberse, al menos en parte, a las fuerzas hidrodinámicas, lo que no sería alentador para su uso de las mismas vacunas en seres humanos y animales más grandes.

El replicón vA317 se suministró a ratones BALB/c, 10 por grupo, mediante vacunaciones intramusculares bilaterales (5 o 50 por pata) en los días 0 y 21:

El Grupo 1 recibió replicón desnudo, 0,2  $\mu$ g en 50  $\mu$ l por pata

40 El Grupo 2 recibió replicón desnudo, 0,2  $\mu$ g en 5  $\mu$ l por pata

El Grupo 3 recibió replicón formulado en emulsión (0,2  $\mu$ g, 50  $\mu$ l por pata)

El Grupo 4 recibió replicón formulado en emulsión (0,2  $\mu$ g, 5  $\mu$ l por pata)

El Grupo 5 recibió replicón formulado en liposomas (0,2  $\mu$ g, 50  $\mu$ l por pata)

El Grupo 6 recibió replicón formulado en liposomas (0,2  $\mu$ g, 5  $\mu$ l por pata)

45 El suero se recolectó para el análisis de anticuerpos en los días 14 y 35. Los GMT de IgG sérica específica de F fueron:

Día	1	2	3	4	5	6
14	42	21	783	760	2669	2610

Día	1	2	3	4	5	6
35	241	154	2316	2951	17 655	18 516

Por lo tanto, la inmunogenicidad del replicón formulado no varió de acuerdo con el volumen suministrado, lo que indica por lo tanto que estas vacunas de ARN no dependen del suministro hidrodinámico para su eficacia.

### Cinética de expresión

- 5 Se usó un replicón de ARN autorreplicante ("vA311") que expresa un gen reportero de luciferasa (luc) para estudiar la cinética de la expresión de proteínas después de la inyección. Los ratones BALB/c, 5 animales por grupo, recibieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0 con:

Grupo 1 ADN que expresa luciferasa, suministrado con el uso de electroporación (10 µg)

Grupo 2 ARN autorreplicante (1 µg) formulado en liposomas

- 10 Grupo 3 ARN autorreplicante (1 µg) formulado con una nanoemulsión catiónica (CNE17)

Grupo 4 ARN autorreplicante (1 µg) formulado con una nanoemulsión catiónica diferente

Grupo 5 VRP (1x10<sup>6</sup> IU) que expresan luciferasa

- 15 Antes de la vacunación los ratones se depilaron. Los ratones se anestesiaron (2 % de isoflurano en oxígeno), el pelo se eliminó primero con una rasuradora eléctrica y después con el producto químico Nair. Después se obtuvieron los datos de bioluminiscencia con el uso de un sistema de captura de imágenes Xenogen IVIS 200 (Caliper Life Sciences) en los días 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63 y 70. Cinco minutos antes de adquirir las imágenes los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con 8 mg/kg de solución de luciferina. Después los animales se anestesiaron y se transfirieron al sistema de captura de imágenes. Los tiempos de adquisición de imágenes se mantuvieron constantes mientras se medía la señal de bioluminiscencia con una cámara CCD enfriada.

- 20 En términos visuales, se observó que las células que expresan luciferasa permanecen principalmente en el sitio de inyección del ARN, y los animales fotografiados después de la extirpación de los cuádriceps no mostraron señal.

En términos cuantitativos, la expresión de luciferasa se midió como la radiancia promedio durante un período de 70 días (p/s/cm<sup>2</sup>/sr), y los resultados fueron los siguientes para los 5 grupos:

Días	1	2	3	4	5
3	8,69E+07	3,33E+06	2,11E+06	9,71E+06	1,46E+07
7	1,04E+08	8,14E+06	1,83E+07	5,94E+07	1,64E+07
14	8,16E+07	2,91E+06	9,22E+06	3,48E+07	8,49E+05
21	1,27E+07	3,13E+05	6,79E+04	5,07E+05	6,79E+05
28	1,42E+07	6,37E+05	2,36E+04	4,06E+03	2,00E+03
35	1,21E+07	6,12E+05	2,08E+03		
42	1,49E+07	8,70E+05			
49	1,17E+07	2,04E+05			
63	9,69E+06	1,72E+03			
70	9,29E+06				

- 25 El ARN autorreplicante formulado con nanoemulsiones catiónicas mostró bioluminiscencia medible en el día 3, que alcanzó su punto máximo en el día 7 y después se redujo a niveles de señal de fondo en los días 28 a 35. Cuando se formuló en liposomas el ARN mostró una bioluminiscencia medible en el día 3, que alcanzó su punto máximo en el día 7 y se redujo a niveles de señal de fondo en el día 63. El ARN suministrado con el uso de VRP mostró bioluminiscencia aumentada en el día 21 en comparación con el ARN formulado, pero la expresión se había reducido a niveles de señal de fondo en el día 28. El ADN electroporado mostró el mayor nivel de bioluminiscencia en todos los puntos de tiempo medidos y los niveles de bioluminiscencia no se redujeron a los niveles de señal de fondo dentro de los 70 días del experimento.

