

EX6820R

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo n. 2611461

a nome di:

GlaxoSmithKline Biologicals SA

“Liposomi PEGilati per somministrare RNA codificante un immunogene”

DESCRIZIONE

La presente domanda rivendica il beneficio della domanda provvisoria U.S. numero 61/378.826, che è stata depositata il 31 agosto 2010.

CAMPO TECNICO

La presente invenzione appartiene al campo della somministrazione non virale di RNA per immunizzazione.

TECNICA DI FONDAMENTO

La somministrazione di acidi nucleici per l'immunizzazione di animali è stata un obiettivo per diversi anni. Sono stati testati vari approcci, comprendenti l'uso di DNA o RNA, di veicoli per somministrazione virali o non virali (o anche senza veicolo per somministrazione, in un vaccino "nudo"), di vettori replicanti o non replicanti, o di vettori virali o non virali.

Rimane una necessità di ulteriori e migliorati vaccini di acido nucleico e, in particolare, di modi di somministrazione migliorati di vaccini di acido nucleico.

WO 2009/086558 descrive composizioni e metodi per la somministrazione di agenti terapeutici a cellule. Le composizioni nuovi lipidi e particelle di acido nucleico-lipide che incapsulano l'acido nucleico e forniscono somministrazione dell'acido nucleico incapsulato a cellule *in vivo*.

WO 2008/103276 descrive composizioni che comprendono una molecola veicolante in combinazione con un veicolo di somministrazione e una molecola biologicamente attiva di interesse per potenziare l'attività della molecola biologicamente attiva. Viene elencato un certo numero di agenti di somministrazione comprendenti lipidi cationici.

Mockey M et al., Cancer Gene Therapy, vol. 14, n. 9, Settembre 2007, pag. 802-814, "mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes" descrivono l'uso di liposomi PEGilati come veicoli per la somministrazione di mRNA.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Secondo l'invenzione, l'immunizzazione con acido nucleico viene ottenuta somministrando RNA incapsulato

entro un liposoma. L'RNA codifica un immunogene di interesse. Il liposoma comprende un lipide PEGilato, cioè il lipide viene modificato mediante attacco covalente di un polietilenglicole. PEG fornisce ai liposomi un rivestimento che può conferire caratteristiche farmacocinetiche favorevoli, per esempio esso può aumentare la stabilità e prevenire l'adsorbimento non specifico dei liposomi. Gli inventori hanno trovato che la lunghezza del PEG può influenzare l'espressione *in vivo* di RNA incapsulato, e quindi l'invenzione usa liposomi che comprendono PEG che ha una massa molecolare media fra 1 kDa e 3 kDa. PEG con un peso molecolare inferiore (per esempio 500 o 750 Da) non forma liposomi stabili.

Quindi, l'invenzione fornisce un liposoma entro il quale viene incapsulato RNA codificante un immunogene di interesse, in cui il liposoma comprende almeno un lipide che include una parte di polietilenglicole, affinché il polietilenglicole sia presente sull'esterno del liposoma, in cui la massa molecolare media del polietilenglicole è fra 1 kDa e 3 kDa; e in cui (a) il lipide che include una parte di polietilenglicole non è PEG-DMG 2000; e/o (b) l'RNA codificante un immunogene di interesse non comprende nucleobasi modificate diverse da un cappuccio in 5' comprendente una 7'-metilguanossina, e/o una metilazione in corrispondenza della posizione 2' del ribosio dei primi 1, 2 o 3 ribonucleotidi in 5'. Questi liposomi sono adatti per la somministrazione *in vivo* dell'RNA a una cellula di vertebrato e sono quindi utili come componenti in composizioni farmaceutiche per l'immunizzazione di soggetti contro varie malattie.

Viene anche descritto in questa sede un procedimento per la preparazione di un liposoma contenente RNA, comprendente una fase di miscelazione di RNA con uno o più lipidi in condizioni tali che i lipidi formino un liposoma nel quale viene incapsulato l'RNA, in cui almeno un lipide comprende una parte di polietilenglicole che viene posizionata sull'esterno del liposoma durante il procedimento, e in cui la massa molecolare media del polietilenglicole è fra 1 kDa e 3 kDa.

Il liposoma

L'invenzione utilizza liposomi entro i quali viene incapsulato RNA codificante un immunogene. Quindi, l'RNA viene (come in un virus naturale) separato da qualsiasi mezzo esterno. È stato trovato che l'incapsulamento con il liposoma protegge l'RNA dalla digestione con RNasi. I liposomi possono includere una certa quantità di RNA

esterno (per esempio sulla loro superficie), ma almeno metà dell'RNA (e idealmente tutto) è incapsulata nel nucleo del liposoma. L'incapsulamento entro liposomi è diverso da, per esempio, i complessi di lipide/RNA descritti nel riferimento 1, in cui RNA viene miscelato con liposomi pre-formati.

Vari lipidi anfifili possono formare doppi strati in un ambiente acquoso per incapsulare un nucleo acquoso contenente RNA come un liposoma. Questi lipidi possono avere un gruppo di testa anionico, cationico o zwitterionico idrofilo. La formazione di liposomi da fosfolipidi anionici risale agli anni '60, e lipidi che formano un liposoma cationico sono stati studiati dagli anni '90. Alcuni fosfolipidi sono anionici, mentre altri sono zwitterionici e altri sono cationici. Classi adatte di fosfolipidi comprendono, ma senza essere limitate a questi, fosfatidiletanolammine, fosfatidilcoline, fosfatidilserine e fosfatidilgliceroli, e alcuni fosfolipidi utili sono elencati nella tabella 1. Lipidi cationici utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, dioleoiltrimetilammonio propano (DOTAP), 1,2-distearilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano (DSDMA), 1,2-dioleilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano (DODMA), 1,2-dilinoilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinolenilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano (DLenDMA). Lipidi zwitterionici comprendono, ma senza essere limitati a questi, lipidi acilzwitterionici e lipidi di etere zwitterionici. Esempi di lipidi zwitterionici utili sono DPPC, DOPC, DSPC, dodecilsfosfocolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) e 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPyPE). I lipidi possono essere saturi o insaturi. Si preferisce l'uso di almeno un lipide insaturo per la preparazione di liposomi. Se un lipide insaturo ha due code, entrambe le code possono essere insature, o esso può avere una coda satura e una coda insatura. Un lipide può includere un gruppo steroideo in una coda, per esempio come in RV05.

Quindi, in una realizzazione, l'invenzione fornisce un liposoma avente un doppio strato lipidico che incapsula un nucleo acquoso, in cui: (i) il doppio strato lipidico comprende almeno un lipide che include una parte di polietilenglicole, affinché il polietilenglicole sia presente sull'esterno del liposoma, in cui la massa molecolare media del polietilenglicole è fra 1 kDa e 3 kDa; e (ii) il nucleo acquoso include un RNA che codifica un immunogene; e in cui (a) il lipide che include una parte di polietilenglicole non è PEG-DMG 2000; e/o (b) l'RNA codificante un immunogene non include nucleobasi modificate diverse da un cappuccio in 5'

comprendente una 7'-metilguanossina, e/o metilazione in corrispondenza della posizione 2' del ribosio dei primi 1, 2 o 3 ribonucleotidi in 5'.

Liposomi dell'invenzione possono venire formati da un singolo lipide o da una miscela di lipidi. Una miscela può comprendere (i) una miscela di lipidi anionici, (ii) una miscela di lipidi cationici, (iii) una miscela di lipidi zwitterionici, (iv) una miscela di lipidi anionici e lipidi cationici, (v) una miscela di lipidi anionici e lipidi zwitterionici, (vi) una miscela di lipidi zwitterionici e lipidi cationici, o (vii) una miscela di lipidi anionici, lipidi cationici e lipidi zwitterionici. Analogamente, una miscela può comprendere lipidi sia saturi che insaturi. Per esempio, una miscela può comprendere DSPC (zwitterionica, satura), DlinDMA (cationico, insaturo) e/o DMG (anionica, satura). Quando viene usata una miscela di lipidi, non tutti i lipidi componenti nella miscela devono essere anfifili, per esempio uno o più lipidi anfifili possono venire miscelati con colesterolo.

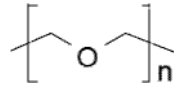
Quando un liposoma dell'invenzione viene formato da una miscela di lipidi, si preferisce che la proporzione di quei lipidi che sono PEGilati come descritto in questa sede sia minore del 10% della quantità totale di lipidi, per esempio fra lo 0,5 e il 5%, fra l'1 e il 4% o circa il 2%. Per esempio, in seguito sono mostrati liposomi utili in cui il 2% dei lipidi totali è costituito da un PEG-DMG. Il resto può essere costituito, per esempio, da colesterolo (per esempio 35-50% di colesterolo) e/o lipide cationico (per esempio 30-70%) e/o DSPC (per esempio 5-15%). Tali miscele vengono usate in seguito. Questi valori percentuali sono percentuali molari.

Quindi, un liposoma può venire formato da un lipide cationico (per esempio DlinDMA, RV05), un lipide zwitterionico (per esempio DSPC, DPyPE), un colesterolo e un lipide PEGilato. Negli esempi viene usata una miscela di DSPC, DlinDMA, PEG-DMG e colesterolo, nonché diverse altre miscele.

Almeno un lipide entro il liposoma include una parte di polietilenglicole. Liposomi che includono questi lipidi PEGilati presenteranno PEG orientato affinché sia presente su almeno l'esterno del liposoma (ma una certa quantità di PEG può anche essere esposta all'interno del liposoma, cioè il nucleo acquoso). Questo orientamento può venire ottenuto attaccando il PEG a una parte appropriata del lipide. Per esempio, in un lipide anfifilo, il PEG potrebbe venire attaccato alla testa idrofila, poiché è questa testa che si orienta verso l'esterno opposta alla parte acquosa del doppio strato lipidico. La PEGilazione in questo modo può venire ottenuta mediante attacco

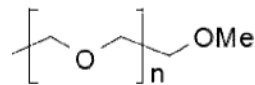
covalente di un PEG a un lipide, per esempio usando tecniche come quelle descritte nei riferimenti 2 e 3.

Quindi, i lipidi PEGilati comprenderanno la struttura di PEG:

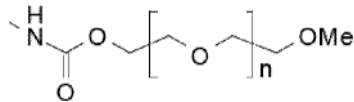


in cui n fornisce un peso molecolare per il PEG fra 1 kDa e 3 kDa, per esempio fra 23 e 68, o circa 45, per una PEGilazione da 2 kDa (vedere, per esempio, la FIGURA 16).

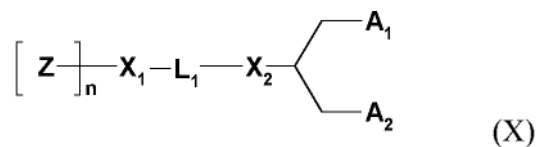
La parte di PEG può terminare con un gruppo -O-metile, e così un lipide PEGilato può comprendere:



Includendo l'attacco a un azoto nel gruppo di testa di un lipide, un lipide PEGilato utile con l'invenzione può quindi comprendere:



Un lipide PEGilato adatto per l'uso con l'invenzione è PEG-DMG, come usato negli esempi. Le FIGURE 17A fino a 17E mostrano ulteriori lipidi PEGilati utili. Può anche venire usato colesterolo PEGilato. Possono venire usati altri lipidi PEGilati, per esempio lipidi di formula (X):



in cui:

Z è un componente del gruppo di testa idrofilo scelto da PEG e polimeri basati su poli(ossazolina), poli(ossido di etilene), poli(alcool vinilico), poli(glicerolo), poli(N-vinilpirrolidone), poli[N-(2-idrossipropil)metacrilammide] e poli(amminoacidi), in cui il polimero può essere lineare o ramificato, e in cui il polimero può essere opzionalmente sostituito;

Z viene polimerizzato mediante n subunità;

n è un grado di polimerizzazione medio numerico fra 10 e 200 unità di Z (e può venire ottimizzato per differenti gruppi Z);

L_1 è un legante di C_{1-10} alchilene o C_{1-10} eteroalchilene opzionalmente sostituito comprendente zero, uno o due di un etere (per esempio -O-), estere (per esempio -C(O)O-), succinato (per esempio -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbammato (per esempio -OC(O)-NR'-), carbonato (per esempio -OC(O)O-), urea (per esempio -NRC(O)NR'-), ammina (per esempio -NR'-), ammidi (per esempio -C(O)NR'-), immina (per esempio -C(NR')-), tioetere (per esempio -S-), xantato (per esempio -OC(S)S-) e fosfodiesteri (per esempio -OP(O)₂O-), in cui R' viene scelto indipendentemente da -H, -NH-, -NH₂, -O-, -S-, un fosfato o un C_{1-10} alchilene opzionalmente sostituito;

X_1 e X_2 vengono scelti indipendentemente da un carbonio o un eteroatomo scelto da -NH-, -O-, -S-, o un fosfato;

A_1 e A_2 vengono scelti indipendentemente da un C_{6-30} alchile, C_{6-30} alchenile e C_{6-30} alchinile, in cui A_1 e A_2 possono essere uguali o diversi, o A_1 e A_2 , insieme con l'atomo di carbonio al quale sono attaccati, formano uno steroide opzionalmente sostituito.

Un liposoma dell'invenzione includerà tipicamente un gran numero di parti di PEG, che possono essere uguali o diverse. La massa molecolare media del PEG in un liposoma dell'invenzione è fra 1 kDa e 3 kDa, per esempio fra 1,5 e 2,5 kDa, fra 1,7 e 2,3 kDa, fra 1,8 e 2,2 kDa, fra 1,9 e 2,1 kDa, o 2 kDa. Quindi, il PEG può essere un PEG che è comunemente noto come "PEG 2000" o "PEG 2k", sebbene possano anche venire usati "PEG 1000" più corto e "PEG 3000" più lungo.

Il PEG comprenderà usualmente catene polimeriche lineari ma, in alcune realizzazioni, il PEG può comprendere catene polimeriche ramificate.

È anche possibile per una singola molecola di lipide includere più di un gruppo di PEG, per esempio attaccati a differenti atomi di carbonio nel gruppo di testa di un lipide (vedere, per esempio, la FIGURA 18). In queste circostanze, il riferimento alla massa molecolare del PEG in un liposoma è la massa molecolare per molecola di lipide anziché per sostituente di PEG. Quindi, in un liposoma in cui il solo lipide PEGilato ha la struttura mostrata nella FIGURA 18, in cui il peso molecolare riquadrato è 2 kDa ed è costituito da due catene di 1 kDa ciascuna, la massa molecolare media del PEG è 2 kDa, non 1 kDa.

In alcune realizzazioni, il PEG può essere un PEG sostituito, per esempio in cui uno o più atomi di carbonio nel polimero sono sostituiti da uno o più gruppi alchile, alcossi, acile o arile.

In alcune realizzazioni, il PEG può includere gruppi di copolimero, per esempio uno o più monomeri di propilene, per formare un polimero di PEG e polipropilene.

Per quanto riguarda una alternativa alla PEGilazione, un lipide può venire modificato mediante attacco covalente di una parte diversa da PEG. Per esempio, in alcune realizzazioni, un lipide può includere un polifosfazene. In alcune realizzazioni, un lipide può includere un poli(vinilpirrolidone). In alcune realizzazioni, un lipide può includere una poli(acrilammide). In alcune realizzazioni, un lipide può includere una poli(2-metil-2-ossazolina). In alcune realizzazioni, un lipide può includere una poli(2-etil-2-ossazolina). In alcune realizzazioni, un lipide può includere un fosfatidilpoliglicerolo. In alcune realizzazioni, un lipide può includere una poli[N-(2-idrossipropil)metacrilammide]. In alcune realizzazioni, un lipide può includere un polimero di polialchilenetere diverso da PEG.

I liposomi vengono solitamente suddivisi in tre gruppi: vescicole multilamellari (MLV); vescicole unilamellari piccole (SUV); e vescicole unilamellari grandi (LUV). MLV hanno doppi strati multipli in ciascuna vescicola, che formano vari compartimenti acquosi separati. SUV e LUV hanno un doppio strato singolo che incapsula un nucleo acquoso; SUV hanno tipicamente un diametro ≤ 50 nm, e LUV hanno un diametro > 50 nm. I liposomi dell'invenzione sono idealmente LUV con un diametro nell'intervallo di 60-180 nm, e preferibilmente nell'intervallo di 80-160 nm.

Un liposoma dell'invenzione può fare parte di una composizione comprendente una pluralità di liposomi, e i liposomi entro la pluralità possono avere un intervallo di diametri. Per una composizione comprendente una popolazione di liposomi con diametri differenti: (i) almeno l'80% in numero dei liposomi deve avere diametri nell'intervallo di 60-180 nm, e preferibilmente nell'intervallo di 80-160 nm, e/o (ii) il diametro medio (mediante intensità, per esempio Z medio) della popolazione è idealmente nell'intervallo di 60-180 nm, e preferibilmente nell'intervallo di 80-160 nm. I diametri entro la pluralità devono avere idealmente un indice di polidispersità $< 0,2$. Si prevede che i complessi di liposoma/RNA del riferimento 1 abbiano un diametro nell'intervallo di 600-800 nm e abbiano una alta polidispersità.

Tecniche per la preparazione di liposomi adatti sono ben note nella tecnica, vedere per esempio i riferimenti 4

fino a 6. Un metodo utile viene descritto nel riferimento 7 e comporta miscelazione di (i) una soluzione etanolica dei lipidi, (ii) una soluzione acquosa dell'acido nucleico, e (iii) tampone, facendo seguire miscelazione, bilanciamento, diluizione e purificazione. Liposomi preferiti dell'invenzione sono ottenibili mediante questo procedimento di miscelazione.

Per ottenere liposomi con il diametro(i) desiderato, la miscelazione può venire eseguita usando un procedimento in cui due flussi di alimentazione di soluzione di RNA acquosa vengono combinati in una singola zona di miscelazione con un flusso di una soluzione di lipide etanolica, tutti alla stessa portata, per esempio in un canale microfluidico come descritto in seguito.

L'RNA

I liposomi dell'invenzione includono una molecola di RNA che (diversamente da siRNA, come nel riferimento 2) codifica un immunogene, in cui l'RNA che codifica un immunogene di interesse non include nucleobasi modificate diverse da un cappuccio in 5' comprendente una 7'-metilguanosina, e/o metilazione in corrispondenza della posizione 2' del ribosio dei primi 1, 2 o 3 ribonucleotidi in 5'. Dopo somministrazione *in vivo* delle particelle, l'RNA viene rilasciato dalle particelle e viene tradotto all'interno di una cellula per fornire l'immunogene *in situ*.

L'RNA è a filamento positivo, e quindi può venire tradotto mediante le cellule senza necessità di qualsiasi fase di replicazione interposta come trascrizione inversa. Esso può anche legarsi a recettori TLR7 espressi mediante cellule immunitarie, iniziando così un effetto adiuvante.

RNA a filamento positivo preferiti sono auto-replicanti. Una molecola di RNA auto-replicante (replicone) può, quando somministrata a una cellula di vertebrato anche senza alcuna proteina, portare alla produzione di più RNA figli mediante trascrizione da se stessa (tramite una copia antisense che viene generata da se stessa). Una molecola di RNA auto-replicante è quindi tipicamente una molecola a filamento positivo che può venire tradotta direttamente dopo somministrazione a una cellula, e questa traduzione fornisce una RNA polimerasi dipendente da RNA che produce quindi entrambi i trascritti antisense e senso dall'RNA somministrato. Quindi, l'RNA somministrato porta alla produzione di più RNA figli. Questi RNA figli, nonché trascritti subgenomici collineari,

possono essi stessi venire tradotti per fornire espressione *in situ* di un immunogene codificato, o possono venire trascritti per fornire ulteriori trascritti con lo stesso senso dell'RNA somministrato che vengono tradotti per fornire espressione *in situ* dell'immunogene. Il risultato globale di questa sequenza di trascrizioni è una enorme amplificazione nel numero di RNA repliconi introdotti, e quindi l'immunogene codificato diventa un prodotto polipeptidico principale delle cellule.

Un sistema adatto per ottenere auto-replicazione consiste nell'usare un RNA replicone basato su alfavirus. Questi repliconi a filamento positivo vengono tradotti dopo somministrazione a una cellula per fornire una replicasi (o replicasi-trascriptasi). La replicasi viene tradotta come una poliproteina che si auto-scinde per fornire un complesso di replicazione che crea copie genomiche a filamento negativo dell'RNA somministrato a filamento positivo. Questi trascritti a filamento negativo possono essi stessi venire trascritti per fornire ulteriori copie dell'RNA progenitore a filamento positivo, e fornire anche un trascritto subgenomico che codifica l'immunogene. La traduzione del trascritto subgenomico porta quindi a espressione *in situ* dell'immunogene mediante la cellula infettata. Repliconi di alfavirus adatti possono usare una replicasi ottenuta da un virus Sindbis, un virus Semliki Forest, un virus dell'encefalite equina orientale, un virus dell'encefalite equina venezuelana, ecc. Possono venire usate sequenze di virus mutanti o di tipo selvatico, per esempio il mutante TC83 attenuato di VEEV è stato usato in repliconi [8].

Una molecola di RNA auto-replicante preferita codifica quindi (i) una RNA polimerasi dipendente da RNA che può trascrivere RNA dalla molecola di RNA auto-replicante, e (ii) un immunogene. La polimerasi può essere una replicasi di alfavirus, comprendente per esempio una o più proteine di alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4.

Mentre genomi di alfavirus naturali codificano proteine del virione strutturali oltre alla poliproteina replicasi non strutturale, si preferisce che una molecola di RNA auto-replicante dell'invenzione non codifichi proteine strutturali di alfavirus. Quindi, un RNA auto-replicante preferito può portare alla produzione di copie di RNA genomico di se stesso in una cellula, ma non alla produzione di virioni contenenti RNA. L'incapacità di produrre questi virioni indica che, diversamente da un alfavirus di tipo selvatico, la molecola di RNA auto-replicante non può perpetuare se stessa in forma infettiva. Le proteine strutturali di alfavirus che sono necessarie per la

perpetuazione in virus di tipo selvatico sono assenti dagli RNA auto-replicanti dell'invenzione, e il loro posto viene preso da un gene(i) codificante l'immunogene di interesse, affinché il trascritto subgenomico codifichi l'immunogene anziché le proteine del virione di alfavirus strutturali.

Quindi, una molecola di RNA auto-replicante utile con l'invenzione può avere due griglie di lettura aperta. La prima griglia di lettura aperta (5') codifica una replicasi; la seconda griglia di lettura aperta (3') codifica un immunogene. In alcune realizzazioni, l'RNA può avere ulteriori griglie di lettura aperta (per esempio a valle), per esempio per codificare ulteriori immunogeni (vedere in seguito) o per codificare polipeptidi accessori.

Una molecola di RNA auto-replicante può avere una sequenza in 5' che è compatibile con la replicasi codificata. Molecole di RNA auto-replicanti possono avere varie lunghezze, ma esse sono tipicamente lunghe 5.000-25.000 nucleotidi, per esempio 8.000-15.000 nucleotidi, o 9.000-12.000 nucleotidi. Quindi, l'RNA è più lungo di quanto osservato nella somministrazione di siRNA.

Una molecola di RNA utile con l'invenzione può avere un cappuccio in 5' (per esempio una 7-metilguanosina). Questo cappuccio può potenziare la traduzione *in vivo* dell'RNA.

Il nucleotide in 5' di una molecola di RNA utile con l'invenzione può avere un gruppo trifosfato in 5'. In un RNA con cappuccio, questo può essere legato a una 7-metilguanosina tramite un ponte da 5' a 5'. Un trifosfato in 5' può potenziare il legame di RIG-I e quindi promuovere effetti adiuvanti.

Una molecola di RNA può avere una coda di poli-A in 3'. Essa può anche includere una sequenza di riconoscimento della polimerasi poli-A (per esempio AAUAAA) vicino alla sua estremità 3'.

Una molecola di RNA utile con l'invenzione sarà tipicamente a filamento singolo. RNA a filamento singolo possono generalmente iniziare un effetto adiuvante legandosi a TLR7, TLR8, RNA elicasi e/o PKR. RNA somministrato in forma a doppio filamento (dsRNA) può legarsi a TLR3, e questo recettore può anche venire innescato mediante dsRNA che viene formato durante la replicazione di un RNA a filamento singolo o entro la struttura secondaria di un RNA a filamento singolo.

Una molecola di RNA utile con l'invenzione può convenientemente venire preparata mediante trascrizione *in vitro* (IVT). IVT può usare uno stampo (cDNA) creato e propagato in forma di plasmide in batteri, o creato

sinteticamente (per esempio mediante metodi di ingegnerizzazione di sintesi genica e/o reazione a catena della polimerasi (PCR)). Per esempio, una RNA polimerasi dipendente da DNA (come le RNA polimerasi di batteriofago T7, T3 o SP6) può venire usata per trascrivere l'RNA da uno stampo di DNA. Reazioni di formazione di un cappuccio e aggiunta di poli-A appropriate possono venire usate quando richiesto (sebbene la poli-A di un replicone venga solitamente codificata entro lo stampo di DNA). Queste RNA polimerasi possono avere richieste stringenti per il nucleotide(i) in 5' trascritto e, in alcune realizzazioni, queste richieste devono venire fatte combaciare con le richieste della replicasi codificata, per assicurare che l'RNA trascritto con IVT possa funzionare efficientemente come un substrato per la replicasi codificata da se stesso.

Come indicato nella rivendicazione 1, l'RNA codificante un immunogene di interesse non include nucleobasi modificate diverse da un cappuccio in 5' comprendente una 7'-metilguanossina, e/o metilazione in corrispondenza della posizione 2' del ribosio dei primi 1, 2 o 3 ribonucleotidi in 5'.

Come descritto nel riferimento 9 più in generale, un RNA auto-replicante può includere (oltre a qualsiasi struttura di cappuccio in 5') uno o più nucleotidi aventi una nucleobase modificata. Quindi, l'RNA può comprendere m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina); m2A (2-metiladenosina); Am (2'-O-metiladenosina); ms2m6A (2-metiltio-N6-metiladenosina); i6A (N6-isopenteniladenosina); ms2i6A (2-metiltio-N6-isopenteniladenosina); io6A (N6-(cis-idrossiisopentenil)adenosina); ms2io6A (2-metiltio-N6-(cis-idrossiisopentenil)adenosina); g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina); t6A (N6-treonilcarbamoiladenosina); ms2t6A (2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina); m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina); hn6A (N6-idrossinorvalilcarbamoiladenosina); ms2hn6A (2-metiltio-N6-idrossinorvalilcarbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m1I (1-metilinosina); m'Im (1,2'-O-dimetilinosina); m3C (3-metilcitidina); Cm (2T-O-metilcitidina); s2C (2-tiocitidina); ac4C (N4-acetilcitidina); f5C (5-fonnilcitidina); m5Cm (5,2-O-dimetilcitidina); ac4Cm (N4acetil2TOMETILcitidina); k2C (lisidina); m1G (1-metilguanossina); m2G (N2-metilguanossina); m7G (7-metilguanossina); Gm (2'-O-metilguanossina); m22G (N2,N2-dimetilguanossina); m2Gm (N2,2'-O-dimetilguanossina); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanossina); Gr(p) (2'-O-

ribosilguanosina (fosfato)); yW (wibutosina); o2yW (perossiwibutosina); OHyW (idrossiwibutosina); OHyW* (idrossiwibutosina sottomodificata); imG (wiosina); mimG (metilguanosina); Q (queuosina); oQ (epossiqueuosina); galQ (galtattosilqueuosina); manQ (mannosil-queuosina); preQo (7-ciano-7-deazaguanosina); preQi (7-amminometil-7-deazaguanosina); G* (arcaeosina); D (diidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp3U (3-(3-ammino-3-carbossipropil)uridina); ho5U (5-idrossiuridina); mo5U (5-metossiuridina); cmo5U (acido uridin-5-ossiacetico); mcmo5U (estere metilico dell'acido uridin-5-ossiacetico); chm5U (5-(carbossiidrossimetil)uridina); mchm5U (estere metilico di 5-(carbossiidrossimetil)uridina); mcm5U (5-metossicarbonilmetiluridina); mcm5Um (S-metossicarbonilmetil-2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metossicarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-amminometil-2-tiouridina); mnm5U (5-metilamminometiluridina); mnm5s2U (5-metilamminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metilamminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetiluridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carbossimetilamminometiluridina); cnmm5Um (5-carbossimetilamminometil-2-L-O-metiluridina); cmnm5s2U (5-carbossimetilamminometil-2-tiouridina); m62A (N6,N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitidina); m4Cm (N4,2-O-dimetilcitidina); hm5C (5-idrossimetilcitidina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carbossimetiluridina); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosina); rn62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosina); m2'2'7G (N2,N2,7-trimetilguanosina); m3Um (3,2T-O-dimetiluridina); m5D (5-metildiidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m1Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m'Am (1,2-O-dimetiladenosina) irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina)); imG-14 (4-demetilguanosina); imG2 (isoguanosina); o ac6A (N6-acetiladenosina), ipoxantina, inosina, 8-osso-adenina, suoi derivati 7-sostituiti, diidrouracile, pseudouracile, 2-tiouracile, 4-tiouracile, 5-amminouracile, 5-(C1-C6)-alchiluracile, 5-metiluracile, 5-(C2-C6)-alcheniluracile, 5-(C2-C6)-alchiluracile, 5-(idrossimetil)uracile, 5-clorouracile, 5-fluorouracile, 5-bromouracile, 5-idrossicitosina, 5-(C1-C6)-alchilcitosina, 5-metilcitosina, 5-(C2-C6)-alchenilcitosina, 5-(C2-C6)-alchilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 7-deazaguanina, 8-azaguanina, guanina 7-deaza-7-sostituita, 7-deaza-7-(C2-C6)alchilguanina, guanina 7-deaza-8-sostituita, 8-idrossiguanina, 6-

tioguanina, 8-ossoguanina, 2-amminopurina, 2-ammino-6-cloropurina, 2,4-diamminopurina, 2,6-diamminopurina, 8-azapurina, 7-deazapurina sostituita, purina 7-deaza-7-sostituita, purina 7-deaza-8-sostituita, o un nucleotide abasico. Per esempio, un RNA auto-replicante può includere una o più nucleobasi di pirimidina modificate, come residui di pseudouridina e/o 5-metilcitosina. In alcuni casi, tuttavia, l'RNA non include nucleobasi modificate, e può non includere nucleotidi modificati, cioè tutti dei nucleotidi nell'RNA sono ribonucleotidi A, C, G e U standard (ad eccezione di qualsiasi struttura a cappuccio in 5', che può includere una 7'-metilguanosina). Un RNA usato con l'invenzione idealmente include solo legami di fosfodiesteri fra nucleosidi ma, in alcune realizzazioni, esso può contenere legami di fosforammidato, fosforotioato e/o metilfosfonato.

