

COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA CONTRA LA INFLUENZA

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de cada una de las siguientes solicitudes, cuya
5 descripción se incorpora por referencia en su totalidad: Solicitud de patente provisional
estadounidense 63/183,624, presentada el 3 de mayo de 2021; Solicitud de patente
provisional estadounidense 63/184,201, presentada el 4 de mayo de 2021; Solicitud de
patente provisional estadounidense 63/197,325, presentada el 4 de junio de 2021; y
Solicitud de patente provisional estadounidense 63/261,784, presentada el 28 de
10 septiembre de 2021.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a composiciones y métodos para la preparación,
fabricación y uso terapéutico de vacunas de ácido ribonucleico que comprenden
15 moléculas de polinucleótidos que codifican uno o más antígenos de la influenza, como los
antígenos de hemaglutinina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los virus de la influenza son miembros de la familia orthomyxoviridae y se
20 clasifican en tres tipos (A, B y C), basándose en las diferencias antigénicas entre su
nucleoproteína (NP) y su proteína matriz (M).

El genoma del virus de la influenza A incluye ocho moléculas (siete en el caso del
virus de la influenza C) de ARN lineal, de polaridad negativa y monocatenario, que
codifican varios polipéptidos, entre ellos: las proteínas ARN polimerasa dirigidas por ARN
25 (PB2, PB1 y PA) y la nucleoproteína (NP), que forman la nucleocápside; las proteínas de
la matriz (M1, M2, que también es una proteína expuesta a la superficie e incrustada en la
membrana del virus); dos glicoproteínas de superficie, que sobresalen de la envoltura
lipoproteica: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA); y las proteínas no
estructurales (NS1 y NS2).

La hemaglutinina es la principal glicoproteína de envoltura de los virus de la influenza A y
30 B, y la hemaglutinina-esterasa (HE) de los virus de la influenza C es una proteína
homóloga a la HA.

Un reto para la terapia y la profilaxis contra la influenza y otras infecciones
mediante vacunas tradicionales es la limitación de las vacunas en cuanto a su amplitud,
35 ya que sólo proporcionan protección contra subtipos estrechamente relacionados.

Además, el tiempo necesario para completar los actuales procesos estándar de producción de vacunas contra el virus de la influenza inhibe el rápido desarrollo y producción de una vacuna adaptada en una situación pandémica.

5 Existe la necesidad de composiciones inmunogénicas mejoradas contra la influenza.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

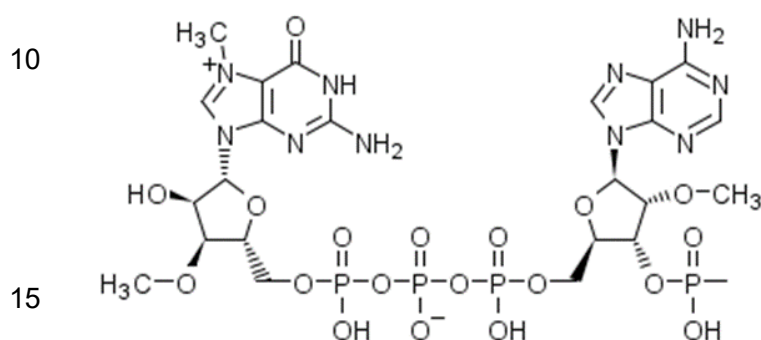
Las necesidades no satisfechas de composiciones inmunogénicas mejoradas contra la influenza, entre otras, se proporcionan en el presente documento. En un
10 aspecto, la descripción se refiere a una composición inmunogénica que incluye: (i) un primer polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tiene un marco de lectura abierto que codifica un primer antígeno, dicho antígeno incluye al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, y (ii) un
15 segundo polinucleótido de ARN que tenga un marco de lectura abierto que codifique un segundo antígeno, dicho segundo antígeno incluyendo 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 estén formulados en una nanopartícula lipídica (NPL). En algunas modalidades, el primer y segundo antígenos incluyen hemagglutina (HA), o un fragmento inmunogénico o variante de la misma. En algunas modalidades, el primer
20 antígeno incluye una HA de un subtipo de virus de la influenza diferente al polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo del segundo antígeno. En algunas modalidades, la composición incluye además (iii) un tercer antígeno que incluye al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el tercer antígeno es del virus de la influenza pero es de una cepa diferente del virus de la influenza a los antígenos primero y segundo. En
25 algunas modalidades, los polinucleótidos ARN primero, segundo y tercero están formulados en una nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, la composición incluye además (iv) un cuarto polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica un cuarto
30 antígeno, dicho antígeno incluye 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. En algunas modalidades, los polinucleótidos ARN primero, segundo, tercero y cuarto están formulados en una nanopartícula lipídica.

35 En algunas modalidades, cada polinucleótido de ARN incluye un nucleótido modificado. En algunas modalidades, 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-azauridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tiopseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metil uridina.

En algunas modalidades, cada polinucleótido de ARN incluye una 5' casquete terminal, una UTR en 5', una 3'UTR y una 3' cola de poliadenilación. En algunas modalidades, el casquete terminal 5' incluye:

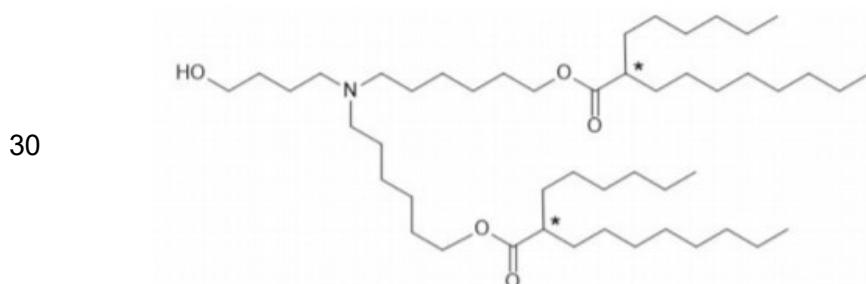


En algunas modalidades, la UTR en 5' incluye SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, la UTR 3' incluye la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, la cola de poliadenilación 3' incluye la SEQ ID NO: 3.

En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una integridad superior al 85%. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una pureza superior al 85%.

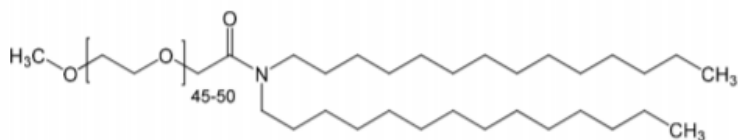
En algunas modalidades, la nanopartícula lipídica incluye 20-60 % mol de lípido catiónico ionizable, 5-25 % mol de lípido neutro, 25-55 % mol de colesterol y 0.5-5 % mol de lípido modificado con PEG.

En algunas modalidades, el lípido catiónico incluye:



Los asteriscos (*) indican centros quirales

En algunas modalidades, el lípido modificado con PEG incluye:



5

En algunas modalidades, 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. En algunas modalidades, el primer y el segundo antígeno son HA del subtipo H3 de la influenza A o un fragmento inmunogénico o variante del mismo y en donde ambos antígenos proceden de cepas diferentes del virus de la influenza H3.

10

15

En algunas modalidades, 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 se derivan de diferentes cepas del virus H1 y los antígenos tercero y cuarto son de diferentes cepas del virus de la influenza H3.

20

En algunas modalidades, al menos el primero y segundo polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, los polinucleótidos de ARN primero y segundo se formulan en una única nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, los polinucleótidos de ARN primero, segundo y tercero se formulan en una única nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, los polinucleótidos de ARN primero, segundo, tercero y cuarto se formulan en una única nanopartícula lipídica.

25

30

En algunas modalidades, cada uno de los polinucleótidos de ARN se formula en una única LNP, en donde cada LNP encapsula el polinucleótido de ARN que codifica un antígeno. En algunas modalidades, el primer polinucleótido de ARN se formula en una primera LNP; y el segundo polinucleótido de ARN se formula en una segunda LNP. En algunas modalidades, el primer polinucleótido de ARN se formula en una primera LNP; el segundo polinucleótido de ARN se formula en una segunda LNP; y el tercer polinucleótido de ARN se formula en una tercera LNP. En algunas modalidades, el primer polinucleótido de ARN se formula en una primera LNP; el segundo polinucleótido de ARN se formula en una segunda LNP; el tercer polinucleótido de ARN se formula en una tercera LNP; y el cuarto polinucleótido de ARN se formula en una cuarta LNP.

35

En otro aspecto, la descripción se refiere a cualquiera de las composiciones inmunogénicas aquí descritas, para usarse en la provocación de una respuesta

inmunitaria contra la influenza.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para provocar una respuesta inmunitaria contra la enfermedad de la influenza, que incluye la administración de una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas aquí descritas.

5 En otro aspecto, la descripción se refiere a un método de purificación de un polinucleótido de ARN sintetizado por transcripción *in vitro*. El método incluye la ultrafiltración y la diafiltración. En algunas modalidades, el método no comprende una etapa de cromatografía. En algunas modalidades, 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. En algunas modalidades, el ADN plasmídico residual es ≤ 500 ng de ADN/mg de ARN. En algunas modalidades, el rendimiento del ARNm purificado es de alrededor del 70% a alrededor del 99%. En algunas modalidades, la pureza del ARNm purificado está comprendida entre alrededor del 60% y alrededor del 100%. En algunas modalidades, la pureza del ARNm purificado está entre alrededor del 85%-95%.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las modalidades de la presente descripción proporcionan vacunas de ARN (por ejemplo, ARNm) que incluyen polinucleótidos que codifican un antígeno del virus de la influenza. Las vacunas de ARN contra el virus de la influenza, tal y como se proporcionan en el presente documento, pueden utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria equilibrada, que comprenda tanto inmunidad celular como humoral, sin muchos de los riesgos asociados a la vacunación con ADN. En algunas modalidades, el virus es una cepa de la influenza A o de la influenza B o combinaciones de las mismas.

25 En un aspecto, la descripción se refiere a una composición inmunogénica que incluye: (i) un primer polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tiene un marco de lectura abierto que codifica un primer antígeno, dicho antígeno incluyendo al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, y (ii) un segundo polinucleótido de ARN que tenga un marco de lectura abierto que codifique un segundo antígeno, dicho segundo antígeno incluyendo 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 estén formulados en una nanopartícula lipídica (NPL). En algunas modalidades, el primer y segundo antígenos incluyen hemagglutina (HA), o un fragmento inmunogénico o variante de la misma. En algunas modalidades, el primer antígeno incluye una HA de un subtipo de virus de la

influenza diferente al polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo del segundo antígeno. En algunas modalidades, la composición incluye además (iii) un tercer antígeno que incluye al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el tercer antígeno es del virus de la influenza pero es de una cepa diferente del virus de la influenza a los antígenos primero y segundo. En algunas modalidades, los primero, segundo y tercero polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, la composición incluye además (iv) un cuarto polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica un cuarto antígeno, dicho antígeno incluye 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. En algunas modalidades, los primero, segundo, tercero y cuarto polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, los polinucleótidos de ARN se mezclan en las proporciones deseadas en un único recipiente y se formulan posteriormente en nanopartículas lipídicas. Los inventores descubrieron sorprendentemente que la entrada inicial de diferentes polinucleótidos de ARN en una proporción conocida para ser formulados en un único proceso de LNP daba lugar sorprendentemente a LNP que encapsulaban los diferentes polinucleótidos de ARN en alrededor de la misma proporción que la proporción de entrada. Los resultados fueron sorprendentes en vista del potencial del proceso de fabricación para favorecer un polinucleótido de ARN a otro al encapsular los polinucleótidos de ARN en una LNP. Dichas modalidades pueden denominarse en el presente documento "premezcla". En consecuencia, en algunas modalidades, los polinucleótidos de ARN primero y segundo se formulan en una única nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, los primero, segundo, tercero y cuarto polinucleótidos de ARN se formulan en una única LNP. En algunas modalidades, los polinucleótidos de ARN primero, segundo, tercero, cuarto y quinto se formulan en una única LNP. En algunas modalidades, los primero, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto polinucleótidos de ARN se formulan en una única LNP. En algunas modalidades, los primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo polinucleótidos de ARN se formulan en una única LNP. En algunas modalidades, los primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo polinucleótidos de ARN se formulan en una única LNP.

En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al segundo polinucleótido de ARN en la mezcla de polinucleótidos de ARN antes

de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2: 1, alrededor de 3: 1, alrededor de 4: 1, o alrededor de 5: 1, alrededor de 10: 1, alrededor de 25: 1 o alrededor de 50: 1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al segundo polinucleótido de ARN es superior a 1:1.

En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al tercer polinucleótido de ARN en la mezcla de polinucleótidos de ARN antes de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al tercer polinucleótido de ARN es superior a 1:1.

En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al cuarto polinucleótido de ARN en la mezcla de polinucleótidos de ARN antes de la formulación en LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al cuarto polinucleótido de ARN es superior a 1:1. En algunas modalidades, la proporción molar entre el primer polinucleótido de ARN y el quinto polinucleótido de ARN en la mezcla de polinucleótidos de ARN previa a la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al quinto polinucleótido de ARN es superior a 1:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al sexto polinucleótido de ARN en la mezcla de polinucleótidos de ARN antes de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al sexto polinucleótido de ARN es superior

a 1:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al séptimo polinucleótido de ARN en la mezcla de polinucleótidos de ARN antes de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al séptimo polinucleótido de ARN es superior a 1:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al octavo polinucleótido de ARN en la mezcla de polinucleótidos de ARN antes de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al octavo polinucleótido de ARN es superior a 1:1.

En modalidades alternativas, cada polinucleótido de ARN que codifica un antígeno concreto se formula en una LNP individual, de forma que cada LNP encapsula un polinucleótido de ARN que codifica antígenos idénticos. Dichas modalidades pueden denominarse en el presente documento "posmezcla". Por consiguiente, en algunas modalidades, el primer polinucleótido de ARN se formula en una primera LNP; el segundo polinucleótido de ARN se formula en una segunda LNP; el tercer polinucleótido de ARN se formula en una tercera LNP; el cuarto polinucleótido de ARN se formula en una cuarta LNP; el quinto polinucleótido de ARN se formula en una quinta LNP; el sexto polinucleótido de ARN se formula en una sexta LNP; el séptimo polinucleótido de ARN se formula en una séptima LNP; y el octavo polinucleótido de ARN se formula en una octava LNP.

En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP con respecto a la segunda LNP en la mezcla de las LNP antes de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar entre la primera LNP y la segunda LNP es superior a 1:1.

En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP con respecto a la tercera LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de alrededor de

1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1: 10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP con respecto a la tercera LNP es superior a 1:1.

En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP con respecto a la cuarta LNP en la mezcla de las LNP antes de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar entre la primera LNP y la cuarta LNP es superior a 1:1. En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP con respecto a la quinta LNP en la mezcla de las LNP antes de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar entre la primera LNP y la quinta LNP es superior a 1:1. En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP con respecto a la sexta LNP en la mezcla de las LNP antes de la formulación en las LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar entre la primera LNP y la sexta LNP es superior a 1:1. En algunas modalidades, la proporción molar entre la primera LNP y la séptima LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP con respecto a la séptima LNP es superior a 1:1. En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP con respecto a la octava LNP en la mezcla de LNP previa a la formulación en LNP es de alrededor de 1:50, alrededor de 1:25, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, o alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 25:1 o alrededor de 50:1. En algunas modalidades, la proporción molar de la primera LNP

con respecto a la octava LNP es superior a 1:1.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que, independientemente del proceso, la proporción resultante de polinucleótidos de ARN era comparable tanto si la pluralidad de polinucleótidos de ARN se mezcla antes de la formulación en una LNP (premezclado) como si los polinucleótidos de ARN que codifican un antígeno concreto se formulan en una LNP individual y se mezcla la pluralidad de LNP para antígenos diferentes (posmezclado). Como resultado del descubrimiento, puede existir la opción de que los profesionales médicos mezclen y administren diferentes proporciones de antígenos en función de la temporada de influenza, en particular, cuando las LNP individuales encapsulan ARN para un único antígeno.

En algunas modalidades, el polipéptido antigénico codifica una proteína hemaglutinina o un fragmento inmunogénico de la misma. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina es H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, o un fragmento inmunogénico de la misma. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina no comprende un dominio de cabeza. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina comprende una porción del dominio de cabeza. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina no comprende un dominio citoplasmático. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina comprende una porción del dominio citoplasmático. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina truncada comprende una porción del dominio transmembrana.

Algunas modalidades proporcionan vacunas contra la influenza que comprenden uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que codifica una proteína hemaglutinina y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, formulado dentro de una nanopartícula lipídica catiónica. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina se selecciona entre H1, H7 y H10. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN codifica además la proteína neuraminidasa (NA). En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina se deriva de una cepa del virus de la influenza A o del virus de la influenza B o de combinaciones de los mismos. En algunas modalidades, el virus de la influenza se selecciona entre H1N1, H3N2, H7N9 y H10N8.

En algunas modalidades, el virus es una cepa de la influenza A o de la influenza B o combinaciones de las mismas. En algunas modalidades, la cepa de la influenza A o de la influenza B está asociada a aves, cerdos, caballos, perros, humanos o primates no humanos. En algunas modalidades, el polipéptido antigénico codifica una proteína hemaglutinina o un fragmento de la misma. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina es H7 o H10 o un fragmento de la misma. En algunas modalidades, la

proteína hemaglutinina comprende una porción del dominio de la cabeza (HA1). En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina comprende una porción del dominio citoplasmático. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina troncada. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina troncada comprende una porción del dominio transmembrana. En algunas modalidades, el virus se selecciona del grupo que consiste en H7N9 y H10N8. Los fragmentos proteicos, los dominios proteicos funcionales y las proteínas homólogas también se consideran dentro del ámbito de los polipéptidos de interés. Por ejemplo, se proporciona aquí cualquier fragmento de proteína (es decir, una secuencia polipeptídica al menos un residuo de aminoácido más corta que una secuencia polipeptídica de referencia pero idéntica por lo demás) de una proteína de referencia de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, una composición de ARN de la influenza incluye un ARN que codifica una proteína de fusión antigénica. Así, el antígeno o antígenos codificados pueden incluir dos o más proteínas (por ejemplo, proteína y/o fragmento de proteína) unidas entre sí. Alternativamente, la proteína a la que se fusiona un antígeno proteico no promueve una respuesta inmunitaria fuerte contra sí misma, sino contra el antígeno de la influenza. Las proteínas de fusión antigénica, en algunas modalidades, conservan la propiedad funcional de cada proteína original.

Algunas modalidades proporcionan métodos de prevención o tratamiento de la infección viral de la influenza que comprenden la administración a un sujeto de cualquiera de las vacunas descritas en el presente documento. En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria específica al antígeno comprende una respuesta de células T. En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria específica al antígeno comprende una respuesta de células B. En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria específica al antígeno comprende tanto una respuesta de células T como una respuesta de células B. En algunas modalidades, el método para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno implica una única administración de la vacuna. En algunas modalidades, la vacuna se administra al sujeto por vía intradérmica, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inoculación intranasal o administración oral.

En algunas modalidades, los polinucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNm) o porciones de los mismos pueden codificar uno o más polipéptidos o fragmentos de los mismos de una cepa de influenza como antígeno.

1. Vacunas de ARNm de la descripción

La presente descripción se refiere a las vacunas de ARNm en general. En el estado de la técnica existen varias plataformas de vacunas de ARNm. La estructura

básica del ARNm transcrito *in vitro* (IVT) se asemeja mucho al ARNm eucariótico "maduro" e incluye (i) un marco de lectura abierto (ORF) codificador de proteínas, flanqueado por (ii) regiones no traducidas (UTR) 5' y 3', y en los extremos (iii) una estructura de casquete 5' de 7-metil guanosina y (iv) una cola 3' de poli(A). Las características estructurales no codificantes desempeñan papeles importantes en la farmacología del ARNm y pueden optimizarse individualmente para modular la estabilidad del ARNm, la eficiencia de la traducción y la inmunogenicidad. Mediante la incorporación de nucleósidos modificados, se pueden producir transcritos de ARNm denominados "ARNm modificado con nucleósidos" con una actividad inmunoestimuladora reducida y, por tanto, se puede obtener un perfil de seguridad mejorado. Además, los nucleósidos modificados permiten diseñar vacunas de ARNm con una estabilidad y una capacidad de traducción muy mejoradas, ya que pueden evitar las vías antivirales directas que inducen los IFN tipo y que están programadas para degradar e inhibir el ARNm invasor. Por ejemplo, la sustitución de uridina por pseudouridina en el ARNm de la IVT reduce la actividad de la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa, que regula la escisión del ARNm por la RNasa L. Además, se miden actividades más bajas de la proteína quinasa R, una enzima que está asociada a la inhibición del proceso de traducción del ARNm.

Además de la incorporación de nucleótidos modificados, se han validado otros enfoques para aumentar la capacidad de traducción y la estabilidad del ARNm. Un ejemplo es el desarrollo de "ARNm de ingeniería de secuencias". En este caso, la expresión del ARNm puede incrementarse fuertemente mediante optimizaciones de la secuencia en el ORF y las UTR del ARNm, por ejemplo, enriqueciendo el contenido de GC, o seleccionando las UTR de moléculas naturales de ARNm de larga vida. Otro enfoque es el diseño de constructos de "ARNm autoamplificante". Éstas se derivan principalmente de alfavirus y contienen un ORF que se sustituye por el antígeno de interés junto con un ORF adicional que codifica la replicasa viral. Esta última impulsa la amplificación intracelular del ARNm y, por tanto, puede aumentar significativamente la capacidad de expresión del antígeno.

También se han implementado varias modificaciones en las estructuras finales del ARNm. Las modificaciones de casquete anti-reverso (ARCA) pueden garantizar la orientación correcta del casquete en el extremo 5', lo que produce fracciones casi completas de ARNm que pueden unirse eficazmente a los ribosomas. Otras modificaciones del casquete, como los análogos de fosforotioato de casquete, pueden mejorar aún más la afinidad hacia el factor 4E de iniciación de la traducción eucariota y aumentar la resistencia frente al complejo de eliminación de casquetes del ARN.

A la inversa, modificando su estructura, se puede mejorar aún más la potencia del ARNm para desencadenar respuestas inmunitarias innatas, pero en detrimento de la capacidad de traducción. Al estabilizar el ARNm con un esqueleto de fosforotioato, o mediante su precipitación con la proteína catiónica protamina, se puede disminuir la expresión del antígeno, pero se pueden obtener capacidades inmunoestimulantes más potentes.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende una molécula de ARNm que codifica uno o más polipéptidos o fragmentos de los mismos de una cepa de influenza como antígeno.

En algunas modalidades, la molécula de ARNm comprende un ARNm modificado con nucleósidos. Los ARNm útiles en la descripción suelen incluir una primera región de nucleósidos enlazados que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, una región codificante), una primera región flanqueante situada en la terminación 5' de la primera región (por ejemplo, una UTR en 5'), una segunda región flanqueante situada en la terminación 3' de la primera región (por ejemplo, una UTR en 3'), al menos una región de casquete 5' y una región estabilizadora en 3'. En algunas modalidades, el ARNm de la descripción incluye además una región poli-A o una secuencia Kozak (por ejemplo, en la UTR en 5'). En algunos casos, el ARNm de la descripción puede contener una o más secuencias nucleotídicas intrónicas capaces de ser extirpadas del polinucleótido. En algunas modalidades, el ARNm de la descripción puede incluir una estructura de casquete 5', un nucleótido de terminación de cadena, un horquilla, una secuencia poli A y/o una señal de poliadenilación. Cualquiera de las regiones de un ácido nucleico puede incluir uno o más componentes alternativos (por ejemplo, un nucleósido alternativo). Por ejemplo, la región estabilizadora 3' puede contener un nucleósido alternativo como un L-nucleósido, una timidina invertida o un 2'-O-metil nucleósido y/o la región codificante, la UTR en 5', la UTR en 3' o la región de casquete pueden incluir un nucleósido alternativo como una uridina 5-sustituida (por ejemplo, 5-metoxiuridina), una pseudouridina 1-sustituida (por ejemplo, 1-metil-pseudouridina), y/o una citidina 5-sustituida (por ejemplo, 5-metil-citidina).

Las composiciones aquí descritas comprenden al menos un polinucleótido de ARN, como un ARNm (por ejemplo, ARNm modificado). El ARNm, por ejemplo, se transcribe *in vitro* a partir de ADN molde, denominado "plantilla de transcripción *in vitro*". En algunas modalidades, una plantilla de transcripción *in vitro* codifica una región 5' no traducida (UTR), contiene un marco de lectura abierto y codifica una UTR en 3' y una cola de poliA. La composición particular de la secuencia de ácido nucleico y la longitud de una

plantilla de transcripción *in vitro* dependerán del ARNm codificado por la plantilla.

Una "región no traducida 5'" (UTR) se refiere a una región de un ARNm que se encuentra directamente cadena arriba (es decir, 5') del codón de inicio (es decir, el primer codón de un transcrito de ARNm traducido por un ribosoma) que no codifica un polipéptido.

En modalidades preferibles, la UTR en 5' comprende SEQ ID NO: 1.

Una "región no traducida 3'" (UTR) se refiere a una región de un ARNm que se encuentra directamente aguas abajo (es decir, 3') del codón de detención (es decir, el codón de un transcrito de ARNm que señala una terminación de la traducción) que no codifica un polipéptido.

En modalidades preferibles, la UTR en 3' comprende SEQ ID NO: 2.

Un "marco de lectura abierto" es un tramo continuo de ADN que comienza con un codón de inicio (por ejemplo, metionina (ATG)) y termina con un codón de detención (por ejemplo, TAA, TAG o TGA) y codifica un polipéptido.

Una "cola poliA" es una región del ARNm que se encuentra aguas abajo, por ejemplo, directamente aguas abajo (es decir, 3'), de la UTR en 3' que contiene múltiples monofosfatos de adenosina consecutivos. Una cola poliA puede contener de 10 a 300 monofosfatos de adenosina. Por ejemplo, una cola poliA puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300 monofosfatos de adenosina. En algunas modalidades, una cola poliA contiene de 50 a 250 monofosfatos de adenosina. En un entorno biológico relevante (por ejemplo, en células, *in vivo*), la cola de poli(A) funciona para proteger el ARNm de la degradación enzimática, por ejemplo, en el citoplasma, y ayuda en la terminación de la transcripción, la exportación del ARNm del núcleo y la traducción.

En modalidades preferibles, la cola de poliadenilación 3' comprende SEQ ID NO: 3.

En algunas modalidades, un polinucleótido incluye de 200 a 3,000 nucleótidos. Por ejemplo, un polinucleótido puede incluir de 200 a 500, de 200 a 1000, de 200 a 1500, de 200 a 3000, de 500 a 1000, de 500 a 1500, de 500 a 2000, de 500 a 3000, de 1000 a 1500, de 1000 a 2000, de 1000 a 3000, de 1500 a 3000 o de 2000 a 3000 nucleótidos).

En algunas modalidades, una LNP incluye uno o más ARN, y el uno o más ARN, los lípidos y las cantidades de los mismos pueden seleccionarse para proporcionar una proporción N:P específica. La proporción N:P de la composición se refiere a la proporción molar de átomos de nitrógeno en uno o más lípidos respecto al número de grupos fosfato en un ARN. En general, se prefiere una proporción N:P más baja. El uno o más ARN, los

lípidos y las cantidades de los mismos pueden seleccionarse para proporcionar una proporción N:P de alrededor de 2:1 a alrededor de 30:1, como 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1, 26: 1 , 28: 1 , o 30: 1 . En ciertas modalidades, la proporción N:P puede ser de alrededor de 2:1 a alrededor de 8: 1. En

5 otras modalidades, la proporción N:P es de alrededor de 5 : 1 a alrededor de 8: 1. Por ejemplo, la proporción N:P puede ser de alrededor de 5.0 1 , alrededor de 5.5:1, alrededor de 5.67: 1, alrededor de 6.0: 1, alrededor de 6.5:1 o alrededor de 7.0: 1. Por ejemplo, la proporción N:P puede ser de alrededor de 5.67: 1.

El ARNm de la descripción puede incluir uno o más componentes naturales,

10 incluido cualquiera de los nucleótidos canónicos A (adenosina), G (guanosina), C (citosa), U (uridina) o T (timidina). En una modalidad, todos o casi todos los nucleótidos que comprenden (a) la UTR en 5', (b) el marco de lectura abierto (ORF), (c) la UTR en 3', (d) la cola poli A, y cualquier combinación de (a, b, c, o d anteriores) comprenden nucleótidos canónicos naturales A (adenosina), G (guanosina), C (citosa), U (uridina), o

15 T (timidina).

El ARNm de la descripción puede incluir uno o más componentes alternativos, como se describe en el presente documento, que le confieren propiedades útiles, entre ellas una mayor estabilidad y/o la ausencia de una inducción sustancial de la respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el polinucleótido. Por ejemplo, un

20 modARN puede mostrar una degradación reducida en una célula en la que se introduce el modARN, en relación con un ARNm inalterado correspondiente. Estas especies alternativas pueden mejorar la eficacia de la producción de proteínas, la retención intracelular de los polinucleótidos y/o la viabilidad de las células contactadas, así como poseer una inmunogenicidad reducida.