Experimentos adicionales de la cinética de expresión usaron ARN que codifica GFP o la enzima reportera SEAP. El replicón "vA306" codifica SEAP; el replicón "vA17" codifica GFP; el replicón "vA336" codifica GFP pero no puede

autorreplicarse; el replicón "vA336\*" es igual a vA336 pero se preparó con un 10 % de uridinas reemplazadas con 5-metiluridina; el replicón "vA336\*\*" es igual a va336 pero el 100 % de sus residuos de uridina son M5U. Los ratones BALB/c recibieron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0. Los animales, 35 en total, se dividieron en 7 grupos (5 animales por grupo) y se inmunizaron de la siguiente manera:

5 Grupo 1 Control sin tratamiento.

El Grupo 2 recibió vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclado con ARN autorreplicante (vA17, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

El Grupo 3 recibió vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclado con ARN no replicante (vA336, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

10 El Grupo 4 recibió vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclado con ARN no replicante (vA336\*, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

El Grupo 5 recibió vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclado con ARN no replicante (vA336\*\*, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

15 El Grupo 6 recibió vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclado con liposomas vacíos a la misma dosis de lípidos que los grupos 2-5.

El Grupo 7 recibió vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en el día 0 con ARN (vA306, 0,1 µg, SEAP) formulado en liposomas mezclado con ARN autorreplicante (vA17, 1,0 µg, GFP) formulado en liposomas.

20 Estos experimentos tuvieron como objetivo observar si las respuestas del huésped al ARN podrían limitar la expresión de proteínas. Por lo tanto se siguió la expresión durante 6 días solamente, antes de que fuera evidente una respuesta adaptativa (anticuerpos, células T).

La actividad de SEAP sérica (unidades de luz relativas) en los días 0, 3 y 6 fue la siguiente (GMT):

	Día 1	Día 3	Día 6
1	898	1170	2670
2	1428	4219	28.641
3	1702	9250	150.472
4	1555	8005	76.043
5	1605	8822	91.019
6	10.005	14 640	93.909
7	1757	6248	53.497

25 El ARN competente para la replicación que codifica GFP suprimió la expresión de SEAP más que el ARN de GFP defectuoso para la replicación, lo que sugiere una fuerte respuesta de defensa del huésped contra el ARN replicante que conduce a la supresión de la expresión de SEAP. Es posible que los interferones inducidos en respuesta al ARN de GFP suprimieran la expresión de SEAP. En el modelo de respuesta/supresión del huésped, se esperaría que el bloqueo del reconocimiento del ARN por parte del huésped conduzca a un aumento en la expresión de SEAP, pero la metilación en 5' de los residuos de U en el ARN de GFP no se asoció con un aumento de SEAP, lo que sugiere  
30 que el reconocimiento del ARN por parte del huésped no era sensible a la metilación en 5'.

**Tabla 1: fosfolípidos útiles**

DDPC	1,2-Didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfato
DEPC	1,2-Erucoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

## ES 2 749 852 T3

DLPA	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG	1,2-Miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPS	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfato
DOPC	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOPS	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-Difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfato
DSPC	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPS	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenada
HSPC	PC de soja hidrogenada de alta pureza
HSPC	PC de soja hidrogenada
LISOPC MIRÍSTICA	1-Miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LISOPC PALMÍTICA	1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LISOPC ESTEÁRICA	1-Estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
Esfingomielina de la leche MPPC	1-Miristoil,2-palmitoil-sn-glicero 3-fosfatidilcolina
MSPC	1-Miristoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina



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

### Referencias

- [1] Heyes y otros (2005) *J Controlled Release* 107:276-87.
- [2] WO2005/121348.
- 5 [3] *Liposomes: Methods and Protocols, Volumen 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols.* (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [4] *Liposome Technology, volúmenes I, II & III.* (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [5] *Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes).* (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002.
- 10 [6] Jeffs y otros (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372.
- [7] *Polymers in Drug Delivery.* (eds. Uchegbu & Schatzlein). CRC Press, 2006.
- [8] *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines.* (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996.
- [9] O'Hagan y otros (2001) *J Virology* 75:9037-9043.
- [10] Singh y otros (2003) *Pharmaceutical Research* 20: 247-251.
- 15 [11] WO2009/132206.
- [12] US-2008/0085870.
- [13] US-2008/0057080.
- [14] US-2007/0014805.
- [15] WO2011/005799.
- 20 [16] Johanning y otros (1995) *Nucleic Acids Res* 23:1495-1501.
- [17] El Ouahabi y otros (1996) *FEBS Letts* 380:108-12.
- [18] Giuliani y otros (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103(29):10834-9.
- [19] WO2009/016515.
- [20] WO02/34771.
- 25 [21] WO2005/032582.
- [22] WO2010/119343.
- [23] WO2006/110413.
- [24] WO2005/111066.
- [25] WO2005/002619.