Idealmente, un liposoma include meno di 10 differenti specie di RNA, per esempio 5, 4, 3 o 2 differenti specie; molto preferibilmente, un liposoma include una singola specie di RNA, cioè tutte le molecole di RNA nel liposoma hanno la stessa sequenza e la stessa lunghezza.

La quantità di RNA per liposoma può variare. Il numero di singole molecole di RNA auto-replicanti per liposoma è tipicamente ≤ 50 , per esempio < 20 , < 10 , < 5 o 1-4 per liposoma.

L'immunogene

Le molecole di RNA usate con l'invenzione codificano un immunogene polipeptidico. Dopo somministrazione dei liposomi, l'RNA viene tradotto *in vivo* e l'immunogene può stimolare una risposta immunitaria nel ricevente. L'immunogene può stimolare una risposta immunitaria contro un batterio, un virus, un fungo o un parassita (o, in alcune realizzazioni, contro un allergene; e, in altre realizzazioni, contro un antigene tumorale). La risposta immunitaria può comprendere una risposta anticorpale (comprendente solitamente IgG) e/o una risposta immunitaria mediata da cellule. L'immunogene polipeptidico stimolerà tipicamente una risposta immunitaria che riconosce il polipeptide batterico, virale, micotico o di parassita (o di allergene o tumorale) corrispondente ma, in alcune realizzazioni, il polipeptide può agire come un mimotopo per stimolare una risposta immunitaria che riconosce un saccaride batterico, virale, micotico o di parassita. L'immunogene sarà tipicamente un polipeptide superficiale, per esempio una adesina, una emagglutinina, una glicoproteina dell'involucro, una glicoproteina

spike, ecc.

La molecola di RNA può codificare un singolo immunogene polipeptidico o più polipeptidi. Immunogeni multipli possono venire presentati come un singolo immunogene polipeptidico (polipeptide di fusione) o come polipeptidi separati. Se immunogeni vengono espressi come polipeptidi separati da un replicone, uno o più di questi possono quindi venire forniti con una IRES a monte o un elemento promotore virale addizionale. In alternativa, immunogeni multipli possono venire espressi da una poliproteina che codifica singoli immunogeni fusi a una corta proteasi autocatalitica (per esempio proteina 2A del virus dell'afta epizootica), o come inteine.

Diversamente dai riferimenti 1 e 10, l'RNA codifica un immunogene. A scanso di dubbi, l'invenzione non comprende RNA che codifica una luciferasi di lucciola, o che codifica una proteina di fusione di β -galattosidasi di *E. coli*, o che codifica una proteina fluorescente verde (GFP). Tali polipeptidi possono essere utili come marcatori, o anche in un contesto di terapia genica, ma l'invenzione si riferisce alla somministrazione di RNA per stimolare un sistema di risposta immunologica. Quindi, anche l'immunogene non è una proteina stessa che viene somministrata per attivare o sostituire una proteina ospite difettosa (come in terapia genica). Inoltre, l'RNA non è RNA di timo di topo totale.

In alcune realizzazioni, l'immunogene stimola una risposta immunitaria contro uno di questi batteri:

Neisseria meningitidis: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, proteine della membrana come adesine, auto-trasportatori, tossine, proteine di acquisizione del ferro e proteina legante il fattore H. Una combinazione di tre polipeptidi utili è descritta nel riferimento 11.

Streptococcus pneumoniae: immunogeni polipeptidici utili sono descritti nel riferimento 12. Questi comprendono, ma senza essere limitati a questi, la subunità del pilo RrgB, il precursore di beta-N-acetil-esosamminidasi (spr0057), spr0096, proteina da stress generale GSP-781 (spr2021, SP2216), serina/treonina chinasi StkP (SP1732) e adesina superficiale pneumococcica PsaA.

Streptococcus pyogenes: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, i polipeptidi descritti nei riferimenti 13 e 14.

Moraxella catarrhalis.

Bordetella pertussis: immunogeni della pertosse utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, tossina o tossoide della pertosse (PT), emagglutinina filamentosa (FHA), pertactina e agglutinosi 2 e 3.

Staphylococcus aureus: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, i polipeptidi descritti nel riferimento 15, come una emolisina, *esxA*, *esxB*, proteina legante ferricromo (*sta006*) e/o la lipoproteina *sta011*.

Clostridium tetani: l'immunogene tipico è tossoide del tetano.

Corynebacterium diphtheriae: l'immunogene tipico è tossoide della difterite.

Haemophilus influenzae: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, i polipeptidi descritti nei riferimenti 16 e 17.

Pseudomonas aeruginosa

Streptococcus agalactiae: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, i polipeptidi descritti nel riferimento 13.

Chlamydia trachomatis: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, *PepA*, *LcrE*, *ArtJ*, *DnaK*, *CT398*, tipo *OmpH*, *L7/L12*, *OmcA*, *AtoS*, *CT547*, *Eno*, *HtrA* e *MurG* (per esempio come descritto nel riferimento 18. *LcrE* [19] e *HtrA* [20] sono due immunogeni preferiti.

Chlamydia pneumoniae: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, i polipeptidi descritti nel riferimento 21.

Helicobacter pylori: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, *CagA*, *VacA*, *NAP* e/o ureasi [22].

Escherichia coli: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, immunogeni derivati da *E. coli* enterotossigenico (ETEC), *E. coli* enteroaggregativo (EA_gEC), *E. coli* che aderisce in modo diffuso (DAEC), *E. coli* enteropatogenico (EPEC), *E. coli* patogenico extraintestinale (ExPEC) e/o *E. coli* enteroemorragico (EHEC). Ceppi di ExPEC includono *E. coli* uropatogenico (UPEC) ed *E. coli* associato a meningite/sepsi (MNEC). Immunogeni polipeptidici di UPEC utili sono descritti nei riferimenti 23 e 24. Immunogeni di MNEC utili sono descritti nel riferimento 25. Un immunogene utile per vari tipi di *E. coli* è

AcfD [26].

Bacillus anthracis

Yersinia pestis: immunogeni utili comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli descritti nei riferimenti 27 e 28.

Staphylococcus epidermis

Clostridium perfringens o *Clostridium botulinums*

Legionella pneumophila

Coxiella burnetii

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

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

Neisseria gonorrhoeae

Treponema pallidum

Haemophilus ducreyi

Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*

Staphylococcus saprophyticus

Yersinia enterocolitica

Mycobacterium tuberculosis

Rickettsia

Listeria monocytogenes

Vibrio cholerae

Salmonella typhi

Borrelia burgdorferi

Porphyromonas gingivalis

Klebsiella

In alcune realizzazioni, l'immunogene stimola una risposta immunitaria contro uno di questi virus:

Orthomyxovirus: immunogeni utili possono derivare da un virus dell'influenza A, B o C, come le proteine emagglutinina, neuramminidasi o M2 della matrice. Quando l'immunogene è una emagglutinina del virus dell'influenza A, essa può venire ottenuta da qualsiasi sottotipo, per esempio H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

Virus dei *paramyxoviridae*: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da Pneumovirus (per esempio virus sinciziale respiratorio, RSV), Rubulavirus (per esempio virus della parotite), Paramyxovirus (per esempio virus della parainfluenza), Metapneumovirus e Morbillivirus (per esempio virus del morbillo).

Poxviridae: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da *Orthopoxvirus* come *Variola vera* comprendente, ma senza essere limitato a questi, *Variola major* e *Variola minor*.

Picornavirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da Picornavirus come Enterovirus, Rhinovirus, Heparnavirus, Cardiovirus e Aphthovirus. In una realizzazione, l'enterovirus è un poliovirus, per esempio un poliovirus di tipo 1, tipo 2 e/o tipo 3. In un'altra realizzazione, l'enterovirus è un enterovirus EV71. In un'altra realizzazione, l'enterovirus è un virus coxsackie A o B.

Bunyavirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un *Orthobunyavirus*, come virus dell'encefalite della California, un *Phlebovirus*, come virus della febbre della Rift Valley, o un *Nairovirus*, come virus della *febbre emorragica della Crimea-Congo*.

Heparnavirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un Heparnavirus come virus dell'epatite A (HAV).

Filovirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un filovirus come un virus Ebola (compreso un virus Ebola dello Zaire, Costa d'Avorio, Reston o Sudan) o un virus Marburg.

Togavirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un Togavirus come un Rubivirus, un Alphavirus o un Arterivirus. Questo comprende il virus della rosolia.

Flavivirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un Flavivirus come virus dell'encefalite portata da zecche (TBE), virus Dengue (tipi 1, 2, 3 o 4), virus della febbre gialla, virus

dell'encefalite giapponese, virus Kyasanur Forest, virus dell'encefalite del Nilo occidentale, virus dell'encefalite di St. Louis, virus dell'encefalite russa primaverile-estiva, virus dell'encefalite Powassan.

Pestivirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un Pestivirus come diarrea virale bovina (BVDV), febbre suina classica (CSFV) o pestivirus ovina (BDV).

Hepadnavirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un Hepadnavirus come virus dell'epatite B. Una composizione può includere antigene superficiale del virus dell'epatite B (HBsAg).

Altri virus dell'epatite: una composizione può includere un immunogene derivato da un virus dell'epatite C, virus dell'epatite delta, virus dell'epatite E o virus dell'epatite G.

Rhabdovirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un Rhabdovirus come un Lyssavirus (per esempio un virus della rabbia) e Vesiculovirus (VSV).

Caliciviridae: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da Caliciviridae come virus Norwalk (Norovirus) e virus tipo Norwalk, come virus Hawaii e virus Snow Mountain.

Coronavirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un coronavirus SARS, bronchite infettiva aviaria (IBV), virus dell'epatite del topo (MHV) e virus della gastroenterite trasmissibile suino (TGEV). L'immunogene per coronavirus può essere un polipeptide spike.

Retrovirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un Oncovirus, un Lentivirus (per esempio HIV-1 o HIV-2) o un Spumavirus.

Reovirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un Orthoreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus o un Coltivirus.

Parvovirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da Parvovirus B19.

Herpesvirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da un herpesvirus umano come, ma solo a titolo di esempio, virus Herpes Simplex (HSV) (per esempio HSV tipi 1 e 2), virus Varicella-zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Herpesvirus 6 umano (HHV6),

Herpesvirus 7 umano (HHV7) ed Herpesvirus 8 umano (HHV8).

Papovavirus: immunogeni virali comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli derivati da Papillomavirus e Polyomavirus. Il papillomavirus (umano) può essere del sierotipo 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 o 65, per esempio ottenuto da uno o più dei sierotipi 6, 11, 16 e/o 18.

Adenovirus: immunogeni virali comprendono quelli derivati da adenovirus sierotipo 36 (Ad-36).

In alcune realizzazioni, l'immunogene stimola una risposta immunitaria contro un virus che infetta pesci come: virus dell'anemia infettiva del salmone (ISAV), virus della malattia pancreatica del salmone (SPDV), virus della necrosi pancreatica infettiva (IPNV), virus del pesce gatto di canale (CCV), virus della linfocisti dei pesci (FLDV), virus della necrosi ematopoietica infettiva (IHNV), herpesvirus koi, virus tipo picorna del salmone (anche noto come virus tipo picorna del salmone atlantico), virus del salmone da allevamento (LSV), rotavirus del salmone atlantico (ASR), virus della dermatite a fragola della trota (TSD), virus del tumore del salmone Coho (CSTV) o virus della setticemia emorragica virale (VHSV).

Immunogeni micotici possono venire derivati da dermatofiti comprendenti: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium audouini*, *Microsporium canis*, *Microsporium distortum*, *Microsporium equinum*, *Microsporium gypsum*, *Microsporium nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum*, e/o *Trichophyton faviforme*; o da *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 lusitaniae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporidia*, *Encephalitozoon* spp., *Septata intestinalis* ed *Enterocytozoon bieneusi*; i meno comuni sono *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 marneffei*, *Malassezia spp.*, *Fonsecaea spp.*, *Wangiella spp.*, *Sporothrix spp.*, *Basidiobolus spp.*, *Conidiobolus spp.*, *Rhizopus spp.*, *Mucor spp.*, *Absidia spp.*, *Mortierella spp.*, *Cunninghamella spp.*, *Saksenaea spp.*, *Alternaria spp.*, *Curvularia spp.*, *Helminthosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Monolinia spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Pithomyces spp.*, e *Cladosporium spp.*

In alcune realizzazioni, l'immunogene stimola una risposta immunitaria contro un parassita dal genere *Plasmodium*, come *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. Quindi, l'invenzione può venire usata per l'immunizzazione contro la malaria. In alcune realizzazioni, l'immunogene stimola una risposta immunitaria contro un parassita dalla famiglia *Caligidae*, in particolare quelli dei generi *Lepeophtheirus* e *Caligus*, per esempio anoplura marina come *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligus rogercresseyi*.

In alcune realizzazioni, l'immunogene stimola una risposta immunitaria contro: allergeni del polline (allergeni del polline di albero, erba, erba infestante e graminacee); allergeni di insetto o aracnide (allergeni inalanti, di saliva e veleno, per esempio allergeni di acari, allergeni di scarafaggi e moscerini, allergeni di veleno di Imenotteri); allergeni di peli e forfora animali (per esempio da cani, gatti, cavalli, ratti, topi, ecc.); e allergeni alimentari (per esempio una gliadina). Allergeni di polline importanti da alberi, graminacee ed erba sono quelli che originano dagli ordini tassonomici delle Fagales, Oleales, Pinales e platanaceae comprendenti, ma senza essere limitati a questi, betulla (*Betula*), ontano (*Alnus*), nocciolo (*Corylus*), carpino (*Carpinus*) e ulivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* e *Juniperus*), platano (*Platanus*), l'ordine delle Poales comprendente graminacee dei generi *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* e *Sorghum*, gli ordini delle Asterales e Urticales comprendenti erbe dei generi *Ambrosia*, *Artemisia* e *Parietaria*. Altri allergeni per inalazione importanti sono quelli che derivano da acari della polvere domestica del genere *Dermatophagoides* ed *Euroglyphus*, acari di prodotti conservati come *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* e *Tyrophagus*, quelli che derivano da scarafaggi, moscerini e pulci, per esempio *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* e *Ctenocephalides*, e quelli che derivano da mammiferi come gatti, cani e cavalli, allergeni di veleno comprendenti quelli che originano da insetti che pungono o mordono come quelli ottenuti dall'ordine tassonomico degli Imenotteri, comprendenti api

(*Apidae*), vespe (*Vespidae*) e formiche (*Formicoidae*).

In alcune realizzazioni, l'immunogene è un antigene tumorale scelto da: (a) antigeni di cancro dei testicoli come NY-ESO-1, SSX2, SCP1, nonché polipeptidi delle famiglie RAGE, BAGE, GAGE e MAGE, per esempio GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 e MAGE-12 (che possono venire usati, per esempio, per indirizzare melanoma, tumori del polmone, della testa e del collo, NSCLC, del seno, gastrointestinali e della vescica); (b) antigeni mutati, per esempio p53 (associato con vari tumori solidi, per esempio cancro coloretale, del polmone, della testa e del collo), p21/Ras (associato con, per esempio, melanoma, cancro pancreatico e cancro coloretale), CDK4 (associato con, per esempio, melanoma), MUM1 (associato con, per esempio, melanoma), caspasi-8 (associata con, per esempio, cancro della testa e del collo), CIA 0205 (associato con, per esempio, cancro della vescica), HLA-A2-R1701, beta-catenina (associata con, per esempio, melanoma), TCR (associato con, per esempio, linfoma non Hodgkin a cellule T), BCR-abl (associato con, per esempio, leucemia mielogenica cronica), trioso fosfato isomerasi, KIA 0205, CDC-27 e LDLR-FUT; (c) antigeni sovraespressi, per esempio Galectina 4 (associata con, per esempio, cancro coloretale), Galectina 9 (associata con, per esempio, malattia di Hodgkin), proteinasi 3 (associata con, per esempio, leucemia mielogenica cronica), WT 1 (associato con, per esempio, varie leucemie), anidrasi carbonica (associata con, per esempio, cancro renale), aldolasi A (associata con, per esempio, cancro del polmone), PRAME (associato con, per esempio, melanoma), HER-2/neu (associato con, per esempio, cancro del seno, del colon, del polmone e dell'ovaio), mammaglobina, alfa-fetoproteina (associata con, per esempio, epatoma), KSA (associato con, per esempio, cancro coloretale), gastrina (associata con, per esempio, cancro pancreatico e gastrico), proteina catalitica telomerasi, MUC-1 (associato con, per esempio, cancro del seno e dell'ovaio), G-250 (associato con, per esempio, carcinoma a cellule renali), p53 (associato con, per esempio, cancro del seno, del colon) e antigene carcinoembriogenico (associato con, per esempio, cancro del seno, cancro del polmone e cancri del tratto gastrointestinale come cancro coloretale); (d) antigeni condivisi, per esempio antigeni di differenziazione fra melanoma e melanocita come MART-1/Melan A, gp100, MC1R, recettore dell'ormone di stimolazione dei melanociti, tirosinasi, proteina-1/TRP1 correlata a tirosinasi e proteina-2/TRP2 correlata a tirosinasi (associati

con, per esempio, melanoma); (e) antigeni associati a prostata come PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, associati con, per esempio, cancro della prostata; (f) idiotipi di immunoglobulina (associati con, per esempio, mieloma e linfomi a cellule B). In certe realizzazioni, gli immunogeni tumorali comprendono, ma senza essere limitati a questi, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antigeni di virus Epstein Barr, EBNA, antigeni di papillomavirus umano (HPV) comprendenti E6 ed E7, antigeni di virus dell'epatite B e C, antigeni di virus della leucemia acuta a cellule T, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteina legante Mac-2/proteina associata a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, e simili.

Composizioni farmaceutiche

I liposomi dell'invenzione sono utili come componenti in composizioni farmaceutiche per l'immunizzazione di soggetti contro varie malattie. Queste composizioni comprenderanno tipicamente un veicolante farmaceuticamente accettabile oltre ai liposomi. Una descrizione approfondita di veicolanti farmaceuticamente accettabili è disponibile nel riferimento 29.

Una composizione farmaceutica dell'invenzione può comprendere uno o più immunopotenziatori a molecola piccola. Per esempio, la composizione può comprendere un agonista di TLR2 (per esempio Pam3CSK4), un agonista di TLR4 (per esempio un amminoalchilglucosamminide fosfato, come E6020), un agonista di TLR7 (per esempio imiquimod), un agonista di TLR8 (per esempio resiquimod) e/o un agonista di TLR9 (per esempio IC31). Qualsiasi di tali agonisti ha idealmente un peso molecolare di <2.000 Da. In alcune realizzazioni, tale agonista(i) è anche incapsulato con l'RNA entro i liposomi, ma in altre realizzazioni non è incapsulato.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono comprendere i liposomi in acqua comune (per esempio acqua per iniezione) o in un tampone, per esempio un tampone fosfato, un tampone Tris, un tampone borato, un

tampone succinato, un tampone di istidina o un tampone citrato. Sali tampone verranno tipicamente inclusi nell'intervallo di 5-20 mM.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono avere un pH fra 5,0 e 9,5, per esempio fra 6,0 e 8,0.

Le composizioni dell'invenzione possono includere sali di sodio (per esempio cloruro di sodio) per fornire tonicità. È tipica una concentrazione di 10 ± 2 mg/ml di NaCl, per esempio circa 9 mg/ml.

Le composizioni dell'invenzione possono includere chelatori di ioni di metallo. Questi possono prolungare la stabilità dell'RNA rimuovendo gli ioni che possono accelerare l'idrolisi del fosfodiester. Quindi, una composizione può includere uno o più di EDTA, EGTA, BAPTA, acido pentetico, ecc. Tali chelatori sono tipicamente presenti a fra 10 e 500 μ M, per esempio 0,1 mM. Un sale citrato, come citrato di sodio, può anche agire come un chelatore, pur fornendo anche vantaggiosamente attività tamponante.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono avere una osmolalità di fra 200 mOsm/kg e 400 mOsm/kg, per esempio fra 240 e 360 mOsm/kg, o fra 290 e 310 mOsm/kg.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono includere uno o più conservanti, come timerosal o 2-fenossietanolo. Sono preferite composizioni prive di mercurio, e possono venire preparati vaccini privi di conservanti.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione sono preferibilmente sterili.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione sono preferibilmente apirogene, contenendo per esempio <1 EU (unità di endotossina, una misura standard) per dose, e preferibilmente <0,1 EU per dose.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione sono preferibilmente prive di glutine.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono venire preparate in forma di dosaggio unitario. In alcune realizzazioni, una dose unitaria può avere un volume fra 0,1 e 1,0 ml, per esempio circa 0,5 ml.

Le composizioni possono venire preparate come prodotti iniettabili, come soluzioni o sospensioni. La composizione può venire preparata per somministrazione polmonare, per esempio mediante un inalatore, usando uno spray fine. La composizione può venire preparata per somministrazione nasale, auricolare o oculare, per esempio come spray o gocce. Sono tipici prodotti iniettabili per somministrazione intramuscolare.

Le composizioni comprendono una quantità immunologicamente efficace di liposomi, nonché qualsiasi di altri componenti, come necessario. Con 'quantità immunologicamente efficace' si intende che la somministrazione di quella quantità a un individuo, in una dose singola o come parte di una serie, è efficace per il trattamento o la prevenzione. Questa quantità varia a seconda della salute e condizione fisica dell'individuo da trattare, età, gruppo tassonomico dell'individuo da trattare (per esempio primate non umano, primate, ecc.), capacità del sistema immunitario dell'individuo di sintetizzare anticorpi, grado di protezione desiderato, formulazione del vaccino, valutazione del medico curante della situazione medica, e altri fattori pertinenti. Si prevede che la quantità ricadrà in un intervallo relativamente ampio che può venire determinato tramite prove ordinarie. Il contenuto di liposomi e RNA delle composizioni dell'invenzione verrà generalmente espresso in termini della quantità di RNA per dose. Una dose preferita ha ≤ 100 μg di RNA (per esempio da 10 fino a 100 μg , come circa 10 μg , 25 μg , 50 μg , 75 μg o 100 μg), ma espressione può venire osservata a livelli molto più bassi, per esempio ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{dose}$, ≤ 100 ng/dose , ≤ 10 ng/dose , ≤ 1 ng/dose , ecc.

L'invenzione fornisce anche un dispositivo per somministrazione (per esempio siringa, nebulizzatore, spruzzatore, inalatore, cerotto dermico, ecc.) contenente una composizione farmaceutica dell'invenzione. Questo dispositivo può venire usato per somministrare la composizione a un soggetto vertebrato.

I liposomi dell'invenzione non contengono ribosomi.

Metodi di trattamento e usi medicali

Contrariamente alle particelle descritte nel riferimento 10, i liposomi e le composizioni farmaceutiche dell'invenzione servono per l'uso *in vivo* per stimolare una risposta immunitaria contro un immunogene di interesse.

Viene anche descritto in questa sede un metodo per suscitare una risposta immunitaria in un vertebrato, comprendente la fase di somministrare una quantità efficace di un liposoma o una composizione farmaceutica dell'invenzione. La risposta immunitaria è preferibilmente protettiva e comporta preferibilmente immunità mediata da anticorpi e/o cellule. Il metodo può suscitare una risposta di richiamo.

L'invenzione fornisce anche un liposoma o una composizione farmaceutica dell'invenzione per l'uso in un

metodo per suscitare una risposta immunitaria in un vertebrato.

Viene anche descritto in questa sede l'uso di un liposoma dell'invenzione nella preparazione di un medicamento per suscitare una risposta immunitaria in un vertebrato.

Suscitando una risposta immunitaria nel vertebrato mediante questi usi e metodi, il vertebrato può venire protetto contro varie malattie e/o infezioni, per esempio contro malattie batteriche e/o virali come descritto in precedenza. I liposomi e le composizioni sono immunogenici, e sono più preferibilmente composizioni di vaccino. Vaccini secondo l'invenzione possono essere profilattici (cioè per prevenire l'infezione) o terapeutici (cioè per trattare l'infezione), ma saranno tipicamente profilattici.

Il vertebrato è preferibilmente un mammifero, come un uomo o un grande mammifero veterinario (per esempio cavalli, bestiame, cervi, capre, maiali). Quando il vaccino serve per uso profilattico, l'uomo è preferibilmente un bambino (per esempio un bambino ai primi passi o un infante) o un adolescente; quando il vaccino serve per uso terapeutico, l'uomo è preferibilmente un adolescente o un adulto. Un vaccino destinato a bambini può anche venire somministrato ad adulti, per esempio per valutare la sicurezza, il dosaggio, l'immunogenicità, ecc.

Vaccini preparati secondo l'invenzione possono venire usati per trattare sia bambini che adulti. Quindi, un paziente umano può avere meno di un anno di età, meno di 5 anni di età, 1-5 anni di età, 5-15 anni di età, 15-55 anni di età o almeno 55 anni di età. Pazienti preferiti per ricevere i vaccini sono gli anziani (per esempio ≥ 50 anni di età, ≥ 60 anni di età e preferibilmente ≥ 65 anni), i giovani (per esempio ≤ 5 anni di età), i pazienti ospedalizzati, gli impiegati nella sanità, personale del servizio armato e militare, donne incinte, i malati cronici o pazienti immunodeficienti. I vaccini non sono tuttavia adatti solamente per questi gruppi, e possono venire usati più generalmente in una popolazione.

Le composizioni dell'invenzione verranno generalmente somministrate direttamente a un paziente. La somministrazione diretta può venire ottenuta mediante iniezione parenterale (per esempio sottocutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscolarmente, intradermicamente o allo spazio interstiziale di un tessuto; diversamente dal riferimento 1, l'iniezione intraglossale non viene tipicamente usata con la presente invenzione). Vie di somministrazione alternative comprendono somministrazione rettale, orale (per esempio

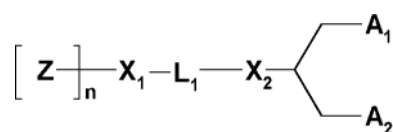
compressa, spray), buccale, sublinguale, vaginale, topica, transdermica o transcutanea, intranasale, oculare, auricolare, polmonare o altra mucosale. Le somministrazioni intradermica e intramuscolare sono due vie preferite. L'iniezione può avvenire tramite un ago (per esempio un ago ipodermico), ma può venire usata in alternativa una iniezione senza ago. Una dose intramuscolare tipica è 0,5 ml.

