

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende (i) un primer polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que comprende un marco de lectura abierto que codifica un primer antígeno, dicho antígeno que comprende al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, y (ii) un segundo polinucleótido de ARN que comprende un marco de lectura abierto que codifica un segundo antígeno, dicho segundo antígeno que comprende al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el primer y el segundo polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica (NPL).

2. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1, en donde el primer y segundo antígenos comprenden hemagglutinina (HA), o un fragmento inmunogénico o variante de la misma.

3. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1 o 2 en donde el primer y segundo antígenos comprenden cada uno una HA, o un fragmento inmunogénico de la misma, que son de diferentes subtipos del virus de la influenza.

4. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además: (iii) un tercer polinucleótido de ARN que comprende un marco de lectura abierto que codifica un antígeno que comprende al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el tercer antígeno es de un virus de la influenza diferente de la cepa del virus de la influenza de los antígenos primero y segundo.

5. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 4, en donde el primer, segundo y tercer polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

6. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 5, que comprende además: iv) un cuarto polinucleótido de ARN que comprende un marco de lectura abierto que codifica un cuarto antígeno, dicho antígeno que comprende al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el cuarto antígeno es del virus de la influenza pero es de una cepa de virus de la influenza diferente a los antígenos primero, segundo y tercero.

7. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 6, en donde el primero, segundo, tercero y cuarto polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

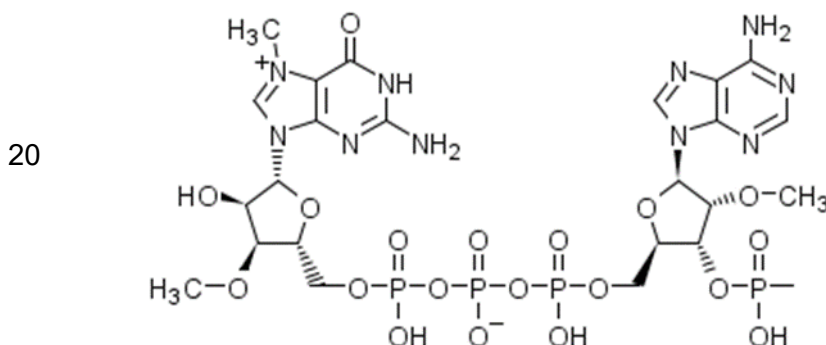
8. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde los polinucleótidos de ARN están presentes en alrededor de proporciones iguales.

9. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde cada polinucleótido de ARN comprende un nucleótido modificado.

5 10. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 9, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en pseudouridina, 1-metilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-
10 pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metil uridina.

11. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde cada polinucleótido de ARN comprende un casquete terminal 5', una UTR 5', una UTR 3' y una cola de poliadenilación 3'.

15 12. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 11, en donde el casquete terminal 5' comprende:



25 13. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 11, en donde la UTR en 5' comprende SEQ ID NO: 1.

14. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 11, en donde la UTR en 3' comprende SEQ ID NO: 2.

30 15. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 11, en donde la cola de poliadenilación 3' comprende SEQ ID NO: 3.

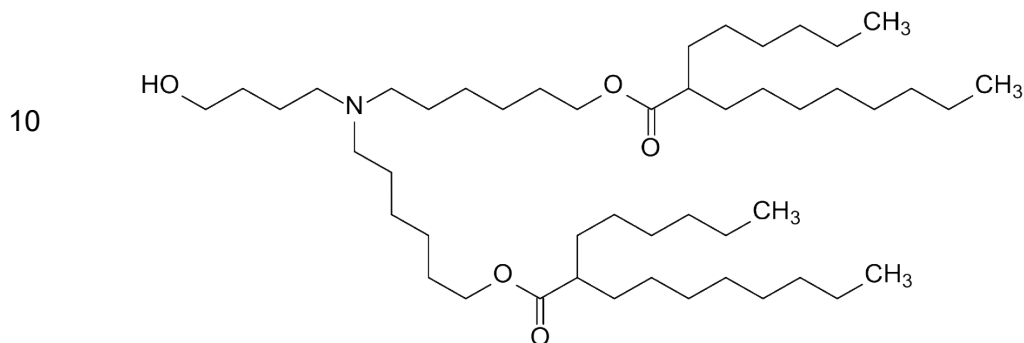
16. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el polinucleótido de ARN tiene una integridad superior al 85%.