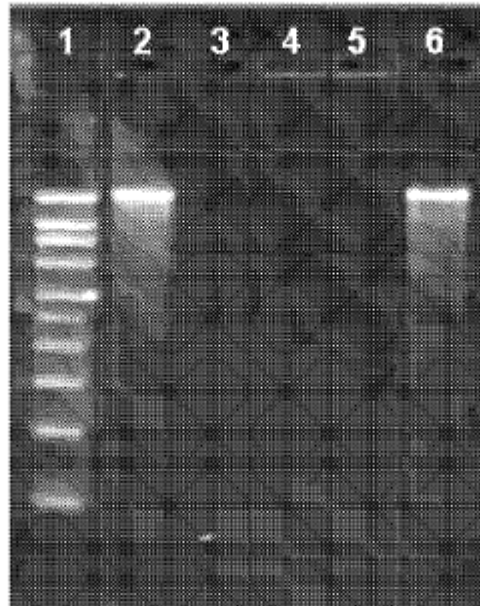
- [26] WO2006/138004.
- [27] WO2009/109860.
- [28] WO02/02606.
- [29] WO03/018054.
- 5 [30] WO2006/091517.
- [31] WO2008/020330.
- [32] WO2006/089264.
- [33] WO2009/104092.
- [34] WO2009/031043.
- 10 [35] WO2007/049155.
- [36] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ma edición, ISBN: 0683306472.
- [37] Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [38] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- 15 [39] Sambrook y otros (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [40] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [41] Ausubel y otros (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ta edición (Current Protocols).
- [42] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y otros, eds., 1998, Academic Press)
- 20 [43] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2da ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [44] Yoneyama & Fujita (2007) Cytokine & Growth Factor Reviews 18:545-51.
- [45] Maurer y otros (2001) Biophysical Journal, 80: 2310-2326.
- [46] Perri y otros (2003) J Virol 77:10394-10403.
- [47] Iavarone y otros (2011) J Immunol 186:4213-22.

**REIVINDICACIONES**

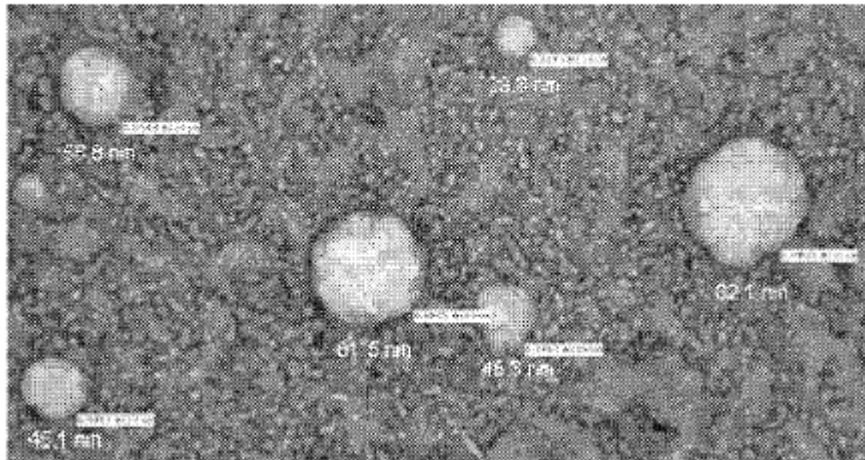
1. Un ARN autorreplicante que codifica un inmunógeno para su uso en un procedimiento para elevar una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno en un vertebrado en el que el ARN se introduce por separado tanto (a) en las células no inmunitarias en un sitio de suministro como (b) en las células inmunitarias infiltrantes, en el que dicho procedimiento comprende administrar dicho ARN que codifica un inmunógeno al sitio de suministro en el tejido del músculo esquelético en un vertebrado y después permitir que las células inmunitarias se infiltren en el sitio de suministro, con la condición de que el ARN no incluya nucleótidos modificados, a excepción de cualquier estructura de caperuza 5' opcional,
  - en el que el ARN se administra en combinación con un sistema de suministro que comprende: (i) liposomas que encapsulan el ARN; (ii) micropartículas de polímeros no tóxicos y biodegradables; y/o (iii) una emulsión catiónica submicrométrica de aceite en agua, y
  - en el que el ARN autorreplicante codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir el ARN de la molécula de ARN autorreplicante, y
  - en el que el ARN codifica un inmunógeno que puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.
2. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en el que el sistema de suministro comprende una emulsión catiónica submicrométrica de aceite en agua.
3. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN se administra por inyección, por ejemplo, en el que la inyección es por medio de una aguja.
4. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que las células no inmunitarias comprenden células musculares y/o fibroblastos.
5. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN se traduce en las células no inmunitarias.
6. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que las células inmunitarias comprenden macrófagos, células dendríticas y/o monocitos.
7. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que las células inmunitarias son positivas para TLR7.
8. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN ocasiona que las células inmunitarias secreten interferones de tipo I y/o citocinas proinflamatorias.
9. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN es de cadena + y puede traducirse en las células no inmunitarias.
10. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN puede unirse a TLR7.
11. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* contra:
  - (a) la glicoproteína F del virus sincitial respiratorio;
  - (b) un virus que infecta a los peces, tal como virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus del bagre de canal (CCV), virus de la linfocistis de los peces (FLDV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), herpesvirus de Koi, virus tipo picorna del salmón (también conocido como virus tipo picorna del salmón del Atlántico), virus del salmón encerrado (LSV), rotavirus del salmón del Atlántico (ASR), virus de la enfermedad de la frutilla de la trucha (TSD), virus del tumor de salmón coho (CSTV) y virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV);
  - (c) ortomixovirus, tal como el virus de la influenza A, B y C; o
  - (d) herpesvirus, tal como los virus del herpes simple (VHS), virus de varicela-zóster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HHV6), herpesvirus humano 7 (HHV7) y herpesvirus humano 8 (HHV8).
12. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el ARN tiene una caperuza 5'.