L'iniezione può venire usata per stimolare l'immunità sistemica e/o mucosale, preferibilmente per stimolare una immunità sistemica e/o mucosale potenziata.

Il dosaggio può avvenire mediante un programma a dose singola o un programma a dose multipla. Dosi multiple possono venire usate in un programma di immunizzazione primaria e/o in un programma di immunizzazione di richiamo. In un programma a dose multipla, le varie dosi possono venire fornite mediante le stesse o diverse vie, per esempio un innesco parenterale e un richiamo mucosale, un innesco mucosale e un richiamo parenterale, ecc. Dosi multiple verranno tipicamente somministrate a una distanza di almeno 1 settimana (per esempio circa 2 settimane, circa 3 settimane, circa 4 settimane, circa 6 settimane, circa 8 settimane, circa 10 settimane, circa 12 settimane, circa 16 settimane, ecc.). In una realizzazione, dosi multiple possono venire somministrate approssimativamente 6 settimane, 10 settimane e 14 settimane dopo la nascita, per esempio a una età di 6 settimane, 10 settimane e 14 settimane, come spesso usato nel Programma Espanso sull'Immunizzazione ("EPI") dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. In una realizzazione alternativa, due dosi primarie vengono somministrate a una distanza di circa due mesi, per esempio una distanza di circa 7, 8 o 9 settimane, facendo seguire una o più dosi di richiamo da circa 6 mesi fino a 1 anno dopo la seconda dose primaria, per esempio circa 6, 8, 10 o 12 mesi dopo la seconda dose primaria. In una ulteriore realizzazione, tre dosi primarie vengono somministrate a una distanza di circa due mesi, per esempio una distanza di circa 7, 8 o 9 settimane, facendo seguire una o più dosi di richiamo da circa 6 mesi fino a 1 anno dopo la terza dose primaria, per esempio circa 6, 8, 10 o 12 mesi dopo la terza dose primaria.

Formula (X)

I composti di formula (X) contengono un gruppo di testa del polimero idrofilo legato a una parte di lipide. Essi possono venire descritti come "lipidi invisibili" e hanno la formula:



in cui:

Z è un componente del gruppo di testa idrofilo scelto da PEG e polimeri a base di poli(ossazolina), poli(ossido di etilene), poli(alcool vinilico), poli(glicerolo), poli(N-vinilpirrolidone), poli[N-(2-idrossipropil)metacrilammide] e poli(amminoacidi), in cui il polimero può essere lineare o ramificato, e in cui il polimero può essere opzionalmente sostituito;

in cui Z viene polimerizzato mediante n subunità;

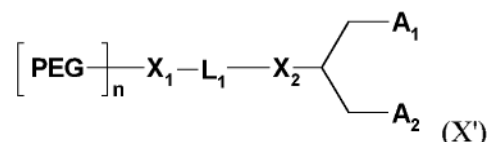
n è un grado di polimerizzazione numerico medio fra 10 e 200 unità di Z, in cui n viene ottimizzato per differenti tipi di polimero;

L₁ è un legante di C₁₋₁₀ alchilene o C₁₋₁₀ eteroalchilene opzionalmente sostituito comprendente zero, uno o due di un etere (per esempio -O-), estere (per esempio -C(O)O-), succinato (per esempio -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbammato (per esempio -OC(O)-NR'-), carbonato (per esempio -OC(O)O-), urea (per esempio -NRC(O)NR'-), ammina (per esempio -NR'-), ammidi (per esempio -C(O)NR'-), immina (per esempio -C(NR')-), tioetere (per esempio -S-), xantato (per esempio -OC(S)S-) e fosfodiesteri (per esempio -OP(O)₂O-),

in cui R' viene scelto indipendentemente da -H, -NH-, -NH₂, -O-, -S-, un fosfato o un C₁₋₁₀ alchilene opzionalmente sostituito;

X₁ e X₂ vengono scelti indipendentemente da un carbonio o un eteroatomo scelto da -NH-, -O-, -S-, o un fosfato; A₁ e A₂ vengono scelti indipendentemente da un C₆₋₃₀ alchile, C₆₋₃₀ alchenile e C₆₋₃₀ alchinile, in cui A₁ e A₂ possono essere uguali o diversi, o A₁ e A₂, insieme con l'atomo di carbonio al quale sono attaccati, formano uno steroide opzionalmente sostituito.

In una realizzazione, il composto di formula (X) ha la formula (X')



in cui

PEG è una subunità di poli(etilenglicole), in cui il PEG può essere lineare o ramificato;

n è un grado di polimerizzazione numerico medio fra 10 e 200 unità di PEG, preferibilmente circa 45 unità;

L₁ è un legante di C₁₋₁₀ eteroalchilene opzionalmente sostituito contenente uno o due di un etere, estere, succinato, carbammato, carbonato, urea, ammina, ammidi, immina, tioetere, xantato e fosfodiesteri;

X₁ e X₂ sono ossigeno;

A₁ e A₂ vengono scelti indipendentemente da un C₆₋₃₀ alchile, C₆₋₃₀ alchenile e C₆₋₃₀ alchinile, in cui A₁ e A₂ possono essere uguali o diversi, o in cui A₁ e A₂, insieme con l'atomo di carbonio al quale sono attaccati, formano uno steroide opzionalmente sostituito.

I lipidi di formula (X) e (X'), quando formulati con lipidi cationici per formare liposomi, possono aumentare la lunghezza del tempo nel quale un liposoma può esistere *in vivo* (per esempio nel sangue). Essi possono schermare la superficie di una superficie del liposoma e ridurre così l'opsonizzazione mediante proteine del sangue e l'assunzione da parte di macrofagi. Ulteriori dettagli sono nei riferimenti 30 e 31. In una realizzazione, il lipide comprende un gruppo scelto da PEG (talvolta indicato come poli(ossido di etilene)) e polimeri a base di poli(ossazolina), poli(alcool vinilico), poli(glicerolo), poli(N-vinilpirrolidone), poli[N-(2-idrossipropil)metacrilammide] e poli(amminoacidi).

Lipidi PEGilati adatti per l'uso con l'invenzione comprendono coniugati di polietilenglicole-diacilglicerolo o polietilenglicole-diacilglicammide (PEG-DAG), includenti quelli comprendenti un gruppo dialchilglicerolo o dialchilglicammide avente una lunghezza della catena di alchile comprendente indipendentemente da circa C₄ fino a circa C₄₀ atomi di carbonio saturi o insaturi. Il gruppo dialchilglicerolo o dialchilglicammide può inoltre comprendere uno o più gruppi alchile sostituiti. Il lipide PEGilato può venire scelto da PEG-dilaurilglicerolo, PEG-dimiristilglicerolo (catalogo # GM-020 della NOF), PEG-dipalmitoilglicerolo, PEG-disterilglicerolo, PEG-dilaurilglicammide, PEG-dimiristilglicammide, PEG-dipalmitoil-glicammide e PEG-disterilglicammide, PEG-colesterolo (1-[8³-(colest-5-en-3[beta]-ossi)carbrossammido-3',6'-diossaottanil]carbamoil-[omega]-metil-poli(etilenglicole)), PEG-DMB (etere di 3,4-ditetradecossilbenzil-[omega]-metil-poli(etilenglicole)), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metossi(polietilenglicole)-2000] (catalogo # 880150P della

Avanti Polar Lipids). Altri lipidi PEGilati utili sono S001, S002, S003, S004, S005, S006, S007, S008, S009, S010, S011 e CS-020SA (NOF); S010 e S011 sono descritti nel rif. 32 rispettivamente alle diciture IVa e IVc. Nel rif. 32, una sintesi diversa da quella riportata in questa sede viene usata per preparare IVa e IVc.

Termini chimici e definizioni

Alo

Il termine “alogeno” (o “alo”) comprende fluoro, cloro, bromo e iodio.

Alchile, alchilene, alchenile, alchinile, cicloalchile, ecc.

I termini “alchile”, “alchilene”, “alchenile” e “alchinile” vengono usati in questa sede per riferirsi a forme acicliche a catena sia lineare che ramificata. Loro analoghi ciclici vengono indicati come cicloalchile, ecc.

Il termine “alchile” include gruppi idrocarbile monovalenti, lineari o ramificati, saturi, ciclici. In una realizzazione alchile è C₁₋₁₀ alchile, in un'altra realizzazione C₁₋₆ alchile, in un'altra realizzazione C₁₋₄ alchile, come gruppi metile, etile, n-propile, i-propile o t-butile.

Il termine “cicloalchile” include gruppi idrocarbile monovalenti, saturi, ciclici. In una realizzazione cicloalchile è C₃₋₁₀ cicloalchile, in un'altra realizzazione C₃₋₆ cicloalchile come ciclopentile e cicloesile.

Il termine “alcossi” indica alchile-O-.

Il termine “alchenile” include gruppi idrocarbile monovalenti, lineari o ramificati, insaturi, ciclici aventi almeno un doppio legame carbonio-carbonio e, in una realizzazione, nessun triplo legame carbonio-carbonio. In una realizzazione alchenile è C₂₋₁₀ alchenile, in un'altra realizzazione C₂₋₆ alchenile, in un'altra realizzazione C₂₋₄ alchenile.

Il termine “cicloalchenile” include gruppi idrocarbile monovalenti, parzialmente insaturi, ciclici aventi almeno un doppio legame carbonio-carbonio e, in una realizzazione, nessun triplo legame carbonio-carbonio. In una realizzazione cicloalchenile è C₃₋₁₀ cicloalchenile, in un'altra realizzazione C₅₋₁₀ cicloalchenile, per esempio cicloesenile o benzocicloesile.

Il termine “alchinile” include gruppi idrocarbile monovalenti, lineari o ramificati, insaturi, ciclici aventi almeno un triplo legame carbonio-carbonio e, in una realizzazione, nessun doppio legame carbonio-carbonio. In una

realizzazione alchinile è C_{2-10} alchinile, in un'altra realizzazione C_{2-6} alchinile, in un'altra realizzazione C_{2-4} alchinile.

Il termine “cicloalchinile” include gruppi idrocarbile monovalenti, parzialmente insaturi, ciclici aventi almeno un triplo legame carbonio-carbonio e, in una realizzazione, nessun doppio legame carbonio-carbonio. In una realizzazione, cicloalchinile è C_{3-10} cicloalchenile, in un'altra realizzazione C_{5-10} cicloalchinile.

Il termine “alchilene” include gruppi idrocarbile bivalente, lineari o ramificati, saturi, ciclici. In una realizzazione alchilene è C_{1-10} alchilene, in un'altra realizzazione C_{1-6} alchilene, in un'altra realizzazione C_{1-4} alchilene, come gruppi metilene, etilene, n-propilene, i-propilene o t-butilene.

Il termine “alchenilene” include gruppi idrocarbile bivalenti, lineari o ramificati, insaturi, ciclici aventi almeno un doppio legame carbonio-carbonio e, in una realizzazione, nessun triplo legame carbonio-carbonio. In una realizzazione alchenilene è C_{2-10} alchenilene, in un'altra realizzazione C_{2-6} alchenilene, in un'altra realizzazione C_{2-4} alchenilene.

Il termine “alchinilene” include gruppi idrocarbile bivalenti, lineari o ramificati, insaturi, ciclici aventi almeno un triplo legame carbonio-carbonio e, in una realizzazione, nessun doppio legame carbonio-carbonio. In una realizzazione alchinilene è C_{2-10} alchinilene, in un'altra realizzazione C_{2-6} alchinilene, in un'altra realizzazione C_{2-4} alchinilene.

Eteroalchile, ecc.

Il termine “eteroalchile” include gruppi alchile in cui fino a sei atomi di carbonio, in una realizzazione fino a cinque atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a quattro atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a tre atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un'altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito da O, $S(O)_q$, N, $P(O)_r$ o Si (e preferibilmente O, $S(O)_q$ o N), purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio dell'alchile. Il gruppo eteroalchile può essere legato con C o etero-legato, cioè può essere legato al resto della molecola tramite un atomo di carbonio o tramite O, $S(O)_q$, N, $P(O)_r$ o Si.

Il termine “eterocicloalchile” include gruppi cicloalchile in cui fino a sei atomi di carbonio, in una realizzazione

fino a cinque atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a quattro atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a tre atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un'altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q o N, purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio del cicloalchile. Esempi di gruppi eterocicloalchile includono ossiranile, tiaranile, aziridinile, ossetanile, tiatanile, azetidinite, tetraidrofurano, tetraidrotiofenile, pirrolidinile, tetraidropiranile, tetraidrotiopiranile, piperidinile, 1,4-diossanile, 1,4-ossatiane, morfolinile, 1,4-ditiane, piperazinile, 1,4-azatiane, ossepanile, tiepanile, azepanile, 1,4-diossepanile, 1,4-ossatiepanile, 1,4-ossazepanile, 1,4-ditiepianile, 1,4-tieazepanile e 1,4-diazepanile. Il gruppo eterocicloalchile può essere legato con C o legato con N, cioè esso può essere legato al resto della molecola tramite un atomo di carbonio o tramite un atomo di azoto.

Il termine "eteroalchenile" include gruppi alchenile in cui fino a tre atomi di carbonio, in una realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un'altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q o N, purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio dell'alchenile. Il gruppo eteroalchenile può essere legato con C o etero-legato, cioè esso può essere legato al resto della molecola tramite un atomo di carbonio o tramite O, S(O)_q o N.

Il termine "eterocicloalchenile" include gruppi cicloalchenile in cui fino a tre atomi di carbonio, in una realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un'altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q o N, purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio del cicloalchenile. Esempi di gruppi eterocicloalchenile comprendono 3,4-diidro-2H-piranile, 5-6-diidro-2H-piranile, 2H-piranile, 1,2,3,4-tetraidropiridinile e 1,2,5,6-tetraidropiridinile. Il gruppo eterocicloalchile può essere legato con C o legato con N, cioè può essere legato al resto della molecola tramite un atomo di carbonio o tramite un atomo di azoto.

Il termine "eteroalchinile" include gruppi alchinile in cui fino a tre atomi di carbonio, in una realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un'altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q o N, purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio dell'alchinile. Il gruppo

eteroalchinile può essere legato con C o etero-legato, cioè esso può essere legato al resto della molecola tramite un atomo di carbonio o tramite O, S(O)_q o N.

Il termine “eterocicloalchinile” include gruppi cicloalchinile in cui fino a tre atomi di carbonio, in una realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un’altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q o N, purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio del cicloalchinile. Il gruppo eterocicloalchenile può essere legato con C o legato con N, cioè esso può essere legato al resto della molecola tramite un atomo di carbonio o tramite un atomo di azoto.

Il termine “eteroalchilene” include gruppi alchilene in cui fino a tre atomi di carbonio, in una realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un’altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q o N, purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio dell’alchilene.

Il termine “eteroalchenilene” include gruppi alchenilene in cui fino a tre atomi di carbonio, in una realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un’altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q o N, purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio dell’alchenilene.

Il termine “eteroalchinilene” include gruppi alchinilene in cui fino a tre atomi di carbonio, in una realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un’altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q o N, purché rimanga almeno uno degli atomi di carbonio dell’alchinilene.

Arile

Il termine “arile” include gruppi idrocarbile monovalenti, aromatici, ciclici come fenile o naftile (per esempio 1-naftile o 2-naftile). In generale, i gruppi arile possono essere gruppi aromatici ad anelli monociclici o policiclici fusi. Arili preferiti sono C₆-C₁₄ arile.

Altri esempi di gruppi arile sono derivati monovalenti di aceantrilene, acenaftilene, acefenantrilene, antracene, azulene, crisene, coronene, fluorantene, fluorene, as-indacene, s-indacene, indene, naftalene, ovalene, perilene, fenalene, fenantrene, picene, pleiadene, pirene, pirantrene e rubicene.

Il termine “arilalchile” indica alchile sostituito con un gruppo arile, per esempio benzile.

Il termine “arilene” include gruppi idrocarbile bivalenti aromatici, ciclici, come fenilene. In generale, i gruppi

arilene possono essere gruppi aromatici ad anelli monociclici o policiclici fusi. Arileni preferiti sono C₆-C₁₄ arilene. Altri esempi di gruppi arilene sono derivati bivalenti di aceantrilene, acenaftilene, acefenantrilene, antracene, azulene, crisene, coronene, fluorantene, fluorene, as-indacene, s-indacene, indene, naftalene, ovalene, perilene, fenalene, fenantrene, picene, pleiadene, pirene, pirantrene e rubicene.

Eteroarile

Il termine “eteroarile” include gruppi idrocarbure monovalenti, eteroaromatici, contenenti inoltre uno o più eteroatomi scelti indipendentemente da O, S, N e NR^N, in cui R^N viene definito in seguito (e in una realizzazione è H o alchile (per esempio C₁₋₆ alchile)).

In generale, i gruppi eteroarile possono essere gruppi eteroaromatici ad anelli monociclici o policiclici (per esempio biciclici) fusi. In una realizzazione, gruppi eteroarile contengono 5-13 elementi dell'anello (preferibilmente 5-10 elementi) e 1, 2, 3 o 4 eteroatomi dell'anello scelti indipendentemente da O, S, N e NR^N. In una realizzazione, un gruppo eteroarile può avere 5, 6, 9 o 10 elementi, per esempio monociclico avente 5 elementi, monociclico avente 6 elementi, biciclico ad anelli fusi avente 9 elementi o biciclico ad anelli fusi avente 10 elementi.

Gruppi eteroaromatici monociclici includono gruppi eteroaromatici contenenti 5-6 elementi dell'anello e 1, 2, 3 o 4 eteroatomi scelti da O, S, N o NR^N.

In una realizzazione, gruppi eteroarile monociclici aventi 5 elementi contengono 1 elemento dell'anello che è un gruppo -NR^N-, un atomo di -O- o un atomo di -S- e, opzionalmente, 1-3 elementi dell'anello (per esempio 1 o 2 elementi dell'anello) che sono atomi di =N- (in cui il resto dei 5 elementi dell'anello sono atomi di carbonio).

Esempi di gruppi eteroarile monociclici aventi 5 elementi sono pirrolile, furanile, tiofenile, pirazolile, imidazolile, isossazolile, ossazolile, isotiazolile, tiazolile, 1,2,3-triazolile, 1,2,4-triazolile, 1,2,3-ossadiazolile, 1,2,4-ossadiazolile, 1,2,5-ossadiazolile, 1,3,4-ossadiazolile, 1,3,4-tiadiazolile, piridile, pirimidinile, piridazinile, pirazinile, 1,3,5-triazinile, 1,2,4-triazinile, 1,2,3-triazinile e tetrazolile.

Esempi di gruppi eteroarile monociclici aventi 6 elementi sono piridinile, piridazinile, pirimidinile e pirazinile.

In una realizzazione, gruppi eteroarile monociclici aventi 6 elementi contengono 1 o 2 elementi dell'anello che

sono atomi di =N- (in cui il resto dei 6 elementi dell'anello sono atomi di carbonio).

Gruppi eteroaromatici biciclici includono gruppi eteroaromatici ad anelli fusi contenenti 9-13 elementi dell'anello e 1, 2, 3, 4 o più eteroatomi scelti da O, S, N o NR^N.

In una realizzazione, gruppi eteroarile biciclici aventi 9 elementi contengono un elemento dell'anello che è un gruppo -NR^N-, un atomo di -O- o un atomo di -S- e, opzionalmente, 1-3 elementi dell'anello (per esempio 1 o 2 elementi dell'anello) che sono atomi di =N- (in cui il resto dei 9 elementi dell'anello sono atomi di carbonio).

Esempi di gruppi eteroarile biciclici ad anelli fusi aventi 9 elementi sono benzofuranile, benzotiofenile, indolile, benzimidazolile, indazolile, benzotriazolile, pirrolo[2,3-b]piridinile, pirrolo[2,3-c]piridinile, pirrolo[3,2-c]piridinile, pirrolo[3,2-b]piridinile, imidazo[4,5-b]piridinile, imidazo[4,5-c]piridinile, pirazolo[4,3-d]piridinile, pirazolo[4,3-c]piridinile, pirazolo[3,4-c]piridinile, pirazolo[3,4-b]piridinile, isoindolile, indazolile, purinile, indolinile, imidazo[1,2-a]piridinile, imidazo[1,5-a]piridinile, pirazolo[1,2-a]piridinile, pirrolo[1,2-b]piridazinile e imidazo[1,2-c]pirimidinile.

In una realizzazione, gruppi eteroarile biciclici aventi 10 elementi contengono 1-3 elementi dell'anello che sono atomi di =N- (in cui il resto dei 10 elementi dell'anello sono atomi di carbonio).

Esempi di gruppi eteroarile biciclici ad anelli fusi aventi 10 elementi sono chinolinile, isochinolinile, cinnolinile, chinazolinile, chinossalinile, ftalazinile, 1,6-naftiridinile, 1,7-naftiridinile, 1,8-naftiridinile, 1,5-naftiridinile, 2,6-naftiridinile, 2,7-naftiridinile, pirido[3,2-d]pirimidinile, pirido[4,3-d]pirimidinile, pirido[3,4-d]pirimidinile, pirido[2,3-d]pirimidinile, pirido[2,3-b]pirazinile, pirido[3,4-b]pirazinile, pirimido[5,4-d]pirimidinile, pirazino[2,3-b]pirazinile e pirimido[4,5-d]pirimidinile.

Il termine "eteroarilalchile" indica alchile sostituito con un gruppo eteroarile.

Il termine "eteroarilene" include gruppi idrocarbure bivalenti eteroaromatici, ciclici, contenenti inoltre uno o più eteroatomi scelti indipendentemente da O, S, N e NR^N, in R^N viene definito in seguito (e in una realizzazione è H o alchile (per esempio C₁₋₆ alchile)). In generale, i gruppi eteroarilene possono essere gruppi eteroaromatici ad anelli fusi monociclici o policiclici (per esempio biciclici). In una realizzazione, gruppi eteroarilene contengono 5-13 elementi dell'anello (preferibilmente 5-10 elementi) e 1, 2, 3 o 4 eteroatomi dell'anello scelti

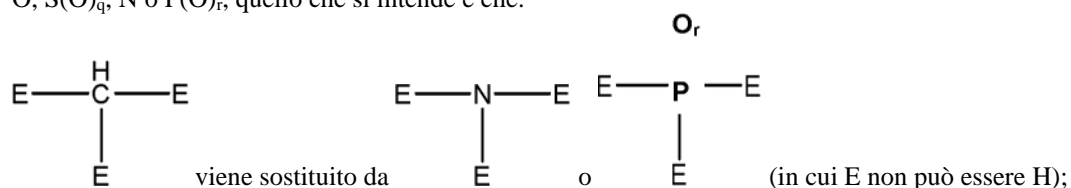
indipendentemente da O, S, N e NR^{N} . In una realizzazione, un gruppo eteroarilene può avere 5, 6, 9 o 10 elementi, per esempio monociclico avente 5 elementi, monociclico avente 6 elementi, biciclicico ad anelli fusi avente 9 elementi o biciclicico ad anelli fusi avente 10 elementi. Il termine “eteroarilene” include derivati bivalenti di ciascuno dei gruppi eteroarile descritti in precedenza.

I termini “arile”, “aromatico”, “eteroarile” ed “eteroaromatico” includono anche gruppi che sono parzialmente ridotti. Quindi, per esempio, “eteroarile” include specie fuse in cui uno degli anelli è stato ridotto a un anello saturo (per esempio 1,2,3,4-tetraidro-1,8-naftiridin-2-ile).

Nozioni generali

A meno che sia altrimenti indicato esplicitamente, dove combinazioni di gruppi vengono indicate in questa sede come una parte, per esempio arilalchile, l'ultimo gruppo menzionato contiene l'atomo con il quale la parte è attaccata al resto della molecola.

Dove viene fatto riferimento a un atomo di carbonio di un gruppo alchile o altro gruppo che viene sostituito con O, S(O)_q , N o P(O)_r , quello che si intende è che:



$-\text{CH}=\text{}$ viene sostituito con $-\text{N}=\text{}$ o $-\text{P(O)}_r=\text{}$;

$\equiv\text{C}-\text{H}$ viene sostituito con $\equiv\text{N}$ o $\equiv\text{P(O)}_r$; o

$-\text{CH}_2-$ viene sostituito con $-\text{O}-$, $-\text{S(O)}_q-$, $-\text{NR}^{\text{N}}-$ o $-\text{P(O)}_r\text{R}^{\text{N}}-$, in cui R^{N} è H o C_{1-6} alchile, C_{1-6} eteroalchile, C_{3-6} cicloalchile, C_{3-6} eterocicloalchile, C_{2-6} alchenile, C_{2-6} eteroalchenile, C_{3-6} cicloalchenile, C_{3-6} eterocicloalchenile, fenile o eteroarile contenente 5 o 6 elementi dell'anello opzionalmente sostituiti. R^{N} è preferibilmente H, C_{1-6} alchile o C_{3-6} cicloalchile.

q è indipendentemente 0, 1 o 2. In una realizzazione, q è 0.

r è indipendentemente 0 o 1. In una realizzazione, r è 0.

Dove viene fatto riferimento a un atomo di carbonio che viene sostituito con Si, quello che si intende è che

l'atomo di carbonio viene scambiato con un atomo di silicio ma per il resto i legami rimangono gli stessi. Quindi, per esempio, $-\text{CH}_2-$ viene sostituito con $-\text{SiH}_2-$; $-\text{CH}=\text{}$ viene sostituito con $-\text{SiH}=\text{}$; e $\equiv\text{C}-\text{H}$ viene sostituito con $\equiv\text{Si}-\text{H}$.

A titolo di chiarimento, in relazione ai gruppi contenenti eteroatomi summenzionati (come eteroalchile, ecc.), dove viene fornito un valore numerico di atomi di carbonio, per esempio C_{3-6} eteroalchile, quello che si intende è un gruppo basato su C_{3-6} alchile in cui uno o più dei 3-6 atomi di carbonio della catena vengono sostituiti con O, $\text{S}(\text{O})_q$ o N. Per conseguenza, un gruppo C_{3-6} eteroalchile potrebbe per esempio contenere meno di 3-6 atomi di carbonio della catena. Per quanto riguarda un altro esempio, un gruppo piridile potrebbe venire classificato come un gruppo C_6 eteroarile anche se contiene 5 atomi di carbonio.

Sostituzione

I gruppi dei composti dell'invenzione (per esempio gruppi alchile, cicloalchile, alcossi, alchenile, cicloalchenile, alchinile, alchilene, alchenilene, eteroalchile, eterocicloalchile, eteroalchenile, eterocicloalchenile, eteroalchinile, eteroalchilene, eteroalchenilene, arile, arilalchile, arileteroalchile, eteroarile, eteroarilalchile o eteroarileteroalchile) possono essere sostituiti o non sostituiti, in una realizzazione non sostituiti. Tipicamente, la sostituzione comporta una sostituzione teorica di un atomo di idrogeno con un gruppo sostituyente, o due atomi di idrogeno nel caso di sostituzione con $=\text{O}$.

Dove sostituiti, vi saranno generalmente 1 fino a 5 sostituenti su ciascun gruppo, in una realizzazione 1 fino a 3 sostituenti, in una realizzazione 1 o 2 sostituenti, in una realizzazione 1 sostituyente. Una realizzazione include più di un sostituyente sullo stesso atomo, per esempio un gruppo acetale.