El ARNm de la descripción puede incluir una o más nucleobases modificadas (por ejemplo, alteradas o alternativas), nucleósidos, nucleótidos o combinaciones de los mismos. El ARNm útil en una LNP puede incluir cualquier modificación o alteración útil, como a la nucleobase, al azúcar o al enlace internucleósido (por ejemplo, a un fosfato de enlace / a un enlace fosfodiéster / a la columna de fosfodiéster). En ciertas modalidades,

30 las alteraciones (por ejemplo, una o más alteraciones) están presentes en cada una de la nucleobase, el azúcar y el enlace internucleósido. Las alteraciones de acuerdo con la presente descripción pueden ser alteraciones de los ácidos ribonucleicos (ARN), por ejemplo, la sustitución del 2'-OH del anillo ribofuranosilo por 2'-H, ácidos nucleicos de treosa (TNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos

35 nucleicos bloqueados (LNA) o híbridos de los mismos. En el presente documento se

describen alteraciones adicionales.

El ARNm de la descripción puede o no estar uniformemente alterado a lo largo de toda la molécula. Por ejemplo, uno o más o todos los tipos de nucleótidos (por ejemplo, purina o pirimidina, o uno o más o todos de A, G, U, C) pueden o no estar uniformemente alterados en un ARNm, o en una región de secuencia predeterminada dada del mismo. En algunos casos, todos los nucleótidos X en un ARNm (o en una región de secuencia dada del mismo) están alterados, en donde X puede ser cualquiera de los nucleótidos A, G, U, C, o cualquiera de las combinaciones A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C o A+G+C.

Pueden existir diferentes alteraciones de los azúcares y/o enlaces internucleósidos (por ejemplo, estructuras de columna) en varias posiciones de un polinucleótido. Una persona con conocimientos ordinarios en la materia apreciará que los análogos de nucleótidos u otra(s) alteración(es) pueden estar situados en cualquier posición(es) de un polinucleótido de tal manera que la función del polinucleótido no se vea sustancialmente disminuida. Una alteración también puede ser una alteración en 5'- o 3'-terminal. En algunas modalidades, el polinucleótido incluye una alteración en el 3'-terminal. El polinucleótido puede contener desde alrededor del 1% hasta alrededor del 100% de nucleótidos alternativos (ya sea en relación con el contenido total de nucleótidos, o en relación con uno o más tipos de nucleótidos, es decir, uno o más de A, G, U o C) o cualquier porcentaje intermedio (por ejemplo, del 1% al 20%, del 1% al 25%, del 1% al 50%, del 1% al 60%, del 1% al 70%, del 1% al 80%, del 1% al 90%, del 1% al 95%, del 10% al 20%, del 10% al 25%, del 10% al 50%, del 10% al 60%, del 10% al 70%, del 10% al 80%, del 10% al 90%, del 10% al 95%, del 10% al 100%, del 20% al 25%, del 20% al 50%, del 20% al 60%, del 20% al 70%, del 20% al 80%, del 20% al 90%, del 20% al 95%, del 20% al 100%, del 50% al 60%, del 50% al 70%, del 50% al 80%, del 50% al 90%, del 50% al 95%, del 50% al 100%, del 70% al 80%, del 70% al 90%, del 70% al 95%, del 70% al 100%, del 80% al 90%, del 80% al 95%, del 80% al 100%, del 90% al 95%, del 90% al 100% y del 95% al 100%). Se entenderá que cualquier porcentaje restante se contabiliza por la presencia de un nucleótido canónico (por ejemplo, A, G, U o C).

Los polinucleótidos pueden contener como mínimo cero y como máximo 100% de nucleótidos alternativos, o cualquier porcentaje intermedio, como al menos 5% de nucleótidos alternativos, al menos 10% de nucleótidos alternativos, al menos 25% de nucleótidos alternativos, al menos 50% de nucleótidos alternativos, al menos 80% de nucleótidos alternativos, o al menos 90% de nucleótidos alternativos. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden contener una pirimidina alternativa, como un uracilo o una citosina

alternativos. En algunas modalidades, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 25%, al menos el 50%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100% del uracilo de un polinucleótido se sustituye por un uracilo alternativo (por ejemplo, un uracilo 5-sustituido). El uracilo alternativo puede sustituirse por un compuesto que tenga una única estructura o puede sustituirse por una pluralidad de compuestos que tengan estructuras diferentes (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas). En algunos casos, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 25%, al menos el 50%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100% de la citosina del polinucleótido se sustituye por una citosina alternativa (por ejemplo, una citosina 5-sustituida). La citosina alternativa puede sustituirse por un compuesto que tenga una única estructura o puede sustituirse por una pluralidad de compuestos que tengan estructuras diferentes (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas).

En algunos casos, los ácidos nucleicos no inducen sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el polinucleótido (por ejemplo, ARNm). Las características de una respuesta inmunitaria innata inducida incluyen 1) aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias, 2) activación de PRR intracelulares (RIG-I, MDA5, etc., y/o 3) terminación o reducción de la traducción de proteínas.

En algunas modalidades, el ARNm comprende uno o más nucleósidos o nucleótidos alternativos. Los nucleósidos y nucleótidos alternativos pueden incluir una nucleobase alternativa. Una nucleobase de un ácido nucleico es una base orgánica como una purina o una pirimidina o un derivado de las mismas. Una nucleobase puede ser una base canónica (por ejemplo, adenina, guanina, uracilo, timina y citosina). Estas nucleobases pueden alterarse o sustituirse por completo para proporcionar moléculas de polinucleótidos que tengan propiedades mejoradas, por ejemplo, una mayor estabilidad como la resistencia a las nucleasas. Las bases no canónicas o modificadas pueden incluir, por ejemplo, una o más sustituciones o modificaciones que incluyen, entre otras, sustituciones alquilo, arilo, halo, oxo, hidroxilo, alquilo y/o tio; uno o más anillos fusionados o abiertos; oxidación y/o reducción.

En algunas modalidades, la nucleobase es un uracilo alternativo. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen un uracilo alternativo incluyen la pseudouridina (ψ), el ribonucleósido piridin-4-ona, 5-aza-uracilo, 6-aza-uracilo, 2-tio-5-aza-uracilo, 2-tio-uracilo (s2U), 4-tio-uracilo (s4U), 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5 -hidroxi -uracilo (ho5U), 5-aminoalil-uracilo, 5-halo-uracilo (p. ej., 5-yodo-uracilo o 5-bromo-uracilo), 3-metil-uracilo (m U), 5-metoxi-uracilo (mo5U), ácido 5-oxiacético uracilo (cmo5U), éster metílico del ácido 5-oxiacético uracilo (mcmo5U), 5-carboximetil-uracilo (cm5U), 1 -

carboximetil-pseudouridina, 5-carboxihidroximetil-uracilo (chm5U), éster metílico del 5-carboxihidroximetil-uracilo (mchm5U), 5-metoxycarbonilmetil-uracilo (mcm5U), 5-metoxycarbonilmetil-2-tio-uracilo (mcm5s2U), 5-aminometil-2-tio-uracilo (nmVu), 5-metilaminometil-uracilo (mnm5U), 5-metilaminometil-2-tio-uracilo (mnmVu), 5-metilaminometil-2-seleno-uracilo (mnm5se2U), 5-carbamoilmetil-uracilo (ncm5U), 5-carboximetilaminometil-uracilo (cmnm5U), 5-carboximetilaminometil-2-tio-uracilo (cmnmVu), 5-propinil-uracilo, 1-propinil-pseudouracilo, 5-taurinometil-uracilo (xm5U), 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uracilo(xm5s2U), 1-taurinometil-4-tio-pseudouridina, 5-metil-uracilo (m5U, es decir, que tiene la nucleobase desoxitimina), 1-metil-pseudouridina (mV), 5-metil-2-tio-uracilo (m5s2U), 1-metil-4-tio-pseudouridina (mxj/), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina (m \ /), 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidrouracilo (D), dihidropseudouridina, 5,6-dihidrouracilo, 5-metil-dihidrouracilo (m5D), 2-tio-dihidrouracilo, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxi-uracilo, 2-metoxi-4-tio-uracilo, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo (acp U), 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina (acp ψ), 5-(isopentenilaminometil)uracilo (inm5U), 5-(isopentenilaminometil)-2-tio-uracilo (inm5s2U), 5,2'-O-dimetil-uridina (m5Um), 2-tio-2'-O-metil-uridina (s2Um), 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metil-uridina (mem Um), 5-carbamoilmetil-2'-O-metil-uridina (ncm5Um), 5-carboximetilaminometil-2'-O-metil-uridina (cmnm5Um), 3,2'-O-dimetil-uridina (m Um), y 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metil-uridina (inm5Um), 1-tio-uracilo, desoximidina, 5-(2-carbometoxivinil)-uracilo, 5-(carbamoilhdroximetil)-uracilo, 5-carbamoilmetil-2-tio-uracilo, 5-carboximetil-2-tio-uracilo, 5-cianometil-uracilo, 5-metoxi-2-tio-uracilo y 5-[3-(1-E-propenilamino)]uracilo.

En algunas modalidades, la nucleobase es una citosina alternativa. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una citosina alternativa incluyen la 5-aza-citosina, 6-aza-citosina, pseudoisotidina, 3-metil-citosina (m3C), N4-acetil-citosina (ac4C), 5-formil-citosina (f5C), N4-metil-citosina (m4C), 5-metil-citosina (m5C), 5-halo-citosina (p. ej., 5-yodo-citosina), 5-hidroximetil-citosina (hm5C), 1-metil-pseudoisotidina, pirrolo-citosina, pirrolo-pseudoisotidina, 2-tio-citosina (s2C), 2-tio-5-metil-citosina, 4-tio-pseudoisotidina, 4-tio-1-metil-1-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-1-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citosina, 2-metoxi-5-metil-citosina, 4-metoxi-pseudoisotidina, 4-metoxi-1-metil-pseudoisotidina, lisidina (k2C), 5,2'-O-dimetil-citidina (m5Cm), N4-acetil-2'-O-metil-citidina (ac4Cm), N4,2'-O-dimetil-citidina (m4Cm), 5-

formil-2'-0-metil-citidina (f5Cm), N4,N4.2'-0- trimetil-citidina (m42Cm), 1-tio-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-(3-azidopropil)-citosina y 5-(2-azidoetil)-citosina.

En algunas modalidades, la nucleobase es una adenina alternativa. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una adenina alternativa incluyen 2-amino-purina, 2.6- diaminopurina, 2-amino-6-halo-purina (por ejemplo, 2-amino-6-cloro-purina), 6-halo-purina (por ejemplo, 6-cloro-purina), 2-amino-6-metil-purina, 8-azido-adenina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza- adenina, 7-deaza-2-amino-purina, 7-deaza-8-aza-2-amino-purina, 7-deaza-2.6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2.6-diaminopurina, 1-metil-adenina (m1A), 2-metil-adenina (m2A), N6-metil-adenina (m6A), 2-metiltio-N6-metil-adenina (ms2m6A), N6-isopentenil-adenina (i6A), 2-metiltio-N6-isopentenil-adenina (ms2i6A), N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenina (io6A), 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenina (ms2io6A), N6-glicinilcarbamoil-adenina (g6A), N6-treonilcarbamoil-adenina (t6A), N6-metil-N6-treonilcarbamoil-adenina (m6t6A), 2-metiltio-N6-treonilcarbamoil-adenina (ms2g6A), N6,N6-dimetil- adenina (m62A), N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenina (hn6A), 2-metiltio-N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenina (ms2hn6A), N6-acetil-adenina (ac6A), 7-metil-adenina, 2-metiltio-adenina, 2-metoxi-adenina, N6.2'-0-dimetil-adenosina (m6Am), N6,N6.2'-0- trimetil-adenosina (m62Am), 1.2'-0-dimetil-adenosina (m1Am), 2-amino-N6-metil-purina, 1-tio-adenina, 8-azido-adenina, N6-(19-amino-pentaoxonadecil)-adenina, 2.8-dimetil- adenina, N6-formil-adenina y N6-hidroximetil-adenina.

En algunas modalidades, la nucleobase es una guanina alternativa. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una guanina alternativa incluyen la inosina (I), 1-metil-inosina (m1I), wiosina (imG), metilwiosina (mimG), 4-demetil-wiosina (imG-14), isowiosina (imG2), wibutosina (yW), peroxibutosina (o2yW), hidroxibutosina (OHyW), hidroxibutosina submodificada (OHyW*), 7-deaza-guanina, queuosina (Q), epoxi-queuosina (oQ), galactosil-queuosina (galQ), manosil-queuosina (manQ), 7-ciano-7-deaza-guanina (preQO), 7-aminometil-7-deaza-guanina (preQI), arqueosina (G+), 7-deaza-8-aza-guanina, 6-tioguanina, 6-tio-7-deaza-guanina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanina, 7-metil-guanina (m7G), 6-tio-7-metil-guanina, 7-metil-inosina, 6-metoxi-guanina, 1 -metil-guanina (m1G), N2-metil-guanina (m2G), N2,N2-dimetil-guanina (m22G), N2,7-dimetil-guanina (m2.7G), N2, N2,7-dimetil-guanina (m2.2.7G), 8-oxo-guanina, 7-metil-8-oxo-guanina, 1 -metil-6-tioguanina, N2-metil-6-tioguanina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanina, N2-metil-2'-0-metil-guanosina (m2Gm), N2,N2-dimetil-2'-0-metil-guanosina (m22Gm), 1 -metil-2'-0-metil-guanosina (m1Gm), N2,7-dimetil-2'-0-metil-guanosina (m2.7Gm), 2'-0-metil-inosina (Im), 1.2'-0-dimetil-inosina (m1Im), 1-tioguanina y O-6-metil-guanina.

La nucleobase alternativa de un nucleótido puede ser independientemente una purina, una pirimidina o un análogo de purina o pirimidina. Por ejemplo, la nucleobase puede ser una alternativa a la adenina, la citosina, la guanina, el uracilo o la hipoxantina. En otra modalidad, la nucleobase también puede incluir, por ejemplo, derivados naturales y sintéticos de una base, como las pirazolo[3.4-d]pirimidinas, la 5-metilcitosina (5-me-C), la 5-hidroximetilcitosina, la xantina, la hipoxantina, la 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de la adenina y la guanina, 2-propil y otros derivados alquílicos de la adenina y la guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo (p. ej., 8-bromo), 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxi y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, deazaguanina, 7-deazaguanina, 3-deazaguanina, deazaadenina, 7-deazaadenina, 3-deazaadenina, pirazolo[3.4-d]pirimidina, imidazo[1.5-a] 1.3.5 triazinonas, 9-deazapurinas, imidazo[4.5-d]pirazinas, tiazolo[4.5-d]pirimidinas, pirazin-2-onas, 1.2.4-triazina, piridazina o 1.3.5 triazina. Cuando los nucleótidos se representan utilizando la abreviatura A, G, C, T o U, cada letra se refiere a la base representativa y/o derivados de la misma, por ejemplo, A incluye adenina o análogos de la adenina, por ejemplo, 7-deaza adenina).

El ARNm puede incluir una estructura de casquete 5'. La estructura de casquete 5' de un polinucleótido está implicada en la exportación nuclear y en el aumento de la estabilidad del polinucleótido y se une a la proteína de unión al casquete del ARNm (CBP), que es responsable de la estabilidad del polinucleótido en la célula y de la competencia traductora mediante la asociación de la CBP con la proteína de unión al poli-A para formar la especie de ARNm cíclico maduro. El casquete ayuda además a la eliminación de los intrones 5'-proximales durante el empalme del ARNm.

Las moléculas de polinucleótidos endógenos pueden ser con casquete terminal 5' generando un enlace 5'-ppp-5'-trifosfato entre un residuo de casquete de guanosina terminal y el nucleótido sentido transcrito 5'-terminal del polinucleótido. Este casquete de 5'-guanilato puede entonces metilarse para generar un residuo de N7-metil-guanilato. Los azúcares ribosa de los nucleótidos transcritos terminales y/o anteterminales del extremo 5' del polinucleótido pueden opcionalmente ser también 2'-O-metilados. La eliminación de casquetes en 5' a través de la hidrólisis y la escisión de la estructura de casquete de guanilato puede tener como blanco una molécula de polinucleótido, como una molécula de ARNm, para su degradación.

Las alteraciones de los polinucleótidos pueden generar una estructura de casquete

no hidrolizable que impida el descapsulado y aumente así la vida media del polinucleótido. Dado que la hidrólisis de la estructura de casquete requiere la escisión de los enlaces fosforodiéster 5'-ppp-5', pueden utilizarse nucleótidos alternativos durante la reacción de *capping*. Por ejemplo, puede utilizarse una enzima de *capping* Vaccinia de New England Biolabs (Ipswich, MA) con nucleótidos de α-tioguanosina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para crear un enlace de fosforotioato en el casquete 5'-ppp-5'.

Pueden utilizarse otros nucleótidos de guanosina alternativos, como los nucleótidos α-metil-fosfonato y seleno-fosfato. Las alteraciones adicionales incluyen, entre otras, la 2'-O-metilación de los azúcares ribosa de los nucleótidos 5'-terminales y/o 5'-anteterminales del polinucleótido (como se ha mencionado anteriormente) en el grupo 2'-hidroxi del azúcar. Pueden utilizarse múltiples estructuras casquete 5' distintas para generar la casquete 5' de una molécula de ARNm.

Los análogos de casquete, que aquí también se denominan análogos sintéticos de casquete, casquetes químicos, análogos químicos de casquete o análogos estructurales o funcionales de casquete, difieren de los casquetes 5' naturales (es decir, endógenos, de tipo natural o fisiológicos) en su estructura química, al tiempo que conservan la función de la cápsula. Los análogos de casquete pueden sintetizarse química (es decir, no enzimáticamente) o enzimáticamente y/ligarse a un polinucleótido. Por ejemplo, el análogo de casquete antirreverso (ARCA) contiene dos guanosinas unidas por un grupo 5'-5'-trifosfato, en donde una guanosina contiene un grupo N7-metilo así como un grupo 3'-O-metilo (es decir, N7, '0-dimetil-guanosina-5'-trifosfato-5'-guanosina, m7G-3'mppp-G, que puede designarse equivalentemente 3' 0-Me-m7G(5')ppp(5')G). El átomo 3'-O de la otra guanosina inalterada se une al nucleótido 5'-terminal del polinucleótido capado (por ejemplo, un ARNm). La guanosina N7- y 3'-O-metilada proporciona la porción terminal del polinucleótido con casquete (por ejemplo, un ARNm). Otro casquete ejemplar es el mCAP, que es similar al ARCA pero tiene un grupo 2'-O-metil en la guanosina (es decir, N7.2'-O-dimetil-guanosina-5'-trifosfato-5'-guanosina, m7Gm-ppp-G).

El casquete puede ser un análogo de casquete dinucleotídico. Como ejemplo no limitativo, el análogo de casquete dinucleotídico puede modificarse en diferentes posiciones de fosfato con un grupo boranofosfato o un grupo fosforoselenoato, como los análogos de casquete dinucleotídico descritos en la patente estadounidense 8,519,110, cuyas estructuras de casquete se incorporan aquí por referencia.

Alternativamente, un análogo de casquete puede ser un N7-(4-clorofenoxi-etil) dinucleótido sustituido análogo de casquete conocido en la técnica y/o descrito en el

presente documento. Ejemplos no limitantes de análogos de casquete dinucleótidos sustituidos N7-(4-clorofenoxietil) incluyen un N7-(4-clorofenoxietil)-G(5')ppp(5')G y un análogo de casquete N7-(4-clorofenoxietil)-m³'-OG(5')ppp(5')G (véase, por ejemplo, los diversos análogos de casquete y los métodos de síntesis de análogos de casquete descritos en Kore et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013 21 :4570-4574; cuyas estructuras de casquete se incorporan aquí por referencia). En otros casos, un análogo de casquete útil en los polinucleótidos de la presente descripción es un análogo de 4-cloro/bromofenoxi etilo.

Aunque los análogos de casquete permiten el *capping* concomitante de un polinucleótido en una reacción de transcripción *in vitro*, hasta un 20% de los transcritos quedan sin casquete. Esto, así como las diferencias estructurales de un análogo de casquete respecto a las estructuras endógenas casquete 5' de los polinucleótidos producidos por la maquinaria de transcripción celular endógena, puede conducir a una menor competencia traduccional y a una menor estabilidad celular.

Los polinucleótidos alternativos también pueden tener casquetes postranscripcionalmente, utilizando enzimas, con objeto de generar estructuras casquete 5' más auténticas. Tal y como se utiliza aquí, la frase "más auténtico" se refiere a un rasgo que refleja o imita de cerca, ya sea estructural o funcionalmente, un rasgo endógeno o de tipo natural. Es decir, una característica "más auténtica" es más representativa de una función y/o estructura celular endógena, de tipo natural o fisiológica que las características sintéticas o análogas de la técnica anterior, o que supera a la característica endógena, de tipo natural o fisiológica correspondiente en uno o más aspectos. Ejemplos no limitantes de estructuras casquete 5' más auténticas útiles en los polinucleótidos de la presente descripción son aquellas que, entre otras cosas, tienen una unión mejorada de las proteínas de unión al casquete, una semivida mayor, una susceptibilidad reducida a las 5'-endonucleasas, y/o una eliminación de casquete en 5' reducida, en comparación con las estructuras casquete 5' sintéticas conocidas en la técnica (o con una estructura casquete 5' de tipo natural, natural o fisiológica). Por ejemplo, la enzima de *capping* recombinante del virus Vaccinia y la enzima 2'-O-metiltransferasa recombinante pueden crear un enlace canónico 5'-5'-trifosfato entre el nucleótido 5'-terminal de un polinucleótido y un nucleótido casquete de guanosina en donde la guanosina casquete contiene una N7-metilación y el nucleótido 5'-terminal del polinucleótido contiene una 2'-O-metilación. Dicha estructura se denomina estructura CapI. Este casquete da como resultado una mayor competencia traduccional, estabilidad celular y una menor activación de citoquinas proinflamatorias celulares, en comparación, por ejemplo, con otras estructuras análogas de casquete 5'

conocidas en la técnica. Otras estructuras de casquete ejemplares incluyen 7mG(5')ppp(5')N,pN2p (Casquete 0), 7mG(5')ppp(5')NImpNp (Casquete 1), 7mG(5')-ppp(5')NImpN2mp (Casquete 2), y m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2')(3,2')Up (Casquete 4).

- 5 Debido a que los polinucleótidos alternativos pueden tener casquetes postranscripcionalmente, y a que este proceso es más eficiente, casi el 100% del ARNm puede tener casquetes. Esto contrasta con el -80% cuando un análogo de casquete se une a un polinucleótido en el curso de una reacción de transcripción *in vitro*. Los casquetes 5'-terminales pueden incluir casquetes endógenos o análogos de casquetes.
- 10 Un casquete en 5'-terminal puede incluir un análogo de guanosina. Los análogos de guanosina útiles incluyen inosina, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina. En algunos casos, un polinucleótido contiene un casquete 5' modificado. Una modificación en el casquete 5' puede aumentar la estabilidad del polinucleótido, aumentar
- 15 la semivida del polinucleótido y podría aumentar la eficacia traduccional del polinucleótido. El casquete 5' modificado puede incluir, entre otras, una o más de las siguientes modificaciones: modificación en la posición 2'- y/o 3'- de un trifosfato de guanosina (GTP) con casquete, una sustitución del oxígeno del anillo de azúcar (que produjo el anillo carbocíclico) por una fracción de metileno (CH₂), una modificación en la fracción del
- 20 puente de trifosfato de la estructura de la cápsula, o una modificación en la fracción de la nucleobase (G).

Una UTR en 5' puede proporcionarse como región flanqueante del ARNm. Una UTR en 5' puede ser homóloga o heteróloga a la región codificante que se encuentra en un polinucleótido. Pueden incluirse múltiples UTR en 5' en la región flanqueante y pueden

25 ser iguales o de secuencias diferentes. Cualquier porción de las regiones flanqueantes, incluida ninguna, puede estar optimizada para el codón y cualquiera puede contener independientemente una o más alteraciones estructurales o químicas diferentes, antes y/o después de la optimización del codón.

En una modalidad, un ORF que codifica un antígeno de la descripción está optimizado en codones. Los métodos de optimización de codones son conocidos en la

30 técnica. Por ejemplo, un ORF de una o más de las secuencias proporcionadas en el presente documento puede optimizarse mediante codones. La optimización de codones, en algunas modalidades, puede utilizarse para hacer coincidir las frecuencias de codones en los organismos blanco y hospedero para garantizar un plegamiento adecuado; sesgar

35 el contenido de GC para aumentar la estabilidad del ARNm o reducir las estructuras

secundarias; minimizar los codones repetidos en tándem o los recorridos de bases que puedan perjudicar la construcción o expresión del gen; personalizar las regiones de control transcripcional y traduccional; insertar o eliminar secuencias de tráfico de proteínas; eliminar/añadir sitios de modificación postraduccional en la proteína codificada (por ejemplo, sitios de glicosilación); añadir, eliminar o barajar dominios proteicos; insertar o eliminar sitios de restricción; modificar los sitios de unión al ribosoma y los sitios de degradación del ARNm; ajustar los ritmos de traducción para permitir que los distintos dominios de la proteína se plieguen correctamente; o reducir o eliminar estructuras secundarias problemáticas dentro del polinucleótido. Las herramientas, algoritmos y servicios de optimización de codones son conocidos en la técnica; entre los ejemplos no limitativos se incluyen los servicios de GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park Calif.) y/o métodos patentados. En algunas modalidades, la secuencia del marco de lectura abierto (ORF) se optimiza utilizando algoritmos de optimización. Para alterar una o más propiedades de un ARNm, pueden modificarse por ingeniería las UTR en 5' que sean heterólogas a la región codificante de un ARNm. A continuación, el ARNm puede administrarse a células, tejidos u organismos y pueden medirse resultados como el nivel de proteína, la localización y/o la vida media para evaluar los efectos beneficiosos que la UTR en 5' heteróloga puede tener sobre el ARNm. Pueden utilizarse variantes de los UTR en 5' en donde se añadan o eliminen uno o más nucleótidos en los terminales, incluyendo A, T, C o G. Las UTR en 5' también pueden optimizarse mediante codones, o alterarse de cualquier manera descrita en el presente documento.

Los ARNm pueden incluir una horquilla como, por ejemplo, una horquilla de histona. La horquilla puede ser una secuencia de nucleótidos que tenga alrededor de 25 o alrededor de 26 nucleótidos de longitud. La horquilla de histona puede estar situado en 3' relativa a la región codificante (por ejemplo, en el 3'-terminal de la región codificante). Como ejemplo no limitativo, la horquilla puede estar situada en el extremo 3' de un polinucleótido descrito en el presente documento. En algunos casos, un ARNm incluye más de una horquilla (por ejemplo, dos horquillas). Una horquilla puede estar situada en una segunda región terminal de un polinucleótido. Como ejemplo no limitativo, la horquilla puede estar situada dentro de una región no traducida (por ejemplo, UTR en 3') en una segunda región terminal. En algunos casos, un ARNm que incluya la horquilla de histona puede estabilizarse mediante la adición de una región 3'-estabilizadora (por ejemplo, una región 3'-estabilizadora que incluya al menos un nucleósido de terminación de cadena). Sin querer atarse a la teoría, la adición de al menos un nucleósido de terminación de cadena puede ralentizar la degradación de un polinucleótido y, por tanto, puede aumentar

la semivida del polinucleótido. En otros casos, un ARNm, que incluye la horquilla de histona puede estabilizarse mediante una alteración de la región 3' del polinucleótido que puede impedir y/o inhibir la adición de oligio(U). En otros casos, un ARNm que incluya la horquilla de histona puede estabilizarse mediante la adición de un oligonucleótido que

5 termine en un 3'-desoxinucleósido, 2',3'-dideoxinucleósido 3'-O- metilnucleósido, 3'-O-etilnucleósido, 3'-arabinósido y otros nucleósidos alternativos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento. En algunos casos, el ARNm de la presente descripción puede incluir una horquilla de histona, una región poli-A y/o una estructura de casquete 5'.

10 La horquilla de histona puede estar antes y/o después de la región poli-A. Los polinucleótidos que incluyen la horquilla de histona y una secuencia de región poli-A pueden incluir un nucleósido de terminación de cadena descrito en el presente documento. En otros casos, los polinucleótidos de la presente descripción pueden incluir una horquilla de histona y una estructura de casquete 5'.