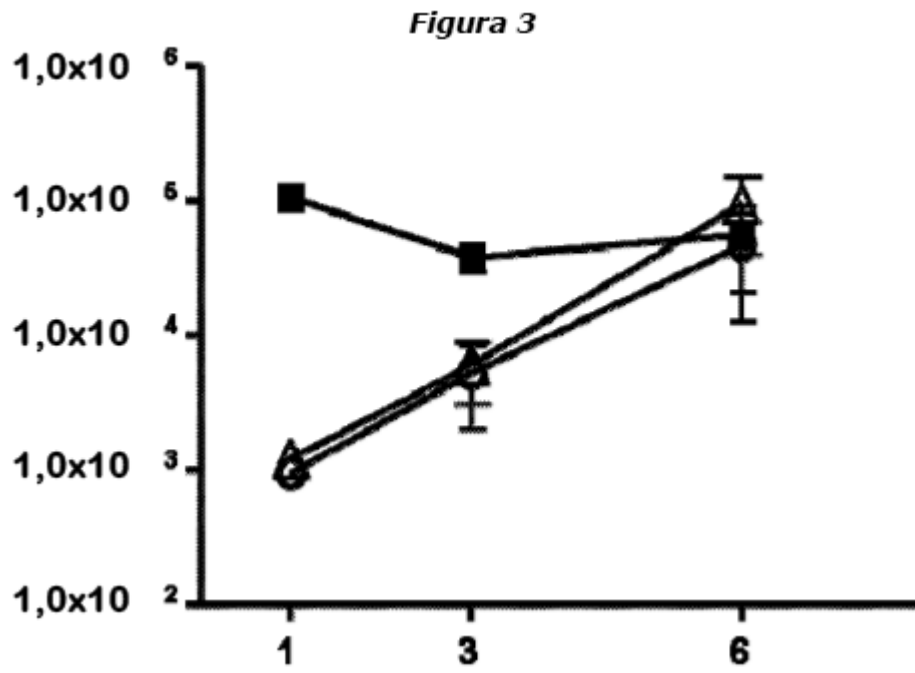
13. El ARN que codifica un inmunógeno para su uso de conformidad con la reivindicación 12, en el que la caperuza 5' incluye una 7-metilguanósina.