In una realizzazione, il sostituyente(i) è/sono indipendentemente Sub^1 o Sub^2 (in una realizzazione Sub^2), in cui:

Sub^1 è indipendentemente alogeno, trialometile, trialoetile, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{N}^+(\text{R}^s)_2\text{O}^-$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2\text{R}^s$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SOR}^s$, $-\text{SO}_2\text{R}^s$, $-\text{SO}_3\text{R}^s$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}^s$, $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^s$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^s$, $=\text{O}$, $-\text{NR}^s_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^s_2$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{C}(=\text{O})\text{OR}^s$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{C}(=\text{O})\text{NR}^s_2$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^s_2$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{C}(=\text{O})\text{R}^s$, $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}^s_2$, $-\text{NR}^s\text{C}(=\text{S})\text{R}^s$, $-\text{SO}_2\text{NR}^s_2$, $-\text{NR}^s\text{SO}_2\text{R}^s$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{C}(=\text{S})\text{NR}^s_2$, $-\text{N}(\text{R}^s)\text{SO}_2\text{NR}^s_2$, $-\text{R}^s$ o $-\text{Z}^s\text{R}^s$,

in cui;

Z^s è indipendentemente O, S o NR^s ;

R^s è indipendentemente H o C_{1-6} alchile, C_{1-6} eteroalchile, $-(Alk^a)_f-C_{3-6}$ cicloalchile, $-(Alk^a)_f-C_{3-6}$ eterocicloalchile, C_{2-6} alchenile, C_{2-6} eteroalchenile, $-(Alk^a)_f-C_{3-6}$ cicloalchenile, $-(Alk^a)_f-C_{3-6}$ eterocicloalchenile, C_{2-6} alchinile, C_{2-6} eteroalchinile, $-(Alk^a)_f-C_{6-14}$ arile, $-(Alk^a)_f-C_{6-14}$ arile o $-(Alk^a)_f$ -eteroarile (dove eteroarile contiene 5-13 elementi dell'anello), in cui

f è 0 o 1;

Alk^a è C_{1-6} alchilene o C_{1-6} eteroalchilene; e

R^s è opzionalmente esso stesso sostituito (in una realizzazione non sostituito) con 1 fino a 3 sostituenti Sub^2 ;

Sub^2 è indipendentemente alogeno, trialometile, trialoetile, $-NO_2$, $-CN$, $-N^+(C_{1-6} \text{ alchile})_2O^-$, $-CO_2H$, $-CO_2C_{1-6}$ alchile, $-SO_3H$, $-SOC_{1-6}$ alchile, $-SO_2C_{1-6}$ alchile, $-SO_3C_{1-6}$ alchile, $-OC(=O)OC_{1-6}$ alchile, $-C(=O)H$, $-C(=O)C_{1-6}$ alchile, $-OC(=O)C_{1-6}$ alchile, $=O$, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})C(=O)O(C_{1-6} \text{ alchile})$, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})C(=O)N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-OC(=O)N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})C(=O)C_{1-6}$ alchile, $-C(=S)N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})C(=S)C_{1-6}$ alchile, $-SO_2N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})SO_2C_{1-6}$ alchile, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})C(=S)N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})SO_2N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-C_{1-6}$ alchile, $-C_{1-6}$ eteroalchile, $-C_{3-6}$ cicloalchile, $-C_{3-6}$ eterocicloalchile, $-C_{2-6}$ alchenile, $-C_{2-6}$ eteroalchenile, $-C_{3-6}$ cicloalchenile, $-C_{3-6}$ eterocicloalchenile, $-C_{2-6}$ alchinile, $-C_{2-6}$ eteroalchinile, $-C_{6-14}$ arile, $-C_{5-13}$ eteroarile, $-Z^1-C_{1-6}$ alchile, $-Z^1-C_{3-6}$ cicloalchile, $-Z^1-C_{2-6}$ alchenile, $-Z^1-C_{3-6}$ cicloalchenile o $-Z^1-C_{2-6}$ alchinile; e

Z^1 è indipendentemente O, S, NH o $N(C_{1-6} \text{ alchile})$.

Mentre R^s in Sub^1 può essere opzionalmente sostituito con 1 fino a 3 sostituenti Sub^2 , Sub^2 è non sostituito.

Tuttavia, in una realizzazione, R^s è non sostituito.

In una realizzazione, R^s è H o C_{1-6} alchile, opzionalmente sostituito con 1 fino a 3 sostituenti Sub^2 .

In una realizzazione, Sub^2 è indipendentemente alogeno, trialometile, trialoetile, $-NO_2$, $-CN$, $-N^+(C_{1-6} \text{ alchile})_2O^-$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-SOC_{1-6}$ alchile, $-SO_2C_{1-6}$ alchile, $-C(=O)H$, $-C(=O)C_{1-6}$ alchile, $=O$, $-N(C_{1-6} \text{ alchile})_2$, $-C(=O)NH_2$, $-C_{1-6}$ alchile, $-C_{3-6}$ cicloalchile, $-C_{3-6}$ eterocicloalchile, $-Z^1-C_{1-6}$ alchile o $-Z^1-C_{3-6}$ cicloalchile.

In una realizzazione in cui il gruppo sostituito è aciclico (per esempio alchile, eteroalchile, alchenile, ecc.), Sub^1

non è -R^s e Sub² non è -C₁₋₆ alchile, -C₁₋₆ eteroalchile, -C₂₋₆ alchenile, -C₂₋₆ eteroalchenile, -C₂₋₆ alchinile o -C₂₋₆ eteroalchinile.

Dove un gruppo diverso da Sub² ha almeno 2 posizioni che possono essere sostituite, il gruppo può essere sostituito mediante entrambe le estremità di una catena di alchilene, alchenilene, alchinilene, eteroalchilene, eteroalchenilene o eteroalchinilene (in una realizzazione contenente 1 fino a 6 atomi, in una ulteriore realizzazione 3 fino a 6 atomi, e in una ulteriore realizzazione 3 o 4 atomi) per formare una parte ciclica. Tale catena è opzionalmente sostituita con 1 fino a 3 sostituenti Sub². In una realizzazione, tale catena è non sostituita. Quindi, i termini “cicloalchile”, “cicloalchenile”, “cicloalchinile”, “eterocicloalchile”, “eterocicloalchenile”, “eterocicloalchinile”, “arile” ed “eteroarile” opzionalmente sostituiti includono specie fuse. Per esempio, “cicloalchile opzionalmente sostituito” include una specie in cui i due anelli di cicloalchile sono fusi, ed “eteroarile opzionalmente sostituito” include una specie in cui un anello di eterocicloalchile è fuso all’anello aromatico (per esempio 5,6,7,8-tetraidro-1,8-naftiridin-2-ile).

Dove un gruppo diverso da Sub² ha un atomo che può essere sostituito due volte, tale atomo può essere sostituito mediante entrambe le estremità di una catena di alchilene, alchenilene, alchinilene, eteroalchilene, eteroalchenilene o eteroalchinilene (in una realizzazione contenente 2 fino a 8 atomi, in una ulteriore realizzazione 3 fino a 6 atomi, e in una ulteriore realizzazione 4 o 5 atomi) per formare una parte ciclica. Tale catena è opzionalmente sostituita con 1 fino a 3 sostituenti Sub². In una realizzazione, tale catena non è sostituita. Quindi, i termini “cicloalchile”, “cicloalchenile”, “cicloalchinile”, “eterocicloalchile”, “eterocicloalchenile”, “eterocicloalchinile”, “arile” ed “eteroarile” opzionalmente sostituiti includono specie spiro.

A titolo di chiarimento, quando un gruppo ha un eteroatomo, un sostituito può essere legato all’eteroatomo. Quindi, per esempio, “eteroalchile opzionalmente sostituito” include -CH₂-N(Sub¹)-CH₂-, -CH(Sub¹)-NH-CH₂- e -CH(Sub¹)-N(Sub¹)-CH₂-, ecc.

Termini modificatori

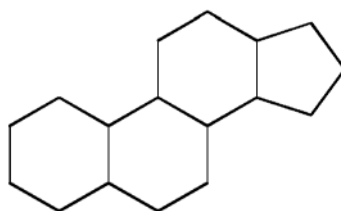
Quando un elenco è preceduto da un modificatore, si intende che il modificatore deve venire compreso per essere applicato a ciascuna delle voci nell’elenco. Per esempio, la frase “gruppo C₃₋₂₀ eterocicloalchile, C₃₋₂₀

eterocicloalchenile, C₃₋₂₀ eterocicloalchinile o C₅₋₂₀ eteroarile opzionalmente sostituito” indica che ciascuna delle quattro voci nell’elenco, cioè il gruppo C₃₋₂₀ eterocicloalchile, il gruppo C₃₋₂₀ eterocicloalchenile, il gruppo C₃₋₂₀ eterocicloalchinile e il gruppo C₆₋₂₀ eteroarile, può essere opzionalmente sostituita.

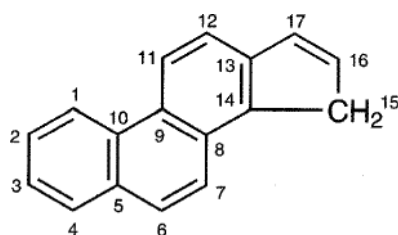
Quando un gruppo è caratterizzato mediante un primo modificatore e quindi, in seguito, lo stesso gruppo è caratterizzato da un modificatore successivo, quello che si intende è che il gruppo è caratterizzato da entrambi i modificatori simultaneamente. Per esempio, se un gruppo viene descritto come un gruppo “C₃₋₂₀ eterocicloalchinile” (il primo modificatore) e quindi in seguito lo stesso gruppo viene descritto come un gruppo “C₅₋₁₆” (il modificatore successivo), quello che si intende è un gruppo C₅₋₁₆ eterocicloalchinile.

Steroidi

Quando usato in questa sede, il termine “steroidi” si riferisce a qualsiasi gruppo comprendente la struttura seguente (la quale struttura viene indicata in questa sede come lo “scheletro di steroide”).



Puramente per scopi di illustrazione, lo scheletro di steroide è stato disegnato in precedenza come completamente saturo. Il termine steroide, tuttavia, intende anche coprire casi in cui vi è insaturazione nello scheletro di steroide. Per esempio, il termine steroide copre un gruppo che comprende lo scheletro di base completamente insaturo (mancude), 15*H*-ciclopenta[*a*]fenantrene:



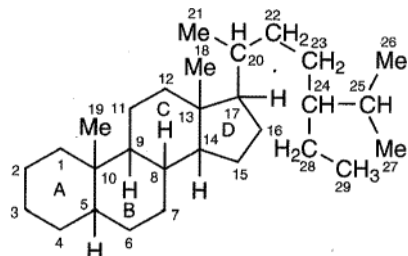
Il termine steroide copre anche un gruppo che comprende uno scheletro di steroide parzialmente insaturo.

Il termine steroide copre anche derivati “seco” dello scheletro di steroide, cioè gruppi in cui è stata effettuata scissione dell’anello; derivati “nor” e “omo” dello scheletro di steroide che comportano, rispettivamente,

contrazione ed espansione dell'anello (vedere Systemic Nomenclature of Organic Chemistry, di D. Hellwinkel, pubblicato da Springer, 2001, ISBN: 3-540-41138-0, pagina 203 per "seco" e pagina 204 per "nor" e "omo"). In una realizzazione, tuttavia, tali derivati seco non sono racchiusi dal termine "steroidi". In un'altra realizzazione, tali derivati nor non sono racchiusi dal termine "steroidi". In un'altra realizzazione, tali derivati omo non sono racchiusi dal termine "steroidi". Quindi, in una realizzazione, tali derivati seco, nor e omo non sono racchiusi dal termine "steroidi".

Il termine steroidi copre anche casi in cui uno o più degli atomi di carbonio nella struttura contrassegnata come scheletro di steroidi sono sostituiti con un eteroatomo. In una tale realizzazione, fino a sei atomi di carbonio, in una realizzazione fino a cinque atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a quattro atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a tre atomi di carbonio, in un'altra realizzazione fino a due atomi di carbonio, in un'altra realizzazione un atomo di carbonio, sono ciascuno indipendentemente sostituito con O, S(O)_q, N, P(O)_r o Si (e preferibilmente O, S(O)_q o N). In una realizzazione, tuttavia, il termine "steroidi" comprende specie in cui lo "scheletro di base di steroidi" non contiene eteroatomi.

Un sistema ad anelli di steroidi viene numerato secondo la convenzione esposta in seguito.



Il termine steroidi racchiude steroli, ormoni steroidei, acidi biliari e sali di acidi biliari. Uno sterolo è qualsiasi steroide con un gruppo ossidrilico in corrispondenza della posizione 3 dell'anello A.

Insaturazione

Secondo l'uso ordinario, la posizione omega-3 si riferisce al terzo legame dal terminale (metile) della catena; la posizione omega-6 si riferisce al sesto legame dal terminale (metile) della catena e la posizione omega-9 si riferisce al nono legame dal terminale (metile) della catena.

Nozioni generali

La realizzazione pratica della presente invenzione impiegherà, a meno che sia altrimenti indicato, metodi convenzionali di chimica, biochimica, biologia molecolare, immunologia e farmacologia, entro l'esperienza della tecnica. Tali tecniche vengono spiegate completamente nella letteratura. Vedere, per esempio, i riferimenti 33-39, ecc.

Il termine "comprendente" racchiude "includente" come pure "consistente", per esempio una composizione "comprendente" X può consistere esclusivamente in X o può includere qualcos'altro, per esempio X + Y.

Il termine "circa" in relazione a un valore numerico x è opzionale e indica, per esempio, $x \pm 10\%$.

La parola "sostanzialmente" non esclude "completamente", per esempio una composizione che è "sostanzialmente priva" di Y può essere completamente priva di Y. Dove necessario, la parola "sostanzialmente" può venire omessa dalla definizione dell'invenzione.

I riferimenti a carica, a cationi, ad anioni, a zwitterioni, ecc., vengono presi a pH 7.

TLR3 è il recettore a tipo Toll 3. Esso è un singolo recettore che si estende attraverso la membrana che gioca un ruolo chiave nel sistema immunitario innato. Agonisti noti di TLR3 comprendono poli(I:C). "TLR3" è il nome HGNC approvato per il gene codificante questo recettore, e il suo ID HGNC unico è HGNC:11849. La sequenza RefSeq per il gene TLR3 umano è GI:2459625.

TLR7 è il recettore a tipo Toll 7. Esso è un singolo recettore che si estende attraverso la membrana che gioca un ruolo chiave nel sistema immunitario innato. Agonisti noti di TLR7 comprendono, per esempio, imiquimod. "TLR7" è il nome HGNC approvato per il gene che codifica questo recettore, e il suo ID HGNC unico è HGNC:15631. La sequenza RefSeq per il gene TLR7 umano è GI:67944638.

TLR8 è il recettore a tipo Toll 8. Esso è un singolo recettore che si estende attraverso la membrana che gioca un ruolo chiave nel sistema immunitario innato. Agonisti noti di TLR8 comprendono, per esempio, resiquimod. "TLR8" è il nome HGNC approvato per il gene che codifica questo recettore, e il suo ID HGNC unico è HGNC:15632. La sequenza RefSeq per il gene TLR8 umano è GI:20302165.

La famiglia del recettore tipo RIG-I ("RLR") comprende varie RNA elicasi che giocano ruoli chiave nel sistema immunitario innato [40]. RLR-1 (anche noto come RIG-I o gene I inducibile con acido retinoico) ha due domini

di reclutamento di caspasi vicino al suo N terminale. Il nome HGNC approvato per il gene che codifica la RLR-1 elicasi è “DDX58” (per polipeptide 58 della cassetta DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)) e il ID HGNC unico è HGNC:19102. La sequenza RefSeq per il gene RLR-1 umano è GI:77732514. RLR-2 (anche noto come MDA5 o gene associato a differenziazione di melanoma 5) ha anche due domini di reclutamento di caspasi vicino al suo N terminale. Il nome HGNC approvato per il gene che codifica la RLR-2 elicasi è “IFIH1” (per interferone indotto con dominio 1 di elicasi C) e il ID HGNC unico è HGNC:18873. La sequenza RefSeq per il gene RLR-2 umano è GI:27886567. RLR-3 (anche noto come LGP2 o laboratorio di genetica e fisiologia 2) non ha domini di reclutamento di caspasi. Il nome HGNC approvato per il gene che codifica la RLR-3 elicasi è “DHX58” (per polipeptide 58 della cassetta DEXH (Asp-Glu-X-His)) e il ID HGNC unico è HGNC:29517. La sequenza RefSeq per il gene RLR-3 umano è GI:149408121.

PKR è una proteina chinasi dipendente da RNA a doppio filamento. Essa gioca un ruolo chiave nel sistema immunitario innato. “EIF2AK2” (per fattore 2-alfa eucariotico di inizio della traduzione di chinasi 2) è il nome HGNC approvato per il gene che codifica questo enzima, e il suo ID HGNC unico è HGNC:9437. La sequenza RefSeq per il gene PKR umano è GI:208431825.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La FIGURA 1 mostra un gel con RNA colorato. Le corsie mostrano (1) marcatori, (2) replicone nudo, (3) replicone dopo trattamento con RNasi, (4) replicone incapsulato in liposomi, (5) liposoma dopo trattamento con RNasi, (6) liposoma trattato con RNasi, quindi sottoposto a estrazione con fenolo/cloroformio.

La FIGURA 2 è una microfotografia elettronica di liposomi.

La FIGURA 3 mostra l'espressione di proteina (come unità luminose relative, RLU) ai giorni 1, 3 e 6 dopo somministrazione di RNA in liposomi con PEG di differenti lunghezze: 1 kDa (triangoli); 2 kDa (cerchi); 3 kDa (quadrati).

La FIGURA 4 mostra un gel con RNA colorato. Le corsie mostrano (1) marcatori, (2) replicone nudo, (3) replicone incapsulato in liposomi, (4) liposoma trattato con RNasi, quindi sottoposto a estrazione con fenolo/cloroformio.

La FIGURA 5 mostra l'espressione di proteina ai giorni 1, 3 e 6 dopo somministrazione di RNA come un replicone impaccato con virione (quadrati), come RNA nudo (rombi) o in liposomi (+ = 0,1 µg, x = 1 µg).

La FIGURA 6 mostra l'espressione di proteina ai giorni 1, 3 e 6 dopo somministrazione di quattro differenti dosi di RNA incapsulato in liposomi.

La FIGURA 7 mostra i titoli di IgG anti-F in animali che ricevono replicone impaccato con virione (VRP o VSRP), 1 µg di RNA nudo e 1 µg di RNA incapsulato in liposomi.

La FIGURA 8 mostra i titoli di IgG anti-F in animali che ricevono VRP, 1 µg di RNA nudo e 0,1 g o 1 µg di RNA incapsulato in liposomi.

La FIGURA 9 mostra titoli anticorpali neutralizzanti in animali che ricevono VRP o uno di 0,1 g o 1 µg di RNA incapsulato in liposomi.

La FIGURA 10 mostra i livelli di espressione dopo somministrazione di un replicone come RNA nudo (cerchi), RNA incapsulato in liposomi (triangolo e quadrato) o come un lipoplex (triangolo capovolto).

La FIGURA 11 mostra titoli di IgG F-specifica (2 settimane dopo la seconda dose) dopo somministrazione di un replicone come RNA nudo (0,01-1 µg), RNA incapsulato in liposomi (0,01-10 µg) o impaccato come un virione (VRP, 10⁶ unità infettive o IU).

La FIGURA 12 mostra titoli di IgG F-specifica (cerchi) e titoli di PRNT (quadrati) dopo somministrazione di un replicone come RNA nudo (1 µg), RNA incapsulato in liposomi (0,1 o 1 µg) o impaccato come un virione (VRP, 10⁶ IU). Sono anche mostrati i titoli in topi naïve. Le linee continue mostrano le medie geometriche.

La FIGURA 13 mostra la produzione di citochina intracellulare dopo ristimolazione con peptidi sintetici che rappresentano gli epitopi principali nella proteina F, 4 settimane dopo una seconda dose. L'asse y mostra la % di citochina+ di CD8+CD4-.

La FIGURA 14 mostra la struttura del lipide "RV05".

La FIGURA 15 mostra titoli di IgG F-specifica (log₁₀ medio dei titoli ± deviazione standard) su 210 giorni dopo immunizzazione di vitelli. Le tre linee vengono facilmente distinte al giorno 63 e sono, dal basso all'alto: controllo negativo con PBS; RNA somministrato con un liposoma; e il prodotto "Triangle 4".

La FIGURA 16 mostra le strutture di tre lipidi DMG coniugati a PEG (1-3 kDa).

Le FIGURE 17A fino a 17E mostrano le strutture di vari tipi di coniugati a PEG, in cui R è PEG di una lunghezza desiderata.

La FIGURA 18 mostra la struttura di un lipide coniugato a PEG di “divisione” utile. Il riquadro mostra il p.m. totale del PEG nel lipide (che, nell’esempio specifico seguente, era 2.000).

MODI PER REALIZZARE L’INVENZIONE

Repliconi di RNA

In quanto segue vengono usati vari repliconi. In generale, questi sono basati su un genoma di alfavirus ibrido con proteine non strutturali ottenute da virus dell’encefalite equina venezuelana (VEEV), un segnale di impaccamento ottenuto da VEEV, e una UTR in 3’ ottenuta da virus Sindbis o un VEEV mutante. Il replicone è lungo circa 10 kb e ha una coda di poli-A.

DNA plasmidico codificante repliconi di alfavirus (denominato: pT7-mVEEV-FL.RSVF o A317; pT7-mVEEV-SEAP o A306; pSP6-VCR-GFP o A50) è servito come uno stampo per la sintesi di RNA *in vitro*. I repliconi contengono gli elementi genetici di alfavirus richiesti per la replicazione di RNA, ma mancano di quei prodotti genici codificanti necessari per l’assemblaggio della particella; le proteine strutturali sono invece sostituite da una proteina di interesse (un reporter come SEAP o GFP, o un immunogene come proteina F di RSV a lunghezza intera), e quindi i repliconi non sono in grado di indurre la generazione di particelle infettive. Un promotore di batteriofago (T7 o SP6) a monte del cDNA di alfavirus facilita la sintesi dell’RNA replicone *in vitro*, e un ribozima del virus dell’epatite delta (HDV) immediatamente a valle della coda di poli(A) genera l’estremità 3’ corretta tramite la sua stessa attività di auto-scissione.

Dopo linearizzazione del DNA plasmidico a valle del ribozima di HDV con una endonucleasi di restrizione adatta, trascritti run-off sono stati sintetizzati *in vitro* usando RNA polimerasi dipendente da DNA derivata da batteriofago T7 o SP6. Le trascrizioni sono state eseguite per 2 ore a 37°C in presenza di 7,5 mM (RNA polimerasi T7) o 5 mM (RNA polimerasi SP6) di ciascuno dei trifosfati nucleosidici (ATP, CTP, GTP e UTP) seguendo le istruzioni fornite dal produttore (Ambion). Dopo la trascrizione, il DNA stampo è stato digerito con

TURBO DNasi (Ambion). L'RNA replicone è stato precipitato con LiCl e ricostituito in acqua priva di nucleasi. A RNA senza cappuccio è stato fornito un cappuccio in modo post-trascrizionale con enzima per la formazione di cappuccio vaccinicco (VCE), usando il sistema per la formazione di cappuccio ScriptCap m7G (Epicentre Biotechnologies) come delineato nel manuale utente; ai repliconi dotati di cappuccio in questo modo viene fornito il prefisso "v", per esempio vA317 è il replicone A317 dotato di cappuccio mediante VCE. RNA dotato di cappuccio in modo post-trascrizionale è stato precipitato con LiCl e ricostituito in acqua priva di nucleasi. La concentrazione dei campioni di RNA è stata determinata mediante misurazione della $DO_{260\text{ nm}}$. L'integrità dei trascritti *in vitro* è stata confermata mediante elettroforesi su gel di agarosio denaturante.

Incapsulamento liposomiale

RNA è stato incapsulato in liposomi prodotti essenzialmente mediante il metodo dei riferimenti 7 e 41. I liposomi erano formati dal 10% di DSPC (zwitterionica), 40% di DlinDMA (cationico), 48% di colesterolo e 2% di DMG coniugata a PEG. Queste proporzioni si riferiscono alla % molare nel liposoma totale.

DlinDMA (1,2-dilinoileilossi-N,N-dimetil-3-amminopropano) è stato sintetizzato usando la procedura del riferimento 2. DSPC (1,2-diastearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) è stata acquistata presso Genzyme. Colesterolo è stato ottenuto da Sigma-Aldrich. DMG coniugata a PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metossi(polietilenglicole), sale di ammonio), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilammonio-propano, sale cloruro) e DC-chol (3 β -[N-(N',N'-dimetilamminoetan)-carbamoil]colesterolo cloridrato) erano della Avanti Polar Lipids.

In breve, i lipidi sono stati disciolti in etanolo (2 ml), un RNA replicone è stato disciolto in tampone (2 ml, citrato di sodio 100 mM, pH 6) e questo è stato miscelato con 2 ml di tampone facendo seguire un'ora di bilanciamento. La miscela è stata diluita con 6 ml di tampone, quindi filtrata. Il prodotto risultante conteneva liposomi, con una efficienza di incapsulamento di ~95%. La FIGURA 2 mostra una microfotografia elettronica di esempio di liposomi preparati mediante questi metodi. Questi liposomi contengono RNA incapsulato codificante l'antigene F di RSV a lunghezza intera. La diffusione dinamica della luce di una carica ha mostrato un diametro medio di 141 nm (mediante intensità) o 78 nm (mediante numero).

In un particolare metodo di incapsulamento, sono state preparate soluzioni base di lipide fresche in etanolo. 37

mg di DlinDMA, 11,8 mg di DSPC, 27,8 mg di colesterolo e 8,07 mg di DMG coniugata a PEG sono stati pesati e disciolti in 7,55 ml di etanolo. Sono stati usati cinque PEG coniugati differenti: PEG-500, PEG-750, PEG-1000, PEG-2000 o PEG-3000. La soluzione base di lipide appena preparata è stata delicatamente sottoposta a scuotimento a 37°C per circa 15 minuti per formare una miscela omogenea. Quindi, 226,7 µl della base sono stati aggiunti a 1,773 ml di etanolo per produrre una soluzione base di lipide operativa di 2 ml. Una soluzione operativa di 2 ml di RNA è stata anche preparata da una soluzione base di ~1 µg/µl in tampone citrato 100 mM (pH 6). Tre fiale in vetro da 20 ml (con barrette di agitazione) sono state risciacquate con soluzione di RNase Away e lavate con acqua MilliQ in abbondanza prima dell'uso per decontaminare le fiale di RNasi. Una delle fiale è stata usata per la soluzione operativa di RNA e le altre per raccogliere le miscele di lipide e RNA (come descritto in seguito). Le soluzioni di lipide e RNA operative sono state riscaldate a 37°C per 10 minuti prima di venire caricate in siringhe luer-lok da 3 cc. 2 ml di tampone citrato (pH 6) sono stati caricati in un'altra siringa da 3 cc. Le siringhe contenenti RNA e i lipidi sono state collegate a un miscelatore a T (PEEK™, D.I. della giunzione 500 µm) usando tubazione in FEP (etilene fluorurato-propilene; tutta la tubazione in FEP ha un diametro interno di 2 mm e un diametro esterno di 3 mm; ottenuta da IDEX Health Science). L'uscita dal miscelatore a T era anche una tubazione in FEP. La terza siringa contenente il tampone citrato è stata collegata a un pezzo separato della tubazione. Tutte le siringhe sono quindi state comandate a una portata di 7 ml/minuto usando una pompa a siringa. Le uscite della tubazione sono state posizionate per raccogliere le miscele in una fiala in vetro da 20 ml (sotto agitazione). La barretta di agitazione è stata prelevata e la soluzione di etanolo/acquosa è stata lasciata bilanciare fino a temperatura ambiente per un'ora. La miscela è stata quindi caricata in una siringa da 5 cc, che è stata collegata a un pezzo della tubazione in FEP e, in un'altra siringa da 5 cc con lunghezza uguale della tubazione in FEP, è stato caricato un volume uguale di tampone citrato 100 mM (pH 6). Le due siringhe sono state comandate a una portata di 7 ml/minuto usando una pompa a siringa e la miscela finale è stata raccolta in una fiala in vetro da 20 ml (sotto agitazione). Successivamente, i liposomi sono stati concentrati a 2 ml e dializzati contro 10-15 volumi di PBS 1X usando un sistema di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) prima di recuperare il prodotto finale. Il sistema TFF e membrane di filtrazione a fibra cava

sono stati acquistati presso Spectrum Labs, e sono stati usati secondo le linee guida del produttore. Sono state usate membrane di filtrazione a fibra cava con un taglio della dimensione dei pori da 100 kD e area superficiale di 20 cm². Per gli esperimenti *in vitro* e *in vivo*, le formulazioni sono state diluite alla concentrazione di RNA richiesta con PBS 1X.