15 La estructura de casquete 5' puede incluir, entre otras, las descritas en el presente documento y/o conocidas en la técnica. En algunos casos, la región conservada del bucle del tallo puede incluir una secuencia miR descrita en el presente documento. Como ejemplo no limitativo, la región de horquilla puede incluir la secuencia semilla de una secuencia miR descrita en el presente documento. En otro ejemplo no limitativo, la región de la horquilla puede incluir una secuencia semilla de miR- 122.

20 El ARNm puede incluir al menos una horquilla de histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación. En ciertos casos, el polinucleótido que codifica para una horquilla de histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación puede codificar para un antígeno patógeno o un fragmento del mismo. En otros casos, el polinucleótido que codifica para una horquilla de histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación puede codificar para una proteína terapéutica.

25 En algunos casos, el polinucleótido que codifica para una horquilla de histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación puede codificar para un antígeno tumoral o un fragmento del mismo. En otros casos, el polinucleótido que codifica para una horquilla de histona y una región poli-A o una señal de poliadenilación puede codificar para un antígeno alergénico o un autoantígeno autoinmune.

30 Un ARNm puede incluir una secuencia poliA y/o una señal de poliadenilación. Una secuencia poliA puede estar compuesta en su totalidad o en su mayor parte por nucleótidos de adenina o análogos o derivados de los mismos. Una secuencia poliA puede ser una cola situada junto a una región 3' no traducida de un ácido nucleico.

35 Durante el procesamiento del ARN, normalmente se añade una larga cadena de

nucleótidos de adenosina (región poliA) a las moléculas de ARN mensajero (ARNm) para aumentar la estabilidad de la molécula. Inmediatamente después de la transcripción, el extremo 3'de la transcripción se escinde para liberar un 3'-hidroxi. A continuación, la poli-A polimerasa añade una cadena de nucleótidos de adenosina al ARN. El proceso, denominado poliadenilación, añade una región poli-A de entre 100 y 250 residuos de longitud. Las longitudes únicas de la región poli-A pueden proporcionar ciertas ventajas a los polinucleótidos alternativos de la presente descripción. Generalmente, la longitud de una región poli-A de la presente descripción es de al menos 30 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, la región poli-A tiene al menos 35 nucleótidos de longitud. En otra modalidad, la longitud es de al menos 40 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 45 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 55 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 70 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 80 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 90 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 100 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 120 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 140 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 160 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 180 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 200 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 250 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 300 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 350 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 400 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 450 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 500 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 600 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 700 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 800 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 900 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1000 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1100 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1200 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1300 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1400 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1500 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1600 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1700 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1800 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 1900 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 2000 nucleótidos. En otra modalidad, la longitud es de al menos 2500 nucleótidos. En otra

modalidad, la longitud es de al menos 3000 nucleótidos. En algunos casos, la región poli-A puede tener 80 nucleótidos, 120 nucleótidos, 160 nucleótidos de longitud en una molécula polinucleotídica alternativa descrita en el presente documento. En otros casos, la región poli-A puede tener 20, 40, 80, 100, 120, 140 o 160 nucleótidos de longitud en una molécula de polinucleótido alternativo descrita en el presente documento. En algunos casos, la región poli-A se diseña en relación con la longitud del polinucleótido alternativo global. Este diseño puede basarse en la longitud de la región codificante del polinucleótido alternativo, en la longitud de una característica o región particular del polinucleótido alternativo (como el ARNm) o basarse en la longitud del producto final expresado a partir del polinucleótido alternativo. En relación con cualquier característica del polinucleótido alternativo (por ejemplo, distinta de la porción de ARNm que incluye la región poli-A), la región poli-A puede tener una longitud un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o un 100% mayor que la característica adicional. La región poli-A también puede diseñarse como una fracción del polinucleótido alternativo al que pertenece. En este contexto, la región poli-A puede ser el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o el 90% o más de la longitud total de la construcción o la longitud total de la construcción menos la región poli-A.

En ciertos casos, los sitios de unión diseñados y/o la conjugación del ARNm para la proteína de unión poli-A pueden utilizarse para mejorar la expresión. Los sitios de unión de ingeniería pueden ser secuencias sensoras que pueden funcionar como sitios de unión para ligandos del microentorno local del ARNm. Como ejemplo no limitativo, el ARNm puede incluir al menos un sitio de unión de ingeniería para alterar la afinidad de unión de la proteína de unión poli-A (PABP) y sus análogos. La incorporación de al menos un sitio de unión diseñado puede aumentar la afinidad de unión de la PABP y sus análogos.

Además, varios ARNm distintos pueden unirse a la PABP (proteína de unión poli-A) a través del extremo 3'- utilizando nucleótidos alternativos en el extremo 3'- de la región poli-A. Los experimentos de transfección pueden realizarse en líneas celulares relevantes a y la producción de proteínas puede ensayarse mediante ELISA a las 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y el séptimo día postransfección. Como ejemplo no limitativo, los experimentos de transfección pueden utilizarse para evaluar el efecto sobre la afinidad de unión de la PABP o sus análogos como resultado de la adición de al menos un sitio de unión diseñado. En ciertos casos, puede utilizarse una región poli-A para modular la iniciación de la traducción. Sin querer atarse a la teoría, la región poli-A recluta PABP que, a su vez, puede interactuar con el complejo de iniciación de la traducción y, por tanto, puede ser esencial para la síntesis de proteínas. En algunos casos, una región poli-A también puede utilizarse en la presente descripción para proteger contra la digestión por 3

'-5' -exonucleasas. En algunos casos, un ARNm puede incluir un cuarteto poli-A-G. El cuarteto G es un conjunto cíclico unido por hidrógeno de cuatro nucleótidos de guanosina que puede estar formado por secuencias ricas en G tanto en el ADN como en el ARN. En esta modalidad, el cuarteto G se incorpora al final de la región poli-A. El ARNm resultante

5 puede someterse a ensayos de estabilidad, producción de proteínas y otros parámetros, incluida la semivida, en varios puntos temporales. Se ha descubierto que el cuarteto poli-A-G da lugar a una producción de proteínas equivalente al menos al 75% de la observada utilizando únicamente una región poli-A de 120 nucleótidos. En algunos casos, el ARNm puede incluir una región poli-A y puede estabilizarse mediante la adición de una región 3'-

10 estabilizadora. El ARNm con una región poli-A puede incluir además una estructura de casquete 5'. En otros casos, el ARNm puede incluir un cuarteto poli-A-G. El ARNm con un cuarteto poli-A-G puede incluir además una estructura de casquete 5'. En algunos casos, la región 3'-estabilizadora que puede utilizarse para estabilizar el ARNm incluye una región poli-A o un Cuarteto poli-A-G. En otros casos, la región 3'-estabilizadora que

15 puede utilizarse con la presente descripción incluye un nucleósido de terminación de cadena como 3'-desoxiadenosina (cordicepina), 3'-desoxiuridina, 3'-desoxicitosina, 3'-desoxiguanosina, 3'-desoxitimina, 2',3'-dideoxynucleósidos, como 2',3'-dideoxiadenosina, 2',3'-dideoxiuridina, 2',3'-dideoxicitosina, 2',3'-dideoxiguanosina, 2',3'-dideoximina, un 2'-desoxynucleósido o un O-metilnucleósido. En otros casos, el ARNm que incluye una

20 región poliA o un cuarteto poli-A-G puede estabilizarse mediante una alteración de la región 3' del polinucleótido que puede impedir y/o inhibir la adición de oligio(U). En otros casos, el ARNm que incluye una región poli-A o un cuarteto poli-A-G puede estabilizarse mediante la adición de un oligonucleótido que termine en un 3'-desoxynucleósido, 2',3'-dideoxynucleósido 3'-O- metilnucleósido, 3'-O-etilnucleósido, 3'-arabinósido y otros

25 nucleósidos alternativos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

En una modalidad, las vacunas de ARNm de la descripción comprenden lípidos. Los lípidos y el ARNm pueden formar juntos nanopartículas. Los lípidos pueden encapsular el ARNm en forma de nanopartícula lipídica (NPL) para facilitar la entrada en las células y la estabilidad de las nanopartículas de ARN/lípido.

30 Las nanopartículas lipídicas pueden incluir un componente lipídico y uno o más componentes adicionales, como uno terapéutico y/o profiláctico. Una LNP puede diseñarse para una o más aplicaciones o blancos específicos. Los elementos de una LNP pueden seleccionarse en función de una aplicación o un blanco concretos, y/o en función de la eficacia, la toxicidad, el gasto, la facilidad de uso, la disponibilidad u otra

35 característica de uno o más elementos. Del mismo modo, la formulación particular de una

LNP puede seleccionarse para una aplicación o un blanco concretos de acuerdo con, por ejemplo, la eficacia y la toxicidad de combinaciones particulares de elementos. La eficacia y la tolerabilidad de una formulación de LNP pueden verse afectadas por la estabilidad de la formulación.

5 Las nanopartículas lipídicas pueden diseñarse para una o más aplicaciones o blancos específicos. Por ejemplo, una LNP puede diseñarse para administrar un producto terapéutico y/o profiláctico, como un ARN, a una célula, tejido, órgano, sistema o grupo de sistemas concretos del organismo de un mamífero.

10 Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas lipídicas pueden alterarse para aumentar la selectividad hacia determinados objetivos corporales. Por ejemplo, el tamaño de las partículas puede ajustarse en función de los tamaños de fenestración de los distintos órganos. El componente terapéutico y/o profiláctico incluido en una LNP también puede seleccionarse en función del objetivo u objetivos de administración deseados. Por ejemplo, un fármaco terapéutico y/o profiláctico puede seleccionarse para
15 una indicación, afección, enfermedad o trastorno concreto y/o para su administración a una célula, tejido, órgano o sistema o grupo de ellos en particular (por ejemplo, administración localizada o específica). En ciertas modalidades, una LNP puede incluir un ARNm que codifique un polipéptido de interés capaz de ser traducido dentro de una célula para producir el polipéptido de interés. Dicha composición puede diseñarse para ser
20 administrada específicamente a un órgano concreto. En algunas modalidades, una composición puede diseñarse para administrarse específicamente en el hígado de un mamífero. En algunas modalidades, una composición puede diseñarse para administrarse específicamente en un ganglio linfático. En algunas modalidades, una composición puede diseñarse para administrarse específicamente en el bazo de un
25 mamífero.

Una LNP puede incluir uno o más componentes descritos en el presente documento. En algunas modalidades, la formulación de la LNP de la descripción incluye al menos un componente de nanopartícula lipídica. Las nanopartículas lipídicas pueden incluir un componente lipídico y uno o más componentes adicionales, como un
30 componente terapéutico y/o profiláctico, como un ácido nucleico. Una LNP puede diseñarse para una o más aplicaciones o blancos específicos. Los elementos de una LNP pueden seleccionarse en función de una aplicación o un blanco concretos, y/o en función de la eficacia, toxicidad, gasto, facilidad de uso, disponibilidad u otra característica de uno o más elementos. Del mismo modo, la formulación particular de una LNP puede
35 seleccionarse para una aplicación o un blanco concretos de acuerdo con, por ejemplo, la

eficacia y la toxicidad de una combinación particular de elementos. La eficacia y tolerabilidad de una formulación de LNP pueden verse afectadas por la estabilidad de la formulación.

En algunas modalidades, por ejemplo, se puede incluir y/o utilizar un polímero para encapsular o encapsular parcialmente una LNP. Un polímero puede ser biodegradable y/o biocompatible. Un polímero puede seleccionarse entre, pero sin limitarse a, poliaminas, poliéteres, poliamidas, poliésteres, policarbamatos, poliureas, policarbonatos, poliestirenos, poliimidaz, polisulfonas, poliuretanos, poliacetilenos, polietilenos, polietileniminas, poliisocianatos, poliácridatos, polimetacrilatos, poliácridonitrilos y poliarilatos. Por ejemplo, un polímero puede incluir poli(caprolactona) (PCL), polímero de etilvinilacetato (EVA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido L-láctico) (PLLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ácido L-láctico-co-ácido glicólico) (PLLGA), poli(D,L-lactida) (PDLA), poli(L-lactida) (PLLA), poli(D,L-lactida-co-caprolactona), poli(D,L-lactida-co-caprolactona-co-glicolida), poli(D,L-lactida-co-PEO-co-D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-PPO-co-D,L-lactida), polialquil cianoacrilato, poliuretano, poli-L-lisina (PLL), metacrilato de hidroxipropilo (HPMA), polietilenglicol, ácido poli-L-glutámico, poli(hidroxiácidos), polianhídridos, poliortoésteres, poli(éster amidas), poliamidas, poli(éster éteres), policarbonatos, polialquilenos como el polietileno y el polipropileno, polialquilenglicoles como el poli(etilenglicol) (PEG), óxidos de polialquileno (PEO), tereftalatos de polialquileno como el poli(tereftalato de etileno), alcoholes polivinílicos (PVA), éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos como el poli(acetato de vinilo), haluros de polivinilo como el poli(cloruro de vinilo) (PVC), polivinilpirrolidona (PVP), polisiloxanos, poliestireno, poliuretanos, celulosas derivatizadas como las alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, hidroxipropilcelulosa carboximetilcelulosa, polímeros de ácidos acrílicos, como poli(metil(met)acrilato) (PMMA), poli(etil(met)acrilato), poli(butil(met)acrilato), poli(isobutil(met)acrilato), poli(hexil(met)acrilato), poli(isodecil(met)acrilato), poli(lauril(met)acrilato), poli(fenil(met)acrilato), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo) y sus copolímeros y mezclas, polidioxanona y sus copolímeros, polihidroxicanoatos, fumarato de polipropileno, polioximetileno, poloxámeros, poloxaminas, poli(orto)ésteres, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), carbonato de trimetileno, poli(N-acriloilmorfolina) (PACM), poli(2-metil-2-oxazolina) (PMOX), poli(2-etil-2-oxazolina) (PEOZ) y poliglicerol.

Los agentes alteradores de la superficie pueden incluir, entre otros, proteínas

aniónicas (por ejemplo, albúmina sérica bovina), tensoactivos (por ejemplo, tensoactivos catiónicos como el bromuro de dimetildioctadecil-amonio), azúcares o derivados del azúcar (por ejemplo, ciclodextrina), ácidos nucleicos, polímeros (por ejemplo, heparina, polietilenglicol y poloxámero), agentes mucolíticos (por ejemplo, acetilcisteína, artemisa, bromelina, papaína, clerodendrum, bromhexina, carbocisteína, eprazinona, mesna, ambroxol, sobrerol, domiodol, letosteína, estepronina, tiopronina, gelsolina, timosina β 4, dornasa alfa, neltenexina y erdoesteína) y DNAsas (por ejemplo, rhDNasa). Un agente alterador de la superficie puede disponerse dentro de una nanopartícula y/o en la superficie de una LNP (por ejemplo, mediante recubrimiento, adsorción, enlace covalente u otro proceso).

Una LNP también puede comprender uno o más lípidos funcionalizados. Por ejemplo, un lípido puede funcionalizarse con un grupo alquino que, cuando se expone a una azida en condiciones de reacción apropiadas, puede sufrir una reacción de cicloadición. En particular, una bicapa lipídica puede funcionalizarse de este modo con uno o más grupos útiles para facilitar la permeación de la membrana, el reconocimiento celular o la obtención de imágenes. La superficie de una LNP también puede conjugarse con uno o más anticuerpos útiles. Los grupos funcionales y los conjugados útiles para la liberación de células blancas, la obtención de imágenes y la permeación de membranas son bien conocidos en la técnica.

Además de estos componentes, las nanopartículas lipídicas pueden incluir cualquier sustancia útil en las composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, la nanopartícula lipídica puede incluir uno o más excipientes o ingredientes accesorios farmacéuticamente aceptables como, entre otros, uno o más disolventes, medios de dispersión, diluyentes, auxiliares de dispersión, auxiliares de suspensión, agentes tensioactivos, agentes amortiguadores, conservantes y otras especies.

Los agentes tensioactivos y/o emulsionantes pueden incluir, entre otros, emulsionantes naturales (por ejemplo, acacia, ácido algínico, alginato de sodio, colesterol y lecitina), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monolaurato de sorbitán polioxietilenado [TWEEN®20], sorbitán polioxietilenado [TWEEN®60], monooleato de sorbitán polioxietilenado [TWEEN®80], monopalmitato de sorbitán [SPAN®40], monoestearato de sorbitán [SPAN®60], triestearato de sorbitán [SPAN®65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitán [SPAN®80]), ésteres de polioxietileno (p. ej., monoestearato de polioxietileno [MYRJ® 45], aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado, aceite de ricino polietoxilado, estearato de polioximetileno y SOLUTOL®), ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (por

ejemplo, CREMOPHOR®), éteres de polioxietileno, (por ejemplo polioxietilen lauril éter [BRIJ® 30]), poli(vinilpirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, lauril sulfato de sodio, PLURONIC® F 68, POLOXAMER® 188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato sódico, y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de conservadores pueden incluir, entre otros, antioxidantes, agentes quelantes, eliminadores de radicales libres, conservadores antimicrobianos, conservadores antifúngicos, conservadores alcohólicos, conservadores ácidos y/u otros conservadores. Algunos ejemplos de antioxidantes son, entre otros, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y/o sulfito de sodio. Algunos ejemplos de agentes quelantes son el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidratado, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato sódico, ácido tartárico y/o edetato trisódico. Algunos ejemplos de conservadores antimicrobianos son, entre otros, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, la clorhexidina clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletil, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal. Algunos ejemplos de conservadores antifúngicos son, entre otros, butilparabeno, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato potásico, sorbato potásico, benzoato sódico, propionato sódico y/o ácido sórbico. Los ejemplos de conservadores alcohólicos incluyen, entre otros, etanol, polietilenglicol, alcohol bencílico, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletilico. Algunos ejemplos de conservadores ácidos son, entre otros, vitamina A, vitamina C, vitamina E, betacaroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroascórbico, ácido ascórbico, ácido sórbico y/o ácido fítico. Otros conservadores son, entre otros, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), etilendiamina, lauril sulfato sódico (SLS), lauril éter sulfato sódico (SLES), bisulfito sódico, metabisulfito sódico, sulfito potásico, metabisulfito potásico, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, metilparabeno, GERMALL® 115, GERMABEN®II, NEOLONE™, KATHON™, y/o EUXYL®. Un eliminador de radicales libres ejemplar incluye el butilhidroxitolueno (BHT o butilhidroxitolueno) o deferoxamina.

Algunos ejemplos de agentes amortiguadores son, entre otros, soluciones amortiguadoras de citrato, soluciones amortiguadoras de acetato, soluciones amortiguadoras de fosfato, cloruro amónico, carbonato cálcico, cloruro cálcico, citrato cálcico, glubionato cálcico, gluceptato cálcico, gluconato cálcico, ácido d-glucónico, glicerofosfato cálcico, lactato cálcico, lactobionato cálcico, ácido propanoico, levulinato cálcico, ácido pentanoico, fosfato cálcico dibásico, ácido fosfórico, fosfato cálcico tribásico, hidróxido fosfato cálcico, acetato potásico, cloruro potásico, gluconato potásico, mezclas potásicas, fosfato potásico dibásico, fosfato potásico monobásico, mezclas de fosfato potásico, acetato sódico, bicarbonato sódico, cloruro sódico, citrato sódico, lactato sódico, fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico, mezclas de fosfato sódico, trometamina, soluciones amortiguadoras de aminosulfonato (p. ej., HEPES), hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua libre de pirógenos, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico, y/o combinaciones de los mismos.

En algunas modalidades, la formulación que incluye una LNP puede incluir además una sal, como una sal de cloruro. En algunas modalidades, la formulación que incluye una LNP puede incluir además un azúcar, como un disacárido. En algunas modalidades, una LNP puede incluir además una o más moléculas hidrófobas pequeñas, como una vitamina (por ejemplo, vitamina A o vitamina E) o un esterol. Los carbohidratos pueden incluir azúcares simples (por ejemplo, glucosa) y polisacáridos (por ejemplo, glucógeno y sus derivados y análogos).

Las características de una LNP pueden depender de sus componentes. Por ejemplo, una LNP que incluya colesterol como lípido estructural puede tener características diferentes a las de una LNP que incluya un lípido estructural distinto. Tal como se utiliza aquí, el término "lípido estructural" se refiere a los esteroides y también a los lípidos que contienen porciones de esteroides. Tal y como se definen en el presente documento, los "esteroides" son un subgrupo de esteroides formado por alcoholes esteroideos. En algunas modalidades, el lípido estructural es un esteroide. En algunas modalidades, el lípido estructural es el colesterol. En algunas modalidades, el lípido estructural es un análogo del colesterol. En algunas modalidades, el lípido estructural es el alfa-tocoferol.

En algunas modalidades, las características de una LNP pueden depender de las cantidades absolutas o relativas de sus componentes. Por ejemplo, una LNP que incluya una fracción molar más alta de un fosfolípido puede tener características diferentes que una LNP que incluya una fracción molar más baja de un fosfolípido. Las características también pueden variar en función del método y las condiciones de preparación de la

nanopartícula lipídica. En general, los fosfolípidos comprenden una porción de fosfolípido y una o más porciones de ácidos grasos.

Una fracción de fosfolípido puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo no restrictivo formado por fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil glicerol, fosfatidil serina, ácido fosfatídico, 2-lisofosfatidil colina y una esfingomielina. Una porción de ácido graso puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo no limitativo formado por ácido láurico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido erúcico, ácido fitanoico, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido behénico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. Algunos fosfolípidos pueden facilitar la fusión con una membrana. En algunas modalidades, un fosfolípido catiónico puede interactuar con uno o más fosfolípidos cargados negativamente de una membrana (por ejemplo, una membrana celular o intracelular). La fusión de un fosfolípido con una membrana puede permitir que uno o más elementos (por ejemplo, un agente terapéutico) de una composición que contenga lípidos (por ejemplo, las LNP) atraviesen la membrana permitiendo, por ejemplo, el suministro de uno o más elementos a un tejido blanco. También se contemplan especies de fosfolípidos no naturales, incluidas especies naturales con modificaciones y sustituciones que incluyen ramificación, oxidación, ciclización y alquinos. En algunas modalidades, un fosfolípido puede funcionalizarse con uno o más alquinos o entrecruzarse con ellos (por ejemplo, un grupo alquenilo en el que uno o más dobles enlaces se sustituyen por un triple enlace). En condiciones de reacción adecuadas, un grupo alquino puede sufrir una cicloadición catalizada por cobre al exponerse a una azida. Estas reacciones pueden ser útiles para funcionalizar una bicapa lipídica de una composición de nanopartículas para facilitar la permeación de la membrana o el reconocimiento celular o para conjugar una composición de nanopartículas con un componente útil como una porción de blanco o de imagen (por ejemplo, un colorante). Los fosfolípidos incluyen, entre otros, glicerofosfolípidos como fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, fosfatidilgliceroles y ácidos fosfatídicos. Los fosfolípidos también incluyen fosfingolípidos, como la esfingomielina. En algunas modalidades, un fosfolípido útil o potencialmente útil en la presente invención es un análogo o variante del DSPC.

Las nanopartículas lipídicas pueden caracterizarse por diversos métodos. Por ejemplo, puede utilizarse la microscopía (por ejemplo, microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido) para examinar la morfología y la distribución del tamaño de una LNP. La dispersión dinámica de la luz o la potenciometría

(por ejemplo, las valoraciones potenciométricas) pueden utilizarse para medir los potenciales zeta. La dispersión dinámica de la luz también puede utilizarse para determinar el tamaño de las partículas. También pueden utilizarse instrumentos como el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para

5 medir múltiples características de una LNP, como el tamaño de las partículas, el índice de polidispersidad y el potencial zeta.

El tamaño medio de una LNP puede estar comprendido entre 10s de nm y 100s de nm, por ejemplo, medido por dispersión dinámica de la luz (DLS). Por ejemplo, el tamaño medio puede ser de alrededor de 40 nm a alrededor de 150 nm, como alrededor de 40

10 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm o 150 nm. En algunas modalidades, el tamaño medio de una LNP puede ser de alrededor de 50 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 50 nm a alrededor de 90 nm, de alrededor de 50 nm a alrededor de 80 nm, de alrededor de 50 nm a alrededor de 70 nm,

15 de alrededor de 50 nm a alrededor de 60 nm, de alrededor de 60 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 60 nm a alrededor de 90 nm, de unos 60 nm a unos 80 nm, de unos 60 nm a unos 70 nm, de unos 70 nm a unos 100 nm, de unos 70 nm a unos 90 nm, de unos 70 nm a unos 80 nm, de unos 80 nm a unos 100 nm, de unos 80 nm a unos 90 nm, o de unos 90 nm a unos 100 nm. En determinadas modalidades, el tamaño medio de una

20 LNP puede ser de alrededor de 70 nm a alrededor de 100 nm. En una modalidad concreta, el tamaño medio puede ser de alrededor de 80 nm. En otras modalidades, el tamaño medio puede ser de alrededor de 100 nm.

Una LNP puede ser relativamente homogénea. Se puede utilizar un índice de polidispersidad para indicar la homogeneidad de una LNP, por ejemplo, la distribución del

25 tamaño de las partículas de las nanopartículas lipídicas. Un índice de polidispersidad pequeño (por ejemplo, inferior a 0.3) indica generalmente una distribución estrecha del tamaño de las partículas. Una LNP puede tener un índice de polidispersidad de alrededor de 0 a alrededor de 0.25, como 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24 o 0.25. En

30 algunas modalidades, el índice de polidispersidad de una LNP puede ser de alrededor de 0.10 a alrededor de 0.20.

El potencial zeta de una LNP puede utilizarse para indicar el potencial electrocinético de la composición. Por ejemplo, el potencial zeta puede describir la carga superficial de una LNP. Las nanopartículas lipídicas con cargas relativamente bajas,

35 positivas o negativas, son generalmente deseables, ya que las especies más altamente

cargadas pueden interactuar de forma indeseable con las células, los tejidos y otros elementos del organismo. En algunas modalidades, el potencial zeta de una LNP puede ser de alrededor de -10 mV a alrededor de +20 mV, de alrededor de -10 mV a alrededor de +15 mV, de alrededor de -10 mV a alrededor de +10 mV, de alrededor de -10 mV a
 5 alrededor de +5 mV, de alrededor de -10 mV a alrededor de 0 mV, de alrededor de -10 mV a alrededor de -5 mV, de alrededor de -5 mV a alrededor de +20 mV, de alrededor de -5 mV a alrededor de +15 mV, de alrededor de -5 mV a alrededor de +10 mV, de alrededor de -5 mV a alrededor de +5 mV, de alrededor de -5 mV a alrededor de 0 mV, de
 10 alrededor de 0 mV a alrededor de +20 mV, de alrededor de 0 mV a alrededor de +15 mV, de alrededor de 0 mV a alrededor de +10 mV, de alrededor de 0 mV a alrededor de +5 mV, de alrededor de +5 mV a alrededor de +20 mV, de alrededor de +5 mV a alrededor de +15 mV o de alrededor de +5 mV a alrededor de +10 mV.

La eficiencia de encapsulación de un producto terapéutico y/o profiláctico describe la cantidad de producto terapéutico y/o profiláctico que queda encapsulado o asociado de
 15 otro modo a una LNP tras su preparación, en relación con la cantidad inicial suministrada. La eficacia de encapsulación es deseablemente alta (por ejemplo, cercana al 100%). La eficacia de la encapsulación puede medirse, por ejemplo, comparando la cantidad de terapéutico y/o profiláctico en una solución que contenga la nanopartícula lipídica antes y después de disolver la nanopartícula lipídica con uno o más disolventes orgánicos o
 20 detergentes. La fluorescencia puede utilizarse para medir la cantidad de terapéutico y/o profiláctico libre (por ejemplo, ARN) en una solución. Para las nanopartículas lipídicas aquí descritas, la eficacia de encapsulación de un terapéutico y/o profiláctico puede ser de al menos el 50%, por ejemplo el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. En algunas modalidades, la eficacia
 25 de encapsulación puede ser de al menos el 80%. En algunas modalidades, la eficacia de encapsulación puede ser de al menos el 90%.

Una LNP puede comprender opcionalmente uno o más recubrimientos. Por ejemplo, una LNP puede formularse en una cápsula, película o comprimido que tenga un recubrimiento. Una cápsula, película o comprimido que incluya una composición descrita
 30 en el presente documento puede tener cualquier tamaño útil, resistencia a la tracción, dureza o densidad.