**Figura 1**

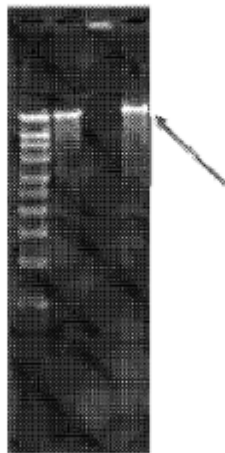


**Figura 2**

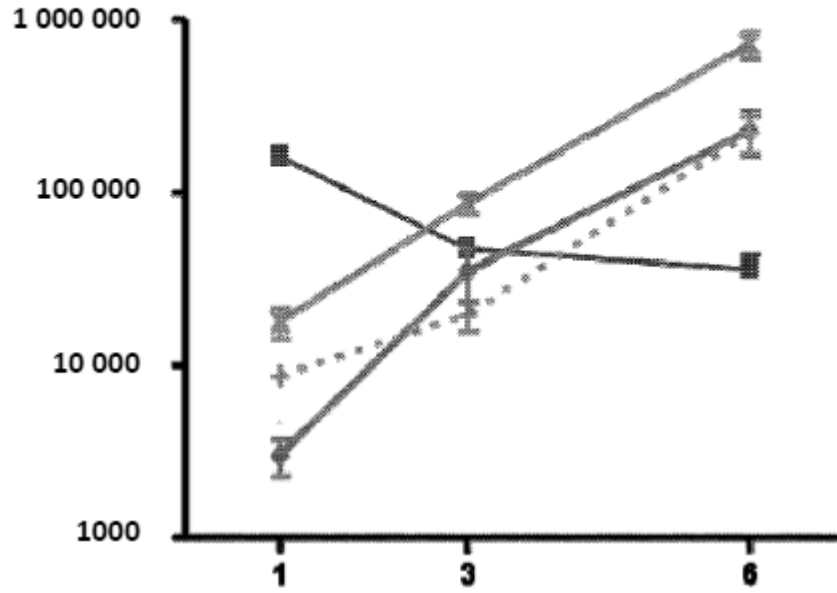




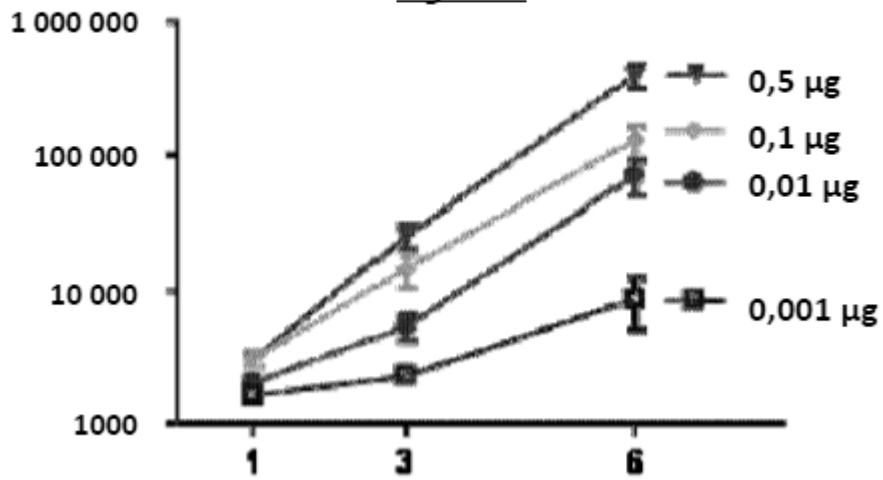
*Figura 4*

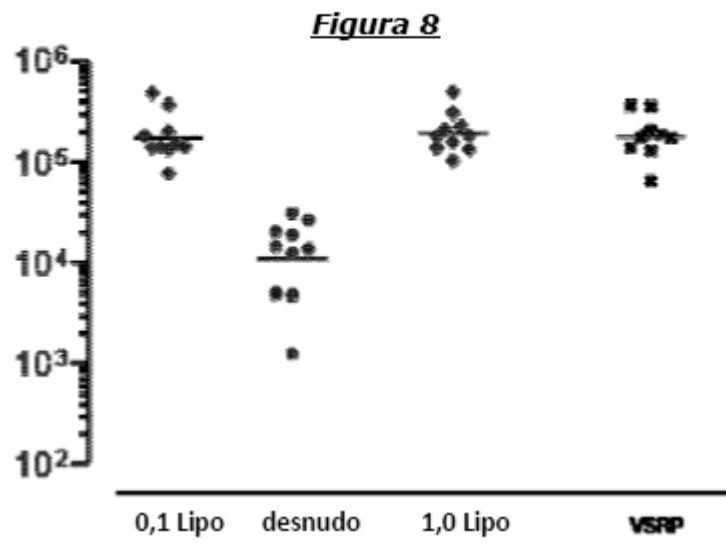
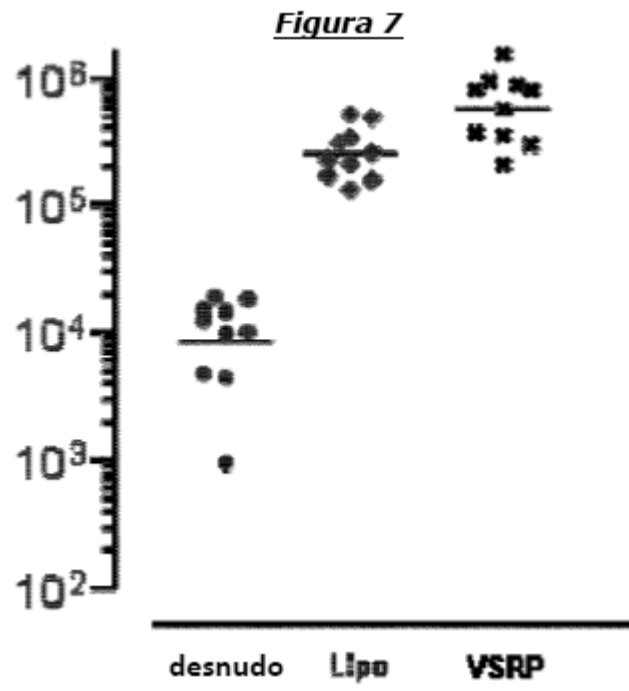