La percentuale di RNA incapsulato e la concentrazione di RNA sono state determinate mediante il kit di reagenti per RNA Quant-iT RiboGreen (Invitrogen), seguendo le istruzioni del produttore. L'RNA ribosomiale standard fornito nel kit è stato usato per generare una curva standard. I liposomi sono stati diluiti a 10x o 100x in tampone TE 1X (dal kit) prima dell'aggiunta del colorante. Separatamente, i liposomi sono stati diluiti a 10x o 100x in tampone TE 1X contenente lo 0,5% di Triton X prima dell'aggiunta del colorante (per distruggere i liposomi e per saggiare quindi l'RNA totale). In seguito, una quantità uguale di colorante è stata aggiunta a ciascuna soluzione, e quindi ~180 µl di ciascuna soluzione dopo l'aggiunta del colorante sono stati caricati in duplicato in una piastra per coltura tissutale a 96 pozzetti. La fluorescenza (eccitazione a 485 nm, emissione a 528 nm) è stata letta su un lettore di micropiastre. Tutte le formulazioni di liposoma sono state dosate *in vivo* sulla base della quantità incapsulata di RNA.

Per ottenere liposomi più piccoli, il metodo con siringa/tubazione è stato sostituito con un metodo in cui le soluzioni di lipide e RNA sono state miscelate in canali su un chip microfluidico. Sono state preparate soluzioni base di lipide fresche in etanolo. 37 mg di DlinDMA, 11,8 mg di DSPC, 27,8 mg di colesterolo e 8,07 mg di PEG-DMG sono stati pesati e disciolti in 7,55 ml di etanolo. La soluzione base di lipide appena preparata è stata delicatamente sottoposta a scuotimento a 37°C per circa 15 minuti per formare una miscela omogenea. Quindi, 226,7 µl della base sono stati aggiunti a 1,773 ml di etanolo per produrre una soluzione base di lipide operativa di 2 ml. Una soluzione operativa di 4 ml di RNA è stata anche preparata da una soluzione base di ~1 µg/µl in tampone citrato 100 mM (pH 6). Quattro fiale in vetro da 20 ml (con barrette di agitazione) sono state risciacquate con soluzione RNase Away e lavate con acqua MilliQ in abbondanza prima dell'uso per decontaminare le fiale di RNasi. Due delle fiale sono state usate per la soluzione operativa di RNA (2 ml ciascuna fiala) e le altre per raccogliere le miscele di lipide e RNA. Le soluzioni di lipide e RNA operative sono

state riscaldate a 37°C per 10 minuti, prima di venire caricate in siringhe luer-lok da 3 cc. Le siringhe contenenti RNA e i lipidi sono state collegate a un chip di giunzione Mito Droplet (un dispositivo microfluidico in vetro ottenuto da Syrris, Parte n. 3000158) usando tubazione in PTFE con D.I. di 0,03 pollici × D.E. di 1/16 di pollice (Syrris), usando un connettore laterale a 4 vie. Due flussi di RNA e un flusso di lipide sono stati comandati mediante pompe a siringa e la miscelazione della fase in etanolo e acquosa è stata eseguita presso la giunzione a X (100 µm × 105 µm) del chip. La portata di tutti e tre i flussi è stata mantenuta a 1,5 ml/minuto, quindi il rapporto fra flusso acquoso ed etanologico totale era 2:1. L'uscita della tubazione è stata posizionata per raccogliere le miscele in una fiala in vetro da 20 ml (con agitazione). La barretta di agitazione è stata prelevata e la soluzione in etanolo/acquosa è stata lasciata bilanciare a temperatura ambiente per un'ora. La miscela è stata quindi caricata in una siringa da 5 cc che era stata collegata a un pezzo della tubazione in PTFE con D.I. di 0,03 pollici × D.E. di 1/16 di pollice, e in un'altra siringa da 5 cc con lunghezza uguale della tubazione in PTFE è stato caricato un volume uguale di tampone citrato 100 mM (pH 6). Le due siringhe sono state comandate a una portata di 3 ml/minuto usando una pompa a siringa, e la miscela finale è stata raccolta in una fiala in vetro da 20 ml (sotto agitazione). In seguito, i liposomi sono stati concentrati a 2 ml e dializzati contro 10-15 volumi di PBS 1X usando il sistema TFF prima di recuperare il prodotto finale. Sono state usate membrane di filtrazione in fibra cava con un taglio della dimensione dei pori di 100 kDa e area superficiale di 20 cm². Per gli esperimenti *in vitro* e *in vivo*, le formulazioni sono state diluite alla concentrazione di RNA richiesta con PBS 1X. Mentre i liposomi preparati usando il metodo con siringa/tubazione con 75 µg di RNA avevano un diametro medio Z (Z_{av}) di 148 nm e un indice di polidispersità (pdI) di 0,122, la miscelazione su chip ha fornito liposomi con un Z_{av} di 97 nm e un pdI di 0,086. La proporzione di RNA incapsulato è diminuita leggermente dal 90% fino all'87%.

L'incapsulamento in liposomi ha mostrato di proteggere RNA dalla digestione con RNasi. Gli esperimenti hanno utilizzato 3,8 mAU di RNasi A per microgrammo di RNA, incubati per 30 minuti a temperatura ambiente. RNasi è stata inattivata con proteinasi K a 55°C per 10 minuti. Una miscela 1:1 volume/volume fra campione e fenolo:cloroformio:alcol isoamilico 25:24:1 volume/volume/volume è stata quindi aggiunta per estrarre l'RNA dai lipidi nella fase acquosa. I campioni sono stati miscelati mediante vortexaggio per pochi secondi e quindi

posti su una centrifuga per 15 minuti a 12.000 giri/minuto. La fase acquosa (contenente l'RNA) è stata rimossa e usata per analizzare l'RNA. Prima del caricamento (400 ng di RNA per pozzetto), tutti i campioni sono stati incubati con colorante di caricamento di formaldeide, denaturati per 10 minuti a 65°C e raffreddati a temperatura ambiente. Marcatori Ambion Millennium sono stati usati per approssimare il peso molecolare del costrutto di RNA. Il gel è stato controllato a 90 V. Il gel è stato colorato usando lo 0,1% di oro SYBR secondo le linee guida del produttore in acqua, scuotendo a temperatura ambiente per un'ora. La FIGURA 1 mostra che RNasi digerisce completamente RNA in assenza di incapsulamento (corsia 3). RNA non è rilevabile dopo incapsulamento (corsia 4), e non viene osservato cambiamento se questi liposomi vengono trattati con RNasi (corsia 4). Dopo che liposomi trattati con RNasi vengono sottoposti ad estrazione con fenolo, viene osservato RNA non digerito (corsia 6). Anche dopo una settimana a 4°C, l'RNA può venire osservato senza alcuna frammentazione (FIGURA 4, freccia). L'espressione di proteina *in vivo* non era cambiata dopo 6 settimane a 4°C e un ciclo di congelamento-scongelo. Questo RNA incapsulato in liposomi è stabile.

Per saggiare l'espressione *in vivo* dell'RNA, un enzima reporter (SEAP; fosfatasi alcalina secreta) è stato codificato nel replicone, anziché un immunogene. I livelli di espressione sono stati misurati in sieri diluiti 1:4 in tampone di diluizione Phospha-Light 1X, usando un substrato per fosfatasi alcalina chemiluminescente. Topi BALB/c di 8-10 settimane di età (5/gruppo) sono stati iniettati intramuscolarmente il giorno 0, 50 µl per zampa, con dose di RNA di 0,1 µg o 1 µg. Lo stesso vettore è stato anche somministrato senza i liposomi (in PBS 1X priva di RNasi) a 1 µg. Sono anche stati testati repliconi impaccati in virione. I repliconi impaccati in virione usati in questa sede (indicati come "VRP") sono stati ottenuti mediante i metodi del riferimento 42, dove il replicone di alfavirus viene derivato dal VEEV mutante o una chimera derivata dal genoma di VEEV ingegnerizzato per contenere la UTR in 3' del virus Sindbis e un segnale di impaccamento (PS) del virus Sindbis, impaccati sottoponendoli a co-elettroporazione in cellule BHK con RNA helper difettosi che codificano i geni del capsido e della glicoproteina del virus Sindbis.

Come mostrato nella FIGURA 5, l'incapsulamento ha aumentato i livelli di SEAP di circa ½ log alla dose di 1 µg, e al giorno 6 l'espressione ottenuta da una dose incapsulata di 0,1 µg corrispondeva ai livelli osservati con la

dose non incapsulata di 1 µg. I livelli di espressione al giorno 3 superavano quelli ottenuti con VRP (quadrati). Quindi, l'espressione è aumentata quando l'RNA è stato formulato nei liposomi rispetto al controllo di RNA nudo, anche a una dose più bassa di 10x. L'espressione era anche più alta rispetto al controllo di VRP, ma le cinetiche di espressione erano molto diverse (vedere la FIGURA 5). La somministrazione dell'RNA con elettroporazione ha portato a espressione aumentata rispetto al controllo di RNA nudo, ma questi livelli erano più bassi rispetto ai liposomi.

Per saggiare se l'effetto osservato nei gruppi con liposoma era dovuto semplicemente ai componenti di liposoma o se era collegato all'incapsulamento, il replicone è stato somministrato in forma incapsulata (con due differenti protocolli di purificazione, 0,1 µg di RNA) o miscelato con i liposomi dopo la loro formazione (un "lipoplex" non incapsulato, 0,1 µg di RNA), o come RNA nudo (1 µg). La FIGURA 10 mostra che il lipoplex ha fornito i livelli più bassi di espressione, mostrando che l'incapsulamento è essenziale per l'espressione potente.

Ulteriori esperimenti con SEAP hanno mostrato una chiara risposta alla dose *in vivo*, con espressione osservata dopo somministrazione di poco RNA come 1 ng (FIGURA 6). Ulteriori esperimenti che hanno confrontato l'espressione ottenuta da repliconi incapsulati e nudi hanno indicato che 0,01 µg di RNA incapsulato erano equivalenti a 1 µg di RNA nudo. A una dose di RNA di 0,5 µg, il materiale incapsulato ha fornito una espressione 12 volte più alta al giorno 6; a una dose di 0,1 µg, i livelli erano 24 volte più alti al giorno 6.

Anziché osservare i livelli medi nel gruppo, sono anche stati studiati singoli animali. Mentre vari animali erano non responder a repliconi nudi, l'incapsulamento ha eliminato i non responder.

Ulteriori esperimenti hanno sostituito DlinDMA con DOTAP. Sebbene i liposomi DOTAP forniscano espressione migliore rispetto a replicone nudo, essi erano inferiori ai liposomi DlinDMA (differenza da 2 fino a 3 volte al giorno 1).

Per saggiare l'immunogenicità *in vivo*, è stato costruito un replicone per esprimere la proteina F a lunghezza intera ottenuta dal virus sinciziale respiratorio (RSV). Questa è stata somministrata nuda (1 µg), incapsulata in liposomi (0,1 o 1 µg) o impaccata in virioni (10^6 IU; "VRP") ai giorni 0 e 21. La FIGURA 7 mostra i titoli di IgG anti-F 2 settimane dopo la seconda dose, e i liposomi hanno chiaramente potenziato l'immunogenicità. La

FIGURA 8 mostra i titoli 2 settimane dopo, punto al quale non vi era differenza statistica fra il gruppo con RNA incapsulato a 0,1 µg, RNA incapsulato a 1 µg o VRP. I titoli di neutralizzazione (misurati come riduzione della placca del 60%, “PRNT60”) non erano significativamente diversi in questi tre gruppi 2 settimane dopo la seconda dose (FIGURA 9). La FIGURA 12 mostra entrambi i titoli di IgG e PRNT 4 settimane dopo la seconda dose.

La FIGURA 13 conferma che l’RNA stimola una robusta risposta di cellule T CD8.

Ulteriori esperimenti hanno confrontato i titoli di IgG F-specifica in topi che ricevono VRP, 0,1 µg di RNA incapsulato in liposomi o 1 µg di RNA incapsulato in liposomi. I rapporti dei titoli (VRP:liposoma) a vari tempi dopo la seconda dose erano come segue:

	2 settimane	4 settimane	8 settimane
0.1µg	2.9	1.0	1.1
1µg	2.3	0.9	0.9

Quindi, l’RNA incapsulato in liposomi induce essenzialmente la stessa entità di risposta immunitaria come osservato con la somministrazione di virione.

Ulteriori esperimenti hanno mostrato risposte superiori di IgG F-specifica con una dose di 10 µg, risposte equivalenti per dosi di 1 µg e 0,1 µg, e una risposta inferiore con una dose di 0,01 µg. La FIGURA 11 mostra i titoli di IgG in topi che ricevono il replicone in forma nuda a 3 dosi differenti, in liposomi a 4 dosi differenti, o come VRP (10^6 IU). La risposta osservata con 1 µg di RNA incapsulato in liposomi non era statisticamente significativa (ANOVA) quando confrontata a VRP, ma la risposta più alta osservata con 10 µg di RNA incapsulato in liposomi era statisticamente significativa ($p < 0,05$) quando confrontata a entrambi di questi gruppi.

Un ulteriore studio ha confermato che 0,1 µg dell’RNA incapsulato in liposomi hanno fornito risposte di IgG anti-F molto più alte (15 giorni dopo la seconda dose) rispetto a 0,1 µg di DNA somministrato, ed erano ancora più immunogenici rispetto a 20 µg di DNA plasmidico codificante l’antigene F, somministrati mediante elettroporazione (sistema di somministrazione di DNA Elgen™, Inovio).

Metodi di preparazione di liposomi

In generale, sono stati usati otto metodi diversi per preparare liposomi secondo l'invenzione. Questi vengono indicati nel testo come metodi (A) fino a (H) e differiscono principalmente in relazione alle fasi di filtrazione e TFF. I dettagli sono come segue:

(A) sono state preparate soluzioni base di lipide fresche in etanolo. 37 mg di DlinDMA, 11,8 mg di DSPC, 27,8 mg di colesterolo e 8,07 mg di PEG DMG 2000 sono stati pesati e disciolti in 7,55 ml di etanolo. La soluzione base di lipide appena preparata è stata delicatamente sottoposta a scuotimento a 37°C per circa 15 minuti per formare una miscela omogenea. Quindi, 755 µl della base sono stati aggiunti a 1,245 ml di etanolo per preparare una soluzione base di lipide operativa di 2 ml. Questa quantità di lipidi è stata usata per formare liposomi con 250 µg di RNA. Una soluzione operativa di 2 ml di RNA è stata anche preparata da una soluzione base di ~1 µg/µl in tampone citrato 100 mM (pH 6). Tre fiale in vetro da 20 ml (con barrette di agitazione) sono state risciacquate con soluzione RNase Away (Molecular BioProducts, San Diego, CA) e lavate con acqua MilliQ in abbondanza prima dell'uso per decontaminare le fiale di RNasi. Una delle fiale è stata usata per la soluzione operativa di RNA e le altre per raccogliere le miscele di lipide e RNA (come descritto in seguito). Le soluzioni di lipide e RNA operative sono state riscaldate a 37°C per 10 minuti prima di venire caricate in siringhe luer-lok da 3 cc. 2 ml di tampone citrato (pH 6) sono stati caricati in un'altra siringa da 3 cc. Le siringhe contenenti RNA e i lipidi sono state collegate a un miscelatore a T (PEEK™, D.I. della giunzione 500 µm, IDEX Health Science, Oak Harbor, WA) usando tubazione in FEP (etilene fluorurato-propilene; tutta la tubazione in FEP ha un diametro interno di 2 mm × un diametro esterno di 3 mm, fornita da IDEX Health Science). L'uscita dal miscelatore a T era anche una tubazione in FEP. La terza siringa contenente il tampone citrato è stata collegata a un pezzo separato della tubazione in FEP. Tutte le siringhe sono quindi state comandate a una portata di 7 ml/minuto usando una pompa a siringa. Le uscite della tubazione sono state posizionate per raccogliere le miscele in una fiala in vetro da 20 ml (sotto agitazione). La barretta di agitazione è stata prelevata e la soluzione in etanolo/acquosa è stata lasciata bilanciare fino a temperatura ambiente per un'ora. 4 ml della miscela sono stati caricati in una siringa da 5 cc, che è stata collegata a un pezzo della tubazione in FEP e, in un'altra siringa da 5 cc collegata a una

lunghezza uguale della tubazione in FEP, è stata caricata una quantità uguale di tampone citrato 100 mM (pH 6). Le due siringhe sono state comandate a una portata di 7 ml/minuto usando la pompa a siringa e la miscela finale è stata raccolta in una fiala in vetro da 20 ml (sotto agitazione). Successivamente, la miscela raccolta dalla seconda fase di miscelazione (liposomi) è stata fatta passare attraverso una membrana Mustang Q (un supporto per scambio anionico che si lega a e rimuove molecole anioniche, ottenuto da Pall Corporation, AnnArbor, MI, USA). Prima del passaggio dei liposomi, 4 ml di NaOH 1 M, 4 ml di NaCl 1 M e 10 ml di tampone citrato 100 mM (pH 6) sono stati fatti passare in successione attraverso la membrana Mustang. I liposomi sono stati riscaldati per 10 minuti a 37°C prima del passaggio attraverso la membrana. In seguito, i liposomi sono stati concentrati a 2 ml e dializzati contro 10-15 volumi di PBS 1X usando TFF prima di recuperare il prodotto finale. Il sistema TFF e membrane di filtrazione a fibra cava sono stati acquistati presso Spectrum Labs, e sono stati usati secondo le linee guida del produttore. Sono state usate membrane di filtrazione a fibra cava di polisolfone (parte numero P/N: XIAB-100-20P) con un taglio della dimensione dei pori da 100 kD e area superficiale di 8 cm². Per gli esperimenti *in vitro* e *in vivo*, le formulazioni sono state diluite alla concentrazione di RNA richiesta con PBS 1X.

(B) Come il metodo (A), ad eccezione che, dopo lo scuotimento, 226,7 µl della base sono stati aggiunti a 1,773 ml di etanolo per preparare una soluzione base di lipide operativa di 2 ml, modificando così il rapporto lipide:RNA.

(C) Come il metodo (B), ad eccezione che la filtrazione su Mustang è stata omessa, per cui i liposomi giungevano dalla fiala in vetro da 20 ml nella dialisi con TFF.

(D) Come il metodo (C), ad eccezione che la TFF ha usato membrane a fibra cava di polietersolfone (PES) (parte numero P-C1-100E-100-01N) con un taglio della dimensione dei pori da 100 kD e un'area superficiale di 20 cm².

(E) Come il metodo (D), ad eccezione che è stata usata la membrana Mustang come nel metodo (A).

(F) Come il metodo (A), ad eccezione che la filtrazione su Mustang è stata omessa, per cui i liposomi giungevano dalla fiala in vetro da 20 ml nella dialisi con TFF.

(G) Come il metodo (D), ad eccezione che è stata preparata una soluzione operativa da 4 ml di RNA da una soluzione base di $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in tampone citrato 100 mM (pH 6). Quindi, sono state preparate nello stesso modo quattro fiale in vetro da 20 ml. Due di queste sono state usate per la soluzione operativa di RNA (2 ml in ciascuna fiala) e le altre per raccogliere le miscele di lipide e RNA come in (C). Anziché usare il miscelatore a T, siringhe contenenti RNA e i lipidi sono state collegate a un chip di giunzione Mito Droplet (un dispositivo microfluidico in vetro ottenuto da Syrris, parte n. 3000158) usando tubazione in PTFE (0,03 pollici di diametro interno \times 1/16 di pollice di diametro esterno), usando un connettore laterale a 4 vie (Syrris). Due flussi di RNA e un flusso di lipide sono stati guidati tramite pompe a siringa e la miscelazione dell'etanolo e della fase acquosa è stata eseguita presso la giunzione a X ($100 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$) del chip. La portata di tutti e tre i flussi è stata mantenuta a 1,5 ml/minuto, quindi il rapporto fra portata acquosa totale ed etanolica era 2:1. L'uscita del tubo è stata posizionata per raccogliere le miscele in una fiala in vetro da 20 ml (sotto agitazione). La barretta di agitazione è stata prelevata e la soluzione in etanolo/acquosa è stata lasciata bilanciare a temperatura ambiente per 1 h. Quindi, la miscela è stata caricata in una siringa da 5 cc, che è stata collegata a un altro pezzo della tubazione in PTFE; in un'altra siringa da 5 cc con lunghezza uguale della tubazione in PTFE, è stato caricato un volume uguale di tampone citrato 100 mM (pH 6). Le due siringhe sono state guidate a una portata di 3 ml/minuto usando una pompa a siringa e la miscela finale è stata raccolta in una fiala in vetro da 20 ml (sotto agitazione). In seguito, i liposomi sono stati concentrati a 2 ml e dializzati contro 10-15 volumi di PBS 1X usando TFF come in (D).

(H) Come il metodo (A), ad eccezione che 2 ml di soluzione base di lipide operativa sono stati preparati miscelando 120,9 μl della base di lipide con 1,879 ml di etanolo. Inoltre, dopo miscelazione nel miscelatore a T, i liposomi ottenuti dalla fiala da 20 ml sono stati caricati in una cassetta per dialisi Pierce Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, extra-resistenza, capacità di 0,5-3 ml), e dializzati contro 400-500 ml di PBS 1X per una notte a 4°C in un contenitore in plastica sottoposto ad autoclave prima di recuperare il prodotto finale.

Immunogenicità per RSV

Il replicone auto-replicante vA317 codificante la proteina F di RSV è stato somministrato a topi BALB/c, 4 o 8

animali per gruppo, mediante vaccinazioni intramuscolari bilaterali (50 µl per zampa) i giorni 0 e 21, con il replicone (1 µg) da solo o formulato come liposomi con DlinDMA (“RV01”) o DOTAP (“RV13”) o il lipide mostrato nella FIGURA 14 (“RV05”). I liposomi RV01 avevano il 40% di DlinDMA, 10% di DSPC, 48% di colesterolo e 2% di PEG-DMG, ma con differenti quantità di RNA. I liposomi RV05 avevano il 40% di RV05, 10% di DSPC, 48% di colesterolo e 2% di PEG-DMG, o il 60% di RV05, 38% di colesterolo e 2% di PEG-DMG. I liposomi RV13 avevano il 40% di DOTAP, 10% di DOPE, 48% di colesterolo e 2% di PEG-DMG. In tutti i casi, il PEG era PEG-2000 (cioè PEG da 2 kDa). Per confronto, DNA plasmidico nudo (20 µg) che esprime lo stesso antigene RSV-F è stato somministrato usando elettroporazione o con liposomi RV01(10) (0,1 µg di DNA). Quattro topi sono stati usati come un gruppo di controllo naïve.

I liposomi sono stati preparati mediante il metodo (A) o il metodo (B). Per alcuni liposomi preparati mediante il metodo (A), è stata usata una quantità doppia o metà di RNA. Il diametro medio delle particelle Z e l'indice di polidispersità erano:

RV	Z_{av} (nm)	pDI	Preparazione
RV01 (10)	158.6	0.088	(A)
RV01 (08)	156.8	0.144	(A)
RV01 (05)	136.5	0.136	(B)
RV01 (09)	153.2	0.067	(A)
RV01 (10)	134.7	0.147	(A)
RV05 (01)	148	0.127	(A)
RV05 (02)	177.2	0.136	(A)
RV13 (02)	128.3	0.179	(A)

Siero è stato prelevato per l'analisi anticorpale i giorni 14, 36 e 49. Le milze sono state raccolte dai topi il giorno 49 per l'analisi di cellule T.

I titoli di IgG nel siero F-specifica (GMT) erano come segue:

RV	Giorno 14	Giorno 36
DNA plasmidico nudo	439	6712
RNA di A317 nudo	78	2291
RV01 (10)	3020	26170
RV01 (08)	2326	9720
RV01 (05)	5352	54907
RV01 (09)	4428	51316
RV05 (01)	1356	5346
RV05 (02)	961	6915
RV01 (10) DNA	5	13
RV13 (02)	644	3616

La proporzione di cellule T che sono citochina-positive e specifiche per il peptide F51-66 di RSV è come segue, mostrando solo cifre che sono statisticamente significativamente sopra lo zero:

RV	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
DNA plasmidico nudo	0.04	0.07		0.10	0.57	0.29		0.66
RNA di A317 nudo	0.04	0.05		0.08	0.57	0.23		0.67
RV01 (10)	0.07	0.10		0.13	1.30	0.59		1.32
RV01 (08)	0.02	0.04		0.06	0.46	0.30		0.51
RV01 (05)	0.08	0.12		0.15	1.90	0.68		1.94
RV01 (09)	0.06	0.08		0.09	1.62	0.67		1.71
RV01 (10) DNA				0.03				0.08
RV13 (02)	0.03	0.04		0.06	1.15	0.41		1.18

Quindi, le formulazioni di liposoma hanno significativamente potenziato l'immunogenicità rispetto ai controlli di RNA nudo, come determinato mediante titoli di IgG F-specifica aumentati e frequenze di cellule T. DNA plasmidico formulato con liposomi, o somministrato nudo usando elettroporazione, era significativamente meno immunogenico rispetto a RNA auto-replicante formulato in liposomi.

Ulteriori liposomi RV01 sono stati preparati mediante il metodo (H), usando nuovamente PEG da 2 kDa

coniugato a DMG, e incapsulando 150 µg di RNA (replicone di vA375 codificante la glicoproteina di fusione superficiale di RSV) o incapsulando solo tampone. Quindi, questi liposomi avevano il 40% di DlinDMA, 10% di DSPC, 48% di colesterolo e 2% di PEG-DMG. Le dimensioni e l'incapsulamento erano come segue:

RV	Zav (nm)	pdI	RNA	Incapsulamento
RV01 (36)	152.1	0.053	+	92.5%
RV01 (36)	144	0.13	-	-

I liposomi sono stati somministrati a topi BALB/c (10 per gruppo) mediante iniezione intramuscolare bilaterale (50 µl per zampa) i giorni 0 e 21. Le dosi erano 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 o 1 µg. I titoli di IgG nel siero F-specifica e PRNT60 (GMT) erano come segue, 2 settimane dopo la prima o seconda iniezione:

RV	RNA (µg)	2wp1	2wp2	PRNT60 (2wp2)
Controllo con tampone	0	-	-	10
RV01 (36)	0	-	-	10
RV01 (36)	0.01	3399	50691	37
RV01 (36)	0.03	3446	53463	83
RV01 (36)	0.1	8262	76808	238
RV01 (36)	0.3	5913	82599	512
RV01 (36)	1	8213	85138	441

Immunogenicità per citomegalovirus

Liposomi RV01 con DlinDMA come il lipide cationico e PEG da 2 kDa sono stati usati per somministrare RNA repliconi codificanti glicoproteine di CMV. Il replicone “vA160” codifica le glicoproteine H e L a lunghezza intera (gH/gL), mentre il replicone “vA322” codifica una forma solubile (gHsol/gL). Le due proteine sono sotto il controllo di promotori subgenomici separati in un singolo replicone; la co-somministrazione di due vettori separati, uno codificante gH e uno codificante gL, non ha fornito buoni risultati.

A topi BALB/c, 10 per gruppo, sono state fornite vaccinazioni intramuscolari bilaterali (50 µl per zampa) i giorni 0, 21 e 42 con VRP che esprimono gH/gL (1×10^6 IU), VRP che esprimono gHsol/gL (1×10^6 IU) e PBS come i controlli. Due gruppi di test hanno ricevuto 1 µg del replicone vA160 o vA322 formulato in liposomi

(40% di DlinDMA, 10% di DSPC, 48% di colesterolo, 2% di PEG-DMG; preparati usando il metodo (D) ma con dimensione della carica di RNA di 150 µg).

I liposomi vA160 avevano un diametro Z_{av} di 168,8 nm, un pDI di 0,144 e un incapsulamento dell'87,4%. I liposomi vA322 avevano un diametro Z_{av} di 162 nm, un pDI di 0,131 e un incapsulamento del 90%.

I repliconi erano in grado di esprimere due proteine da un singolo vettore.

I sieri sono stati prelevati per l'analisi immunologica al giorno 63 (3wp3). I titoli di neutralizzazione di CMV (il reciproco della diluizione nel siero che produce una riduzione del 50% nel numero di foci positivi al virus per pozzetto, rispetto ai controlli) erano come segue:

VRP di gH/gL	VRP di gHsol/gL	Liposoma di gH/gL	Liposoma di gHsol/gL
4576	2393	4240	10062

RNA che esprime una forma a lunghezza intera o una solubile del complesso gH/gL di CMV ha suscitato quindi alti titoli di anticorpi neutralizzanti, come saggiato su cellule epiteliali. I titoli medi suscitati mediante gli RNA incapsulati in liposomi erano alti almeno come quelli per i corrispondenti VRP.