35 17. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el polinucleótido de ARN tiene una pureza superior al

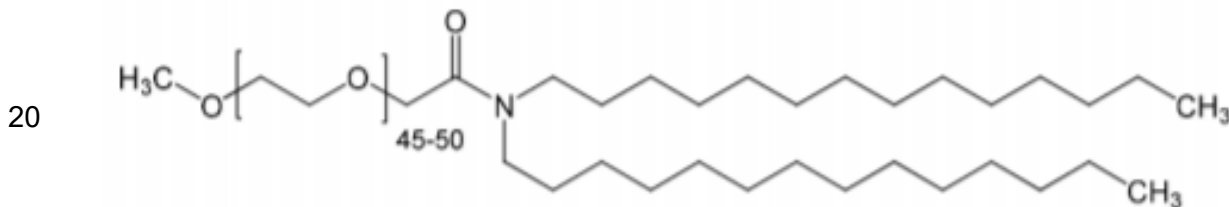
85%.

18. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la nanopartícula lipídica comprende 20-60 % mol de lípido catiónico ionizable, 5-25 % mol de lípido neutro, 25-55 % mol de colesterol y 0.5-5 % mol de lípido modificado con PEG.

19. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde el lípido catiónico comprende:



20. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el lípido modificado con PEG comprende:



21. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde el primer antígeno es HA del subtipo H1 de la influenza A o un fragmento inmunogénico o variante del mismo y el segundo antígeno es HA de una cepa H1 diferente al primer antígeno o un fragmento inmunogénico o variante del mismo.

22. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el primer y segundo antígenos son HA del subtipo H3 de la influenza A o un fragmento inmunogénico o variante del mismo y en donde ambos antígenos derivan de diferentes cepas del virus de la influenza H3.

23. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6-22, en donde los antígenos primero y segundo son HA del subtipo H1 de la influenza A o un fragmento inmunogénico o variante del mismo y los antígenos tercero y cuarto son del subtipo H3 de la influenza A o un fragmento inmunogénico o

variante del mismo y en donde los antígenos primero y segundo derivan de diferentes cepas del virus H1 y los antígenos tercero y cuarto derivan de diferentes cepas del virus H3 de la influenza.

24. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde al menos el primer y el segundo polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

25. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde el primer y el segundo polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

26. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4-25, en donde el primero, segundo y tercer polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

27. La composición inmunogénica de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde los polinucleótidos de ARN primero, segundo, tercero y cuarto están formulados en una única LNP.

28. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde cada uno de los polinucleótidos de ARN está formulado en una sola LNP, en donde cada una de las LNP encapsula el polinucleótido de ARN que codifica un antígeno.

29. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 28, en donde el primer polinucleótido de ARN está formulado en una primera LNP; y el segundo polinucleótido de ARN está formulado en una segunda LNP.

30. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 28, en donde el primer polinucleótido de ARN está formulado en una primera LNP; el segundo polinucleótido de ARN está formulado en una segunda LNP; y el tercer polinucleótido de ARN está formulado en una tercera LNP.

31. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 28, en donde el primer polinucleótido de ARN está formulado en una primera LNP; el segundo polinucleótido de ARN está formulado en una segunda LNP; el tercer polinucleótido de ARN está formulado en una tercera LNP; y el cuarto polinucleótido de ARN está formulado en una cuarta LNP.

32. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-31 para usarse en la obtención de una respuesta inmunitaria contra la influenza en un sujeto.

33. Un método para provocar una respuesta inmunitaria contra la enfermedad de

la influenza en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32.

5 34. Un método de purificación de un polinucleótido de ARN que comprende un marco de lectura abierto que codifica un primer antígeno, dicho antígeno comprende al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, sintetizado por transcripción *in vitro*, el método comprende ultrafiltración y diafiltración.

 35. El método de conformidad con la reivindicación 34, en donde el método no comprende una etapa de cromatografía.

10 36. El método de conformidad con la reivindicación 34, en donde el polinucleótido de ARN purificado está sustancialmente libre de contaminantes que comprenden especies de ARN abortivo corto, especies de ARN abortivo largo, ARN de doble cadena (dsARN), ADN plasmídico residual, enzimas de transcripción *in vitro* residuales, disolvente residual y/o sal residual.

15

20

25

30

35