*Figura 5*



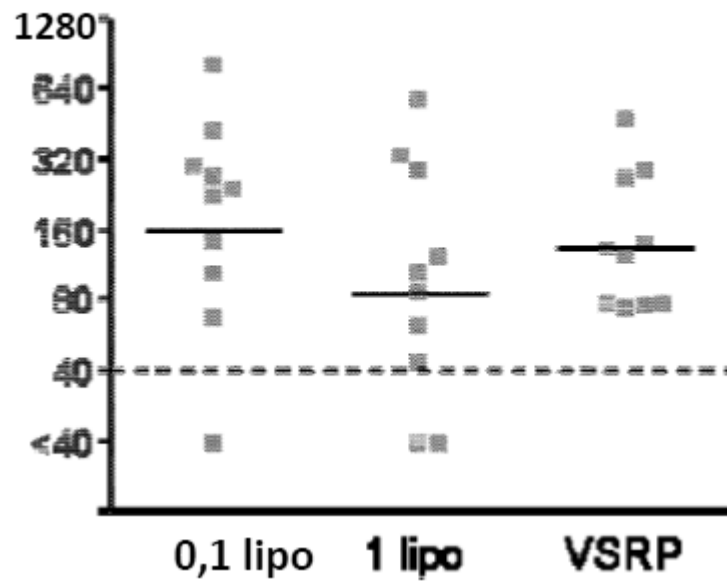
*Figura 6*



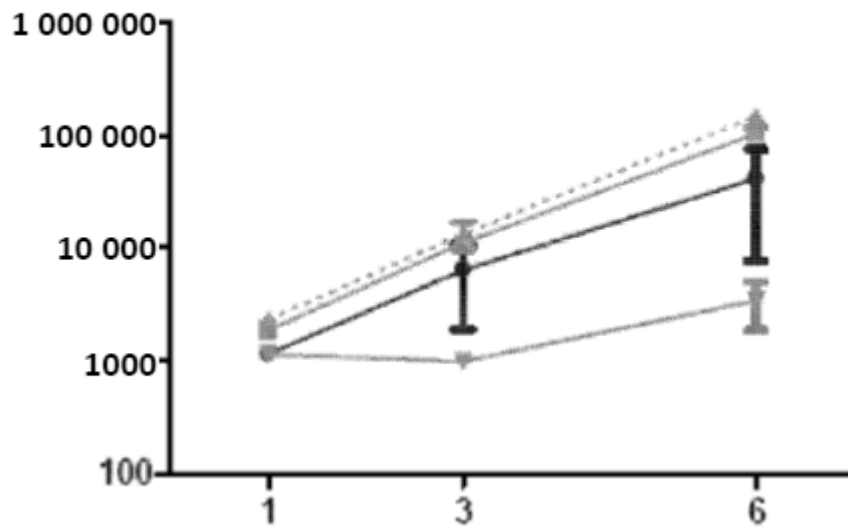




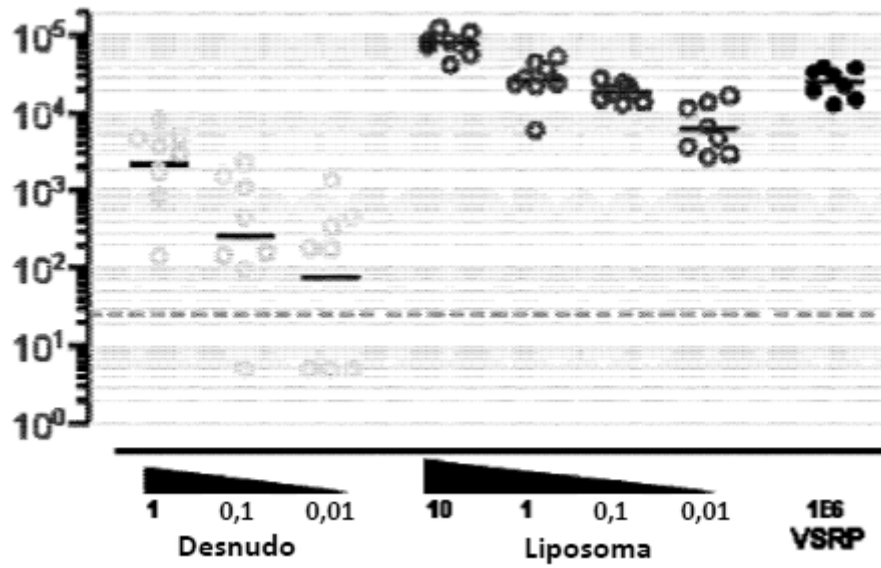
**Figura 9**



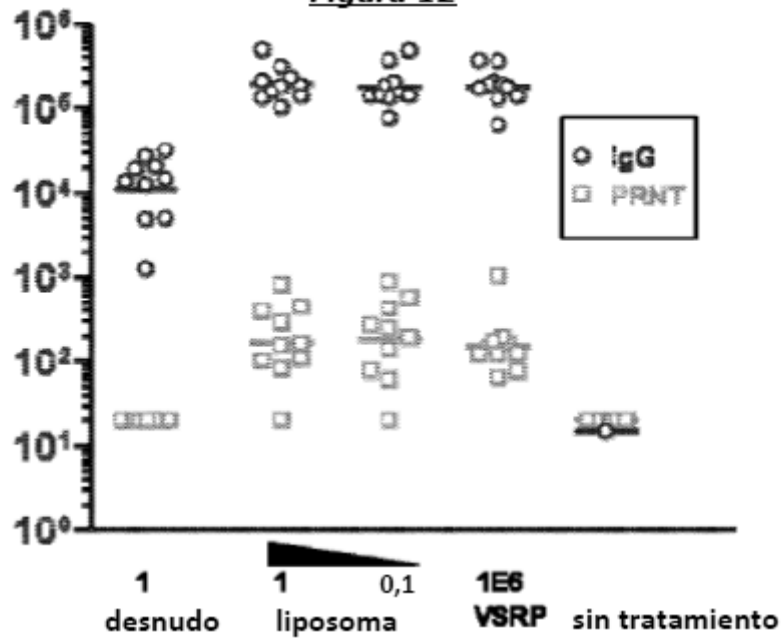