Esperimenti ripetuti hanno confermato che il replicone era in grado di esprimere due proteine da un singolo vettore. L'RNA replicone ha fornito un titolo 3wp3 di 11.457, rispetto a 5.516 con VRP.

Cinetiche di espressione

Un RNA replicone auto-replicante ("vA311") che esprime un gene reporter di luciferasi (*luc*) è stato usato per studiare le cinetiche di espressione di proteina dopo iniezione. Topi BALB/c, 5 animali per gruppo, hanno ricevuto vaccinazioni intramuscolari bilaterali (50 µl per zampa) il giorno 0 con:

Gruppo 1 DNA che esprime luciferasi, somministrato usando elettroporazione (10 µg)

Gruppo 2 RNA auto-replicante (1 µg) formulato in liposomi (40% di DlinDMA, 10% di DSPC, 48% di colesterolo, 2% di PEG-2000 coniugato a DMG)

Gruppo 3 RNA auto-replicante (1 µg) formulato con una nanoemulsione cationica (CNE17)

Gruppo 4 RNA auto-replicante (1 µg) formulato con una nanoemulsione cationica differente

Gruppo 5 VRP (1×10^6 IU) che esprime luciferasi

Prima della vaccinazione, i topi sono stati depilati. I topi sono stati anestetizzati (2% di isoflurano in ossigeno), il pelo è stato dapprima rimosso con un rasoio elettrico e quindi con il composto chimico Nair chimico. I dati di bioluminescenza sono quindi stati acquisiti usando un sistema per la formazione di immagini Xenogen IVIS 200 (Caliper Life Sciences) i giorni 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63 e 70. Cinque minuti prima della formazione di immagini, i topi sono stati iniettati intraperitonealmente con 8 mg/kg di soluzione di luciferina. Gli animali sono quindi stati anestetizzati e trasferiti al sistema per la formazione di immagini. I tempi di acquisizione dell'immagine sono stati mantenuti costanti quando il segnale di bioluminescenza è stato misurato con una camera a CCD raffreddato.

In termini visivi, è stato osservato che cellule che esprimono luciferasi rimangono principalmente in corrispondenza del sito di iniezione di RNA, e gli animali sottoposti a formazione di immagini dopo rimozione dei quadricipiti non hanno mostrato segni.

In termini quantitativi, l'espressione di luciferasi è stata misurata come radianza media su un periodo di 70 giorni (p/s/cm²/sr), e i risultati sono come segue per i 5 gruppi:

Giorni	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				

L'RNA auto-replicante formulato con nanoemulsioni cationiche ha mostrato bioluminescenza misurabile al giorno 3, che ha presentato un picco al giorno 7 e si è quindi ridotta ai livelli di sfondo ai giorni 28 fino a 35. Quando formulato in liposomi, l'RNA ha mostrato bioluminescenza misurabile il giorno 3, che ha presentato un picco il giorno 7 e si è ridotta ai livelli di sfondo al giorno 63. RNA somministrato usando VRP ha mostrato bioluminescenza aumentata al giorno 21 quando confrontato all'RNA formulato, ma l'espressione si è ridotta ai

livelli di sfondo al giorno 28. DNA elettroporato ha mostrato il livello più alto di bioluminescenza in tutti i punti di tempo misurati, e i livelli di bioluminescenza non si sono ridotti ai livelli di sfondo entro i 70 giorni dell'esperimento.

Volume di somministrazione

La somministrazione idrodinamica impiega la forza generata mediante la rapida iniezione di un grande volume di soluzione per superare le barriere fisiche di membrane cellulari che impediscono a composti grandi e impermeabili per la membrana di entrare in cellule. Questo fenomeno ha mostrato in precedenza di essere utile per la somministrazione intracellulare di vaccini a DNA.

Un volume di somministrazione tipico per un topo per iniezione intramuscolare è 50 µl nella zampa posteriore, che è un volume relativamente alto per il muscolo della gamba di un topo. Al contrario, una dose intramuscolare umana di ~0,5 ml è relativamente piccola. Se l'immunogenicità in topi potrebbe essere dipendente dal volume, l'efficacia di vaccini a replicone potrebbe quindi essere dovuta, almeno in parte, a forze idrodinamiche, il che potrebbe non essere incoraggiante per l'uso degli stessi vaccini in uomini e animali più grandi.

Il replicone vA317 è stato somministrato a topi BALB/c, 10 per gruppo, mediante vaccinazioni intramuscolari bilaterali (5 o 50 per zampa) i giorni 0 e 21:

il gruppo 1 ha ricevuto replicone nudo, 0,2 µg in 50 µl per zampa

Il gruppo 2 ha ricevuto replicone nudo, 0,2 µg in 5 µl per zampa

Il gruppo 3 ha ricevuto replicone formulato in emulsione (0,2 µg, 50 µl per zampa)

Il gruppo 4 ha ricevuto replicone formulato in emulsione (0,2 µg, 5 µl per zampa)

Il gruppo 5 ha ricevuto replicone formulato in liposomi (0,2 µg, 50 µl per zampa)

Il gruppo 6 ha ricevuto replicone formulato in liposomi (0,2 µg, 5 µl per zampa)

I liposomi per i gruppi 5 e 6 erano 40% di DlinDMA, 10% di DSPC, 48% di colesterolo e 2% di PEG-2000 coniugato a DMG.

Il siero è stato prelevato per l'analisi anticorpale i giorni 14 e 35. I GMT di IgG nel siero F-specifica erano:

Giorno	1	2	3	4	5	6
14	42	21	783	760	2669	2610
35	241	154	2316	2951	17655	18516

Quindi, l'immunogenicità del replicone formulato non variava secondo il volume somministrato, indicando quindi che questi vaccini a RNA non si basano sulla somministrazione idrodinamica per la loro efficacia.

Ratti del cotone

È stato eseguito uno studio in ratti del cotone (*Sigmodon hispidis*) al posto di topi. A una dose di 1 µg, l'incapsulamento in liposomi ha aumentato i titoli di IgG F-specifica di 8,3 volte rispetto a RNA nudo, e aumentato i titoli di PRNT di 9,5 volte. L'entità della risposta anticorpale era equivalente a quella indotta mediante VRP a 5×10^6 IU. Sia RNA nudo che incapsulato in liposomi sono stati in grado di proteggere i ratti del cotone dalla stimolazione con RSV (1×10^5 unità che formano la placca), riducendo il carico virale polmonare di almeno 3,5 log. L'incapsulamento ha aumentato la riduzione di circa 2 volte.

Un ulteriore lavoro in ratti del cotone ha usato quattro repliconi differenti: vA317 esprime RSV-F a lunghezza intera; vA318 esprime RSV-F troncato (transmembrana e coda citoplasmatica rimosse); vA142 esprime RSV-F con il suo peptide di fusione deletato; vA140 esprime RSV-F troncata anche senza il suo peptide. A ratti del cotone, da 4 fino a 8 animali per gruppo, sono state fornite vaccinazioni intramuscolari (100 µl in una zampa) ai giorni 0 e 21 con i quattro repliconi differenti a due dosi (1,0 e 0,1 µg), formulati in liposomi prodotti usando DMG coniugata a PEG da 2 kDa mediante il metodo (D), ma con una dimensione della carica di RNA di 150 µg. I gruppi di controllo hanno ricevuto un vaccino con proteina della subunità di RSV-F (5 µg) adiuvato con allume (8 animali/gruppo), VRP che esprimono RSV-F a lunghezza intera (1×10^6 IU, 8 animali/gruppo) o controllo naïve (4 animali/gruppo). Il siero è stato prelevato per l'analisi anticorpale i giorni 0, 21 e 34.

I titoli di IgG nel siero F-specifica e i titoli di anticorpi neutralizzanti RSV nel siero i giorni 21 e 34 erano:

Gruppo	IgG, giorno 21	IgG, giorno 34	NT, giorno 21	NT, giorno 34
1 µg di vA317	915	2249	115	459
0,1 µg di vA317	343	734	87	95
1 µg di vA318	335	1861	50	277
0,1 µg di vA318	129	926	66	239
1 µg di vA142	778	4819	92	211
0,1 µg di vA142	554	2549	78	141
1 µg di vA140	182	919	96	194
0,1 µg di vA140	61	332	29	72
5 µg di subunità trimerica di F/allume	13765	86506	930	4744
VRP-F intera a 1 x 10 ⁶ IU	1877	19179	104	4528
Naïve	5	5	10	15

Tutti e quattro i repliconi valutati in questo studio (vA317, vA318, vA142, vA140) erano immunogenici in ratti del cotone quando somministrati mediante liposomi, sebbene i titoli di neutralizzazione nel siero erano almeno 10 volte più bassi rispetto a quelli indotti mediante vaccini con proteina adiuvati o mediante VRP. I vaccini a liposoma/RNA hanno suscitato IgG F-specifica nel siero e anticorpi neutralizzanti RSV dopo la prima vaccinazione, e una seconda vaccinazione ha richiamato la risposta efficacemente. Titoli di IgG F-specifica dopo la seconda vaccinazione con 1 µg di replicone erano da 2 fino a 3 volte più alti rispetto a dopo la seconda vaccinazione con 0,1 µg di replicone. I quattro repliconi hanno suscitato titoli anticorpali paragonabili, suggerendo che RSV-F a lunghezza intera e troncata, ognuna con o senza il peptide di fusione, sono analogamente immunogeniche in ratti del cotone.

Un ulteriore lavoro in ratti del cotone ha usato nuovamente i repliconi vA317, vA318 e vA142. A ratti del cotone, 2-8 animali per gruppo, sono state fornite vaccinazioni intramuscolari (100 µl in una zampa) ai giorni 0 e 21 con i repliconi (0,1 o 1 µg) incapsulati in liposomi RV01 (con PEG-2000), prodotti mediante il metodo (D) ma con una dimensione della carica di RNA di 150 µg. I gruppi di controllo hanno ricevuto il vaccino con proteina della subunità di RSV-F (5 µg) adiuvato con allume, o VRP che esprimono RSV-F a lunghezza intera (1 × 10⁶ IU, 8 animali/gruppo). Tutti questi animali hanno ricevuto una terza vaccinazione (giorno 56) con vaccino con proteina della subunità di RSV-F (5 µg) adiuvato con allume. Inoltre, vi era un controllo naïve (4

animali/gruppo). Inoltre, a un gruppo supplementare sono state fornite vaccinazioni intramuscolari bilaterali (50 µl per zampa) ai giorni 0 e 56 con 1 µg di RNA vA317 in liposomi, ma non ha ricevuto una terza vaccinazione con il vaccino con proteina della subunità.

Siero è stato prelevato per l'analisi anticorpale ai giorni 0, 21, 35, 56, 70, più i giorni 14, 28 e 42 per il gruppo supplementare. I titoli di IgG nel siero F-specifica (GMT) erano come segue:

	Giorno 21	Giorno 35	Giorno 56	Giorno 70
1 µg di vA318	260	1027	332	14263
0,1 µg di vA318	95	274	144	2017
1 µg di vA142	483	1847	1124	11168
0,1 µg di vA142	314	871	418	11023
1 µg di vA317	841	4032	1452	13852
VRP (F intera) a 1×10^6	2075	3938	1596	14574
5 µg di subunità trimera di F/allume	12685	54526	25846	48864
Naïve	5	5	5	5

I titoli di neutralizzazione nel siero erano come segue (titoli di neutralizzazione di RSV al 60% per 2 aggregati di 3-4 animali per gruppo, GMT di questi 2 aggregati per gruppo):

	Giorno 21	Giorno 35	Giorno 56	Giorno 70
1 µg di vA318	58	134	111	6344
0,1 µg di vA318	41	102	63	6647
1 µg di vA142	77	340	202	5427
0,1 µg di vA142	35	65	56	2223
1 µg di vA317	19	290	200	4189
VRP (F intera) a 1×10^6	104	1539	558	2876
5 µg di subunità trimera di F/allume	448	4457	1630	3631
Naïve	10	10	10	

I titoli nel siero e i titoli neutralizzanti per il gruppo supplementare erano come segue:

Giorno	14	21	28	35	42	56	70
IgG	397	561	535	501	405	295	3589
NT	52	82	90	106	80	101	1348

Quindi, i repliconi si sono confermati come immunogenici in ratti del cotone, stimolando IgG F-specifica nel siero e anticorpi neutralizzanti RSV dopo la prima vaccinazione. Una seconda vaccinazione ha richiamato le risposte efficacemente. I titoli di IgG F-specifica dopo la seconda vaccinazione con 1,0 µg di replicone erano da 1,5 fino a 4 volte più alti rispetto a dopo la seconda vaccinazione con 0,1 µg di replicone.

La terza vaccinazione (proteina al giorno 56) non ha richiamato titoli in ratti del cotone precedentemente vaccinati con subunità trimera di F + allume, ma ha fornito un grande richiamo per titoli in ratti del cotone precedentemente vaccinati con replicone. Nella maggior parte dei casi, i titoli di neutralizzazione di RSV nel siero dopo due vaccinazioni con replicone seguite da richiamo con la proteina erano uguali o superiori ai titoli indotti mediante due o tre vaccinazioni con proteina sequenziali.

Questo studio ha anche valutato le cinetiche della risposta anticorpale a 1,0 µg di vA317. I titoli di IgG nel siero F-specifica e di neutralizzazione di RSV indotti mediante una singola vaccinazione hanno raggiunto il loro picco circa al giorno 21 e sono stati mantenuti fino ad almeno il giorno 56 (diminuzione del 50-70% nel titolo di IgG F-specifica, piccolo cambiamento nel titolo di neutralizzazione di RSV). Una seconda vaccinazione omologa è stata fornita a questi animali il giorno 56, e i titoli anticorpali sono stati richiamati a un livello almeno uguale a quello ottenuto quando la seconda vaccinazione è stata somministrata il giorno 21.

Ulteriori esperimenti hanno comportato una stimolazione virale. Il replicone vA368 codifica la glicoproteina di fusione superficiale di tipo selvatico a lunghezza intera di RSV con il peptide di fusione deleto, con l'espressione guidata mediante la IRES EV71. A ratti del cotone, 7 per gruppo, sono state somministrate vaccinazioni intramuscolari (100 µl per zampa) i giorni 0 e 21 con vA368 in liposomi preparati mediante il metodo (H), dimensione della carica di RNA di 175 µg, o con VRP aventi lo stesso replicone. I liposomi includevano PEG da 2 kDa coniugato a DMG. Un gruppo di controllo ha ricevuto 5 µg di proteina adiuvata con allume, ed è stato anche incluso un gruppo di controllo naïve.

Tutti i gruppi hanno ricevuto una stimolazione intranasale (i.n.) con 1×10^6 PFU di RSV quattro settimane dopo l'immunizzazione finale. Il siero è stato prelevato per l'analisi anticorpale ai giorni 0, 21, 35. I titoli virali polmonari sono stati misurati 5 giorni dopo la stimolazione. I risultati sono come segue:

	Liposoma	VRP	Proteina	Naïve
<i>Titoli di IgG nel siero F-specifica (GMT)</i>				
Giorno 21	370	1017	28988	5
Giorno 35	2636	2002	113843	5
<i>Titoli neutralizzanti (GMT)</i>				
Giorno 21	47	65	336	10
Giorno 35	308	271	5188	10
<i>Carico virale polmonare (pfu per grammo di polmone)</i>				
Giorno 54	422	225	124	694110

Quindi, il vaccino a RNA ha ridotto il carico virale polmonare di oltre tre log, da approssimativamente 10^6 PFU/g in ratti del cotone di controllo non vaccinati a meno di 10^3 PFU/g in ratti del cotone vaccinati.

Studio su un mammifero grande

Uno studio su un animale grande è stato eseguito in bestiame. Vitelli (4-6 settimane di età, ~60-80 kg, 5 per gruppo) sono stati immunizzati con 66 µg di replicone vA317 codificante la proteina F di RSV a lunghezza intera ai giorni 0, 21, 86 e 146. I repliconi sono stati formulati entro liposomi preparati mediante il metodo (E), ma con una dimensione della carica di RNA di 1,5 mg; essi avevano il 40% di DlinDMA, il 10% di DSPC, il 48% di colesterolo e il 2% di PEG-2000 coniugato a DMG. PBS da sola è stata usata come un controllo negativo, e un vaccino autorizzato è stato usato come un controllo positivo (“Triangle 4” della Fort Dodge, contenente virus ucciso). Tutti i vitelli hanno ricevuto 15 µg di proteina F adiuvata con l’emulsione MF59 il giorno 146.

I vaccini a RNA codificano F di RSV umano, mentre il vaccino “Triangle 4” contiene F di RSV bovino, ma la proteina F di RSV è altamente conservata fra BRSV e HRSV.

I vitelli hanno ricevuto 2 ml di ciascun vaccino sperimentale, somministrati intramuscolarmente come 2×1 ml su ciascun lato del collo. Al contrario, il vaccino “Triangle 4” è stato fornito come una singola dose da 2 ml nel collo.

Siero è stato prelevato per l’analisi anticorpale ai giorni 0, 14, 21, 35, 42, 56, 63, 86, 100, 107, 114, 121, 128, 135, 146, 160, 167, 174, 181, 188, 195 e 202. Se un singolo animale presentava un titolo inferiore al limite di

rilevazione, è stato assegnato un titolo di 5.

La FIGURA 15 mostra i titoli di IgG F-specifica per 210 giorni. Per i primi 63 giorni, l'RNA replicone era immunogenico nelle vacche tramite liposomi, sebbene fornisse titoli più bassi rispetto al vaccino autorizzato. Tutte le vacche vaccinate mostravano anticorpi F-specifici dopo la seconda dose, e i titoli erano molto stabili dal periodo di 2 fino a 6 settimane dopo la seconda dose (ed erano particolarmente stabili per i vaccini a RNA). I titoli fino al giorno 202 erano come segue:

	G0	3wp1 G21	2wp2 G35	5wp2 G56	~9wp2 G86	2wp3 G100	5wp3 G121	8wp3 G146	2wp4 G160	5wp4 G181	8wp4 G202
PBS	5	5	5	5	5	5	5	5	46	98	150
Liposoma	5	5	12	11	20	768	428	74	20774	7022	2353
Triangle 4	5	5	1784	721	514	3406	2786	336	13376	4775	2133

I titoli di anticorpi neutralizzanti RSV nel siero erano come segue:

	G0	2wp2 G35	5wp2 G56	2wp3 G100	3wp3 G107	4wp3 G114	8wp3 G146	2wp4 G160	3wp4 G167	4wp4 G174
PBS	12	10	10	14	18	20	14	10	10	10
Liposoma	13	10	10	20	13	17	13	47	26	21
Triangle 4	12	15	13	39	38	41	13	24	26	15

Il materiale usato per la seconda dose di liposomi non è stato preparato di fresco, e lo stesso lotto di RNA ha mostrato una diminuzione nella potenza in uno studio di immunogenicità nel topo. Quindi, è possibile che il vaccino potesse essere più immunogenico se fosse stato usato materiale fresco per tutte le vaccinazioni.

Quando saggiati con complemento, anticorpi neutralizzanti sono stati rilevati in tutte le vacche vaccinate. In questo saggio, tutti i vitelli vaccinati avevano buoni titoli di anticorpi neutralizzanti dopo la seconda vaccinazione con RNA. Inoltre, il vaccino a RNA ha stimolato titoli di IgG nel siero F-specifica che sono stati rilevati in qualche vitello dopo la seconda vaccinazione e in tutti i vitelli dopo la terza.

RSV-F adiuvata con MF59 è stata in grado di richiamare la risposta di IgG in tutti i vitelli precedentemente vaccinati, e a richiamare titoli di neutralizzazione indipendenti dal complemento di vitelli precedentemente vaccinati con RNA.

La prova di fattibilità per vaccini a RNA in animali grandi è particolarmente importante alla luce della perdita di

potenza osservata in precedenza con vaccini a base di DNA quando ci si sposta da modelli di animali piccoli ad animali più grandi e uomini. Una dose tipica per un vaccino a DNA in vacche potrebbe essere 0,5-1 mg [43, 44], e per cui è molto incoraggiante che risposte immunitarie sono state indotte con solamente 66 µg di RNA.

Effetto della lunghezza di PEG

Come summenzionato, liposomi sono stati preparati usando DMG alla quale sono stati coniugati cinque PEG differenti. Il peso molecolare medio del PEG era 500 Da, 750 Da, 1 kDa, 2 kDa o 3 kDa.

Liposomi formati usando i PEG più corti (500 Da e 750 Da) erano instabili o si sono aggregati durante la purificazione con TFF. PEG-750 ha fornito liposomi con un diametro medio Z (669 nm) e un indice di polidispersità (0,21) significativamente più alti, con incapsulamento del 77%. I liposomi con PEG-500 si sono aggregati visibilmente in soluzione durante il procedimento di TFF e l'esperimento è stato terminato. Quindi, questi liposomi con PEG corto erano instabili, ma PEG più lunghi hanno formato liposomi stabili.

Le lunghezze differenti del PEG (FIGURA 16) avevano un piccolo effetto sul diametro e sull'indice di polidispersità dei liposomi. Il diametro medio Z era 197 nm (pDI di 0,119) per il PEG da 1 kDa, 142 nm (pDI di 0,137) per il PEG da 2 kDa, e 147 nm (pDI di 0,075) per il PEG da 3 kDa. L'incapsulamento di RNA è aumentato gradualmente quando è aumentata la lunghezza del PEG, dall'81,7% fino all'85,9% fino al 91,5% (sebbene questa relazione non sia stata sempre osservata in esperimenti successivi).

I liposomi sono stati somministrati a topi mediante iniezione intramuscolare il giorno 0. I livelli di SEAP nel siero sono stati misurati ai giorni 1, 3 e 6 mediante saggio chemiluminescente. Come mostrato nella FIGURA 3, le tre lunghezze di PEG erano tutte efficaci, ma la variazione della lunghezza del PEG presentava un qualche effetto sui livelli di SEAP nel siero, con PEG 2000 che ha fornito l'espressione più alta.

Differenti lipidi e lunghezze di PEG

Il replicone vA317 è stato somministrato in liposomi aventi una varietà di differenti lipidi con differenti lunghezze di PEG. I liposomi avevano tutti il 40% di DlinDMA, il 10% di DSPC e il 48% di colesterolo, ma il restante 2% è stato variato con differenti lipidi PEGilati (per esempio FIGURE 17A fino a 17E) e differenti lunghezze di PEG.

Le caratteristiche fisiche dei liposomi, preparati mediante il metodo (H), erano:

Nome	Lipide PEGilato	Lunghezza di PEG	Zav (nm)	pDI	% di incapsulamento
A	DMG	2000	136.3	0.087	85.35
B	DMG	3000	120.9	0.087	72.06
C	DMG	1000	175.9	0.111	92.52
D	Fig. 17A	2000	157.9	0.094	97.44
E	Fig. 17D	2000	122.2	0.122	77.84
F	Fig. 17E	2000	129.8	0.125	82.57
G	Colesterolo	2000	122.9	0.087	87.1
H	Fig. 17C	2000	138	0.137	78.48
I	Fig. 17B	2000	113.4	0.091	89.12

A topi BALB/c, 8 per gruppo, sono state fornite vaccinazioni intramuscolari bilaterali (50 μ l per zampa) ai giorni 0 e 21 con il replicone, nudo (1 μ g) o incapsulato in questi liposomi (0,1 μ g). Siero è stato prelevato per l'analisi anticorpale ai giorni 14 e 35.

I titoli di IgG nel siero F-specifica (GMT) erano come segue, 2 settimane dopo le due iniezioni (2wp1):

RV	2wp1	2wp2
RNA nudo	216	1356
A	3271	15659
B	3860	22378
C	1691	7412
D	1025	1767
E	1618	9536
F	2684	11221
G	3514	10566
H	4142	22810
I	952	10410

I risultati mostrano una tendenza che indica che gruppi di testa di PEG con peso molecolare più alto sono più immunogenici. Quando la lunghezza del PEG coniugato a DMG aumenta da 1.000 Da fino a 3.000 Da, i titoli di

IgG F-specifica 2wp2 aumentano da 7.412 fino a 15.659 fino a 22.378.

Il cambiamento della regione legante da estere a etere non ha avuto sostanzialmente un impatto sui titoli. Inoltre, allo stesso peso molecolare del gruppo di testa (2.000), vi è stata una tendenza che l'aumento della lunghezza delle code lipidiche diminuisce i titoli (H con dialchile C14 rispetto a I con dialchile C18). La sostituzione di una coda lipidica dialchilica di PEG con colesterolo ha avuto un piccolo impatto sull'immunogenicità (A con DMG rispetto a G con colesterolo).

Sono stati eseguiti esperimenti simili con differenti lipidi, in cui i 2 kDa di PEG vengono divisi in 2 gruppi da 1 kDa (FIGURA 18, con il p.m. totale nella regione riquadrata che è 2.000). È stato nuovamente usato il replicone vA317 con topi BALB/c, 8 per gruppo, ai quali sono state fornite vaccinazioni intramuscolari bilaterali (50 µl per zampa) ai giorni 0 e 21 con 1 µg di RNA nudo o 0,1 µg di RNA incapsulato in liposomi. I liposomi avevano tutti il 40% di lipide cationico (DlinDMA), il 10% di DSPC e il 48% di colesterolo, ma il rimanente 2% è stato variato con differenti lipidi PEGilati (ma tutti con PEG da 2 kDa). Essi sono stati preparati mediante il metodo (H).

Le caratteristiche fisiche dei liposomi erano:

Nome	Lipide PEGilato	Zav (nm)	pDI	% di incapsulamento
A	DMG	121	0.101	84.84
B	Divisione; R = C14 saturo	141.3	0.049	95.41
C	Divisione; R = C16 saturo	114.6	0.101	96.79
D	Divisione; R = C18 saturo	116.5	0.088	98.63
E	Divisione; R = C18, 1 insaturo	129.4	0.149	93.37

Sono stati preparati ulteriori liposomi con RV05. I liposomi avevano il 40% di lipide cationico (RV05) e il 2% di DMG PEGilata (PEG da 2 kDa), mentre variavano i componenti rimanenti (ma colesterolo era sempre incluso). I liposomi sono stati preparati mediante il metodo (H), ma con pH 5. Le caratteristiche fisiche erano:

Nome	Altri componenti	Zav (nm)	pDI	% di incapsulamento
F	10% di DSPC, 48% di colesterolo	102.2	0.12	76.81
G	10% di DSPC, 46% di colesterolo, 2% di α GC	103.7	0.107	72.58
H	10% di DPyPE, 48% di colesterolo	99.6	0.115	78.34
I	10% di PC 18:3, 48% di colesterolo	130	0.14	87.92
J	10% di PC 18:2, 48% di colesterolo	101.1	0.133	76.64
K	30% di PC 18:2, 28% di colesterolo	134.3	0.158	57.76

α GC = α -galattosilceramide

A topi BALB/c, 8 per gruppo, sono state fornite vaccinazioni intramuscolari bilaterali (50 μ l per zampa) ai giorni 0 e 21 con il replicone, nudo (1 μ g) o incapsulato (0,1 μ g). Siero è stato prelevato per l'analisi anticorpale ai giorni 14 e 35. I titoli di IgG nel siero F-specifica (GMT) erano come segue, 2 settimane dopo le due iniezioni (2wp1):

RV	2wp1	2wp2
RNA nudo	321	915
A	2761	17040
B	866	3657
C	1734	5209
D	426	2079
E	2696	15794
F	551	955
G	342	2531
H	1127	3881
I	364	1741
J	567	5679
K	1251	5303

La divisione dei gruppi di testa di PEG ha quindi diminuito i titoli *in vivo*. L'inclusione di un doppio legame (1 grado di instaurazione per la coda alchilica) nelle code lipidiche di PEG ha aumentato i titoli di IgG, di 6 volte al giorno 14 e di 7 volte al giorno 35. Per un lipide cationico con una coda lipidica asimmetrica (alchile + colesterolo), il cambiamento del lipide neutro da DSPC (coda lipidica C18 satura) a PC 18:2 o 18:3 (con 2 e 3

doppi legami insaturi per coda) ha aumentato i titoli di IgG totali. Risultati paragonabili sono stati osservati con la sostituzione di DSPC con DPyPE.