Las formulaciones que comprenden polímeros anfífilicos y nanopartículas lipídicas pueden formularse total o parcialmente como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más polímeros anfífilicos y una o más
 35 nanopartículas lipídicas. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede incluir uno o

más polímeros anfífilos y una o más nanopartículas lipídicas que incluyan una o más terapéuticas y/o profilácticas diferentes. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además uno o más excipientes o ingredientes accesorios farmacéuticamente aceptables, como los descritos en el presente documento. Las directrices generales para la formulación y fabricación de composiciones y agentes farmacéuticos están disponibles, por ejemplo, en Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006. Los excipientes convencionales y los ingredientes accesorios pueden utilizarse en cualquier composición farmacéutica, excepto en la medida en que cualquier excipiente convencional o ingrediente accesorio pueda ser incompatible con uno o más componentes de una LNP o con uno o más polímeros anfífilos de la formulación de la descripción. Un excipiente o ingrediente accesorio puede ser incompatible con un componente de una LNP o con el polímero anfílico de la formulación si su combinación con el componente o el polímero anfílico puede dar lugar a algún efecto biológico indeseable o a cualquier otro efecto deletéreo.

En algunas modalidades, uno o más excipientes o ingredientes accesorios pueden constituir más del 50% de la masa o volumen total de una composición farmacéutica que incluya una LNP. Por ejemplo, uno o más excipientes o ingredientes accesorios pueden constituir el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de una convención farmacéutica. En algunas modalidades, un excipiente farmacéuticamente aceptable tiene una pureza de al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100%. En algunas modalidades, un excipiente está aprobado para usarse en humanos y para uso veterinario. En algunas modalidades, un excipiente está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos. En algunas modalidades, un excipiente es de calidad farmacéutica. En algunas modalidades, un excipiente cumple las normas de la Farmacopea de Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional. Las cantidades relativas de uno o más polímeros anfífilos, una o más nanopartículas lipídicas, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y/o cualquier ingrediente adicional de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción variarán, de acuerdo con la identidad, el tamaño y/o el estado del sujeto tratado y, además, según la vía por la que se vaya a administrar la composición. A modo de ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender entre un 0.1% y un 100% (peso/peso) de una o más nanopartículas lipídicas. Como otro ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender entre un 0.1% y un 15% (p/p) de uno o más polímeros

anfífilicos (por ejemplo, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10% o 12.5% p/p).

En ciertas modalidades, las nanopartículas lipídicas y/o las composiciones farmacéuticas de la descripción se refrigeran o congelan para su almacenamiento y/o envío (por ejemplo, se almacenan a una temperatura de 4 °C o inferior, como una
 5 temperatura entre -150 °C y 0 °C aproximadamente o entre -80 °C y -20 °C aproximadamente (por ejemplo, alrededor de -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -130 °C o -150 °C). Por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende uno o más polímeros anfífilicos y una o más nanopartículas lipídicas es una solución o un sólido (por ejemplo, mediante liofilización)
 10 que se refrigera para su almacenamiento y/o envío a, por ejemplo, alrededor de -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C u -80 °C. En ciertas modalidades, la descripción también se refiere a un método para aumentar la estabilidad de las nanopartículas lipídicas añadiendo una cantidad eficaz de un polímero anfífilico y almacenando las nanopartículas lipídicas y/o sus composiciones farmacéuticas a una temperatura de 4 °C
 15 o inferior, como una temperatura entre aproximadamente -150 °C y aproximadamente 0 °C o entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -20 °C, por ejemplo, alrededor de -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -130 °C o -150 °C).

Las propiedades químicas de la LNP, la suspensión de LNP, la composición
 20 liofilizada de LNP o la formulación de LNP de la presente descripción pueden caracterizarse por diversos métodos. En algunas modalidades, puede utilizarse la electroforesis (por ejemplo, la electroforesis capilar) o la cromatografía (por ejemplo, la cromatografía líquida de fase inversa) para examinar la integridad del ARNm.

La eficacia del producto depende de la expresión del ARN administrado, lo que
 25 requiere una molécula de ARN suficientemente intacta. La integridad del ARN es una medida de la calidad del ARN que cuantifica el ARN intacto. El método también es capaz de detectar posibles productos de degradación. La integridad del ARN se determina de manera preferible mediante electroforesis en gel capilar. La especificación inicial se establece para garantizar una integridad suficiente del ARN en las preparaciones del
 30 producto farmacéutico. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una integridad de al menos alrededor de 80%. 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una integridad de o superior a alrededor del 95%. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una integridad de o mayor de alrededor del 98%. En algunas modalidades, el
 35 polinucleótido de ARN tiene una integridad de alrededor del 99% o superior.

En modalidades preferidas, el polinucleótido de ARN tiene una pureza de grado clínico. En algunas modalidades, la pureza del polinucleótido de ARN está comprendida entre alrededor del 60% y alrededor del 100%. En algunas modalidades, la pureza del polinucleótido de ARN está comprendida entre alrededor del 80% y el 99%. En algunas modalidades, la pureza del polinucleótido de ARN está comprendida alrededor de 90% y 99%. En algunas modalidades, en donde el ARNm purificado tiene una pureza de grado clínico sin purificación adicional. En algunas modalidades, la pureza de grado clínico se consigue mediante un método que incluye la purificación por filtración de flujo tangencial (TFF). En algunas modalidades, la pureza de grado clínico se consigue sin la purificación adicional seleccionada entre la purificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR), la purificación basada en ligando o unión, y/o la cromatografía de intercambio iónico. En algunas modalidades, el método de producción de los polinucleótidos de ARN elimina las especies de ARN abortivo largo, el ARN de doble cadena (ARNds), el ADN plasmídico residual, el disolvente residual y/o la sal residual. En algunas modalidades, los contaminantes del transcrito abortivo corto comprenden menos de 15 bases. En algunas modalidades, los contaminantes de transcripción abortivos cortos comprenden alrededor de 8-12 bases. En algunas modalidades, el método de la invención también elimina el inhibidor de ARNasa.

En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN purificado comprende menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 % o está sustancialmente libre de contaminantes proteínicos determinados por electroforesis capilar. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN purificado comprende menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 % o está sustancialmente libre de contaminantes salinos determinados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN purificado comprende un 5 % o menos, un 4 % o menos, un 3 % o menos, un 2 % o menos, un 1 % o menos o está sustancialmente libre de contaminantes de transcripción abortiva corta determinados por métodos conocidos, como, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN purificado tiene una integridad del 95 % o superior, del 96 % o superior, del 97 % o superior, del 98 % o superior, o del 99 % o superior determinada por un método conocido, como, por ejemplo, la electroforesis capilar.

En algunas modalidades, la integridad de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP de la presente descripción es de alrededor del 20% o superior, alrededor del 25% o superior, alrededor del 30% o superior,

alrededor del 35% o superior, alrededor del 40% o superior, alrededor del 45% o superior, alrededor del 50% o superior, alrededor del 55% o superior, alrededor del 60% o superior, alrededor del 65% o superior, alrededor del 70% o superior, alrededor del 75% o superior, alrededor del 80% o superior, alrededor del 85% o superior, alrededor del 90% o superior, 5 alrededor del 95% o superior, alrededor del 96% o superior, alrededor del 97% o superior, alrededor del 98% o superior, o alrededor del 99% o superior.

En algunas modalidades, la integridad de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP de la presente descripción es superior a la integridad de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de 10 LNP o formulación de LNP producida por un método comparable en alrededor de un 5% o más, alrededor de un 10% o más, alrededor de un 15% o más, alrededor de un 20% o más, alrededor de un 30% o más, alrededor de un 40% o más, alrededor de un 50% o más, alrededor de un 60% o más, alrededor de un 70% o más, alrededor de un 80% o más, alrededor de un 90% o más, alrededor de 1 vez o más, alrededor de 2 veces o 15 más, alrededor de 3 veces o más, alrededor de 4 veces o más, alrededor de 5 veces o más, alrededor de 10 veces o más, alrededor de 20 veces o más, alrededor de 30 veces o más, alrededor de 40 veces o más, alrededor de 50 veces o más, alrededor de 100 veces o más, alrededor de 200 veces o más, alrededor de 300 veces o más, alrededor de 400 veces o más, alrededor de 500 veces o más, alrededor de 1000 veces o más, alrededor de 20 de 2000 veces o más, alrededor de 3000 veces o más, alrededor de 4000 veces o más, 20 alrededor de 5000 veces o más, o alrededor de 10000 veces o más.

En algunas modalidades, el Txo% de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP de la presente descripción es de alrededor de 12 meses o más, alrededor de 15 meses o más, alrededor de 18 meses o 25 más, alrededor de 21 meses o más, alrededor de 24 meses o más, alrededor de 27 meses o más, alrededor de 30 meses o más, alrededor de 33 meses o más, alrededor de 36 meses o más, alrededor de 48 meses o más, alrededor de 60 meses o más, alrededor de 72 meses o más, alrededor de 84 meses o más, alrededor de 96 meses o más, alrededor de 108 meses o más, alrededor de 120 meses o más.

En algunas modalidades, el Txo% de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP de la presente descripción es mayor que el Txo% de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP producida por un método comparable en alrededor de un 5% o más, alrededor del 10% o más, alrededor del 15% o más, alrededor del 20% o más, 35 alrededor del 30% o más, alrededor del 40% o más, alrededor del 50% o más, alrededor

del 60% o más, alrededor del 70% o más, alrededor del 80% o más, alrededor del 90% o más, alrededor de 1 vez o más, alrededor de 2 veces o más, alrededor de 3 veces o más, alrededor de 4 veces o más, alrededor de 5 veces o más.

En algunas modalidades, el T1/2 de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP de la presente descripción es de alrededor de 5
12 meses o más, alrededor de 15 meses o más, alrededor de 18 meses o más, alrededor de 21 meses o más, alrededor de 24 meses o más, alrededor de 27 meses o más, alrededor de 30 meses o más, alrededor de 33 meses o más, alrededor de 36 meses o más, alrededor de 48 meses o más, alrededor de 60 meses o más, alrededor de 72
10 meses o más, alrededor de 84 meses o más, alrededor de 96 meses o más, alrededor de 108 meses o más, alrededor de 120 meses o más.

En algunas modalidades, la T1/2 de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP de la presente descripción es más larga que la T1/2 de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP producida por un método comparable en alrededor de un 5% o más, alrededor del 10% o más, alrededor del 15% o más, alrededor del 20% o más, alrededor del 30% o más, alrededor del 40% o más, alrededor del 50% o más, alrededor del 60% o más, alrededor del 70% o más, alrededor del 80% o más, alrededor del 90% o más, alrededor de 1 vez o más, alrededor de 2 veces o más, alrededor de 3 veces o más, alrededor de 4
20 veces o más, alrededor de 5 veces o más

Como se utiliza aquí, "Tx" se refiere a la cantidad de tiempo que dura la integridad del ácido nucleico (por ejemplo, la integridad del ARNm) de una LNP, suspensión de LNP, composición liofilizada de LNP o formulación de LNP para degradarse a alrededor de X de la integridad inicial del ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) utilizado para la preparación de la LNP, suspensión de LNP, composición liofilizada de LNP o formulación de LNP. Por ejemplo, "T80%" se refiere a la cantidad de tiempo que tarda la integridad del ácido nucleico (por ejemplo, la integridad del ARNm) de una LNP, una suspensión de LNP, una composición liofilizada de LNP o una formulación de LNP en degradarse hasta alrededor del 80% de la integridad inicial del ácido nucleico (por ejemplo, el ARNm) utilizado para la preparación de la LNP, la suspensión de LNP, la composición liofilizada de LNP o la formulación de LNP. Por otro ejemplo, "T1/2" se refiere a la cantidad de tiempo que tarda la integridad del ácido nucleico (por ejemplo, la integridad del ARNm) de una LNP, suspensión de LNP, composición liofilizada de LNP o formulación de LNP en degradarse hasta alrededor de 1/2 de la integridad inicial del ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) utilizado para la preparación de la LNP, suspensión de LNP, composición liofilizada de
35

LNP o formulación de LNP.

Las nanopartículas lipídicas pueden incluir un componente lipídico y uno o más componentes adicionales, como uno terapéutico y/o profiláctico, como un ácido nucleico. Una LNP puede diseñarse para una o más aplicaciones o blancos específicos. Los
 5 elementos de una LNP pueden seleccionarse en función de una aplicación o un blanco concretos, y/o en función de la eficacia, la toxicidad, el gasto, la facilidad de uso, la disponibilidad u otra característica de uno o más elementos. Del mismo modo, la formulación particular de una LNP puede seleccionarse para una aplicación o un blanco
 10 concretos de acuerdo con, por ejemplo, la eficacia y la toxicidad de una combinación particular de elementos. La eficacia y la tolerabilidad de una formulación de LNP pueden verse afectadas por la estabilidad de la formulación.

El componente lipídico de una LNP puede incluir, por ejemplo, un lípido catiónico, un fosfolípido (como un lípido insaturado, por ejemplo, DOPE o DSPC), un lípido PEG y un lípido estructural. Los elementos del componente lipídico pueden proporcionarse en
 15 fracciones específicas.

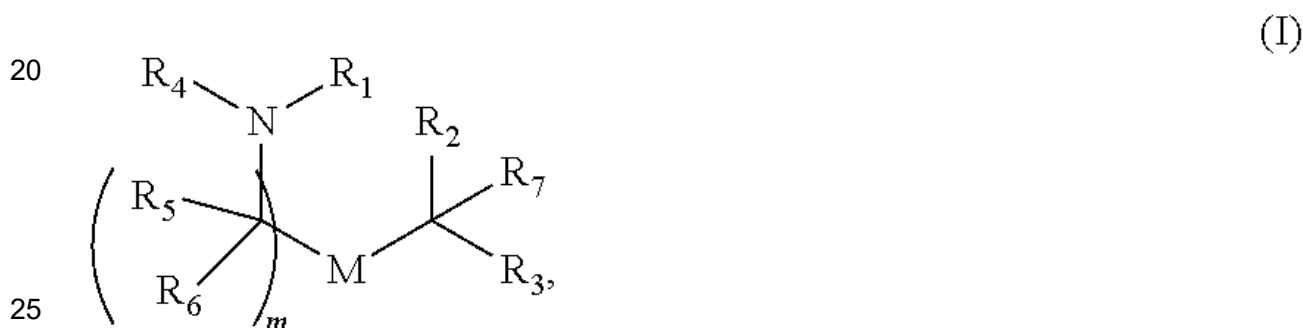
En algunas modalidades, la LNP comprende además un fosfolípido, un lípido PEG, un lípido estructural o cualquier combinación de los mismos. En el presente documento se describen fosfolípidos, lípidos PEG y lípidos estructurales adecuados para los métodos de la presente descripción.

En algunas modalidades, el componente lipídico de una LNP incluye un lípido catiónico, un fosfolípido, un lípido PEG y un lípido estructural. En algunas modalidades, el componente lipídico de la nanopartícula lipídica incluye alrededor de 30 % mol a alrededor de 60 % mol de lípido catiónico, alrededor de 0 % mol a alrededor de 30 % mol de fosfolípido, alrededor de 18.5 % mol a alrededor de 48.5 % mol de lípido estructural, y
 25 alrededor de 0 % mol a alrededor de 10 % mol de lípido PEG, siempre que el % mol total no supere el 100%. En algunas modalidades, el componente lipídico de la nanopartícula lipídica incluye alrededor de 35 % mol a alrededor de 55 % mol de compuesto de lípido catiónico, alrededor de 5 % mol a alrededor de 25 % mol de fosfolípido, alrededor de 30 % mol a alrededor de 40 % mol de lípido estructural, y alrededor de 0 % mol a alrededor de
 30 10 % mol de lípido PEG. En una modalidad particular, el componente lipídico incluye alrededor de 50 % mol de dicho lípido catiónico, alrededor de 10 % mol de fosfolípido, alrededor de 38.5 % mol de lípido estructural y alrededor de 1.5 % mol de lípido PEG. En otra modalidad, el componente lipídico incluye alrededor de un 40 % mol de dicho lípido catiónico, alrededor de un 20 % mol de fosfolípido, alrededor de un 38.5 % mol de lípido
 35 estructural y alrededor de un 1.5 % mol de lípido PEG. En algunas modalidades, el

fosfolípido puede ser DOPE o DSPC. En otras modalidades, el lípido PEG puede ser PEG-DMG y/o el lípido estructural puede ser colesterol.

La cantidad de un terapéutico y/o profiláctico en una LNP puede depender del tamaño, la composición, el blanco deseado y/o la aplicación, u otras propiedades de la nanopartícula lipídica, así como de las propiedades del terapéutico y/o profiláctico. Por ejemplo, la cantidad de un ARN útil en una LNP puede depender del tamaño, la secuencia y otras características del ARN. Las cantidades relativas de una sustancia terapéutica y/o profiláctica (es decir, farmacéutica) y otros elementos (por ejemplo, lípidos) en una LNP también pueden variar. En algunas modalidades, la proporción peso/peso del componente lipídico con respecto a una sustancia terapéutica y/o profiláctica en una LNP puede ser de alrededor de 5:1 a alrededor de 60:1, como 5:1, 6:1, 7:1.8:1.9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 25:1.30:1.35:1, 40:1, 45:1, 50:1 y 60:1. Por ejemplo, la proporción p/p del componente lipídico con respecto al terapéutico y/o profiláctico puede ser de alrededor de 10:1 a alrededor de 40: 1. En ciertas modalidades, la proporción peso/peso es de alrededor de 20: 1. La cantidad de un componente terapéutico y/o profiláctico en una LNP puede, por ejemplo, medirse mediante espectroscopia de absorción (por ejemplo, espectroscopia ultravioleta-visible).

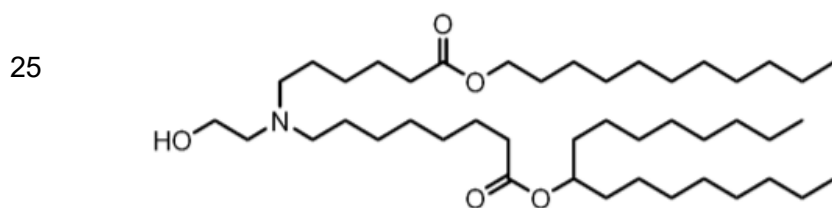
En algunas modalidades, el lípido ionizable es un compuesto de fórmula (I):



o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde:

R_i se selecciona del grupo formado por alquilo C5-30, alqueno C5-20, -R*YR", -YR" y -R "M'R"; R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo formado por H, alquilo C1-14, alqueno C2-14, -R*YR", -YR" y -R*OR", o R₂ y R₃, junto con el átomo al que están unidos, forman un heterociclo o un carbociclo; R₄ se selecciona entre el grupo formado por hidrógeno, un carbociclo C3-6, -(CH₂)_nQ, -(CH₂)_nCHQR, -CHQR, -CQ(R)₂, y alquilo C1-6 no sustituido, donde Q se selecciona entre un carbociclo heterociclo, -OR, -O(CH₂)_nN(R)₂, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX₃, -CX₂H, -CXH₂, -CN, -N(R)₂, -C(O)N(R)₂, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(R)C(S)N(R)₂ -N(R)Re, N(R)S(O)₂R₈, -

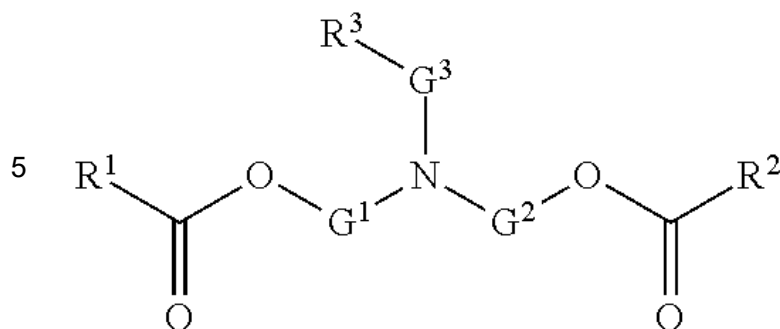
$O(CH_2)_nOR$, $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$, $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$, $-OC(O)N(R)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(OR)C(O)R$, $-N(OR)S(O)_2R$, $-N(OR)C(O)OR$, $-N(OR)C(O)N(R)_2$, $-N(OR)C(S)N(R)_2$, $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$, $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$, $-C(=NR_9)N(R)_2$, $-C(=NR_9)R$, $-C(O)N(R)OR$, y $-C(R)N(R)_2C(O)OR$, y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4 y 5; cada R_5 se selecciona independientemente del grupo formado por alquilo C1-3, alqueno C2-3 y H; cada R_e se selecciona independientemente del grupo formado por alquilo C1-3, alqueno C2-3 y H; M y M' se seleccionan independientemente entre $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-OC(O)-M''-C(O)O-$, $-C(O)N(R')$, $-N(R')C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(S)S-$, $-SC(S)-$, $-CH(OH)-$, $-P(O)(OR')O-$, $-S(O)_2-$, $-S-S-$, un grupo arilo y un grupo heteroarilo, en el que M'' es un enlace, un alquilo C1-13 o un alqueno C2-13; R_7 se selecciona del grupo formado por alquilo C1-3, alqueno C2-3 y H; R_e se selecciona del grupo formado por carbociclo C3-6 y heterociclo; R_9 se selecciona del grupo formado por H, CN, NO₂, alquilo C1-6, $-OR$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2N(R)_2$, alqueno C2-6, carbociclo C3-6 y heterociclo; cada R se selecciona independientemente del grupo formado por alquilo C1-3, alqueno C2-3 y H; cada R' se selecciona independientemente del grupo formado por C1 es alquilo, C2 es alqueno, $-R^*YR''$, $-YR''$ y H; cada R'' se selecciona independientemente del grupo formado por alquilo C3-15 y alqueno C3-15; cada R^* se selecciona independientemente del grupo formado por alquilo C1-12 y alqueno C2-12; cada Y es independientemente un carbociclo C3-6; cada X se selecciona independientemente del grupo formado por F, Cl, Br e I; y m se selecciona entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13; y en donde cuando R_4 es $-(CH_2)_nQ$, $-(CH_2)_nCHQR$, $-CHQR$ o $-CQ(R)_2$, entonces (i) Q no es $-N(R)_2$ cuando n es 1, 2, 3, 4 o 5, o (ii) Q no es heterocicloalquilo de 5, 6 o 7 miembros cuando n es 1 o 2. En algunas modalidades, el lípido ionizable



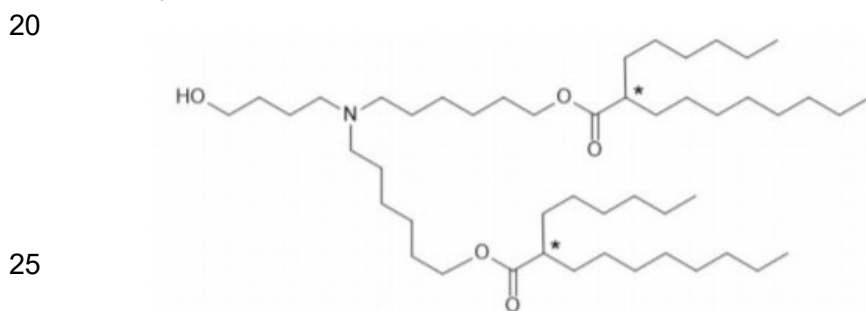
es:

30 En algunas modalidades, los compuestos tienen la siguiente estructura (I):

(IE)



10 o una sal, tautómero, profármaco o estereoisómero del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde: uno de L1 o L2 es -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)x-, -S-S-, -C(=O)S-, SC(=O)-, -NRaC(=O)-, -C(=O)NRa-, NRaC(=O)NRa-, -OC(=O)NRa- o -NRaC(=O)O-, y el otro de L1 o L2 es -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)x-, -S-S-, -C(=O)S-, SC(=O)-, -NRaC(=O)-, -C(=O)NRa-, NRaC(=O)NRa-, -OC(=O)NRa- o -NRaC(=O)O- o un enlace directo; G1 y G2 son cada uno independientemente alquileo C1-C12 no sustituido o alquilenilo C1-C12; G3 es alquileo C1-C24, alquilenilo C1-C24, cicloalquileo C3-C8, cicloalquilenilo C3-C8; Ra es H o alquilo C1-C12; R1 y R2 son cada uno independientemente alquilo C6-C24 o alquilenilo C6-C24; R3 es H, OR5, CN, -C(=O)OR4, -OC(=O)R4 o -NR5C(=O)R4; R4 es alquilo C1-C12; R5 es H o alquilo C1-C6; y x es 0, 1 ó 2. En una modalidad preferible, el lípido ionizable es:



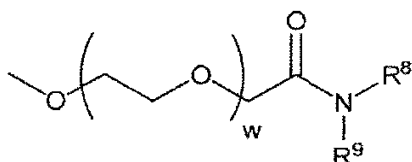
Los asteriscos (*) indican centros quirales

El componente lipídico de una composición de nanopartículas lipídicas puede incluir una o más moléculas que contengan polietilenglicol, como PEG o lípidos modificados con PEG. Estas especies pueden denominarse alternativamente lípidos PEGilados. Un lípido PEG es un lípido modificado con polietilenglicol. Un lípido PEG puede seleccionarse del grupo no limitativo que incluye fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, ácidos fosfatídicos modificados con PEG, ceramidas modificadas con PEG, dialquilaminas modificadas con PEG, diacilglicerolos modificados con PEG, dialquilglicerolos modificados con PEG y sus mezclas. En algunas modalidades, un lípido PEG puede ser PEG-c- DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC o un

30

35

lípidos modificados con polietilenglicol (PEG). Algunos ejemplos no limitantes de lípidos PEG son la fosfatidiletanolamina y el ácido fosfatídico modificados con PEG, los conjugados PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20), las dialquilaminas modificadas con PEG y las 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. Tales lípidos también se denominan lípidos PEGilados. En algunas modalidades, un lípido PEG puede ser PEG-c-DMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC o un lípido PEG-DSPE. En algunas modalidades, los lípidos modificados con PEG son una forma modificada de PEG DMG. En algunas modalidades, el lípido modificado con PEG es un lípido de PEG con la fórmula (IV):



(IV)

en donde R8 y R9 son cada uno independientemente una cadena alquílica lineal o ramificada, saturada o insaturada, que contiene de 10 a 30 átomos de carbono, en donde la cadena alquílica está opcionalmente interrumpida por uno o más enlaces éster; y w tiene un valor medio que oscila entre 30 y 60.

Las vacunas de ARN (por ejemplo, ARNm) pueden utilizarse en diversos entornos en función de la prevalencia de la infección o del grado o nivel de necesidad médica no satisfecha. Las vacunas de ARN pueden utilizarse para tratar y/o prevenir un virus de la influenza de varios genotipos, cepas y aislados. Las vacunas de ARN suelen tener propiedades superiores en el sentido de que producen títulos de anticuerpos mucho mayores y producen respuestas antes que los tratamientos terapéuticos antivirales disponibles en el mercado. Sin querer ceñirnos a la teoría, se cree que las vacunas de ARN, como polinucleótidos de ARNm, están mejor diseñadas para producir la conformación proteica adecuada tras la traducción, ya que las vacunas de ARN cooptan la maquinaria celular natural. A diferencia de las vacunas tradicionales, que se fabrican ex vivo y pueden desencadenar respuestas celulares no deseadas, las vacunas de ARN (por ejemplo, ARNm) se presentan al sistema celular de forma más nativa.

Puede haber situaciones en las que las personas corran el riesgo de infectarse con más de una cepa del virus de la influenza. Las vacunas terapéuticas de ARN (por ejemplo, ARNm) son especialmente aptas para los enfoques de vacunación combinada debido a una serie de factores que incluyen, entre otros, la velocidad de fabricación, la capacidad de adaptar rápidamente las vacunas para adaptarse a la amenaza geográfica

percibida, y similares. Además, como las vacunas utilizan el cuerpo humano para producir la proteína antigénica, las vacunas son susceptibles de producir proteínas antigénicas más grandes y complejas, lo que permite un plegamiento adecuado, la expresión de la superficie, la presentación del antígeno, etc. en el sujeto humano. Para proteger contra
5 más de una cepa de la influenza, se puede administrar una vacuna combinada que incluya ARN (por ejemplo, ARNm) que codifique al menos una proteína polipéptida antigénica (o una porción antigénica de la misma) de un primer virus u organismo de la influenza y que incluya además ARN que codifique al menos una proteína polipéptida antigénica (o una porción antigénica de la misma) de un segundo virus u organismo de la
10 influenza. El ARN (por ejemplo, el ARNm) puede coformularse, por ejemplo, en una única nanopartícula lipídica (NPL) o puede formularse en NPL separadas para su coadministración.

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan vacunas (o composiciones o composiciones inmunogénicas) contra el virus de la influenza (influenza)
15 que incluyen al menos un polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo (por ejemplo, un fragmento inmunogénico capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra la influenza).

En algunas modalidades, el al menos un polipéptido antigénico es uno de los
20 subdominios antigénicos definidos de HA, denominados HA1, HA2 o una combinación de HA1 y HA2, y al menos un polipéptido antigénico seleccionado entre neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1) y proteína no estructural 2 (NS2).

En algunas modalidades, el al menos un polipéptido antigénico es HA o derivados
25 del mismo que comprenden secuencias antigénicas de HA1 y/o HA2, y al menos un polipéptido antigénico seleccionado de NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2.