**Figura 10**



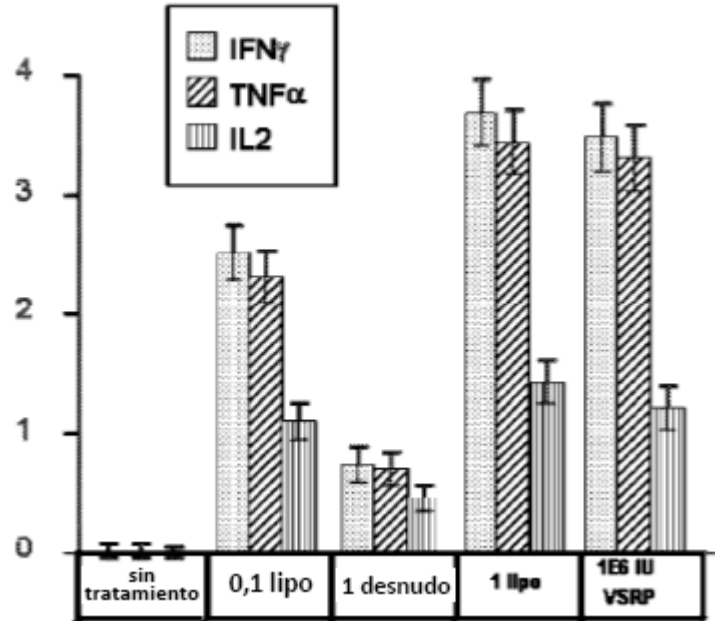
**Figura 11**



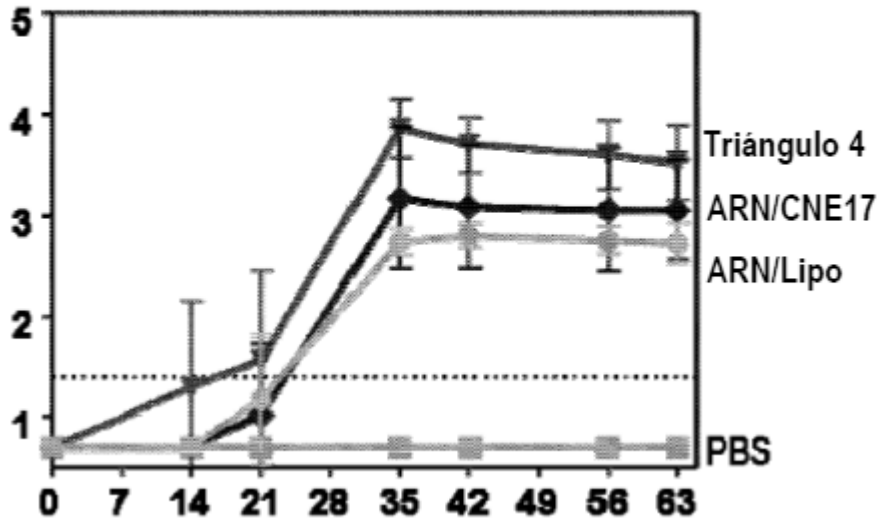
**Figura 12**



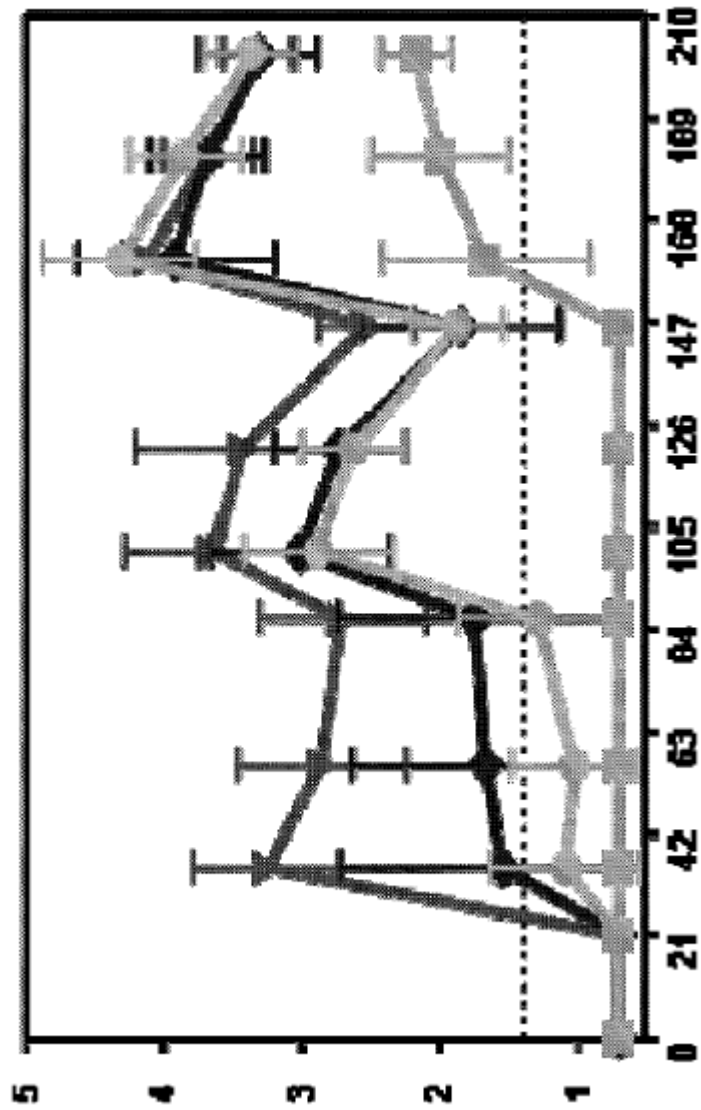
**Figura 13**



**Figura 14A**

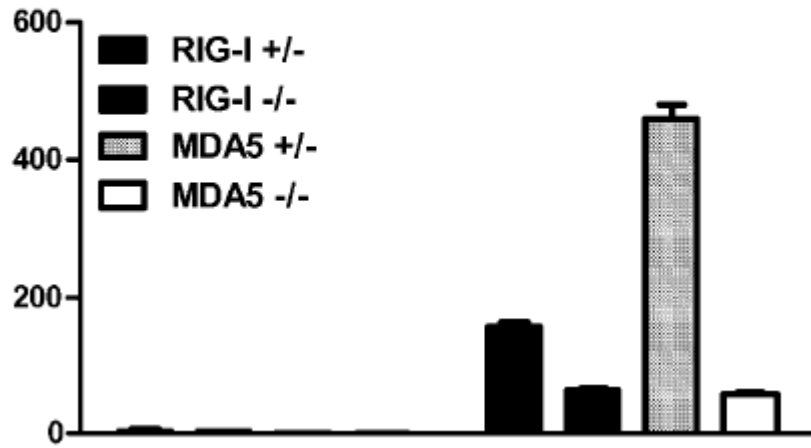