Si comprenderà che l'invenzione è stata descritta solamente a titolo di esempio, e modifiche possono venire apportate pur rimanendo entro il campo e l'essenza dell'invenzione.

Tabella 1: fosfolipidi utili

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-glicerolo...)]
DLOPC	1,2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerolo...)]
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-glicerolo...)]
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-glicerolo...)]
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-glicerolo...)]
DPPS	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfato
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-diostearpil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-distearoil-sn-glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerolo...)]
DSPS	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC di uovo
HEPC	PC di uovo idrogenato
HSPC	PC di soia idrogenato ad alta purezza
HSPC	PC di soia idrogenato
LYSOPC MIRISTICO	1-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMITICO	1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC STEARICO	1-stearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
MPPC di sfingomielina di latte	1-miristoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
MSPC	1-miristoil,2-stearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PMPC	1-palmitoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-palmitoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfatidil-rac-(1-glicerolo)...]
PSPC	1-palmitoil,2-stearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-stearoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-stearoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-stearoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

RIFERIMENTI

- [1] Johanning *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res* 23:1495-1501.
- [2] Heyes *et al.* (2005) *J Controlled Release* 107:276-87.
- [3] WO2005/121348.
- [4] *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols.* (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [5] *Liposome Technology*, volumi I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [6] *Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes).* (ed. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002.
- [7] Jeffs *et al.* (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372.
- [8] WO2005/113782.
- [9] WO2011/005799.
- [10] El Ouahabi *et al.* (1996) *FEBS Letts* 380:108-12.
- [11] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29):10834-9.
- [12] WO2009/016515.
- [13] WO02/34771.
- [14] WO2005/032582.
- [15] WO2010/119343.
- [16] WO2006/110413.

- [17] WO2005/111066.
- [18] WO2005/002619.
- [19] WO2006/138004.
- [20] WO2009/109860.
- [21] WO02/02606.
- [22] WO03/018054.
- [23] WO2006/091517.
- [24] WO2008/020330.
- [25] WO2006/089264.
- [26] WO2009/104092.
- [27] WO2009/031043.
- [28] WO2007/049155.
- [29] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20^a edizione, ISBN: 0683306472.
- [30] Romberg *et al.* (2008) *Pharmaceutical Research* 25:55-71.
- [31] Hoekstra *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52
- [32] WO2009/086558
- [33] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, ed., Academic Press, Inc.)
- [34] *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, ed, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [35] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a edizione (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [36] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [37] Ausubel *et al.* (ed) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5^a edizione (Current Protocols).
- [38] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, ed., 1998,

Academic Press)

[39] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2^a ed. (Newton & Graham ed., 1997, Springer

Verlag)

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

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

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

[43] Boxus *et al.* (2007) *J Virol* 81:6879-89.

[44] Taylor *et al.* (2005) *Vaccine* 23:1242-50.

RIVENDICAZIONI

1. Liposoma entro il quale viene incapsulato RNA codificante un immunogene di interesse, in cui il liposoma comprende almeno un lipide che include una parte di polietilenglicole, in modo che il polietilenglicole sia presente sull'esterno del liposoma, in cui la massa molecolare media del polietilenglicole è fra 1 kDa e 3 kDa, in cui:

(a) il lipide che include una parte di polietilenglicole non è PEG-DMG 2000; e/o

(b) l'RNA codificante un immunogene di interesse non include nucleobasi modificate diverse da un cappuccio in 5' comprendente una 7'-metilguanosina, e/o metilazione in corrispondenza della posizione 2' del ribosio dei primi 1, 2 o 3 ribonucleotidi in 5'.

2. Liposoma della rivendicazione 1, comprendente PEG-DMG.

3. Liposoma di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il liposoma ha un diametro nell'intervallo di 80-160 nm.

4. Liposoma di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il liposoma comprende un lipide con un gruppo di testa cationico.

5. Liposoma di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il liposoma comprende un lipide con un gruppo di testa zwitterionico.

6. Liposoma di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'RNA è un RNA auto-replicante.

7. Liposoma della rivendicazione 6, in cui la molecola di RNA auto-replicante codifica (i) una RNA polimerasi dipendente da RNA che può trascrivere RNA dalla molecola di RNA auto-replicante, e (ii) un immunogene.

8. Liposoma della rivendicazione 7, in cui la molecola di RNA ha due griglie di lettura aperta, la prima delle quali codifica una replicasi di alfavirus e la seconda delle quali codifica l'immunogene.

9. Liposoma di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la molecola di RNA ha una lunghezza di 9.000-12.000 nucleotidi.

10. Liposoma di qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'immunogene può stimolare una risposta immunitaria *in vivo* contro un batterio, un virus, un fungo o un parassita.

11. Composizione farmaceutica comprendente un liposoma di qualsiasi rivendicazione precedente.
12. Liposoma delle rivendicazioni 1-10, o composizione farmaceutica della rivendicazione 11, per l'uso in un metodo per suscitare una risposta immunitaria protettiva in un vertebrato, comprendente la fase di somministrare al vertebrato una quantità efficace di detto liposoma o detta composizione farmaceutica.

LEGENDA – DISEGNI

TAVOLA 4/12	
FIG. 7 E 8	
naked	nudo
Lipo	Liposoma
Tavola 5/12	
FIG. 9	
lipo	liposoma
TAVOLA 6/12	
FIG. 11 E 12	
Naked	Nudo
Liposome	Liposoma
TAVOLA 7/12	
FIG. 13 E 18	
naked	nudo
lipo	liposoma

FIG. 1

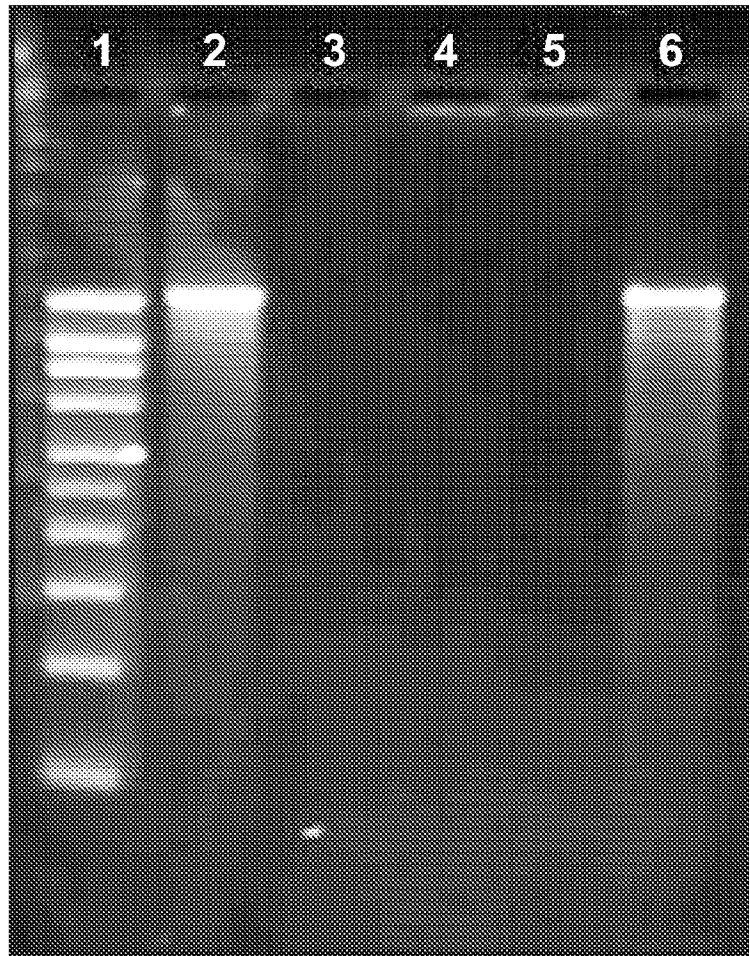


FIG. 2

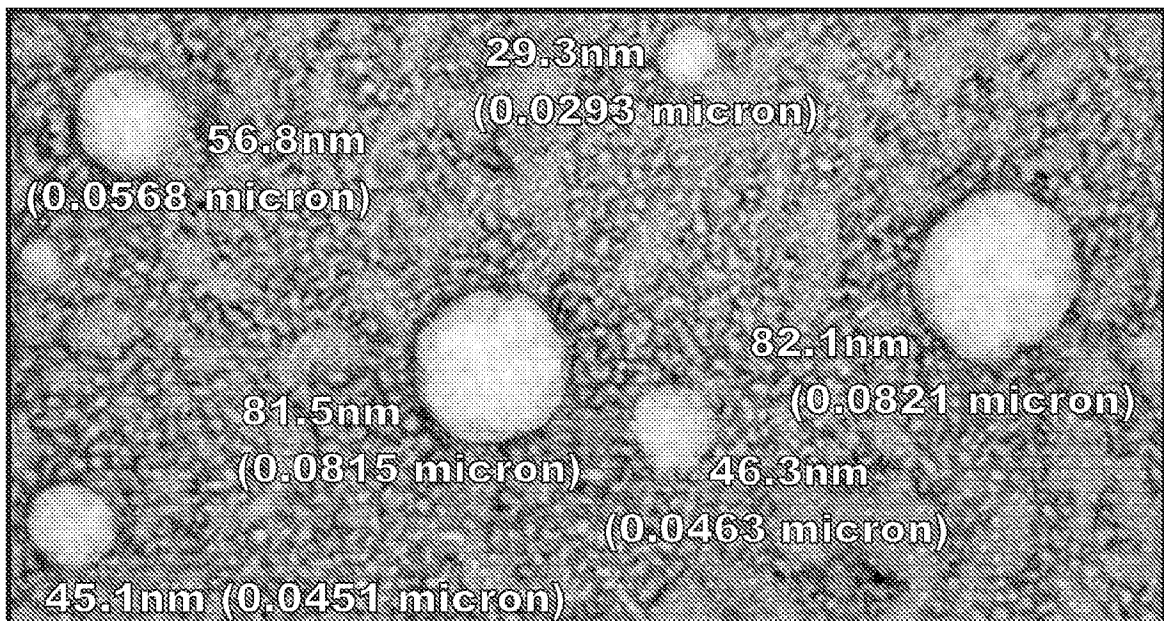


FIG. 3

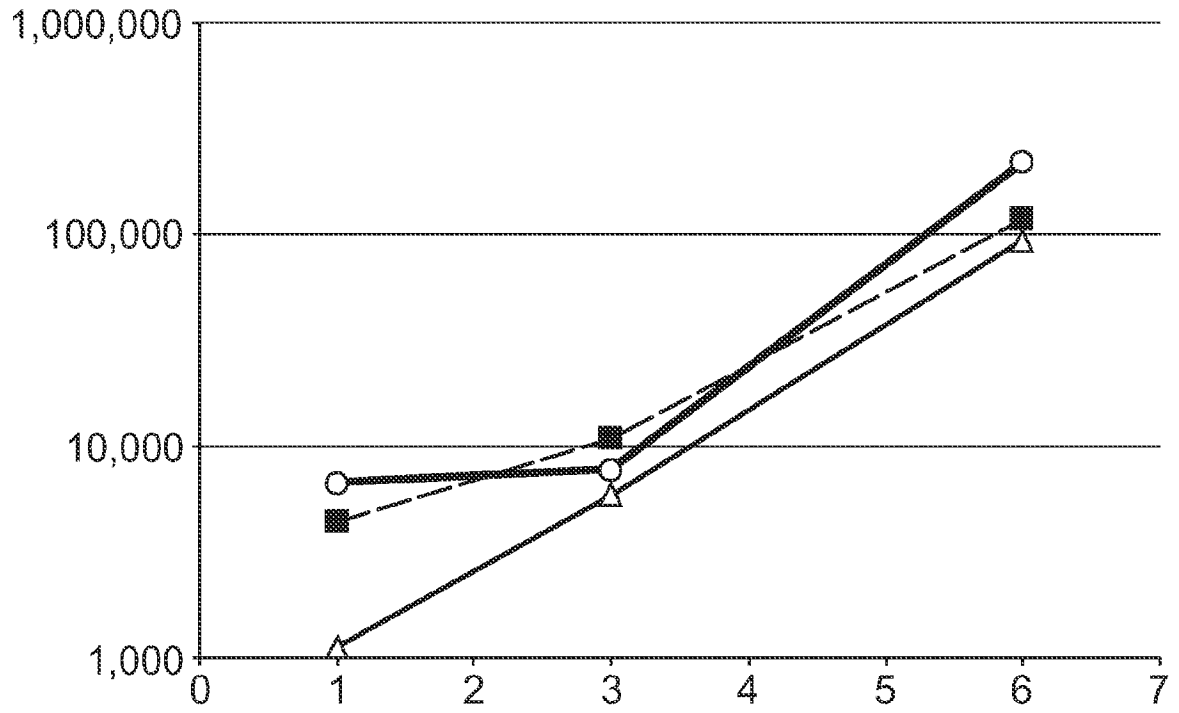


FIG. 4

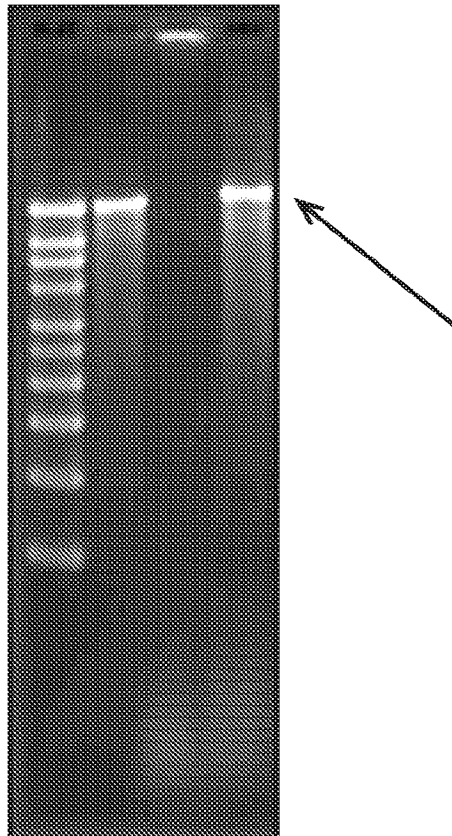


FIG. 5

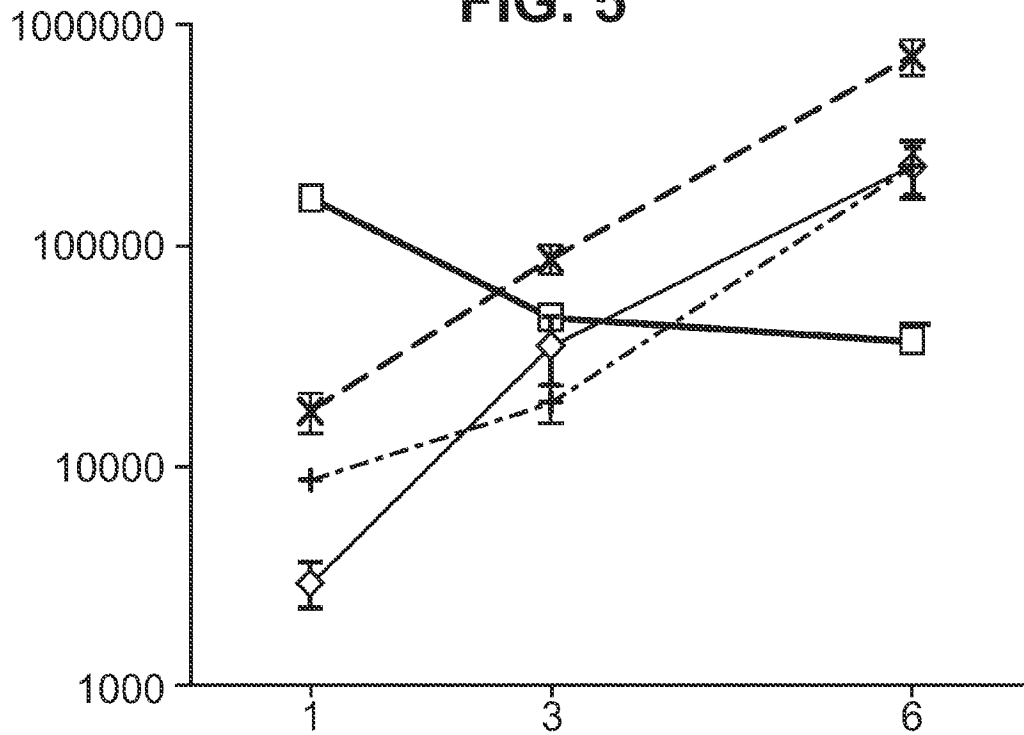


FIG. 6

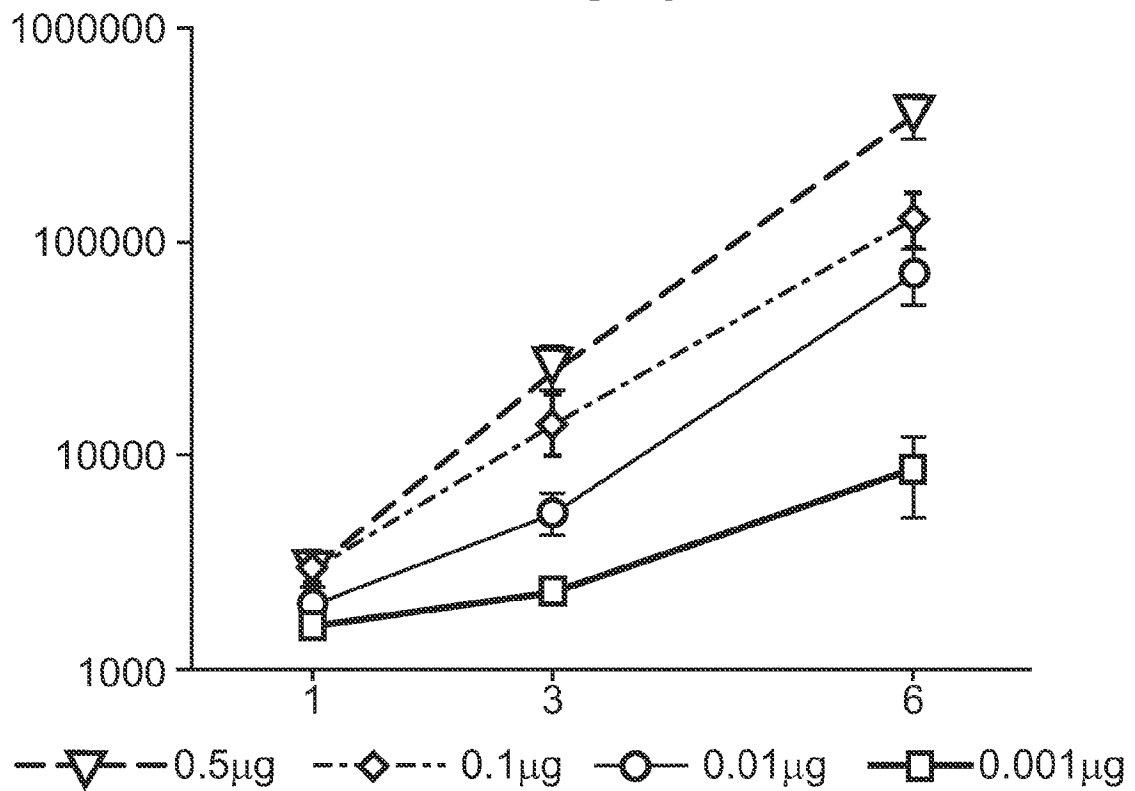


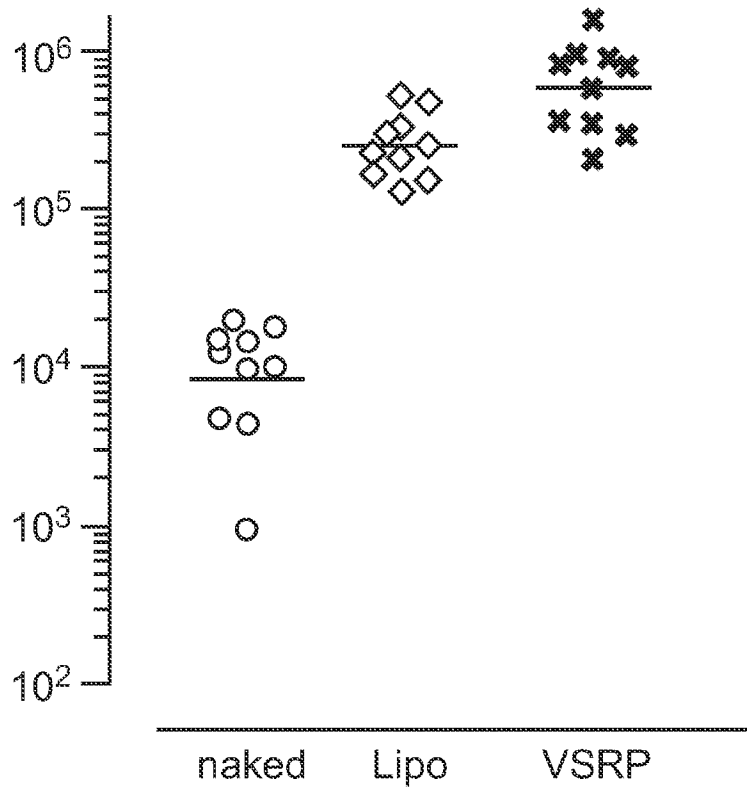
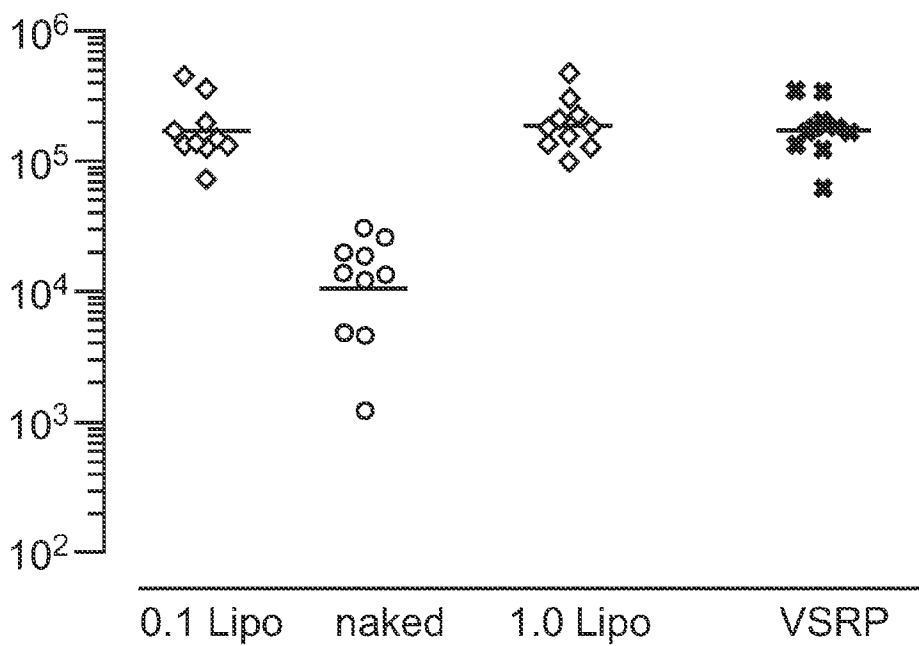
FIG. 7**FIG. 8**