En algunas modalidades, el al menos un polipéptido antigénico es HA o derivados del mismo que comprenden secuencias antigénicas de HA1 y/o HA2 y al menos dos polipéptidos antigénicos seleccionados de NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2.

30 En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína del virus de la influenza, o un fragmento inmunogénico de la misma.

En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica múltiples
35 proteínas del virus de la influenza, o fragmentos inmunogénicos de las mismas.

En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos una HA1, HA2, o una combinación de ambas).

5 En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos una HA1, HA2, o una combinación de ambas, de una cualquiera o de todas las H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, y/o H18) y al menos otro ARN (por
10 ejemplo, ARNm) que tenga un marco de lectura abierto que codifique una proteína seleccionada de entre una proteína NP, una proteína NA, una proteína M1, una proteína M2, una proteína NS1 y una proteína NS2 obtenidas del virus de la influenza.

En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína
15 HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos uno de o una combinación de uno o todos los H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, y/o H18) y al menos otros dos ARN (por ejemplo, ARNm) polinucleótidos que tengan dos marcos de lectura abiertos que codifiquen dos proteínas seleccionadas de entre una proteína NP, una proteína NA, una proteína M1, una proteína
20 M2, una proteína NS1 y una proteína NS2 obtenidas del virus de la influenza.

En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos uno o una combinación de uno o todos los H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13,
25 H14, H15, H16, H17 y/o H18) y al menos otros tres ARN (por ejemplo, ARNm) polinucleótidos que tengan tres marcos de lectura abiertos que codifiquen tres proteínas seleccionadas de entre una proteína NP, una proteína NA, una proteína M, una proteína M2, una proteína NS1 y una proteína NS2 obtenidas del virus de la influenza.

En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de
30 ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos uno o una combinación de uno o todos los H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 y/o H18) y al menos otros cuatro ARN (por ejemplo, ARNm) polinucleótidos que tengan cuatro marcos de lectura abiertos que codifiquen cuatro
35 proteínas seleccionadas de entre una proteína NP, una proteína NA, una proteína M1,

una proteína M2, una proteína NS1 y una proteína NS2 obtenidas del virus de la influenza.

En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos uno o una combinación de uno o todos los H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 y/o H18) y al menos otros cinco ARN (por ejemplo, ARNm) polinucleótidos que tengan cinco marcos de lectura abiertos que codifiquen cinco proteínas seleccionadas entre una proteína NP, una proteína NA, una proteína M1, una proteína M2, una proteína NS1 y una proteína NS2 obtenidas del virus de la influenza.

En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos una o una combinación de una o todas las H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 y/o H18), una proteína NP o un fragmento inmunogénico de la misma, una proteína NA o un fragmento inmunogénico de la misma, una proteína M1 o un fragmento inmunogénico de la misma, una proteína M2 o un fragmento inmunogénico de la misma, una proteína NS1 o un fragmento inmunogénico de la misma y una proteína NS2 o un fragmento inmunogénico de la misma obtenidos a partir del virus de la influenza.

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan las siguientes secuencias polipeptídicas novedosas del virus de la influenza: H1HA10-Foldon_ΔNgly1; H1HA10TM-PR8 (H1 A/Puerto Rico/8/34 HA); H1HA10-PR8-DS (H1 A/Puerto Rico/8/34 HA; pH1HA10-Cal04-DS (H1 A/California/04/2009 HA); Pandemia H1HA10 de California 04; pH1HA10-ferritina; HA10; H1HA10 pandémica de California 04; H1HA10 pandémica de la cepa California 04/sin foldon y con mutación K68C/R76C para la trimerización; H1HA10 de la cepa A/Puerto Rico/8/34, sin plegón y con mutación Y94D/N95L para la trimerización; H1HA10 de la cepa A/Puerto Rico/8/34, sin plegón y con mutación K68C/R76C para la trimerización; H1N1 A/Viet Nam/850/2009; H3N2 A/Wisconsin/67/2005; H7N9 (A/Anhui/1/2013); H9N2 A/Hong Kong/1073/99; H10N8 A/JX346/2013.

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan vacunas contra el virus de la influenza (influenza) que incluyen al menos un polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza o un fragmento inmunogénico de las nuevas secuencias de polipéptidos del virus de la influenza descritas anteriormente (por ejemplo, un fragmento inmunogénico

capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra la influenza). En algunas modalidades, una vacuna contra la influenza comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza que comprende una secuencia modificada que tiene
5 al menos un 75% (por ejemplo, cualquier número entre el 75% y el 100%, ambos inclusive, por ejemplo, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% y 100%) de identidad con una secuencia de aminoácidos de las nuevas secuencias del virus de la influenza descritas anteriormente. La secuencia modificada puede ser al menos un 75% (por ejemplo, cualquier número entre el 75% y el 100%, inclusive, por ejemplo, 70%, 80%, 85%, 90%,
10 95%, 99% y 100%) idéntica a una secuencia de aminoácidos de las secuencias del nuevo virus de la influenza descritas anteriormente.

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica las nuevas secuencias polipeptídicas del virus de la influenza descritas anteriormente; un vector de expresión que comprende el
15 ácido nucleico; y una célula hospedera que comprende el ácido nucleico. La presente descripción también proporciona un método para producir un polipéptido de cualquiera de las secuencias del nuevo virus de la influenza descritas anteriormente. El método puede incluir el cultivo de la célula hospedera en un medio en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico de las nuevas secuencias del virus de la influenza descritas
20 anteriormente, y la purificación a partir de la célula cultivada o del medio de la célula de un nuevo polipéptido del virus de la influenza. La presente descripción también proporciona moléculas de anticuerpos, incluidos anticuerpos de longitud completa y derivados de anticuerpos, dirigidos contra las secuencias novedosas del virus de la influenza.

En algunas modalidades, el marco de lectura abierto de una vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) está optimizado para codones. En algunas modalidades, el marco de lectura abierto que codifica el polipéptido de la influenza o un fragmento del mismo está optimizado para codones. Algunas modalidades proporcionan el uso de una vacuna contra la influenza que incluye al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tiene un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico de
30 la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde al menos el 80% (por ejemplo, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%) del uracilo en el marco de lectura abierto tiene una modificación química, opcionalmente en donde la vacuna está formulada en una nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, el 100% del uracilo en el marco de lectura abierto tiene una modificación química. En algunas modalidades, una modificación
35 química se encuentra en la posición 5 del uracilo. En algunas modalidades preferibles,

una modificación química es una N1-metil pseudouridina.

En algunas modalidades, una vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) comprende además un adyuvante.

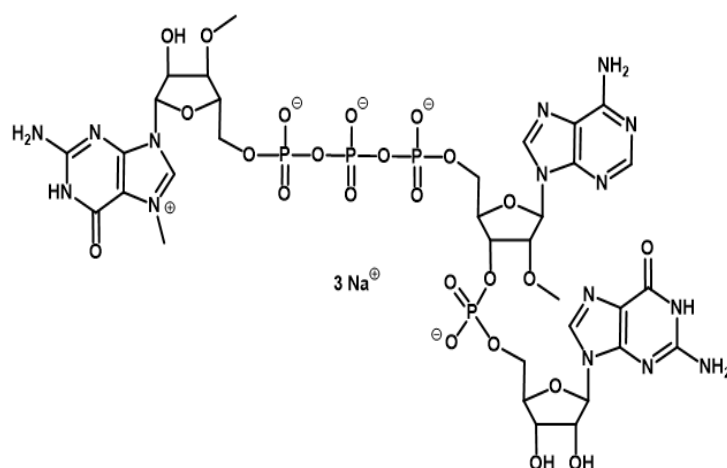
En algunas modalidades, al menos un polinucleótido de ARN codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza que se une a los receptores celulares.

En algunas modalidades, al menos un polinucleótido de ARN codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza que provoca la fusión de las membranas viral y celular.

En algunas modalidades, al menos un polinucleótido de ARN codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza que es responsable de la unión del virus a una célula infectada.

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan una vacuna que incluye al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) (por ejemplo, ARNm) con un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza, al menos un casquete en 5' terminal y al menos una modificación química, formulada dentro de una nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el casquete terminal 5' es 7mG(5')ppp(5')NlmpNp. En algunas modalidades preferibles, el casquete 5' comprende:



En algunas modalidades, al menos una modificación química se selecciona entre pseudouridina, N1-metilpseudouridina, N1-etilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina, 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-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metil uridina. En algunas modalidades, la modificación química se produce en la

posición 5 del uracilo. En algunas modalidades, la modificación química es una N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, la modificación química es una N1-etilpseudouridina.

En algunas modalidades, una nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido modificado con PEG, un esteroil y un lípido no catiónico. En algunas modalidades, un lípido catiónico es un lípido catiónico ionizable y el lípido no catiónico es un lípido neutro, y el esteroil es un colesterol. En algunas modalidades, un lípido catiónico se selecciona del grupo formado por 2,2-dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), dilinoil-metil-4-dimetilaminobutirato (DLin-MC3-DMA), di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecanodioato (L319), (12Z,15Z)-N,N-dimetil-2-nonilhenicosa-12.15-dien-1-amina (L608), y N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]heptadecan-8-amina (L530).

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan una vacuna que incluye al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) que tiene un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza, en donde al menos el 80% (por ejemplo, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%) del uracilo en el marco de lectura abierto tiene una modificación química, opcionalmente en donde la vacuna está formulada en una nanopartícula lipídica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido modificado con PEG, un esteroil y un lípido no catiónico).

En algunas modalidades, el 100% del uracilo en el marco de lectura abierto tiene una modificación química. En algunas modalidades, una modificación química se encuentra en la posición 5 del uracilo. En algunas modalidades, una modificación química es una N1-metil pseudouridina. En algunas modalidades, el 100% de los uracilos del marco de lectura abierto tienen una N1-metil pseudouridina en la posición 5 del uracilo.

En algunas modalidades, un marco de lectura abierto de un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza. En algunas modalidades, el marco de lectura abierto codifica al menos dos, al menos cinco o al menos diez polipéptidos antigénicos. En algunas modalidades, el marco de lectura abierto codifica al menos 100 polipéptidos antigénicos. En algunas modalidades, el marco de lectura abierto codifica entre 1 y 100 polipéptidos antigénicos.

En algunas modalidades, una vacuna comprende al menos dos polinucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNm), cada uno con un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico de la influenza. En algunas modalidades, la vacuna comprende al menos cinco o al menos diez polinucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNm),

cada uno con un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico o un fragmento inmunogénico del mismo. En algunas modalidades, la vacuna comprende al menos 100 polinucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNm), cada uno con un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico. En algunas modalidades, la vacuna comprende de 2 a 100 polinucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNm), cada uno con un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico.

También se proporciona aquí una vacuna de ARN de la influenza (por ejemplo, ARNm) de cualquiera de los párrafos anteriores formulada en una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica).

En algunas modalidades, la nanopartícula tiene un diámetro medio de 50-200 nm. En algunas modalidades, la nanopartícula es una nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido modificado con PEG, un estero y un lípido no catiónico. En algunas modalidades, la nanopartícula lipídica comprende una proporción molar de alrededor de 20-60% de lípido catiónico, 0.5-15% de lípido modificado con PEG, 25-55% de estero y 25% de lípido no catiónico. En algunas modalidades, el lípido catiónico es un lípido catiónico ionizable y el lípido no catiónico es un lípido neutro, y el estero es un colesterol.

En algunas modalidades, la nanopartícula tiene un valor de polidispersidad inferior a 0.4 (por ejemplo, inferior a 0.3, 0.2 o 0.1).

En algunas modalidades, la nanopartícula tiene una carga neta neutra a un valor de pH neutro.

En algunas modalidades, la vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) es multivalente.

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto, que comprenden la administración al sujeto de cualquiera de las vacunas de ARN (por ejemplo, ARNm) aquí proporcionadas en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. En algunas modalidades, la vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) es una vacuna contra la influenza. En algunas modalidades, la vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) es una vacuna combinada que comprende una combinación de vacunas antigripales (una vacuna antigripal de amplio espectro).

En algunas modalidades, una respuesta inmunitaria específica de antígeno comprende una respuesta de células T o una respuesta de células B.

En algunas modalidades, un método para producir una respuesta inmunitaria específica al antígeno comprende administrar a un sujeto una dosis única (sin dosis de refuerzo) de una vacuna de ARN de la influenza (por ejemplo, ARNm) de la presente

descripción.

En algunas modalidades, el método comprende además la administración al sujeto de una segunda dosis (de refuerzo) de una vacuna de ARN de la influenza (por ejemplo, ARNm). Pueden administrarse dosis adicionales de una vacuna de ARN de la influenza

5

(por ejemplo, ARNm).

En algunas modalidades, los sujetos presentan una tasa de seroconversión de al menos el 80% (por ejemplo, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95%) tras la primera dosis o la segunda dosis (de refuerzo) de la vacuna. La seroconversión es el periodo de tiempo durante el cual un anticuerpo específico se desarrolla y se hace detectable en la sangre. Una vez que se ha producido la seroconversión, se puede detectar un virus en los análisis de sangre para detectar el anticuerpo. Durante una infección o inmunización, los antígenos entran en la sangre y el sistema inmunológico comienza a producir anticuerpos como respuesta. Antes de la seroconversión, el antígeno en sí puede ser detectable o no, pero los anticuerpos se consideran ausentes. Durante la seroconversión, los anticuerpos están presentes pero aún no son detectables. En cualquier momento después de la seroconversión, los anticuerpos pueden detectarse en la sangre, lo que indica una infección previa o actual.

10

15

En algunas modalidades, una vacuna de ARN de la influenza (por ejemplo, ARNm) se administra a un sujeto mediante inyección intradérmica, intramuscular o intranasal. En algunas modalidades, una vacuna de ARN de la influenza (por ejemplo, ARNm) se administra a un sujeto mediante inyección intramuscular.

20

Algunas modalidades de la presente descripción proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto, incluida la administración a un sujeto de una vacuna de ARN de la influenza (por ejemplo, ARNm) en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto. Las respuestas inmunitarias específicas de antígeno en un sujeto pueden determinarse, en algunas modalidades, mediante un ensayo para el título de anticuerpos (para el título de un anticuerpo que se une a un polipéptido antigénico de la influenza) tras la administración al sujeto de cualquiera de las vacunas de ARN de la influenza (por ejemplo, ARNm) de la presente descripción. En algunas modalidades, el título de anticuerpos contra el polipéptido antigénico producido en el sujeto aumenta al menos 1 log con respecto a un control. En algunas modalidades, el título del anticuerpo polipéptido antiantigénico producido en el sujeto aumenta entre 1 y 3 log en relación con un control.

25

30

En algunas modalidades, el título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en un sujeto aumenta al menos 2 veces en relación con un control. En algunas

35

modalidades, el título del anticuerpo polipéptido antiantigénico producido en el sujeto aumenta al menos 5 veces en relación con un control. En algunas modalidades, el título del anticuerpo polipéptido antiantigénico producido en el sujeto aumenta al menos 10 veces en relación con un control. En algunas modalidades, el título de anticuerpos antipolipéptidos antiantigénicos producido en el sujeto aumenta entre 2 y 10 veces en relación con un control.

En algunas modalidades, el control es un título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en un sujeto al que no se le ha administrado una vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) de la presente descripción. En algunas modalidades, el control es un título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en un sujeto al que se le ha administrado una vacuna contra influenza viva atenuada o inactivada, o en donde el control es un título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en un sujeto al que se le ha administrado una vacuna proteica contra influenza recombinante o purificada. En algunas modalidades, el control es un título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en un sujeto al que se le ha administrado una vacuna con partículas similares al virus de la influenza (VLP).

Una vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) de la presente descripción se administra a un sujeto en una cantidad eficaz (una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria). En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis equivalente a una reducción de al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces de la dosis estándar de cuidado de una vacuna proteica recombinante contra la influenza, en donde el título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en el sujeto es equivalente a un título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en un sujeto de control al que se le administró la dosis estándar de cuidado de una vacuna proteica recombinante contra la influenza, una vacuna proteica purificada contra la influenza, una vacuna viva atenuada contra la influenza, una vacuna inactivada contra la influenza o una vacuna VLP contra la influenza. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis equivalente a una reducción de 2-1000 veces la dosis estándar de cuidado de una vacuna proteica recombinante contra la influenza, en donde el título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en el sujeto es equivalente a un título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en un sujeto de control al que se le administró la dosis estándar de cuidado de una vacuna recombinante de proteínas de la influenza, una vacuna purificada de proteínas de la influenza, una vacuna viva atenuada contra la influenza, una vacuna inactivada contra la influenza o una vacuna VLP contra la influenza.

En algunas modalidades, el control es un título de anticuerpos polipéptidos antiantigénicos producido en un sujeto al que se le ha administrado una vacuna de partículas similares a virus (VLP) que comprende proteínas estructurales de la influenza.

En algunas modalidades, la vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) se formula en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria específica al antígeno en un sujeto.

En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis total de 25 µg a 1000 µg, o de 50 µg a 1000 µg. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis total de 100 µg. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis de 25 µg administrada al sujeto un total de dos veces. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis de 100 µg administrada al sujeto un total de dos veces. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis de 400 µg administrada al sujeto un total de dos veces. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis de 500 µg administrada al sujeto un total de dos veces.

En algunas modalidades, la eficacia (o efectividad) de una vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) es superior al 60%. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNm) de la vacuna contiene al menos un polipéptido antigénico de la influenza.

La eficacia de la vacuna puede evaluarse mediante análisis estándar. Por ejemplo, la eficacia de la vacuna puede medirse mediante ensayos clínicos controlados, aleatorizados y a doble ciego. La eficacia de la vacuna puede expresarse como una reducción proporcional de la tasa de ataque de la enfermedad (AR) entre las cohortes de estudio no vacunadas (ARU) y vacunadas (ARV) y puede calcularse a partir del riesgo relativo (RR) de enfermedad entre el grupo vacunado con el uso de las siguientes fórmulas:

$$\text{Eficacia} = (\text{ARU} - \text{ARV}) / \text{ARU} \times 100; \text{ y } \text{Eficacia} = (1 - \text{RR}) \times 100.$$

Del mismo modo, la eficacia de la vacuna puede evaluarse mediante análisis estándar. La eficacia de la vacuna es una evaluación de cómo una vacuna (que ya puede haber demostrado tener una alta eficacia vacunal) reduce la enfermedad en una población. Esta medida puede evaluar el balance neto de beneficios y efectos adversos de un programa de vacunación, no sólo de la vacuna en sí, en condiciones naturales de campo y no en un ensayo clínico controlado. La efectividad de la vacuna es proporcional a su eficacia (potencia), pero también se ve afectada por lo bien inmunizados que estén los grupos blancos de la población, así como por otros factores no relacionados con la vacuna que influyen en los resultados "del mundo real" de hospitalizaciones, visitas

ambulatorias o costes. Por ejemplo, puede utilizarse un análisis retrospectivo de casos y controles, en el que se comparan las tasas de vacunación entre un conjunto de casos infectados y los controles apropiados. La eficacia de la vacuna puede expresarse como una diferencia de tasas, con el uso de la proporción de probabilidades (OR) de desarrollar la infección a pesar de la vacunación: $Eficacia = (1 - OR) \times 100$. En algunas modalidades, la eficacia (o efectividad) de una vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) es de al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% o al menos el 90%.

En algunas modalidades, la vacuna inmuniza al sujeto contra la Influenza durante un máximo de 2 años. En algunas modalidades, la vacuna inmuniza al sujeto contra la Influenza durante más de 2 años, más de 3 años, más de 4 años, o durante 5-10 años.

En algunas modalidades, el sujeto tiene alrededor de 5 años o menos. Por ejemplo, el sujeto puede tener entre 1 año y 5 años (por ejemplo, 1, 2, 3, 5 o 5 años), o entre 6 meses y 1 año (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses). En algunas modalidades, el sujeto tiene alrededor de 12 meses o menos (por ejemplo, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 meses o 1 mes). En algunas modalidades, el sujeto tiene alrededor de 6 meses o menos.

En algunas modalidades, el sujeto nació a término (por ejemplo, alrededor de 37-42 semanas). En algunas modalidades, el sujeto nació prematuramente, por ejemplo, alrededor de las 36 semanas de gestación o antes (por ejemplo, alrededor de las 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26 o 25 semanas). Por ejemplo, el sujeto puede haber nacido alrededor de las 32 semanas de gestación o antes. En algunas modalidades, el sujeto nació prematuramente entre alrededor de 32 semanas y alrededor de 36 semanas de gestación. En tales sujetos, la vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) puede administrarse más tarde en la vida, por ejemplo, a la edad de alrededor de 6 meses a alrededor de 5 años, o más.

En algunas modalidades, el sujeto es un adulto joven con edades comprendidas entre alrededor de 20 años y alrededor de 50 años (por ejemplo, alrededor de 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 años).

En algunas modalidades, el sujeto es un anciano de alrededor de 60 años, 70 años o más (por ejemplo, de alrededor de 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 años).

En algunas modalidades, el sujeto ha estado expuesto a la influenza (por ejemplo, *C. trachomatis*); el sujeto está infectado por la influenza (por ejemplo, *C. trachomatis*); o el sujeto está en riesgo de infección por la influenza (por ejemplo, *C. trachomatis*).

En algunas modalidades, el sujeto ha estado expuesto al betacoronavirus (por

ejemplo, el SRAG-CoV-2); el sujeto está infectado por el betacoronavirus (por ejemplo, el SRAG-CoV-2); o el sujeto está en riesgo de infección por el betacoronavirus (por ejemplo, el SRAG-CoV-2).

En algunas modalidades, el sujeto ha recibido al menos una dosis de una
5 composición inmunogénica contra el betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2), por
ejemplo, seleccionada entre cualquiera de las vacunas COMIRNATY®, la vacuna COVID-
19 de Pfizer-BioNTech, la vacuna COVID-19 de Moderna mRNA-1273 y la vacuna
COVID-19 de Janssen; el sujeto ha recibido al menos dos dosis de una composición
inmunogénica contra el betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2); el sujeto está
10 recibiendo al menos una dosis de una composición inmunogénica contra el
betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2), por ejemplo, seleccionada entre cualquiera
de las vacunas COMIRNATY®, la vacuna contra el COVID-19 de Pfizer-BioNTech, la
vacuna contra el COVID-19 de Moderna mRNA-1273 y la vacuna contra el COVID-19 de
Janssen; o el sujeto está recibiendo una composición inmunogénica contra el
15 betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2), por ejemplo, seleccionada entre cualquiera
de las vacunas COMIRNATY®, la vacuna COVID-19 de Pfizer-BioNTech, la vacuna
Moderna mRNA-1273 COVID-19 y la vacuna Janssen COVID-19 en riesgo de infección
por betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2) de forma concomitante, simultánea o en
las 12-48 horas siguientes a cualquiera de las composiciones inmunogénicas contra la
20 influenza aquí divulgadas.

En algunas modalidades, el sujeto está inmunocomprometido (tiene un sistema
inmunitario deteriorado, por ejemplo, padece un trastorno inmunitario o autoinmunitario).

En algunas modalidades, las vacunas de ácido nucleico aquí descritas están
químicamente modificadas. En otras modalidades, las vacunas de ácido nucleico no están
25 modificadas.

Sin embargo, otros aspectos proporcionan composiciones para y métodos para
vacunar a un sujeto que comprenden administrar al sujeto una vacuna de ácido nucleico
que comprende uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto
que codifica un primer polipéptido antigénico del virus, en donde el polinucleótido de ARN
30 no incluye un elemento de estabilización, y en donde un adyuvante no está coformulado o
coadministrado con la vacuna.

En otros aspectos, la invención es una composición para o un método para
vacunar a un sujeto que comprende administrar al sujeto una vacuna de ácido nucleico
que comprende uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto
35 que codifica un primer polipéptido antigénico en donde se administra al sujeto una

dosificación de entre 10 µg/kg y 400 µg/kg de la vacuna de ácido nucleico. En algunas modalidades, la dosificación del polinucleótido de ARN es de 1-5 µg, 5-10 µg, 10-15 µg, 15-20 µg, 10-25 µg, 20-25 µg, 20-50 µg, 30-50 µg, 40-50 µg, 40-60 µg, 60-80 µg, 60-100 µg, 50-100 µg, 80-120 µg, 40-120 µg, 40-150 µg, 50-150 µg, 50-200 µg, 80-200 µg, 100-200 µg, 120-250 µg, 150-250 µg, 180-280 µg, 200-300 µg, 50-300 µg, 80-300 µg, 100-300 µg, 40-300 µg, 50-350 µg, 100-350 µg, 200-350 µg, 300-350 µg, 320-400 µg, 40-380 µg, 40-100 µg, 100-400 µg, 200-400 µg, o 300-400 µg por dosis. En algunas modalidades, la vacuna de ácido nucleico se administra al sujeto mediante inyección intradérmica o intramuscular. En algunas modalidades, la vacuna de ácido nucleico se administra al sujeto el día cero. En algunas modalidades, se administra una segunda dosis de la vacuna de ácido nucleico al sujeto el día veintiuno.

En algunas modalidades, se incluye una dosificación de 25 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, se incluye una dosificación de 100 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, se incluye una dosificación de 50 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, se incluye una dosificación de 75 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, se incluye una dosificación de 150 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, se incluye una dosificación de 400 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, se incluye una dosificación de 200 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN se acumula a un nivel 100 veces superior en el ganglio linfático local en comparación con el ganglio linfático distal. En otras modalidades, la vacuna de ácido nucleico está modificada químicamente y en otras modalidades la vacuna de ácido nucleico no está modificada químicamente.

Aspectos de la descripción proporcionan una vacuna de ácido nucleico que comprende uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, en donde el polinucleótido de ARN no incluye un elemento de estabilización, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde no se incluye un adyuvante en la vacuna. En algunas modalidades, el elemento de estabilización es una horquilla de histona. En algunas modalidades, el elemento de estabilización es una secuencia de ácido nucleico que tiene un mayor contenido de GC en

relación con la secuencia de tipo natural.

Aspectos de la descripción proporcionan vacunas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, en donde el polinucleótido de ARN está presente en la formulación para la administración *in vivo* a un hospedero, que confiere un título de anticuerpos superior al criterio de seroprotección para el primer antígeno para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. En algunas modalidades, el título de anticuerpos producido por las vacunas de ARNm de la descripción es un título de anticuerpos neutralizantes. En algunas modalidades, el título de anticuerpos neutralizantes es mayor que el de una vacuna proteica. En otras modalidades, el título de anticuerpos neutralizantes producido por las vacunas de ARNm de la descripción es mayor que el de una vacuna proteica adyuvada. En otras modalidades, el título de anticuerpos neutralizantes producido por las vacunas de ARNm de la descripción es 1,000-10,000, 1,200-10,000, 1,400-10,000, 1,500-10,000, 1,000-5,000, 1,000-4,000, 1,800-10,000, 2,000-10,000, 2,000-5,000, 2,000-3,000, 2,000-4,000, 3,000-5,000, 3,000-4,000 o 2,000-2,500. Un título de neutralización se expresa típicamente como la dilución de suero más alta requerida para lograr una reducción del 50% en el número de placas.

También se proporcionan vacunas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, en donde el polinucleótido de ARN está presente en una formulación para la administración *in vivo* a un hospedero para provocar un título de anticuerpos alto más duradero que un título de anticuerpos provocado por una vacuna de ARNm que tiene un elemento estabilizador o formulada con un adyuvante y que codifica el primer polipéptido antigénico. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN está formulado para producir anticuerpos neutralizantes en el plazo de una semana tras una única administración. En algunas modalidades, el adyuvante se selecciona entre un péptido catiónico y un ácido nucleico inmunoestimulador. En algunas modalidades, el péptido catiónico es protamina.

Los aspectos proporcionan vacunas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que comprende al menos una modificación química u opcionalmente ningún nucleótido modificado, el marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, en donde el polinucleótido de ARN está presente en la formulación para su administración *in vivo* a un hospedero de tal manera que el nivel de expresión del antígeno en el hospedero supera significativamente el nivel de expresión del antígeno producido por una vacuna de ARNm que tenga un

elemento estabilizador o formulada con un adyuvante y que codifique el primer polipéptido antigénico.

Otros aspectos proporcionan vacunas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que comprende al menos una modificación química u opcionalmente ningún nucleótido modificado, el marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, en donde la vacuna tiene al menos 10 veces menos polinucleótidos de ARN que los necesarios para que una vacuna de ARNm no modificado produzca un título de anticuerpos equivalente. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN está presente en una dosificación de 25-100 microgramos.

Aspectos de la descripción también proporcionan una vacuna unitaria de uso, que comprende entre 10 ug y 400 ug de uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que comprende al menos una modificación química u opcionalmente ningún nucleótido modificado, el marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, formulado para su administración a un sujeto humano. En algunas modalidades, la vacuna comprende además una nanopartícula lipídica catiónica.