**Figura 14B**

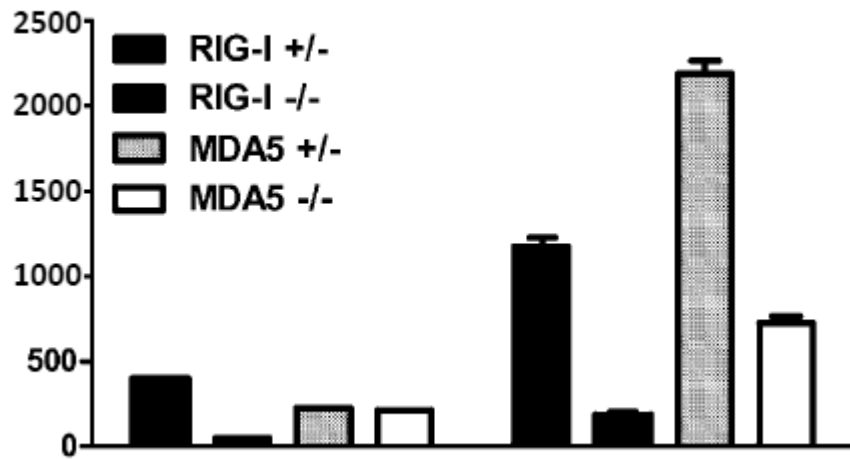


**Figura 15**

**Figura 15A**

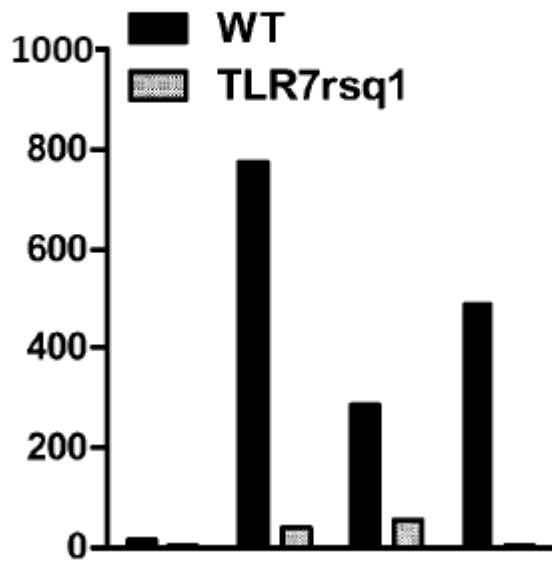


**Figura 15B**



**Figura 16**

**Figura 16A**



**Figura 16B**