FIG. 9

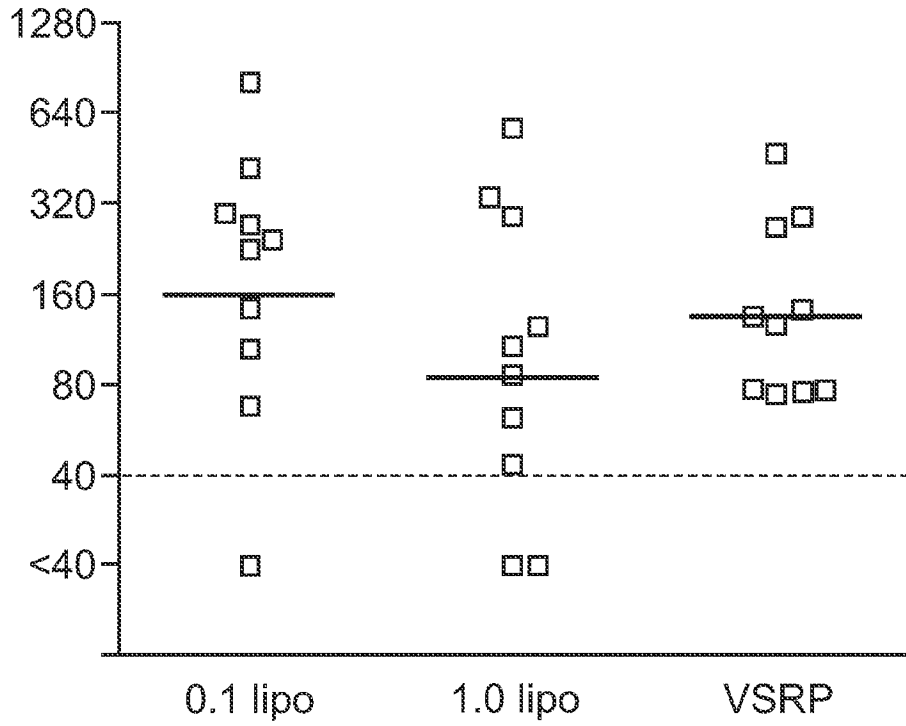


FIG. 10

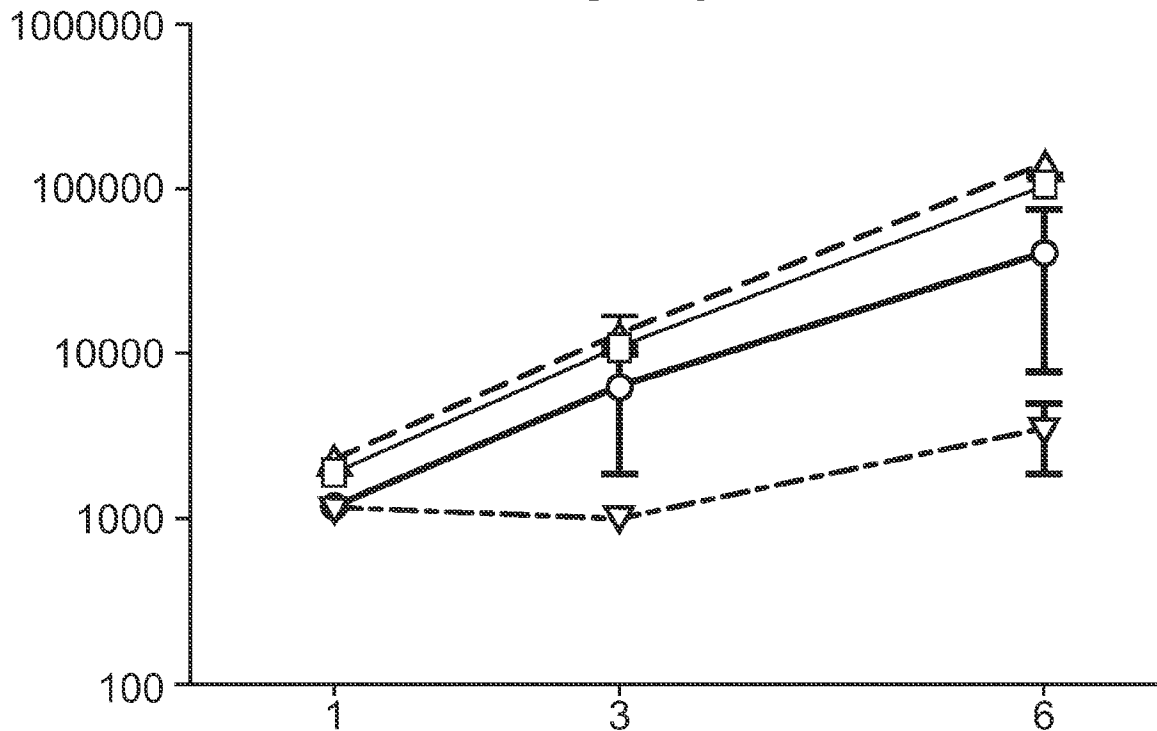


FIG. 11

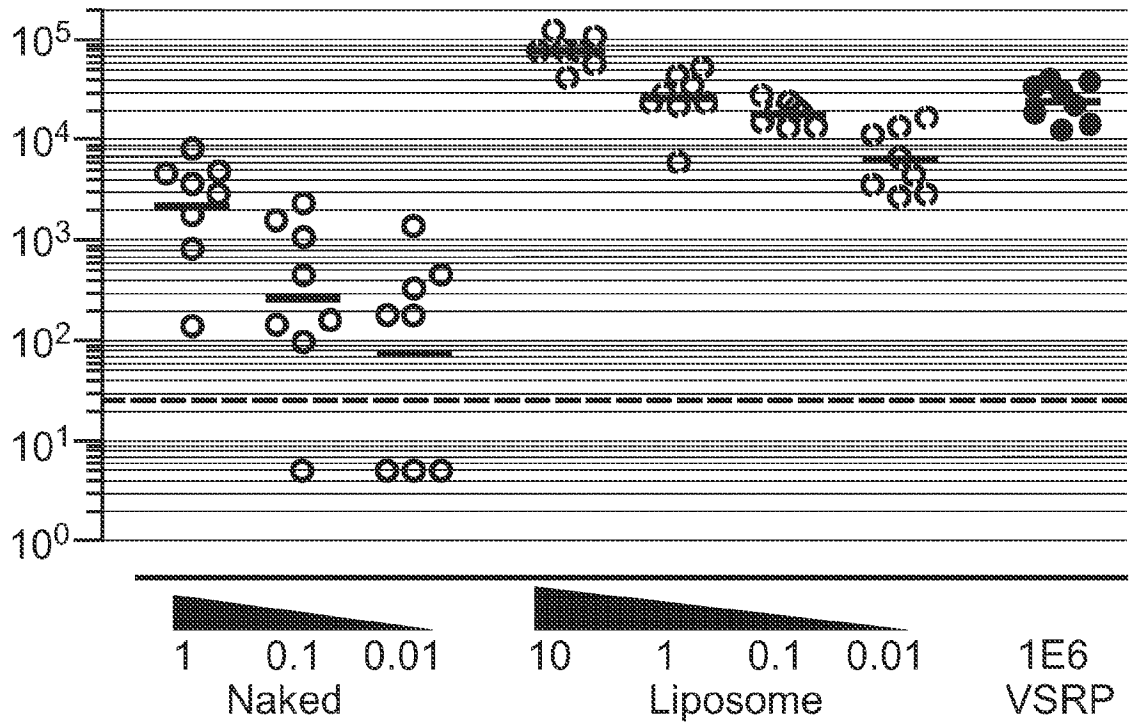


FIG. 12

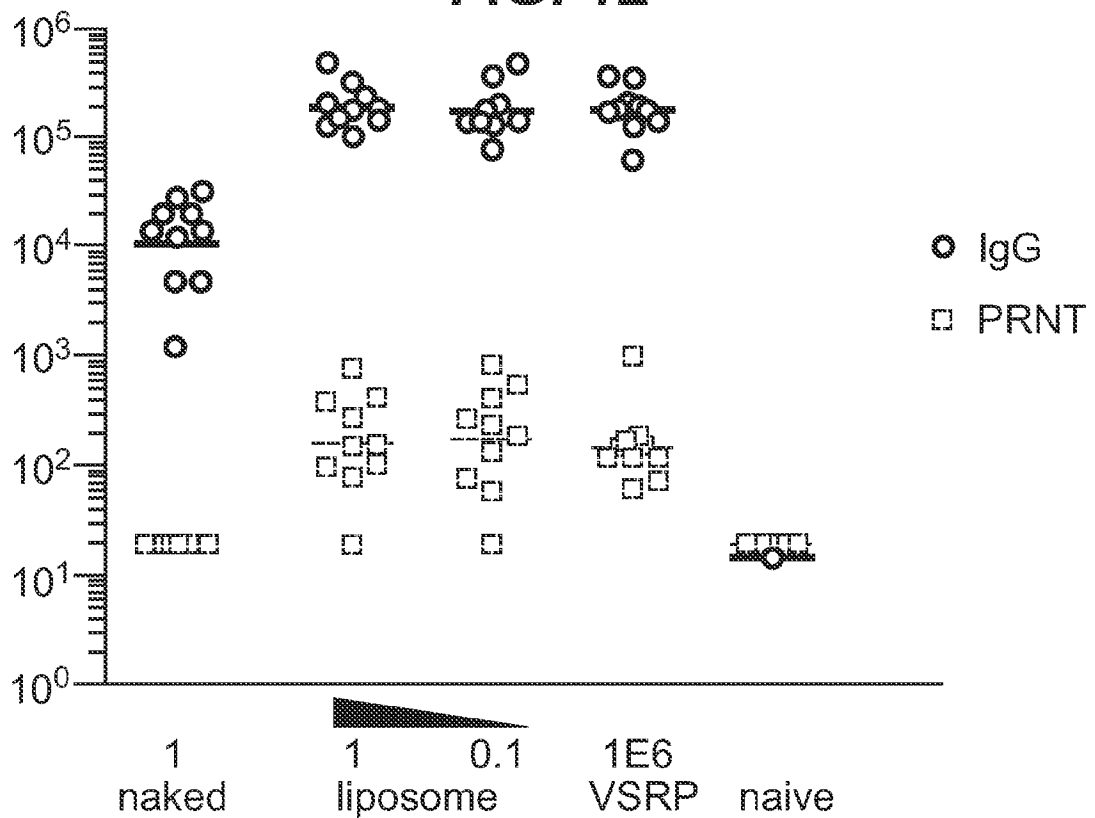
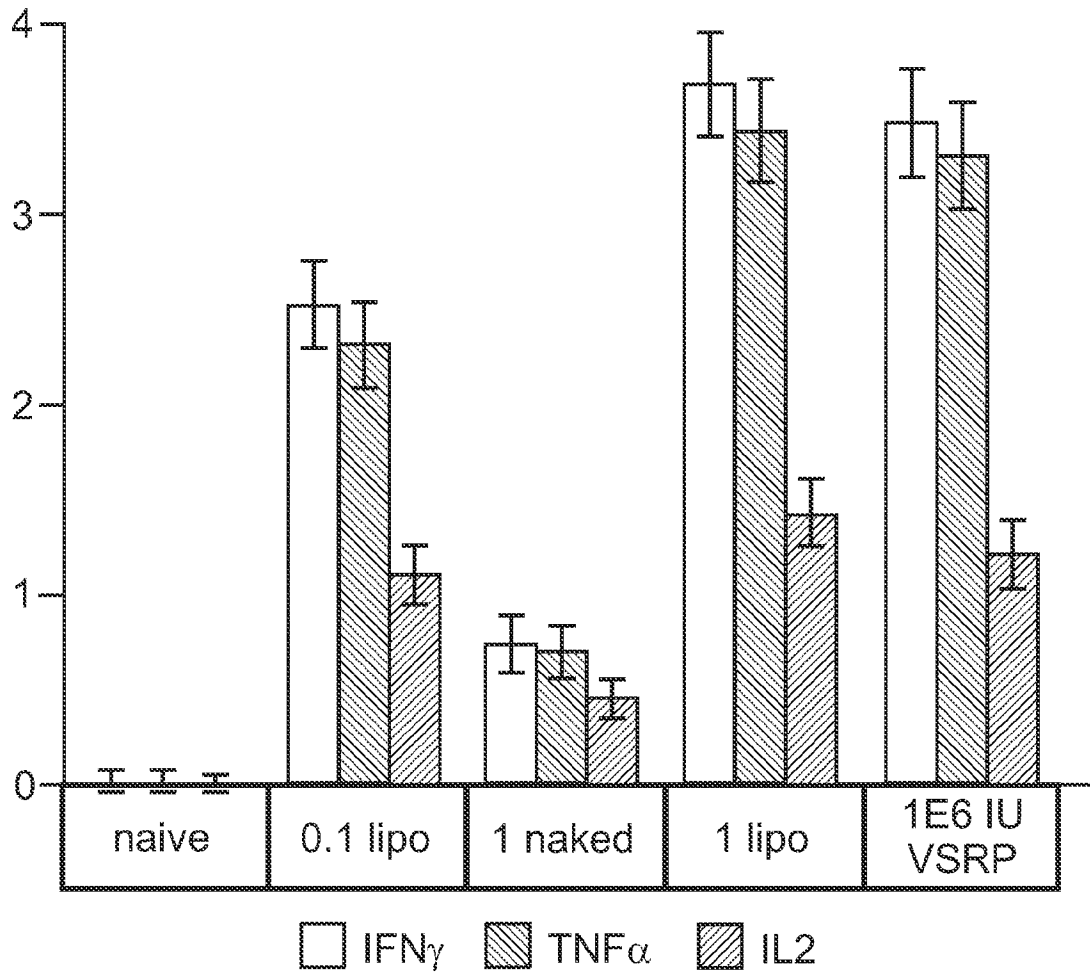
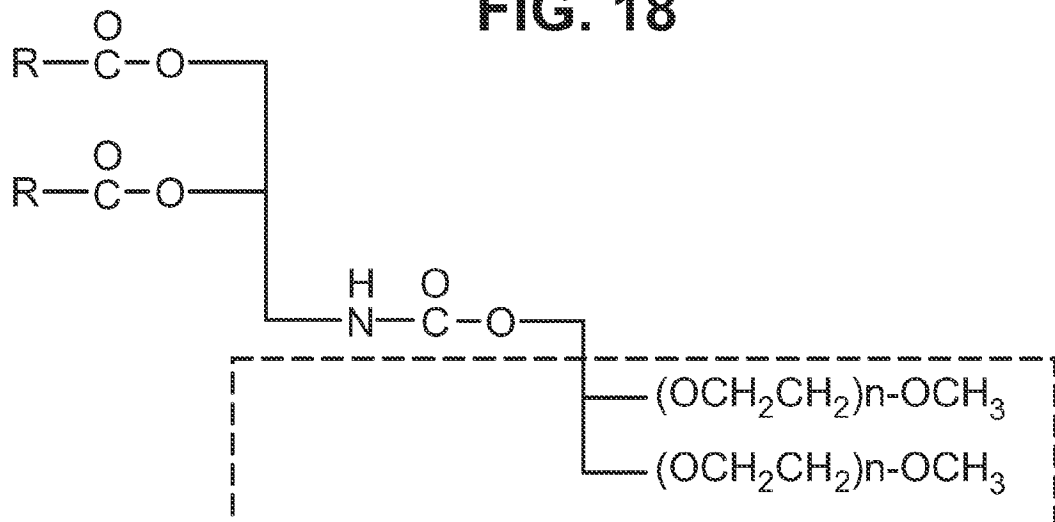


FIG. 13**FIG. 18**

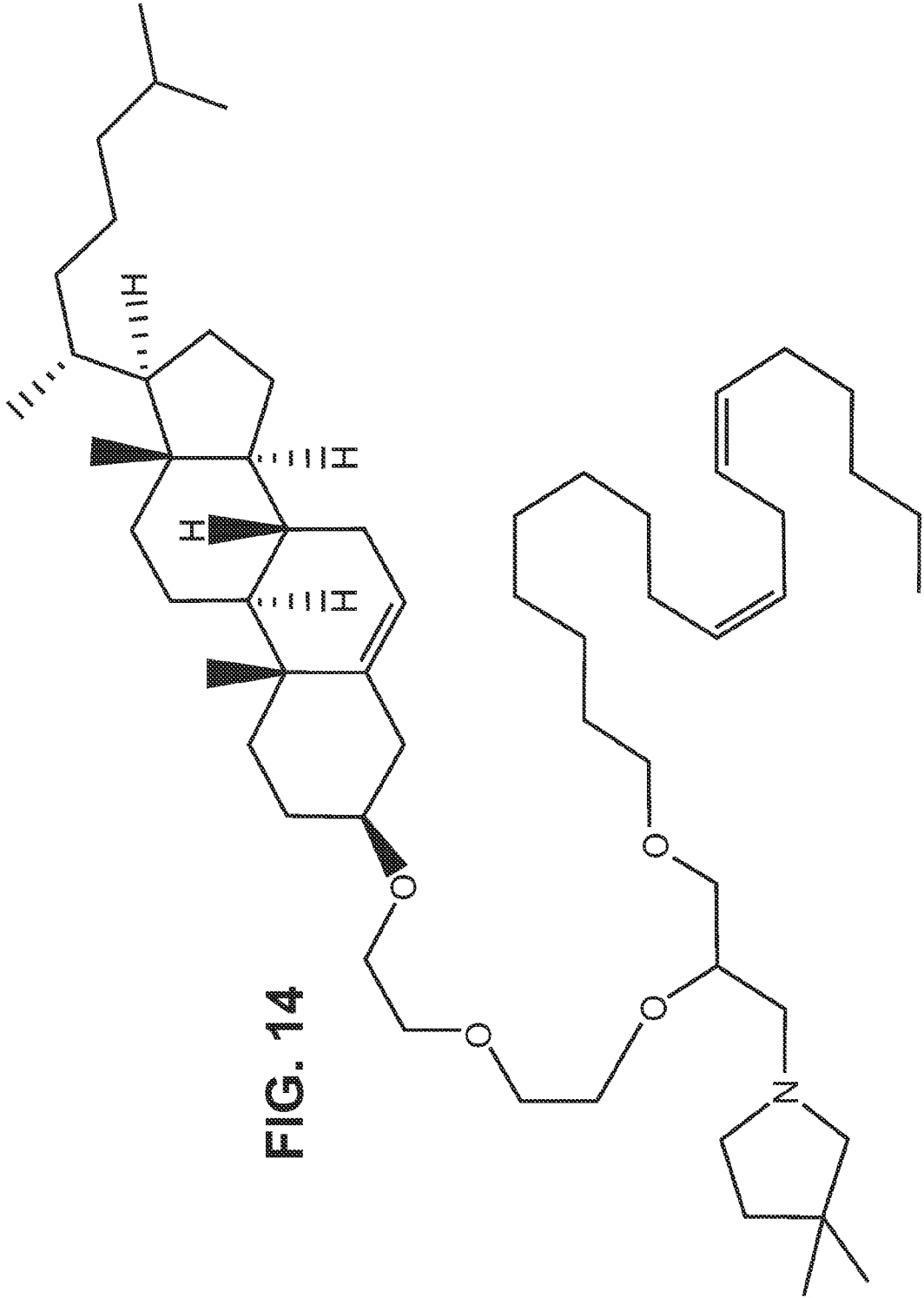
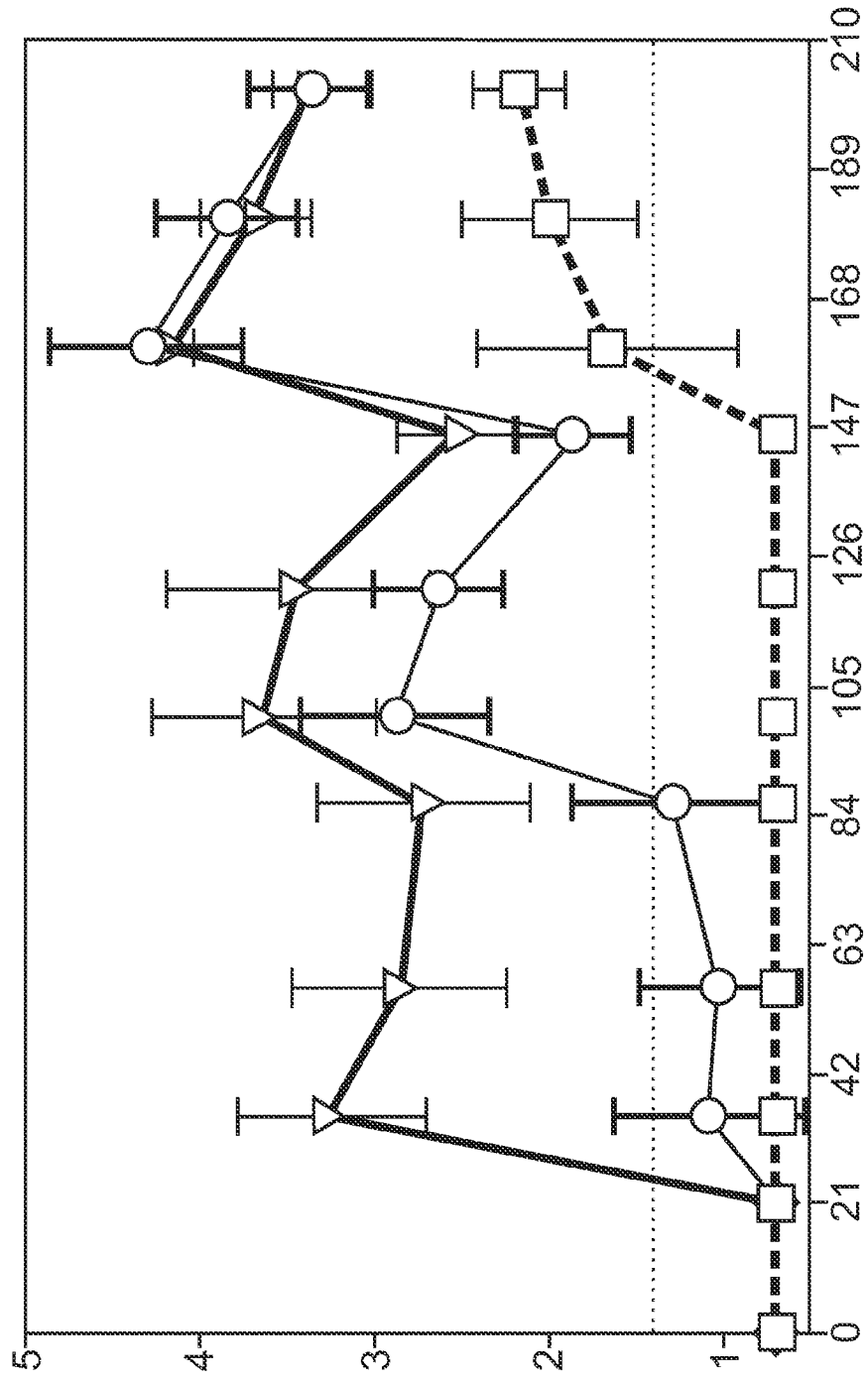


FIG. 14

FIG. 15



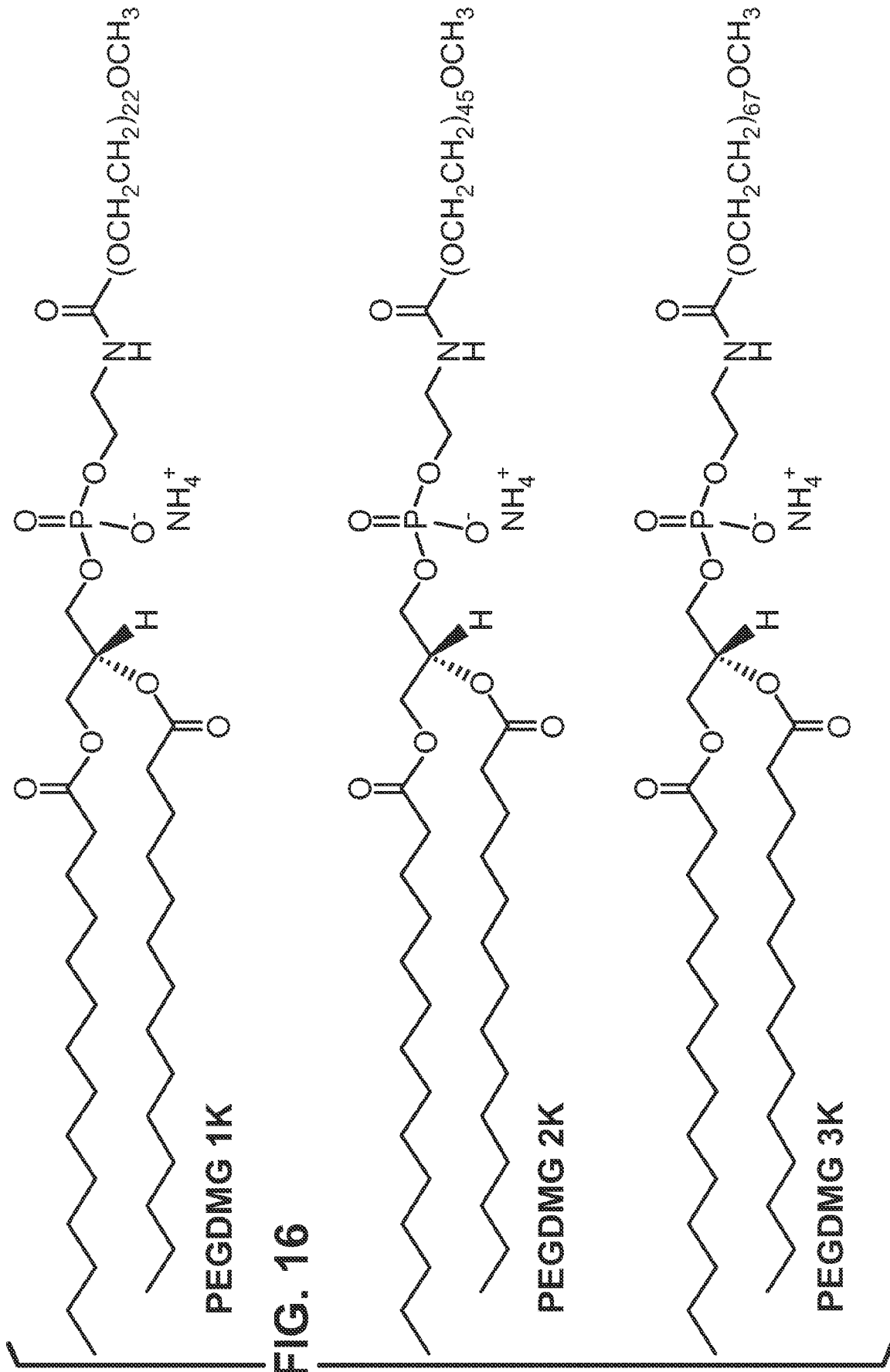


FIG. 16

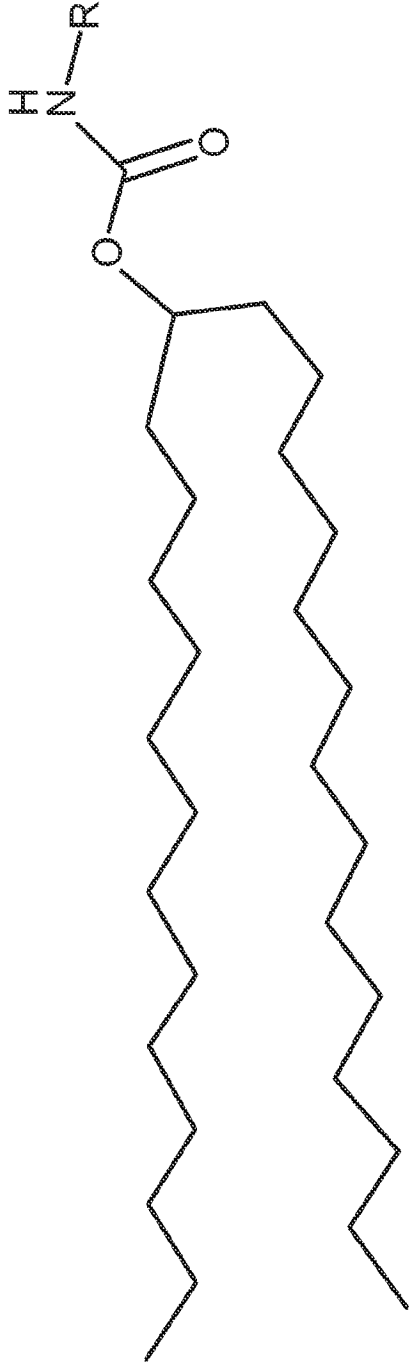


FIG. 17A

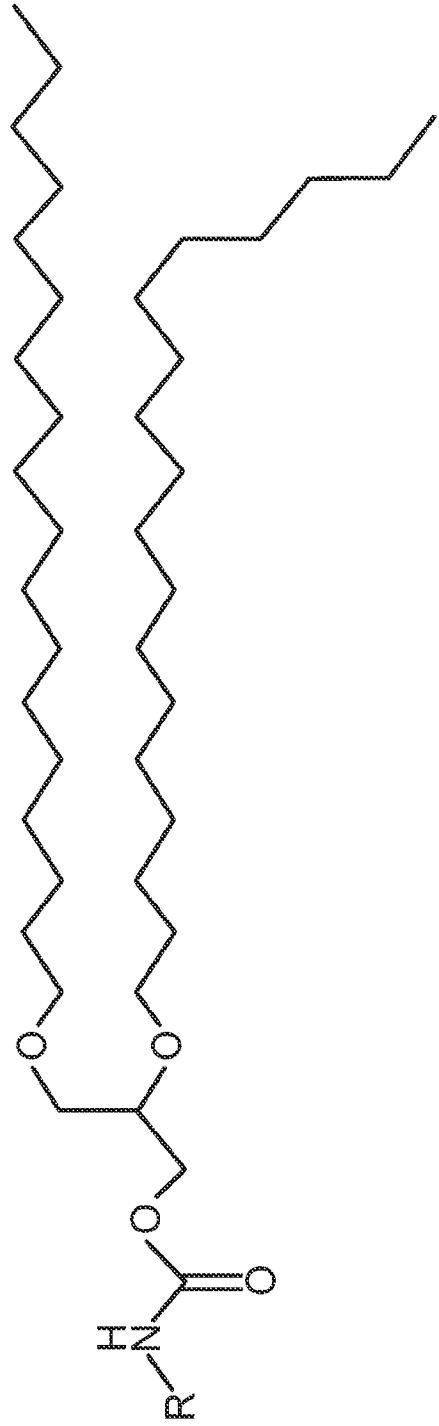


FIG. 17B

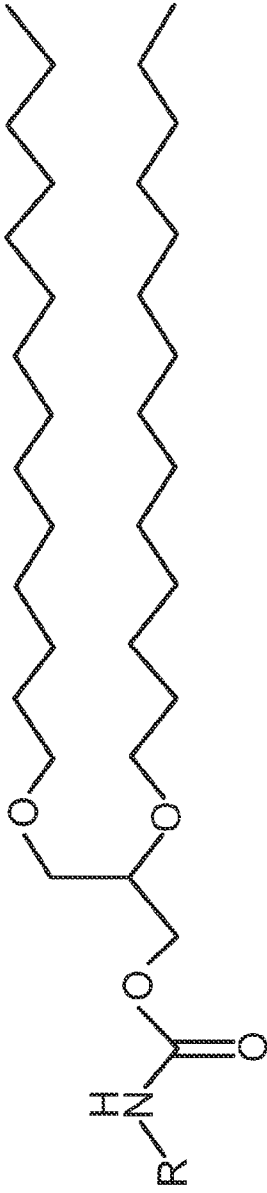


FIG. 17C

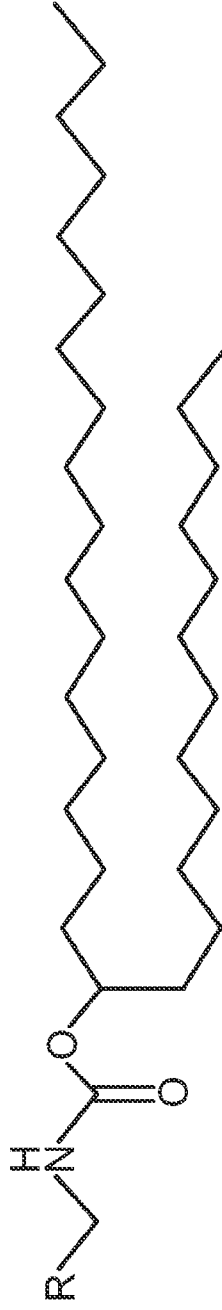


FIG. 17D

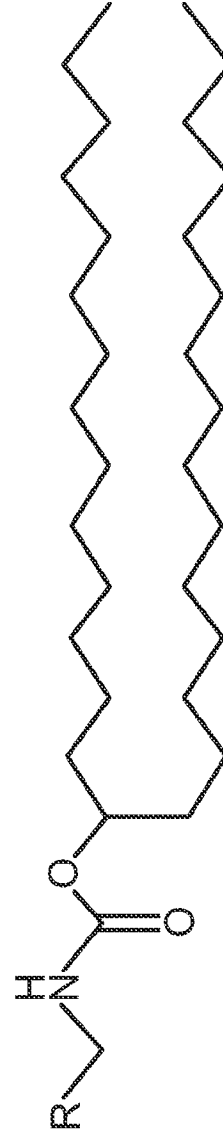


FIG. 17E