Aspectos de la descripción proporcionan métodos para crear, mantener o restaurar la memoria antigénica a una cepa de virus en un individuo o población de individuos que comprenden administrar a dicho individuo o población una vacuna de ácido nucleico de refuerzo de memoria antigénica que comprende (a) al menos un polinucleótido de ARN, dicho polinucleótido que comprende al menos una modificación química u opcionalmente ningún nucleótido modificado y dos o más marcos de lectura abiertos optimizados para codones, dichos marcos de lectura abiertos que codifican un conjunto de polipéptidos antigénicos de referencia, y (b) opcionalmente un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la vacuna se administra al individuo por una vía seleccionada del grupo que consiste en la administración intramuscular, la administración intradérmica y la administración subcutánea. En algunas modalidades, la etapa de administración comprende el contacto de un tejido muscular del sujeto con un dispositivo adecuado para la inyección de la composición. En algunas modalidades, el paso de administración comprende el contacto de un tejido muscular del sujeto con un dispositivo adecuado para la inyección de la composición en combinación con la electroporación.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto

una composición de ARN de la influenza en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. En algunas modalidades, una respuesta inmunitaria específica de antígeno comprende una respuesta de células T o una respuesta de células B. En algunas modalidades, una respuesta inmunitaria específica de antígeno comprende una respuesta de células T y una respuesta de células B. En algunas modalidades, un método para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno implica una única administración de la vacuna. En algunas modalidades, un método incluye además la administración al sujeto de una dosis de refuerzo de la vacuna. En algunas modalidades, la vacuna se administra al sujeto mediante inyección intradérmica o intramuscular.

Aspectos de la descripción proporcionan métodos para vacunar a un sujeto que comprenden la administración al sujeto de una dosificación única de entre 25 ug/kg y 400 ug/kg de una vacuna de ácido nucleico que comprende uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico en una cantidad eficaz para vacunar al sujeto.

Otros aspectos proporcionan vacunas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que comprende al menos una modificación química, el marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, en donde la vacuna tiene al menos 10 veces menos polinucleótidos de ARN que los necesarios para que una vacuna de ARNm no modificado produzca un título de anticuerpos equivalente. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN está presente en una dosificación de 25-100 microgramos.

Otros aspectos proporcionan vacunas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido de ARN formulado en una LNP que tiene un marco de lectura abierto que no comprende modificaciones nucleotídicas (no modificado), el marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, en donde la vacuna tiene al menos 10 veces menos polinucleótido de ARN que el requerido para que una vacuna de ARNm no modificado y no formulado en una LNP produzca un título de anticuerpos equivalente. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN está presente en una dosificación de 25-100 microgramos.

Los datos presentados en los Ejemplos demuestran una mejora significativa de las respuestas inmunitarias utilizando las formulaciones de la descripción. Tanto las vacunas de ARNm químicamente modificado como las no modificadas son útiles de acuerdo con la invención. Sorprendentemente, en contraste con los informes de la técnica anterior según los cuales era preferible utilizar ARNm químicamente no modificado formulado en un

portador para producir vacunas, aquí se describe que las vacunas ARNm-LNP químicamente modificadas requerían una dosis efectiva de ARNm mucho menor que el ARNm no modificado, es decir, diez veces menos que el ARNm no modificado cuando se formulaban en portadores distintos de la LNP. Tanto las vacunas de ARNm químicamente
5 modificado como las no modificadas de la descripción producen mejores respuestas inmunitarias que las vacunas de ARNm formuladas en un portador lipídico diferente.

En otros aspectos, la invención abarca un método para tratar a un sujeto adulto mayor de 60 años o más que comprende administrar al sujeto una vacuna de ácido nucleico que comprende uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de
10 lectura abierto que codifica un polipéptido antigénico del virus en una cantidad eficaz para vacunar al sujeto.

En otros aspectos, la invención abarca un método de tratamiento de un sujeto joven de 17 años o menos que comprende la administración al sujeto de una vacuna de ácido nucleico que comprende uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de
15 lectura abierto que codifica un polipéptido antigénico del virus en una cantidad eficaz para vacunar al sujeto.

En otros aspectos, la invención abarca un método para tratar a un sujeto adulto que comprende administrar al sujeto una vacuna de ácido nucleico que comprende uno o más polinucleótidos de ARN que tienen un marco de lectura abierto que codifica un
20 polipéptido antigénico del virus en una cantidad eficaz para vacunar al sujeto.

En algunos aspectos, la invención es un método de vacunación de un sujeto con una vacuna combinada que incluye al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican antígenos en donde la dosificación de la vacuna es una dosificación terapéutica combinada en donde la dosificación de cada ácido nucleico individual que codifica un
25 antígeno es una dosificación subterapéutica. En algunas modalidades, la dosificación combinada es de 25 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, la dosificación combinada es de 100 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, la dosificación combinada es de 50 microgramos del
30 polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, la dosificación combinada es de 75 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, la dosificación combinada es de 150 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido nucleico administrada al sujeto. En algunas modalidades, la dosificación combinada es de 400 microgramos del polinucleótido de ARN en la vacuna de ácido
35

nucleico administrada al sujeto.

En aspectos preferidos, las vacunas de la descripción (por ejemplo, las vacunas de ARNm encapsulado en LNP) producen niveles, concentraciones y/o títulos profiláctica y/o terapéuticamente eficaces de anticuerpos específicos de antígeno en la sangre o el suero de un sujeto vacunado. Tal y como se define en el presente documento, el término título de anticuerpos se refiere a la cantidad de anticuerpo específico de antígeno producido en un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. En modalidades ejemplares, el título de anticuerpos se expresa como la inversa de la mayor dilución (en una dilución seriada) que aún da un resultado positivo. En algunas modalidades, el título de anticuerpos se determina o mide mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). En modalidades ejemplares, el título de anticuerpos se determina o mide mediante un ensayo de neutralización, por ejemplo, mediante un ensayo de microneutralización. En ciertos aspectos, la medición del título de anticuerpos se expresa como una proporción, como 1:40, 1:100, etc.

En modalidades ejemplares de la descripción, una vacuna eficaz produce un título de anticuerpos superior a 1:40, superior a 1:100, superior a 1:400, superior a 1:1000, superior a 1:2000, superior a 1:3000, superior a 1:4000, superior a 1:500, superior a 1:6000, superior a 1:7500, superior a 1:10000. En modalidades ejemplares, el título de anticuerpos se produce o se alcanza a los 10 días de la vacunación, a los 20 días de la vacunación, a los 30 días de la vacunación, a los 40 días de la vacunación o a los 50 o más días de la vacunación. En modalidades ejemplares, el título se produce o se alcanza tras una única dosis de vacuna administrada al sujeto. En otras modalidades, el título se produce o se alcanza tras múltiples dosis, por ejemplo, tras una primera y una segunda dosis (por ejemplo, una dosis de refuerzo). En aspectos ejemplares de la descripción, los anticuerpos específicos del antígeno se miden en unidades de $\mu\text{g/ml}$ o se miden en unidades de UI/L (unidades internacionales por litro) o mIU/ml (miliunidades internacionales por ml). En modalidades ejemplares de la descripción, una vacuna eficaz produce $>0.5 \mu\text{g/ml}$, $>0.1 \mu\text{g/ml}$, $>0.2 \mu\text{g/ml}$, $>0.35 \mu\text{g/ml}$, $>0.5 \mu\text{g/ml}$, $>1 \mu\text{g/ml}$, $>2 \mu\text{g/ml}$, $>5 \mu\text{g/ml}$ o $>10 \mu\text{g/ml}$. En modalidades ejemplares de la descripción, una vacuna eficaz produce $>10 \text{ mUI/ml}$, $>20 \text{ mUI/ml}$, $>50 \text{ mUI/ml}$, $>100 \text{ mUI/ml}$, $>200 \text{ mUI/ml}$, $>500 \text{ mUI/ml}$ o $>1000 \text{ mUI/ml}$. En modalidades ejemplares, el nivel o la concentración de anticuerpos se produce o se alcanza a los 10 días de la vacunación, a los 20 días de la vacunación, a los 30 días de la vacunación, a los 40 días de la vacunación o a los 50 o más días de la vacunación. En modalidades ejemplares, el nivel o la concentración se produce o se alcanza tras una única dosis de vacuna administrada al sujeto. En otras modalidades, el

nivel o la concentración se produce o se alcanza tras múltiples dosis, por ejemplo, tras una primera y una segunda dosis (por ejemplo, una dosis de refuerzo.) En modalidades ejemplares, el nivel o la concentración de anticuerpos se determina o mide mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En modalidades ejemplares, el nivel o la concentración de anticuerpos se determina o mide mediante un ensayo de neutralización, por ejemplo, mediante un ensayo de microneutralización.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: COMPOSICIÓN DEL PRODUCTO FARMACÉUTICO

La composición del producto farmacéutico es una sustancia farmacológica ARNm de la influenza dirigida a la hemaglutinina Wisconsin 2021/2022.

Tabla 1 Composición de la formulación de la presentación lista para usar (RTU) del medicamento Vacuna contra influenza

Componentes	Función	Concentración, mg/mL
PF-07829855 Sustancia farmacológica (ARNm)	Activo	0.1
ALC-0315	Lípido funcional	1.43
ALC-0159	Lípido funcional	0.18
DSPC	Lípido estructural	0.31
Colesterol	Lípido estructural	0.62
Sacarosa	Crioprotector/Tonificante	1.3
Tris/Trometamina	Solución amortiguadora, pH 7.4	0.18
Tris HCl		1.34
Agua para inyección	Disolvente/vehículo	q.s.

En algunas modalidades, la composición inmunogénica que comprende una molécula de ARNm encapsulada en nanopartículas lipídicas que codifica la HA es monovalente y tiene una dosis seleccionada entre 1 µg de ARNm, 2 µg de ARN, 5 µg de ARN y 20 µg de ARN.

En algunas modalidades, la composición inmunogénica que comprende una nanopartícula lipídica encapsulada de molécula de ARNm que codifica la HA, una segunda nanopartícula lipídica encapsulada de molécula de ARNm que codifica la HA, una tercera nanopartícula lipídica encapsulada de molécula de ARNm que codifica la NA y una cuarta nanopartícula lipídica encapsulada de molécula de ARNm que codifica la NA,

en donde la dosis total es de hasta 20 µg de ARN.

En algunas modalidades, el sujeto tiene entre 30 y 50 años.

EJEMPLO 2: INFORMACIÓN SOBRE EL ENVÍO Y EL CIERRE DEL ENVASE

- 5 El producto farmacéutico se envía congelado en hielo seco. El cierre primario del envase es un vial de vidrio tipo 1 de 2 mL con tapón de 13 mm. El producto farmacológico debe almacenarse entre -60 y -90 °C.

EJEMPLO 3: Formas de dosificación

- 10 Los candidatos a composición inmunogénica de ARNmod de la influenza PF-07252220 incluyen una de 3 formas de dosificación diferentes, seleccionadas entre 2 formas monovalentes y una forma tetravalente, cada una de las cuales incorpora diferentes constructos de ARNm.

Cuatro constructos de ARNmod:

- ARNmod de Wisconsin (Wisc2019 HA)
- 15 • ARNmod de Phuket (Phuk2013 HA)
- ARNmod de Washington (Wash2019 HA)
- ARNmod de Camboya (Camb2020 HA)

- 20 En consecuencia, existen 2 composiciones inmunogénicas monovalentes (también denominadas en este documento productos farmacológicos (PD)) y una composición inmunogénica tetravalente.

1. Monovalente que incluye ARNmod de Wisconsin
2. Monovalente que incluye ARNmod de Phuket
3. Tetravalente, que incluye ARNmod de Wisconsin, ARNmod de Phuket, ARNmod de Washington y ARNmod de Camboya

- 25 La composición inmunogénica se suministra en un vial de vidrio de 2 mL sellado con un tapón de goma de clorobutilo y un cierre de aluminio con tapa de plástico abatible (volumen nominal de 0.3 mL).

4.2. Componentes de la composición inmunogénica

- 30 La composición inmunogénica incluye ARNmod que codifica una glicoproteína de la envoltura de la HA de longitud completa, específica de la cepa y optimizada para el codón, que es responsable de la unión viral a las células blanco y de mediar en la entrada celular.

- 35 La composición inmunogénica es una dispersión estéril sin conservadores de LNP en solución amortiguadora acuosa crioprotectora para administración IM. La composición inmunogénica está formulada a 0.1 mg/mL de ARN en solución amortiguadora Tris 10

mM, sacarosa 300 mM, pH 7.4 en forma de vial monodosis con un volumen de llenado de 0.5 mL/vial y un volumen nominal de 0.3 mL.

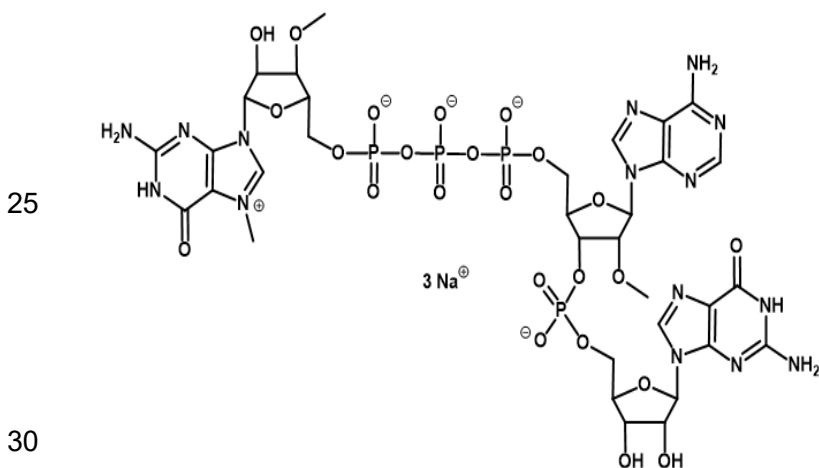
4.2.1. Principio Activo

Los constructos específicos (es decir, ARNmod de Wisconsin [ARNmod de Wisc2019] y ARNmod de Phuket [ARNmod de Phuk2013]) o constructos (tetraivalentes: ARNmod de Wisconsin, ARNmod de Phuket, ARNmod de Washington y ARNmod de Camboya) en la sustancia farmacológica (ARNmod) son los únicos principios activos del PD. La sustancia farmacológica se formula en solución amortiguadora HEPES 10 mM, EDTA 0.1 mM a pH 7.0 y se almacena a 20 ± 5 °C en botellas de HDPE envases flexibles de EVA.

Además de la secuencia optimizada de codones que codifica el antígeno, el ARN contiene elementos estructurales comunes optimizados para mediar en la alta estabilidad del ARN y la eficiencia de la traducción (casquete 5', 5'UTR, UTR en 3', poli(A)-cola; véase la tabla y las secuencias más abajo). Además, un péptido señal intrínseco (sec) forma parte del marco de lectura abierto y se traduce como un péptido N-terminal. El ARN no contiene uridinas; en lugar de uridina se utiliza la N1-metilpseudouridina modificada en la síntesis del ARN.

Cada uno de los constructos específicos comprende los siguientes elementos:

A continuación se muestra el análogo de casquete 5' ($m_2^{7,3'-O}$ Gppp($m_1^{2'-O}$)ApG) para la producción de ARN que contiene una estructura casquete1



La estructura casquete1 (es decir, que contiene un grupo 2'-O-metil en el penúltimo nucleósido del extremo 5' de la cadena de ARN) se incorpora a la sustancia farmacológica utilizando un análogo de casquete respectivo durante la transcripción *in vitro*. En el caso de los ARN con nucleótidos de uridina modificados, la estructura casquete 1 es superior a otras estructuras casquete, ya que casquete1 no es reconocida

por factores celulares como IFIT1 y, por tanto, la traducción dependiente de casquete1 no se inhibe por competencia con el factor de iniciación de la traducción eucariota 4E. En el contexto de la expresión del IFIT1, los ARNm con estructura casquete1 dan niveles de expresión proteica superiores.

5

Tabla 2 Tabla de elementos

Elemento	Descripción	Posición
cap	Una estructura casquete1 en 5' modificada (m ⁷ G+m ³ '-5'-ppp-5'-Am)	1-2
UTR en 5'	Región 5' no traducida derivada del ARN de la alfa-globina humana con una secuencia Kozak optimizada	3-54
UTR en 3'	La región 3' no traducida comprende dos elementos de secuencia derivados del ARNm del potenciador aminoterminal de la división (AES) y del ARN ribosómico 12S codificado mitocondrialmente para conferir estabilidad al ARN y una elevada expresión proteica total.	3880-4174
poli(A)	Una cola de poli(A) de 110 nucleótidos formada por un tramo de 30 residuos de adenosina, seguido de una secuencia enlazadora de 10 nucleótidos y otros 70 residuos de adenosina.	4175-4284

20

Secuencia

GA

25 GAAΨAAAC ΨAGΨAΨΨCΨΨ CΨGGΨCCCCA CAGACΨCAGA GAGAACCCGC 50
CACC 54 (SEQ ID NO: 1)

C ΨCGAGCΨGGΨ ACΨGCAΨGCA 3900
CGCAAΨGCΨA GCΨGCCCCΨΨ ΨCCCGΨCCΨG GGΨACCCCGA GΨCΨCCCCCG 3950
30 ACCΨCGGGΨC CCAGGΨAΨGC ΨCCCACCΨCC ACCΨGCCCCA CΨCACCACCΨ 4000
CΨGCΨAGΨΨC CAGACACCΨC CCAAGCACGC AGCAAΨGCAG CΨCAAAACGC 4050
ΨΨAGCCΨAGC CACACCCCCA CGGGAAACAG CAGΨGAΨΨAA CCΨΨΨAGCAA 4100
ΨAAACGAAAG ΨΨΨAACΨAAG CΨAΨACΨAAC CCCAGGGΨΨG GΨCAAAΨΨΨCG 4150
ΨGCCAGCCAC ACCCΨGGAGC ΨAGC (SEQ ID NO: 2)

35

AAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 4200
 AAAAGCAΨAΨ GACΨAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 4250
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA AAAA 4284 (SEQ ID NO: 3)

5 Ψ = 1-metil-3'-pseudouridililo

El proceso de fabricación comprende la síntesis de ARN mediante el paso de transcripción *in vitro* (IVT), seguido de los pasos de digestión con DNasa I y proteinasa K, la purificación por ultrafiltración/diafiltración (UFDF) y la filtración y dispensación finales.

10 Se utilizó un enfoque de plataforma para los pasos del proceso de IVT, digestión y purificación en la producción de las cuatro sustancias farmacológicas de ARNmod. Los lotes clínicos del principio activo ARNm se prepararon a una escala de 37.6 L de volumen inicial para IVT. El objetivo principal del paso de digestión con DNasa I es reducir el tamaño de la plantilla de ADN lineal para permitir su posterior eliminación a través del

15 paso de ultrafiltración/diafiltración. Se añade una solución de DNasa I al final de la incubación final de IVT. La temperatura y la velocidad de agitación del paso IVT se mantienen durante este paso. El objetivo principal del paso de digestión con proteinasa K es reducir el tamaño de las proteínas en la mezcla de reacción para su posterior eliminación a través del paso de ultrafiltración/diafiltración. La solución de proteinasa K se

20 añade al recipiente de reacción y se incuba durante un tiempo predeterminado. La temperatura y la velocidad de agitación aplicadas durante los pasos de digestión IVT y DNasa se mantienen durante este paso. Todo el material se purifica mediante una única ultrafiltración (UF) de dos etapas y diafiltración (DF) (UFDF) para producir el principio activo de ARN. El paso de UFDF elimina las pequeñas impurezas relacionadas con el

25 proceso y concentra, e intercambia en solución amortiguadora el ARN en la formulación final de DS.

Basándose en la concentración de fracción retenida de ARN determinada tras la diafiltración 2, a continuación, el producto retenido diafiltrado se concentra, si es necesario, y se recupera a través de un filtro de doble capa en un recipiente flexible. El

30 sistema UFDF se enjuaga posteriormente y se añade a la reserva de fracción retenida a través del mismo filtro de doble capa. Puede añadirse solución amortiguadora de formulación. La reserva final se filtra entonces a través de un segundo filtro de doble capa en botella(s) de HDPE.

35 **Tabla 3 Resultados de los lotes de principio activo de la vacuna contra la influenza**

ARNmod Wisconsin

	Atributo de calidad	Procedimiento analítico	Criterios de aceptación	Material de desarrollo	Material de desarrollo	Principio activo clínico
5	Aspecto (Claridad)	Claridad	≤ 6 NTU	NT	≤ 3 NTU	≤ 1 NTU
	Aspecto (coloración)	Coloración	No más intensamente coloreado que el nivel 7 de la norma de color marrón (B).	NT	$\leq B9$	$\leq B9$
	pH	Potenciometría	7.0 ± 0.5	NT	6.8	6.8
10	Contenido (concentración de ARN)	Espectroscopia UV	2.25 ± 0.25 mg/mL	2.40 mg/mL	2.28 mg/mL	2.17 mg/mL
	RT-PCR	Identidad de la secuencia de ARN codificada	Identidad confirmada	NT	Identidad confirmada	Confirmado
15	Integridad del ARN	Electroforesis en gel capilar	$\geq 60\%$	87%	86%	88%
	RP-HPLC	Casquete en 5'	Resultados del informe	82%	82%	83%
	Plantilla de ADN residual	qPCR	≤ 500 ng de ADN/mg de ARN	NT	23 ng/mg	112 ng de ADN/mg de ARN
	Endotoxina	Endotoxina (LAL)	≤ 12.5 EU/mL	NT	0.35 EU/mL	NMT 1.00 EU/mL
20	Biocarga	Biocarga	≤ 1 UFC/10 ml	NT	0 UFC/10 ml	0 UFC/10mL

Las especificaciones sólo se aplican a los suministros clínicos

Abreviaturas: NTU = unidades nefelométricas de turbidez; NT = no analizado; ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa en gotitas digitales; RP-HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa; qPCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; LAL = lisado de amebocitos de limulus; EU = unidad de endotoxina; CFU = unidad formadora de colonias

25

30

35

Tabla 4

Tabla 4 Análisis de lotes para el medicamento clínico de Wisconsin

	Procedimiento analítico	Atributos de calidad	Criterios de aceptación	Resultados del lote
	Composición y concentración			
5	Apariencia (visual)	Apariencia	Suspensión de color blanco a blanquecino	Suspensión de color blanco a blanquecino
	Aspecto (partículas)	Aspecto (partículas visibles)	Puede contener partículas amorfas opacas de color blanco a blanquecino	Cumple
10	Partículas subvisibles	Partículas subvisibles	Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$: ≤ 6000 por envase Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$: ≤ 600 por envase	21 Partículas/envase 1 Partículas/envase
	Potenciometría	pH	7.4 ± 0.5	7.4
	Osmometría	Osmolalidad	240 - 400 mOsmol/kg	364 mOsm/kg
	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	Tamaño LNP	40 -120 nm	67 nm
		Polidispersidad LNP	≤ 0.3	0.2
15	Ensayo de fluorescencia	Contenido de ARN	0.074 - 0.126 mg/mL	0.104 mg/mL
		Encapsulación de ARN	$\geq 80\%$	97%
	HPLC-CAD	Contenido ALC-0315	0.90 - 1.85 mg/mL	1.39 mg/mL
		Contenido ALC-0159	0.11 - 0.24 mg/mL	0.18 mg/mL
		Contenido del DSPC	0.18 - 0.41 mg/mL	0.32 mg/mL
		Contenido de colesterol	0.36 - 0.78 mg/mL	0.61 mg/mL
20	Contenido del envase	Contenido del vial (volumen)	No menos de 0.30 ml	No menos que el volumen etiquetado
	Identidad			
	HPLC-CAD	Identidades lipídicas	Tiempos de retención coherentes con las referencias (ALC-0315, ALC-0159, Colesterol, DSPC)	Tiempos de retención coherentes con las referencias (ALC-0315, ALC-0159, Colesterol, DSPC)
25	RT-PCR	Identidad de la(s) secuencia(s) de ARN codificada(s)	Identidad confirmada	Confirmado
	Pureza			
	Electroforesis en gel capilar	Integridad del ARN	$\geq 55\%$ de ARN intacto (liberación) $\geq 50\%$ de ARN intacto (estabilidad)	87%
	Seguridad			
30	Endotoxina (LAL)	Endotoxina (LAL)	$\leq 12.5 \text{ EU/mL}$	NMT 5.0 EU/mL
	Esterilidad	Esterilidad	No se detecta crecimiento	No se detecta crecimiento

Las especificaciones sólo se aplican a los suministros clínicos

Abreviaturas: NTU = unidades nefelométricas de turbidez; NT = no analizado; ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa en gotitas digitales; RP-HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa; qPCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; LAL = lisado de amebocitos de limulus; UE = unidad de endotoxina; UFC = unidad formadora de colonias.

Tabla 5

Resultados del lote de principio activo de la vacuna contra la influenza ARNmod Phuket

	Atributo de calidad	Procedimiento analítico	Criterios de aceptación	Material de desarrollo	Principio activo clínico
5	Aspecto (Claridad)	Claridad	≤ 6 NTU	NT	≤ 0 NTU
	Aspecto (coloración)	Coloración	No más intensamente coloreado que el nivel 7 de la norma de color marrón (B).	NT	$\leq B9$
	pH	Potenciometría	7.0 ± 0.5	NT	6.8
10	Contenido (concentración de ARN)	Espectroscopia UV	2.25 ± 0.25 mg/mL	2.42 mg/mL	2.20 mg/mL
	RT-PCR	Identidad de la secuencia de ARN codificada	Identidad confirmada	NT	Confirmado
	Integridad del ARN	Electroforesis en gel capilar	$\geq 60\%$	88%	87%
15	RP-HPLC	casquete en 5'	Resultados del informe	85%	88%
	Plantilla de ADN residual	qPCR	≤ 500 ng de ADN/mg de ARN	NT	156 ng de ADN/mg de ARN
	Endotoxina	Endotoxina (LAL)	≤ 12.5 EU/mL	NT	NMT 1.00 EU/mL
	Biocarga	Biocarga	≤ 1 UFC/10 ml	NT	0 UFC/10mL

Las especificaciones sólo se aplican a los suministros clínicos

Abreviaturas: NTU = unidades nefelométricas de turbidez; NT = no analizado; ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa en gotitas digitales; RP-HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa; qPCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; LAL = lisado de amebocitos de limulus; UE = unidad de endotoxina; UFC = unidad formadora de colonias.

Tabla 6 Análisis de lotes para el medicamento clínico Phuket

	Procedimiento analítico	Atributos de calidad	Criterios de aceptación	Resultados del lote
	Composición y resistencia			
5	Apariencia (visual)	Apariencia	Suspensión de color blanco a blanquecino	Suspensión de color blanco a blanquecino
	Aspecto (partículas)	Aspecto (partículas visibles)	Puede contener partículas amorfas opacas de color blanco a blanquecino	Cumple
10	Partículas subvisibles	Partículas subvisibles	Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$: ≤ 6000 por envase Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$: ≤ 600 por envase	46 Partículas/envase <1 Partículas/envase
	Potenciometría	pH	7.4 ± 0.5	7.3
	Osmometría	Osmolalidad	240 - 400 mOsmol/kg	360 mOsm/kg
	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	Tamaño LNP	40 -120 nm	80 nm
		Polidispersidad LNP	≤ 0.3	0.2
15	Ensayo de fluorescencia	Contenido de ARN	0.074 - 0.126 mg/mL	0.086 mg/mL
		Encapsulación de ARN	$\geq 80\%$	94 %
	HPLC-CAD	ALC-0315 Contenido	0.90 - 1.85 mg/mL	1.39 mg/mL
		ALC-0159 Contenido	0.11 - 0.24 mg/mL	0.17 mg/mL
20		Contenido del DSPC	0.18 - 0.41 mg/mL	0.29 mg/mL
		Contenido de colesterol	0.36 - 0.78 mg/mL	0.59 mg/mL
	Contenido del envase	Contenido del vial (volumen)	No menos de 0.30 ml	No menos que el volumen etiquetado
	Identidad			
25	HPLC-CAD	Identidades lipídicas	Tiempos de retención coherentes con las referencias (ALC-0315, ALC-0159, Colesterol, DSPC)	Tiempos de retención coherentes con las referencias (ALC-0315, ALC-0159, Colesterol, DSPC)
	RT-PCR	Identidad de la(s) secuencia(s) de ARN codificada(s)	Identidad confirmada	Confirmado
	Pureza			
30	Electroforesis en gel capilar	Integridad del ARN	$\geq 55\%$ de ARN intacto (liberación)	85 %
	Seguridad			
	Endotoxina (LAL)	Endotoxina (LAL)	≤ 12.5 EU/mL	NMT 5.0 EU/mL
	Esterilidad	Esterilidad	No se detecta crecimiento	No se detecta crecimiento

Tabla 7

**Resultados de lote para principio activo de la vacuna contra la influenza ARNmod
Camboya**

	Atributo de calidad	Procedimiento analítico	Criterios de aceptación	Material de desarrollo	Principio activo clínico
5	Aspecto (Claridad)	Claridad	≤ 6 NTU	NT	≤ 1 NTU
10	Aspecto (coloración)	Coloración	No más intensamente coloreado que el nivel 7 de la norma de color marrón (B).	NT	$\leq B9$
	pH	Potenciometría	7.0 ± 0.5	NT	6.8
	Contenido (concentración de ARN)	Espectroscopia UV	2.25 ± 0.25 mg/mL	2.31 mg/mL	2.18 mg/mL
15	ddPCR	Identidad de la secuencia de ARN codificada	Identidad confirmada	NT	Confirmado
	Integridad del ARN	Electroforesis en gel capilar	$\geq 60\%$	90%	75%
	RP-HPLC	casquete en 5'	Resultados del informe	80%	86%
20	Plantilla de ADN residual	qPCR	≤ 1500 ng de ADN/mg de ARN	NT	221 ng de ADN/mg de ARN
	Endotoxina	Endotoxina (LAL)	≤ 12.5 EU/mL	NT	NMT 1.00 EU/mL
	Biocarga	Biocarga	≤ 1 UFC/10 ml	NT	0 UFC/10mL

Las especificaciones sólo se aplican a los suministros clínicos

Abreviaturas: NTU = unidades nefelométricas de turbidez; NT = no analizado; ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa en gotitas digitales; RP-HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa; qPCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; LAL = lisado de amebocitos de limulus; UE = unidad de endotoxina; UFC = unidad formadora de colonias.

30

35

Tabla 8

Resultados de lote para principio activo de la vacuna contra la influenza ARNmod Washington

	Atributo de calidad	Procedimiento analítico	Criterios de aceptación	Material de desarrollo	Principio activo clínico
5	Aspecto (Claridad)	Claridad	≤ 6 NTU	NT	≤ 1 NTU
10	Aspecto (coloración)	Coloración	No más intensamente coloreado que el nivel 7 de la norma de color marrón (B).	NT	$\leq B9$
	pH	Potenciometría	7.0 ± 0.5	NT	6.9
	Contenido (concentración de ARN)	Espectroscopia UV	2.25 ± 0.25 mg/mL	2.41 mg/mL	2.22 mg/mL
15	RT-PCR	Identidad de la secuencia de ARN codificada	Identidad confirmada	NT	Confirmado
	Integridad del ARN	Electroforesis en gel capilar	$\geq 60\%$	87%	83%
	RP-HPLC	casquete en 5'	Resultados del informe	86%	87%
20	Plantilla de ADN residual	qPCR	≤ 1500 ng de ADN/mg de ARN	NT	364 ng de ADN/mg de ARN
	Endotoxina	Endotoxina (LAL)	≤ 12.5 EU/mL	NT	NMT 1.00 EU/mL
	Biocarga	Biocarga	≤ 1 UFC/10 ml	NT	0 UFC/10mL

Las especificaciones sólo se aplican a los suministros clínicos

Abreviaturas: NTU = unidades nefelométricas de turbidez; NT = no analizado; ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa en gotitas digitales; RP-HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa; qPCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; LAL = lisado de amebocitos de limulus; UE = unidad de endotoxina; UFC = unidad formadora de colonias.

Los parámetros del proceso de formación y estabilización de nanopartículas lipídicas se resumen en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros del proceso de formación y estabilización de las LNP

Intervalo aceptable de parámetro del proceso

Temperatura de la fase acuosa 15-25 °C

Temperatura de la fase orgánica 15-25 °C

- 5 Relación de flujo de la solución amortiguadora de citrato al principio activo diluido para la preparación de la fase acuosa 4:1^a

Relación de flujo de la suspensión de LNP respecto a la solución amortiguadora de citrato para la estabilización 2:1^a

Temperatura del recipiente de recolección de LNP 2-25 °C

- 10 ^aPunto de ajuste objetivo durante la formación de LNP. Las proporciones pueden calcularse a partir de los caudales de entrada.

Formación y estabilización de nanopartículas lipídicas (LNP)

- 15 Para formar las LNP, la solución amortiguadora de citrato se combina en línea con el principio activo diluido en una relación de flujo de 4:1 para crear la fase acuosa. Las fases orgánica y acuosa se introducen en uno o más mezcladores en T para formar las LNP. Tras la formación de la suspensión de LNP, las LNP se estabilizan mediante dilución en línea con solución amortiguadora de citrato en una proporción de 2:1 de suspensión de LNP a solución amortiguadora de citrato y después se recoge en un recipiente que se
- 20 mantiene a 2-25 °C.

Intercambio y concentración de soluciones amortiguadoras

- Para preparar la operación de intercambio de solución amortiguadora y concentración, las membranas de filtración de flujo tangencial (TFF) se lavan con solución amortiguadora Tris para equilibrio.
- 25 Las LNP se procesan a través de una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) donde se concentran y luego se intercambian con 2 diavolumenes de solución amortiguadora tris para eliminar etanol de la suspensión. A continuación, las LNP se concentran aún más y se intercambian con solución amortiguadora con ≥ 8 diavolumenes adicionales de solución amortiguadora Tris.

30

35

Tabla 9 Controles durante el proceso de fabricación de medicamentos

	Descripción	Control durante el proceso	Criterios de aceptación
5	Formación del LNP y estabilización	pH de la solución amortiguadora de citrato	4.0 ± 0.1
	Intercambio de soluciones amortiguadoras, concentración y filtración	pH de la solución amortiguadora Tris	7.5 ± 0.2
10	Ajuste de la concentración y adición de crioprotector	pH de la solución amortiguadora sacarosa/Tris	7.5 ± 0.2
	Ajuste de la concentración y adición de crioprotector	Contenido de ARN antes de Tris adición	≥ 0.133 mg/mL (Acción límite)
15	Filtración estéril	Carga biológica antes de la esterilización filtración	≤ 2 UFC/20 ml
	Filtración estéril	Integridad del filtro antes/después de su uso filtración estéril	Pase
20	Llenado aséptico	Peso de llenado (medida)	$0.5 \text{ ml (0.52 g)} \pm 4\%$

4.2.2. Excipientes

Los excipientes trometamina (base de Tris) y clorhidrato de Tris (HCl) presentes en el producto farmacéutico LNP son componentes amortiguadores utilizados en farmacia y adecuados para lograr el pH deseado del producto. También se incluye sacarosa, que se seleccionó por su efecto estabilizador para permitir el almacenamiento como composición congelada antes de la distribución y la refrigeración en el punto de uso. Los 4 excipientes lipídicos de la composición inmunogénica son lípidos funcionales y estructurales utilizados como parte de la plataforma ARNmod.

4.3. Dosificación y administración

La composición inmunogénica se diluye según sea necesario con solución salina normal, ya sea por dilución en el vial o mezcla de jeringa a jeringa, antes de la administración de las composiciones monovalentes o de la combinación para las

composiciones bivalentes.

Para la dosificación monovalente, la composición inmunogénica se dosifica en el intervalo de 3.75 a 30 µg por dosis con un volumen de inyección de 0.3 mL. Excepto para la dosis de 30 µg, se requiere dilución con cloruro sódico estéril al 0.9% (solución salina normal) para la dosificación. Los 4 niveles de dosis son:

- 3.75 µg de ARNm
- 7.5 µg de ARNm
- 15 µg de ARNm
- 30 µg de ARNm

La composición inmunogénica Wisconsin también se dosifica como vacuna bivalente en combinación con la composición inmunogénica Phuket en un volumen total suministrado de 0.3 mL. El intervalo de dosificación propuesto (ARN total) y las proporciones de la composición inmunogénica Wisconsin (W) con respecto a la composición inmunogénica Phuket (P) en la composición inmunogénica bivalente son:

- 15 µg en 1W:1P (7.5 µg A + 7.5 µg B)
- 30 µg en 1W:1P (15 µg A + 15 µg B)
- 22.5 µg en 1W:2P (7.5 µg A + 15 µg B)
- 18.75 µg en 1W:4P (3.75 µg A + 15 µg B)

Para la dosificación tetravalente, la composición inmunogénica se dosifica con un volumen de inyección de 0.3 mL que contiene cada una de las 4 secuencias de ARNmod para una dosis total de hasta 30 µg. No se requiere dilución para la administración de la composición inmunogénica tetravalente.

Sistema de cierre del envase

Los viales de vidrio de borosilicato de tipo I cumplen las normas USP <660>, Ph. Eur. 3.2.1, y JP 7.01 los requisitos reglamentarios de resistencia hidrolítica para los envases de vidrio de tipo I. Los tapones elastoméricos de clorobutilo cumplen los requisitos USP <381>, Ph. Eur. 3.2.9 y JP 7.03 requisitos reglamentarios de pruebas químicas para tapones elastoméricos.

4.4. Almacenamiento y transporte, etiquetado y envasado del medicamento

La composición inmunogénica se congela y se almacena a temperatura ultrabaja (ULT) (de -90 °C a 60 °C) para su conservación a largo plazo.

La composición inmunogénica del ARNmod de la influenza está formada por uno o más ARNm modificados por nucleósidos que codifican la glicoproteína HA de longitud completa derivada de cepas de influenza humana estacional. El ARNmod está formulado con 2 lípidos funcionales y 2 estructurales, que protegen el ARNmod de la degradación y

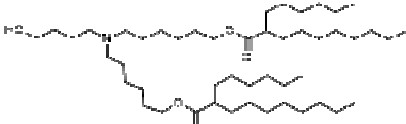
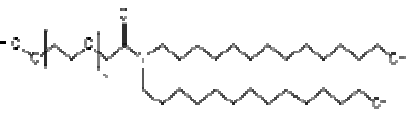
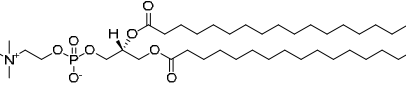
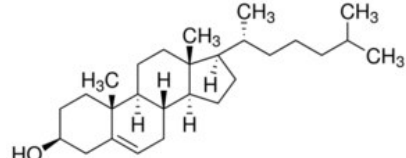
permiten la transfección del ARNmod en las células hospederas tras la inyección IM. La HA de la influenza es la glicoproteína de envoltura más abundante en la superficie de los viriones de la influenza A y B.

La farmacología primaria de la composición inmunogénica del ARNmod de la influenza se evaluó en estudios no clínicos *in vitro* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron el mecanismo de acción de la composición inmunogénica del ARNmod de la influenza, que consiste en codificar la HA de la influenza que induce una respuesta inmunitaria caracterizada tanto por una fuerte respuesta de anticuerpos funcionales como por una respuesta de células T CD4+ de tipo Th1 y una respuesta de células T CD8+ de tipo IFNγ+. Se demostró la expresión *in vitro* eficiente de la glicoproteína HA de las vacunas ARNmod de la influenza en células cultivadas. Los estudios de inmunogenicidad en ratones y ratas demostraron que las vacunas ARNmod contra la influenza provocaban fuertes respuestas de anticuerpos funcionales y neutralizantes y de células T CD4+ y CD8+. Los estudios de inmunogenicidad en ratones, comparados con una vacuna contra influenza inactivada adyuvada autorizada, también respaldan el uso potencial de una formulación de composición inmunogénica de ARNmod de la influenza multivalente para dirigirse a 4 cepas diferentes del virus de la influenza.

Una composición inmunogénica de ARN encapsulado en nanopartículas lipídicas que codifica la HA de la influenza como antígeno de vacuna

La composición inmunogénica del ARNmod de la influenza se basa en una tecnología de plataforma de ARNmod. El ARNmod monocatenario con un casquete en 5', contiene un marco de lectura abierto que codifica el antígeno vacunal HA y presenta elementos estructurales optimizados para una alta eficacia del ARN. El ARNmod también contiene una sustitución de 1-metil-pseudouridina por cada uridina para disminuir el reconocimiento del ARN de la vacuna por los sensores inmunitarios innatos, como los TLR 7 y 8, lo que resulta en una menor activación inmunitaria innata y una mayor traducción de la proteína. El ARNmod se encapsula en una LNP para su administración en las células blanco. La formulación contiene 2 lípidos funcionales, ALC-0315 y ALC-0159, y 2 lípidos estructurales DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina-) y colesterol. Las propiedades fisicoquímicas y las estructuras de los 4 lípidos se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 10 Lípidos en la formulación

	Lípidos	Peso mole- cular [Da]	Fórmula molecular	Estado físico y condición de almacenamiento	Nombre químico (sinónimos) y estructura
5	ALC-0315	766	$C_{48}H_{95}NO_5$	Líquido (aceite) -20°C	((4-hidroxitil)azanodiil)bis(hexano- 6,1-diil)bis(2-hexildecanoato) 
10	ALC-0159	~2400- 2600	$C_{30}H_{60}NO(C_2H_4O)_n$ OCH_3	Sólido -20°C	2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N- ditetradecilacetamida 
15	DSPC	790	$C_{44}H_{88}NO_8P$	Sólido -20°C	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3- fosfocolina 
20	Colesterol	387	$C_{27}H_{46}O$	Sólido -20°C	

CAS = Chemical Abstracts Service; DSPC = 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina

Las vacunas candidatas ARNmod contra la influenza seleccionadas para las pruebas clínicas iniciales contendrán la secuencia codificante de longitud completa y codón optimizado para la glicoproteína HA de las 4 cepas de virus celulares recomendadas para usarse en la temporada de influenza del hemisferio norte 2021-2022.

- A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)
- A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)
- B/Phuket/3073/2013 (B Yamagata)
- B/Washington/02/2019 (B Victoria)

En otra modalidad, la vacuna PF-07252220 (IRV) para suspensión inyectable se suministra como un líquido congelado estéril de color blanco a blanquecino, envasado en un vial de vidrio transparente de 2 mL con tapón de goma, sello de aluminio y tapa con cierre a presión (*flip off*). La solución es un líquido opalescente de color blanco a blanquecino que puede contener partículas amorfas opacas de color blanco a

blanquecino. El vial contiene 0.5 mL con un volumen extraíble de 0.3 mL para dilución adicional mediante mezcla con jeringa. Para la dilución en el vial, el contenido del vial (0.5 mL) debe tenerse en cuenta para la solución de dosificación final. Cada vial incluye los 0.1 mg/mL de PF-07252220 en una construcción de nanopartículas lipídicas (LNP) en 300 mM de sacarosa y 10 mM de Tris, pH 7.4. La formulación no contiene ningún inhibidor del crecimiento microbiológico.

PF-07252220 consta de cinco variaciones; cuatro presentaciones de cepa monovalente y una presentación de cepa tetravalente. Las presentaciones monovalentes pueden mezclarse posteriormente a soluciones dosificadoras bivalentes y tetravalentes en el punto de uso. Los datos de estabilidad presentados a continuación se aplican a todas las presentaciones y mezclas.

- PF-07836259 (Phuket) Suspensión inyectable de ARN mod de la influenza, 0.1 mg/mL
- PF-07829855 (Wisconsin) Suspensión inyectable de ARN mod. de la influenza, 0.1 mg/mL
- PF-07836261 (Washington) Suspensión inyectable de ARN mod de la influenza, 0.1 mg/ml
- PF-07836258 (Camboya) Suspensión inyectable de ARN de la influenza mod, 0.1 mg/ml
- PF-07841697 Suspensión inyectable tetravalente de ARN mod. de la influenza, 0.1 mg/mL.

El producto activo en investigación debe almacenarse entre -90 y -60 °C (-130 y -76 °F) antes de su uso. Los viales deben descongelarse a temperatura ambiente (no más de 30 °C/ 86 °F) durante aproximadamente 30 minutos y luego mezclarse invirtiendo suavemente el/los vial(es) 10 veces. El producto en investigación se administrará por vía intramuscular.

Tabla 11

PREPARACIONES DE DOSIS MONOVALENTES UTILIZANDO VIALES DE 0.5 ML DE VOLUMEN DE LLENADO DE VACUNA ARN MOD MONOVALENTE DE LA INFLUENZA							
Dosis	Tipo de dilución	Volumen de PF-07252220	Volumen de cloruro de sodio al 0.9%	Volumen final de la solución de dosificación	Concentración final de la solución dosificadora (en jeringa/ampolla diluida)	Volumen de inyección final	Número máximo de dosis por vial DP
3.75 mcg	Jeringa a	0.3 ml	2.1 ml	2.4 ml	12.5 mcg/mL	0.3 ml	5
7.5	En vial	0.5 ml	1.5 ml	2 ml	25 mcg/mL	0.3 ml	4
15	En vial	0.5 ml	0.5 ml	1 ml	50 mcg/mL	0.3 ml	2
30	Ninguno	0.5 ml	0 ml	0.5 ml	100 mcg/mL	0.3 ml	1

* Las diluciones del ARN mod de la influenza PF-07252220 no se limitan a las preparaciones descritas en esta tabla. Las instrucciones de preparación proporcionadas en este documento están destinadas a apoyar un diseño clínico específico, sin embargo, la preparación de la dosis no se limita a estos conjuntos de instrucciones específicas. Se aceptan dosis activas en el intervalo de concentración verificado.

Tabla 12

PREPARACIONES DE DOSIS BIVALENTES UTILIZANDO VIALES DE VOLUMEN LLENO DE 0.5 ML DE VACUNA DE ARN MOD MONOVALENTE DE LA INFLUENZA Y MEZCLA DE JERINGA A JERINGA							
Cepa: Dosis (mcg)	Cepa Vial DP	Volumen de PF-07252220 en Vial	Volumen de cloruro de sodio al 0.9% en el vial	Mezcla de jeringa a jeringa (1:1)	Volumen final de la solución dosificadora en la jeringa diluida	Concentración de la solución de dosificación final (contenido activo total)	Volumen de inyección final
1:7.5 mcg 2:7.5 mcg	1	0.5 mL x	0.5 mL	0.3 mL	0.6 mL	50 mcg/mL	0.3 mL
	2	0.5 mL x 1 vial	0.5 mL	0.3 mL			
1:15	1	0.5 mL x	0	0.3 mL			

5	mcg 2:15 mcg	2	0.5 mL x 1 vial	0	0.3 mL	0.6 mL	100 mcg/mL	0.3 mL
	1:30 mcg 2:30 mcg	1	0.5 mL x 2 viales	0	0.5 mL	1 mL	100 mcg/mL	0.6 mL
		2	0.5 mL x 2 viales	0	0.5 mL			

*Las dosis bivalentes pueden hacerse de 2 cepas monovalentes cualesquiera, designadas como cepa 1 y cepa 2

Tabla 13

PREPARACIONES DE DOSIS BIVALENTES UTILIZANDO VIALES DE VOLUMEN LLENO DE 0.5 ML DE VACUNA DE ARN MOD MONOVALENTE DE LA INFLUENZA Y MEZCLA EN VIAL (VOLUMEN DE LA CEPA 1 DEL VIAL TRANSFERIDO A LA CEPA 2 DEL VIAL)							
Cepa: Dosis (mcg)	Cepa vial DP	Volumen de PF- 07252220 en Vial	Volumen del Cloruro sódico al 0.9% en el vial	Mezcla en vial: Volumen de la cepa del vial 1 transferido a la cepa del vial 2	Volumen final de la solución dosificadora en el vial diluido	Concentración de la solución de dosificación final (contenido activo total)	Volumen de inyección final
1:7.5 mcg 2:15 mcg	1	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	1 mL en vial 2	75 mcg/mL	0.3 mL
	2	0.5 mL	0	N/A			
1:3.75 mcg 2:15 mcg	1	0.5 mL	1.5 mL	0.5 mL	1 mL en vial 2	62.5 mcg/mL	0.3 mL
	2	0.5 mL	0	N/A			

*Las dosis bivalentes pueden hacerse de 2 cepas monovalentes cualesquiera, designadas como cepa 1 y cepa 2

Tabla 14

PREPARACIONES DE DOSIS TETRAVALENTES CON VACUNA TETRAVALENTE CONTRA LA INFLUENZA DE ARN MOD DE 100 MCG/ML						
Dosis	Tipo de dilución	Volumen de PF-0725222	Volumen de cloruro sódico al 0.9%	Concentración final de la solución de dosificación	Volumen de inyección	Número máximo de dosis por vial DP
7.5 mcg por cepa	Ninguno	0.5 mL	N/A	100 mcg/mL	0.3 mL	1
15 mcg por cepa	Ninguno	0.5 mL x 2 viales	N/A	100 mcg/mL	0.6 mL	1

Tabla 15

PREPARACIONES DE DOSIS TETRAVALENTES UTILIZANDO VIALES DE 0.5 ML DE VOLUMEN DE LLENADO DE VACUNA DE ARN MOD MONOVALENTE DE LA INFLUENZA Y MEZCLA DE JERINGA A JERINGA							
Cepa Dosis (mcg)	Cepa vial DP	Volumen de PF-07252220 en el vial	Paso 1: Volumen del vial para la mezcla de jeringa a jeringa	Volumen de cloruro de sodio al 0.9 %	Paso 2: Volumen del paso 1 para la mezcla de jeringa a jeringa	Solución de dosificación final Concentración (contenido activo total)	Volumen de inyección final
1:7.5 mcg 2:7.5 mcg 3:22.5 mcg 4:22.5 mcg	1	0.5 mL	0.3 mL	1.6 mL	1.1 mL de la jeringa A	60 mcg/mL	1 mL
	2	0.5 mL	0.3 mL				
	3	0.5 mL x 2 viales	0.6 mL	N/A	0.9 mL de la jeringa B		
	4	0.5 mL x 2 viales	0.6 mL				
1:7.5 mcg 2:7.5 mcg 3:37.5 mcg 4:37.5 mcg	1	0.5 mL	0.3 mL	0.4 mL	0.3 mL de la jeringa A	90 mcg/mL	1 mL
	2	0.5 mL	0.3 mL				
	3	0.5 mL x 2 viales	0.6 mL	N/A	0.9 mL de la jeringa B		
	4	0.5 mL x 2 viales	0.6 mL				

*Se pueden hacer dosis tetravalentes de cualquiera de las 4 cepas monovalentes, designadas como cepa 1, 2, 3 y 4.

EJEMPLO 4: ESTUDIOS NO CLÍNICOS

Se llevó a cabo un estudio inicial de inmunogenicidad en ratones utilizando una composición inmunogénica ARNmod de la influenza que codifica la secuencia HA de A/California/07/2009 (H1N1). Esta secuencia de HA difiere del antígeno de HA H1N1 que se utilizará en el estudio clínico debido a las diferencias de cepa, pero el ARNmod se formuló con la misma composición de LNP clínica y proporciona datos de apoyo para la plataforma.

Los ratones BALB/c fueron inmunizados IM con 1 µg de la vacuna ARNmod contra la influenza formulada con LNP en los días 0 y 28. La prueba ELISA de los sueros obtenidos en los días 28 y 49 mostró niveles elevados de IgG de unión a HA. Los sueros obtenidos tan pronto como 14 días después de la primera dosis tenían altos títulos de neutralización contra el virus de la influenza A/California/07/2009, y para el Día 49 (21 días después de la segunda dosis) los títulos de neutralización de la influenza en suero superaban 1×10^4 . Los títulos de HAI contra A/California/07/2009 medidos en los sueros extraídos el día 49 superaban con creces el título de 40 que generalmente se acepta como protector contra la influenza en humanos. Los ratones BALB/c fueron inmunizados dos veces IM con 1 µg de la vacuna candidata. La IgG específica de HA se midió mediante ELISA. La funcionalidad de los anticuerpos se midió mediante microneutralización del virus de la influenza. El ELISpot de IFN γ utilizando esplenocitos cosechados el día 49 y estimulados con péptidos específicos de antígeno mostró fuertes respuestas de células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$. Estos datos confirmaron que el ARNmod formulado con las LNP provocó respuestas de células T de fenotipo Th1. Los ratones BALB/c recibieron 2 inmunizaciones IM con 1 µg de ARNmod que codificaba la HA de la influenza. La respuesta de las células T se analizó utilizando péptidos específicos de antígeno para estimular las células T recuperadas del bazo. La liberación de IFN γ se midió tras la estimulación con péptidos mediante un ensayo ELISpot.

El ensayo serológico primario utilizado para medir las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna contra la influenza es el ensayo de inhibición de la hemaglutinina, o HAI. El HAI mide cuantitativamente anticuerpos funcionales en el suero que impiden la aglutinación de glóbulos rojos mediada por HA en reacciones con muestras de suero pretratadas con enzimas destructoras de receptores, virus de la influenza y glóbulos rojos derivados de pavo o conejillo de indias. El título de la HAI es el recíproco de la dilución más alta de suero que resulta en la pérdida de actividad de HA, visualizada como una forma de lágrima cuando la placa de microtitulación está inclinada. Los títulos de múltiples determinaciones por muestra se informan como títulos medios geométricos (GMT). Un

título de HAI de $\geq 1:40$ se acepta generalmente como protector en humanos. Se han desarrollado ensayos HAI para cada una de las 4 cepas de influenza, A/Wisconsin/588/2019 (H1N1), A/Camboya/e0826360/2020 (H3N2), B/Phuket/3073/2013 (B Yamagata) y B/Washington/02/2019 (B Victoria).

- 5 El ensayo de microneutralización del virus de la influenza, o MNT, mide cuantitativamente los anticuerpos funcionales presentes en el suero que neutralizan la actividad del virus de la influenza, impidiendo la infección productiva de una monocapa de células hospedera. La reacción de neutralización se produce cuando el virus de la influenza se incuba con muestras de suero; esta mezcla de reacción se aplica después a una monocapa de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) para medir el grado de neutralización. Los títulos de MNT se notifican como el recíproco de la dilución que da lugar a una reducción del 50% de la infección cuando en comparación con un control sin suero.

15 **Estudio para evaluar la viabilidad de la vacuna contra la influenza HA con ARNmod bivalente con principio activo (ARN) premezclado para formar una LNP y brazos de LNP posmezclados**

Tal como se utiliza aquí, a menos que se indique lo contrario, un principio activo "premezclado" se refiere a una composición en donde el ARN que expresa HA o NA se mezcla en una proporción deseada, seguida de una formulación única en una LNP. Un producto farmacológico "posmezclado" se refiere a una composición en donde cada ARN que expresa HA o NA se encapsula en una LNP y las LNP encapsuladas con ARN resultantes se mezclan a continuación en una proporción deseada.

Se examinaron los títulos de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HAI) en ratones a los que se administró una formulación como la descrita en la tabla siguiente.

Tabla de diseño del estudio:

Tabla 16

Gp#	Ratones	Producto farmacológico de ARN (DP, es decir, LNP de ARN encapsulado) Descripción	Dosis (µg)	Dosis Vol/Vía	Vax (Día)	Sangrado (Día)
1	10	Solución salina	-	50 µl/ IM	0, 28	21, 42
2	10	LNP ARNmod HA monovalente - Cepa Wisc 10 mM Tris y 300 mM Sacarosa	1	50 µl/ IM	0, 28	21, 42
3	10	LNP ARNmod HA monovalente - Cepa Wisc 10 mM Tris y 300 mM Sacarosa	0.2	50 µl/ IM	0, 28	21, 42

5	4	10	LNP ARNmod HA monovalente - Ceba Phuket 10 mM Tris y 300 mM Sacarosa	1	50 µl/ IM	0, 28	21, 42
	5	10	LNP ARNmod HA monovalente - Ceba Phuket 10 mM Tris y 300 mM Sacarosa	0.2	50 µl/ IM	0, 28	21, 42
	6	10	LNP ARNmod HA premezcla bivalente, es decir, Wisconsin bivalente y Phuket (DS mezclado antes de la formación de la LNP) 10 mM Tris y 300 mM Sacarosa	2	50 µl / IM	0, 28	21, 42
	7	10	LNP ARNmod HA premezcla bivalente, es decir, Wisconsin bivalente y Phuket (DS mezclado antes de la formación de la LNP) 10 mM Tris y 300 mM Sacarosa	0.4	50 µl / IM	0, 28	21, 42
	8	10	LNP ARNmod HA posmezcla bivalente, es decir, Bivalente Wisconsin y Phuket (mezcla LNP) 10 mM Tris y 300 mM Sacarosa	2	50 µl / IM	0, 28	21, 42
10							
15	9	10	LNP ARNmod HA posmezcla bivalente, es decir, Bivalente Wisconsin y Phuket (mezcla LNP) 10 mM Tris y 300 mM Sacarosa	0.4	50 µl / IM	0, 28	21, 42

Los títulos elevados de HAI fueron inducidos por el ARNmod de HA de Wisconsin a las 3 semanas de la dosis 1.

20 HAI ligeramente superior en los grupos bivalentes.

HAI más alto en la formulación premezclada para bivalente a dosis de 0.2ug. Véanse las tablas 17-18 a continuación.

Tabla 17 GMT 3 semanas después de la dosis 1 (Wisconsin)

25	GMT:	10	422	260	453	130
	Muestra:	Solución salina (Grupo 1)	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla	bi-val. posmezcla
30	Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

Tabla 18 GMTs 3 semanas después de la dosis 1 (Phuket)

GMT:	10	25	13	28	10
Muestra:	Solución salina (Grupo 1)	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla	bi-val. posmezcla
Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

También se observó que los títulos de Ab neutralizante al 50% eran comparables entre el producto farmacológico premezclado y el posmezclado. Véanse las tablas 19-22 a continuación.

Tabla 19 a las 3 semanas tras la dosis 1 (contra Wisconsin)

GMT	165	14319	9393	24043	5221
Muestra:	Solución salina	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla.	bi-val. posmezcla.
Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

Tabla 20 a las 2 semanas tras la dosis 2 (contra Wisconsin)

GMT	169	1286052	290731	1187870	278031
Muestra:	Solución salina	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla.	bi-val. posmezcla.
Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

Tabla 21 a las 3 semanas tras la dosis 1 (contra Phuket)

GMT	60	730	1051	1089	265
Muestra:	Solución salina	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla.	bi-val. posmezcla.
Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

Tabla 22 a las 2 semanas tras la dosis 2 (contra Phuket)

GMT	103	31818	6800	29035	8186
Muestra:	Solución salina	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla.	bi-val. posmezcla.
Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

Los títulos de HAI fueron comparables entre el producto farmacéutico premezclado y el posmezclado. Véanse las tablas 23-26 a continuación.

Tabla 23 a las 3 semanas tras la dosis 1 (contra Wisconsin)

GMT	10	422	260	453	130
Muestra:	Solución salina	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla.	bi-val. posmezcla.
Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

Tabla 24 a las 2 semanas tras la dosis 2 (contra Wisconsin)

GMT	10	2986	2389	3152	2229
Muestra:	Solución salina	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla.	bi-val. posmezcla.
Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

Tabla 25 a las 3 semanas tras la dosis 1 (contra Phuket)

GMT	10	25	13	28	10
Muestra:	Solución salina	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla.	bi-val. posmezcla.
Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

Tabla 26 a las 2 semanas tras la dosis 2 (contra Phuket)

	GMT	10	1040	243	844	184
	Muestra:	Solución salina	premezcla bi-val.	premezcla bi-val.	bi-val. posmezcla.	bi-val. posmezcla.
5	Dosis de ARN (ug)	--	2	0.4	2	0.4

EJEMPLO 5: DESCRIPCIÓN DEL MEDICAMENTO TETRAVALENTE

El producto farmacológico tetraivalente es una dispersión estéril sin conservadores de nanopartículas líquidas (NPL) en solución amortiguadora acuosa crioprotectora para administración intramuscular. El producto farmacológico está formulado a 0.1 mg/mL de ARN en solución amortiguadora Tris 10 mM, sacarosa 300 mM, pH 7.4.

El medicamento se suministra en un vial de vidrio de 2 mL sellado con un tapón de goma de clorobutilo y un cierre de aluminio con tapa de plástico abatible (volumen nominal máximo de 0.3 mL).

Tabla 27

Composición del medicamento tetraivalente						
	Nombre del ingrediente	Grado/ Norma de calidad	Función	Fórmula unitaria (mg/mL)	Cantidad llenada (Total mg/vial)	Cantidad nominal o cantidad neta (Neto mg/vial)
20	PF-07829855 Principio activo (Wisconsin)	Especificación interna	Ingrediente activo	0.025	0.013	0.008
	PF-07836258 Principio activo (Camboya)	Especificación interna	Ingrediente activo	0.025	0.013	0.008
	PF-07836259 Principio activo (Phuket)	Especificación interna	Ingrediente activo	0.025	0.013	0.008
	PF-07836261 Principio activo (Washington)	Especificación interna	Ingrediente activo	0.025	0.013	0.008
25	ALC-0315 ^a	Especificación interna	Lípido funcional	1.43	0.72	0.43
	ALC-0159 ^b	Especificación interna	Lípido funcional	0.18	0.09	0.05
	DSPC ^c	Especificación interna	Lípido estructural	0.31	0.16	0.09
	Colesterol	Ph. Eur., NF	Lípido estructural	0.62	0.31	0.2
30	Sacarosa	Ph. Eur., NF	Crioprotector	102.69	51.35	30.81
	Trometamina (Tris base)	Ph. Eur., USP	Componente amortiguador	0.20	0.10	0.06
	Clorhidrato de Tris (hidroximetil) aminometano (Tris HCl)	Especificación interna	Componente amortiguador	1.32	0.66	0.40

Composición del medicamento tetravalente					
Nombre del ingrediente	Grado/ Norma de calidad	Función	Fórmula unitaria (mg/mL)	Cantidad llenada (Total mg/vial)	Cantidad nominal o cantidad neta (Neto mg/vial)
Agua para inyección	Ph. Eur., USP, JP	Disolvente	q.s. ^d a 1.00 ml	q.s. ^d a 0.50 mL	q.s. ^d a 0.30 ml
a. ALC-0315 = ((4-hidroxibutil)azanodiil)bis(hexano-6.1-diil)bis(2-hexildecanoato) b. ALC-0159 = 2-[[[polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida c. DSPC = 1.2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina d. q.s. es una abreviatura de <i>quantum satis</i> que significa tanto como sea suficiente.					

La temperatura de almacenamiento recomendada del principio activo FIH es de -20±5°C.

La temperatura recomendada de almacenamiento a largo plazo del medicamento FIH es de -60 a -90°C.

El producto farmacéutico puede almacenarse a 2-8°C en el punto de uso.

Tabla 28 Análisis de lotes para el medicamento clínico tetravalente

Procedimiento analítico	Atributos de calidad	Criterios de aceptación	
Composición y concentración			
Apariencia (visual)	Apariencia	Suspensión de color blanco a blanquecino	
Aspecto (partículas)	Aspecto (partículas visibles)	Puede contener partículas amorfas opacas de color blanco a blanquecino	
Partículas subvisibles	Partículas subvisibles	Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$: ≤ 6000 por envase Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$: ≤ 600 por envase	
Potenciometría	pH	7.4 $\pm$ 0.5	
Osmometría	Osmolalidad	240 - 400 mOsmol/kg	
Dispersión dinámica de la luz (DLS)	Tamaño LNP	40 -120 nm	
	Polidispersidad LNP	≤ 0.3	
Ensayo de fluorescencia	Contenido de ARN	0.074 - 0.126 mg/mL	
	Encapsulación de ARN	$\geq 80\%$	
HPLC-CAD	Contenido ALC-0315	0.90 - 1.85 mg/mL	
	Contenido ALC-0159	0.11 - 0.24 mg/mL	
	Contenido del DSPC	0.18 - 0.41 mg/mL	
	Contenido de colesterol	0.36 - 0.78 mg/mL	

Tabla 28 Análisis de lotes para el medicamento clínico tetravalente

	Procedimiento analítico	Atributos de calidad	Criterios de aceptación	
	Contenido del envase	Contenido del vial (volumen)	No menos de 0.30 mL	
5	Identidad			
	HPLC-CAD	Identidades lipídicas	Tiempos de retención coherentes con las referencias (ALC-0315, ALC-0159, Colesterol, DSPC)	
10	RT-PCR	Identidad de la(s) secuencia(s) de ARN codificada(s)	Identidad confirmada	
	Pureza			
	Electroforesis en gel capilar	Integridad del ARN	≥ 55% de ARN intacto (liberación) ≥ 50% de ARN intacto (estabilidad)	
15	Seguridad			
	Endotoxina (LAL)	Endotoxina (LAL)	≤ 12.5 EU/mL	
	Esterilidad	Esterilidad	No se detecta crecimiento	
	Incursión del colorante	Integridad del cierre del envase	Aprueba	

Tabla 29 Análisis de lotes para el medicamento clínico tetravalente

	Procedimiento analítico	Atributos de calidad	Criterios de aceptación	
20	Composición y concentración			
	Apariencia (visual)	Apariencia	Suspensión de color blanco a blanquecino	
25	Aspecto (partículas)	Aspecto (partículas visibles)	Puede contener partículas amorfas opacas de color blanco a blanquecino	
	Partículas subvisibles	Partículas subvisibles	Partículas ≥ 10 µm : ≤ 6000 por envase Partículas ≥ 25 µm: ≤ 600 por envase	
30	Potenciometría	pH	7.4 ± 0.5	
	Osmometría	Osmolalidad	240 - 400 mOsmol/kg	
	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	Tamaño LNP	40 -120 nm	
		Polidispersidad LNP	≤ 0.3	
	Ensayo de fluorescencia	Contenido de ARN	0.074 - 0.126 mg/mL	
35		Encapsulación de ARN	≥ 80%	

Tabla 29 Análisis de lotes para el medicamento clínico tetravalente

5	Procedimiento analítico		
	Atributos de calidad	Criterios de aceptación	
5	HPLC-CAD	Contenido de ALC-0315	0.90 - 1.85 mg/mL
		Contenido de ALC-0159	0.11 - 0.24 mg/mL
		Contenido del DSPC	0.18 - 0.41 mg/mL
		Contenido de colesterol	0.36 - 0.78 mg/mL
10	Contenido del envase	Contenido del vial (volumen)	No menos de 0.30 ml
	Identidad		
15	HPLC-CAD	Identidades lipídicas	Tiempos de retención coherentes con las referencias (ALC-0315, ALC-0159, Colesterol, DSPC)
	RT-PCR	Identidad de la(s) secuencia(s) de ARN codificada(s)	Identidad confirmada
20	Pureza		
	Electroforesis en gel capilar	Integridad del ARN	≥ 55% de ARN intacto (liberación) ≥ 50% de ARN intacto (estabilidad)
	Seguridad		
	Endotoxina (LAL)	Endotoxina (LAL)	≤ 12.5 EU/mL
25	Esterilidad	Esterilidad	No se detecta crecimiento
	Incursión del colorante	Integridad del cierre del envase	Aprueba

EJEMPLO 6: Estudio de la LNP tetravalente de ARNmod contra influenza HA

El siguiente ejemplo describe un estudio de LNP tetravalente de ARNmod contra influenza HA, en el que se administraron a ratones diferentes materiales de LNP ARNmod contra influenza HA como se detalla en la tabla siguiente. Los sueros recogidos en el día 21 post cebado y en el día 42 (14 días post cebado) se evaluaron mediante pruebas serológicas (HAI, y neutralización).

Tabla 30

	Ratones	Descripción de ARN DP	Dosis (µg)	Dosis Vol / Vía	Vax (Día)	Sangrado (Día)
5	10	Solución salina	-	50 µl / IM	0, 28	21, 42
	10	Tetravalente (ARNmod premezclados y coformulados)	4	50 µl / IM	0, 28	21, 42
10	10	Tetravalente (ARNmod premezclados y coformulados)	0.8	50 µl / IM	0, 28	21, 42
	10	Tetravalente (LNP fabricadas por separado y mezcladas), "posmezclado"	4 (1ug cada una)	50 µl / IM	0, 28	21, 42
15	10	Tetravalente (LNP fabricadas por separado y mezcladas) "posmezcladas"	0.8 (0.2ug cada uno)	50 µl / IM	0, 28	21, 42

Los títulos de HAI fueron comparables entre el producto farmacológico premezclado y el posmezclado en D21, véanse las tablas 31-35 siguientes.

Tabla 31 GMT 3 semanas después de la dosis 1 (Wisconsin)

20	GMT:	10	686	343	485	299
	Muestra:	Solución salina (Grupo 1)	Premezclado	Premezclado	Posmezclado	Posmezclado
25	Dosis de ARN (ug)	--	4	0.8	4	0.8

Tabla 32 GMT 3 semanas después de la dosis 1 (Camboya)

30	GMT:	10	686	343	485	299
	Muestra:	Solución salina (Grupo 1)	Premezclado	Premezclado	Posmezclado	Posmezclado
	Dosis de ARN (ug)	--	4	0.8	4	0.8

Tabla 33 GMT 3 semanas después de la dosis 1 (Camboya)

GMT:	28	40	49	46	53
Muestra:	Solución salina (Grupo 1)	Premezclado	Premezclado	Posmezclado	Posmezclado
Dosis de ARN (ug)	--	4	0.8	4	0.8

Tabla 34 GMT 3 semanas después de la dosis 1 (Washington)

GMT:	14	26	21	30	23
Muestra:	Solución salina (Grupo 1)	Premezclado	Premezclado	Posmezclado	Posmezclado
Dosis de ARN (ug)	--	4	0.8	4	0.8

Tabla 35 GMT 3 semanas después de la dosis 1 (Phuket)

GMT:	10	61	36	--	53
Muestra:	Solución salina (Grupo 1)	Premezclado	Premezclado	Posmezclado	Posmezclado
Dosis de ARN (ug)	--	4	0.8	4	0.8

H1N1 A/Wisconsin: se observaron títulos de neutralización del 50% comparables entre la premezcla y la posmezcla. H3N2 A/Camboya: se observaron títulos de neutralización comparables del 50% entre la premezcla y la posmezcla. Bv/Phuket: se observaron títulos de neutralización comparables del 50% entre la premezcla y la posmezcla. Bv/Washington: se observaron títulos de neutralización comparables del 50% entre la premezcla y la posmezcla.

EJEMPLO 7: Datos de inmunogenicidad en ratones de una vacuna multivalente contra la influenza ARNmod, continuación.

Para evaluar la viabilidad de una formulación multivalente de la vacuna contra influenza de ARNmod, se generaron ARNmod que codifican 4 proteínas HA y 4 proteínas

neuraminidasa (NA) diferentes. Se compararon las respuestas inmunitarias provocadas por ratones vacunados con ARNmod formulado con LNP que codificaba una única cepa específica de HA o NA con grupos vacunados con una formulación octavalente de HA/NA ARNmod. Se compararon los métodos de formulación octavalente formulando por separado cada ARNmod que expresaba HA o NA en LNP y mezclando después las ocho LNP en proporciones iguales, o mezclando previamente los ocho ARNmod seguidos de una única coformulación en LNP.

Se inmunizó a ratones BALB/c por vía IM con 2 µg de cada ARNmod que expresaba HA y NA, ya fuera como formulación de vacuna monovalente u octavalente en LNPs en los días 0 y 28. Se obtuvieron respuestas sólidas de anticuerpos y células T con el ARNmod formulado en LNP frente a todos los componentes de HA y NA, a niveles similares o superiores a los del comparador de la vacuna autorizada. Se observaron respuestas similares de HAI y neutralizantes en el día 49 (21 días después del segundo refuerzo) para las formulaciones individuales de HA y octavalente para las cepas de influenza A. Los anticuerpos medidos contra la NA mostraron una tendencia similar a la de la HA (datos no mostrados). Los estudios de inmunogenicidad en ratones, comparados con una vacuna contra influenza inactivada adyuvada autorizada, respaldan el uso potencial de una formulación de vacuna contra influenza ARNmod multivalente para blanco de al menos cuatro cepas diferentes del virus de la influenza. Los estudios iniciales de inmunogenicidad en ratones de una vacuna octavalente HA/NA ARNmod no indicaron interferencias para las cepas de influenza A y mostraron respuestas de anticuerpos para las cepas de influenza B en comparación con las vacunas monovalentes de control. Estos datos iniciales de inmunogenicidad en ratones apoyan el uso de una formulación multivalente de ARNmod.

Cláusulas

1. Una vacuna contra el virus de la influenza, que comprende: al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tiene un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, formulado en una nanopartícula lipídica.

2. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde el ARN comprende además un análogo de casquete 5'.

3. La vacuna contra influenza de la cláusula 2, en donde el análogo de casquete 5' comprende $m_2^{7,3'-O}$ Gppp($m_1^{2'-O}$)ApG.

4. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde el ARN comprende

además un nucleótido modificado.

5. La vacuna contra influenza de la cláusula 4, en donde el nucleótido modificado comprende N1-metilpseudouridina-5'-trifosfato (m1ΨTP).

6. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde el al menos un polipéptido antigénico es la hemaglutinina 1 de la influenza (HA1), la hemaglutinina 2 (HA2), un fragmento inmunogénico de HA1 o HA2, o una combinación de dos o más de los anteriores.

7. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde al menos un polipéptido antigénico es HA1, HA2 o una combinación de HA1 y HA2, y al menos un polipéptido antigénico se selecciona del grupo que consiste en neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de la matriz 1 (M1), proteína de la matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1) y proteína no estructural 2 (NS2).

8. La vacuna contra influenza de la cláusula 1, en donde al menos un polipéptido antigénico es HA1, HA2 o una combinación de HA1 y HA2, y al menos un polipéptido antigénico es neuraminidasa (NA).

9. La vacuna contra influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende **a)** al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tenga un marco de lectura abierto que codifique la hemaglutinina 1 (HA1) de la influenza; **b)** al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tenga un marco de lectura abierto que codifique la hemaglutinina 2 (HA2); **c)** al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tenga un marco de lectura abierto que codifique al menos un polipéptido antigénico se selecciona del grupo que consiste en neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de la matriz 1 (M1), proteína de la matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1) y proteína no estructural 2 (NS2) **y d)** al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tenga un marco de lectura abierto que codifique al menos un polipéptido antigénico se selecciona del grupo que consiste en neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1) y proteína no estructural 2 (NS2).

10. La vacuna contra la influenza de acuerdo con la cláusula 5, en donde el marco de lectura abierto está optimizado para codones.

11. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende además un lípido catiónico.

12. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende una nanopartícula lipídica que engloba la molécula de ARNm.

13. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición

- comprende **a)** una nanopartícula lipídica que engloba al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) con un marco de lectura abierto que codifica la hemaglutinina 1 (HA1) de la influenza; **b) una** nanopartícula lipídica que engloba al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) con un marco de lectura abierto que codifica la hemaglutinina 2 (HA2); **c) una** nanopartícula lipídica que engloba al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tiene un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico se selecciona del grupo que consiste en neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1) y proteína no estructural 2 (NS2); **y d)** una nanopartícula lipídica que engloba al menos un polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) con un marco de lectura abierto que codifica al menos un polipéptido antigénico se selecciona del grupo formado por la neuraminidasa (NA), la nucleoproteína (NP), la proteína de matriz 1 (M1), la proteína de matriz 2 (M2), la proteína no estructural 1 (NS1) y la proteína no estructural 2 (NS2).
14. La vacuna contra influenza de la cláusula 13, en donde el tamaño de la nanopartícula lipídica es de al menos 40 nm.
15. La vacuna contra influenza de la cláusula 13, en donde el tamaño de la nanopartícula lipídica es como máximo de 180 nm.
16. La vacuna contra influenza de la cláusula 13, en donde al menos el 80% del ARN total de la composición está encapsulado.
17. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende
18. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende ALC-0315 (4-hidroxibutil)azanediilbis(hexano-6.1-diil)bis(2-hexildecanoato).
19. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende ALC-0159 (2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida).
20. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC).
21. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende colesterol.
22. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende 0.9-1.85 mg/mL de ALC-0315; 0.11-0.24 mg/mL de ALC-0159; 0.18 - 0.41 mg/mL de DSPC; y 0.36 - 0.78 mg/mL de colesterol.
23. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende Tris.

24. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende sacarosa.

25. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición no comprende además cloruro de sodio.

5 26. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende Tris 10 mM.

27. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición comprende 300 mM de sacarosa.

10 28. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición tiene un pH de 7.4.

29. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde la composición tiene menos o igual a 12.5 EU/mL de endotoxinas bacterianas.

15 30. La vacuna contra la influenza de la cláusula 1, en donde el polinucleótido de ARN comprende un casquete 5', una UTR en 5', una UTR en 3', un horquilla de histona y una cola de poli-A.

31. La vacuna contra influenza de la cláusula 30, en donde la UTR en 5' comprende la secuencia AATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCC (UTR1 en 5' de OMS) (SEQ ID No: 4).

20 32. La vacuna contra influenza de la cláusula 30, en donde la UTR en 5' comprende la secuencia GAGAAΨAAACΨAGΨAΨCΨΨ CΨGGGΨCCCCA CAGACΨCAGA GAGAACCCGCCACC (SEQ ID NO: 5)

33. La vacuna contra influenza de la cláusula 30, en donde la UTR en 5' comprende la secuencia AGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCC (UTR1 en 5' de OMS). (SEQ ID NO: 6)

25 34. La vacuna contra influenza de la cláusula 30, en donde la UTR en 3' comprende la secuencia
CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUA
CCCCGAGUCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCACCUCACCACCUGCUAGU
UCCAGACCUCCUCCAGCACCUCUCCACCACGCAGCAAUGCAGCUAAAACGCUUA
30 GCACCCACCCACCCACGGGAAACCAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAG
UUAACUAAGCUAUACCCACGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACCCUGGAGCUA
GC (UTR2 en 3' de OMS). (SEQ ID NO: 7)

35. La vacuna contra influenza de la cláusula 30, en donde el UTR en 3' comprende la secuencia

35 CΨCGAGCΨGGΨACΨGCAΨGCACGCAAΨGCΨAGCΨGCCCCΨΨΨCCCGΨCCΨGGG

ΨACCCCGAGΨCΨCCCCGACCΨCGGGΨCCCAGGΨAΨGCΨCCCACCΨCCACCΨG
 CCCCACΨCACCACCΨCΨGCΨAGΨΨCCAGACACCΨCCCAAGCACGCAGCAAΨGCA
 GCΨCAAAACGCΨΨAGCCΨAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGΨGAΨΨAACCCΨ
 ΨΨAGCAAΨAAACGAAAGΨΨΨAACΨAAGCΨAΨACΨAACCCCAGGGΨΨGGΨCAAΨΨ
 5 ΨCGΨGCCAGCCACACCCΨGGAGCΨAGC (ΨTR2 en 3' de OMS).(SEQ ID NO: 8).

36. Una composición inmunogénica que comprende (i) un primer polinucleótido de ácido ribonucleico (ARN) que tiene 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
 10 ARN que tenga un marco de lectura abierto que codifique un segundo antígeno, dicho segundo antígeno que comprenda 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 estén formulados en una nanopartícula lipídica (LNP).

37. La composición inmunogénica de la cláusula 36, en donde el primer y segundo
 15 antígenos comprenden hemaglutinina (HA), o un fragmento inmunogénico o variante de la misma.

38. La composición inmunogénica de la cláusula 36 o 37 en donde el primer antígeno comprende una HA de un subtipo diferente de virus de la influenza al polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo del segundo
 20 antígeno.

39. La composición inmunogénica de cualquiera de las cláusulas 36 - 38, en donde el primer y el segundo polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

40. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior que comprende
 25 además: (iii) un tercer 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 del virus de la influenza pero es de una cepa de virus de la influenza diferente a los antígenos primero y segundo.

41. La composición inmunogénica de la cláusula 40, en donde el primer, segundo y
 30 tercer polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

42. La composición inmunogénica de la cláusula 41, en donde el primer, segundo y tercer polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

43. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior que comprende
 35 además: (iv) un cuarto polinucleótido de ARN que tiene 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.

5 44. La composición inmunogénica de la cláusula 43, en donde el primero, segundo, tercero y cuarto polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

45. La composición inmunogénica de la cláusula 44, en donde el primero, segundo, tercero y cuarto polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

10 46. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior que comprende además: (v) un quinto polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica un quinto antígeno, dicho antígeno que comprende al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el quinto antígeno es del virus de la influenza pero es de una cepa de virus de la influenza diferente a los antígenos primero, segundo, tercero y cuarto.

15 47. La composición inmunogénica de la cláusula 46, en donde el primero, segundo, tercero, cuarto y quinto polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

20 48. La composición inmunogénica de la cláusula 47, en donde el primero, segundo, tercero, cuarto y quinto polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

25 49. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior que comprende además: (vi) un sexto polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica un sexto antígeno, dicho antígeno que comprende al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el sexto antígeno es del virus de la influenza pero es de una cepa de virus de la influenza diferente a los antígenos primero, segundo, tercero, cuarto y quinto.

50. La composición inmunogénica de la cláusula 49, en donde el primero, segundo, tercero, cuarto y quinto polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

30 51. La composición inmunogénica de la cláusula 50, en donde el primero, segundo, tercero, cuarto y quinto polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

35 52. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior que comprende además: (vii) un séptimo polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica un séptimo antígeno, dicho antígeno que comprende al menos un polipéptido

antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el séptimo antígeno es del virus de la influenza pero es de una cepa de virus de la influenza diferente a los antígenos primero, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto.

53. La composición inmunogénica de la cláusula 52, en donde el primero, segundo,
5 tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

54. La composición inmunogénica de la cláusula 53, en donde el primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

10 55. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior que comprende además: (viii) un octavo polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica un octavo antígeno, dicho antígeno que comprende al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el octavo antígeno es del virus de la influenza pero es de una cepa de virus de la influenza
15 diferente a los antígenos primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo.

56. La composición inmunogénica de la cláusula 55, en donde el primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula lipídica.

57. La composición inmunogénica de la cláusula 56, en donde el primero, segundo,
20 tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

58. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior que comprende además: (v) un quinto polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica un quinto antígeno, dicho antígeno que comprende al menos un polipéptido
25 antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el quinto antígeno es del virus de la influenza pero es de una cepa de virus de la influenza diferente a los antígenos primero, segundo, tercero y cuarto.

59. La composición inmunogénica de la cláusula 58, en donde el primero, segundo, tercero, cuarto y quinto polinucleótidos de ARN están formulados en una nanopartícula
30 lipídica.

60. La composición inmunogénica de la cláusula 59, en donde los polinucleótidos de ARN están presentes en alrededor de proporciones iguales.

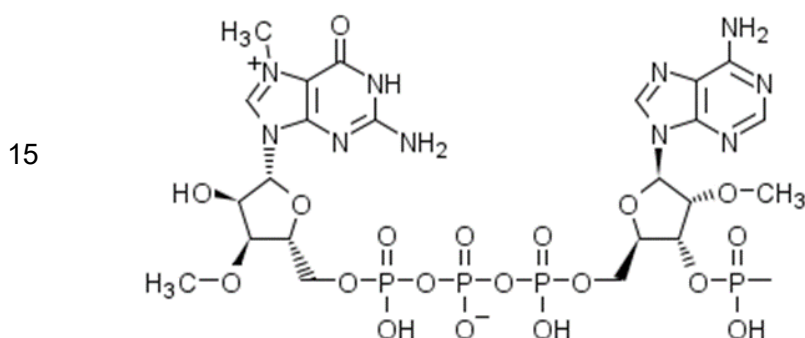
61. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde cada polinucleótido de ARN comprende un nucleótido modificado.

35 62. La composición inmunogénica de la cláusula 61, 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-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metil uridina.

63. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde cada polinucleótido de ARN comprende un casquete terminal 5', una UTR en 5', una UTR en 3' y una cola de poliadenilación en 3'.

64. La composición inmunogénica de la cláusula 63, en donde el casquete terminal 5' comprende:



65. La composición inmunogénica de la cláusula 63, en donde la UTR en 5' comprende SEQ ID NO: 1.

66. La composición inmunogénica de la cláusula 63, en donde la UTR en 3' comprende SEQ ID NO: 2.

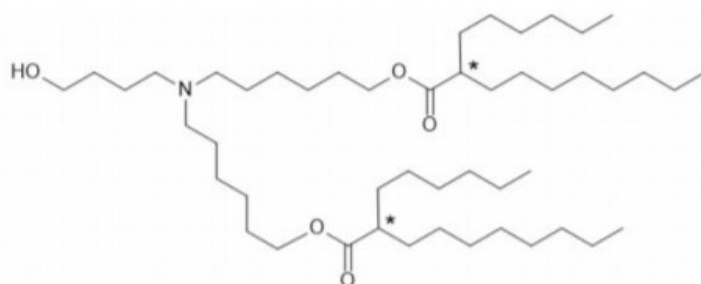
67. La composición inmunogénica de la cláusula 63, en donde la cola de poliadenilación 3' comprende SEQ ID NO: 3.

68. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde el polinucleótido de ARN tiene una integridad superior al 85%.

69. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde el polinucleótido de ARN tiene una pureza superior al 85%.

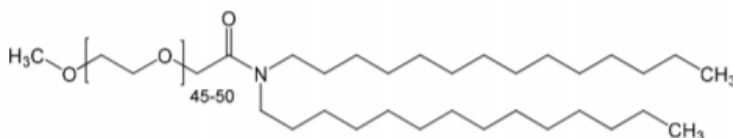
70. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde la nanopartícula lipídica comprende 20-60 % mol de lípido catiónico ionizable, 5-25 % mol de lípido neutro, 25-55 % mol de colesterol y 0.5-5 % mol de lípido modificado con PEG.

71. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde el lípido catiónico comprende:



Los asteriscos (*) indican centros quirales

72. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde el lípido modificado con PEG



comprende:

73. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, 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.

74. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, 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.

75. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, 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 se derivan de diferentes cepas del virus H1 y los antígenos tercero y cuarto son de diferentes cepas del virus de la influenza H3.

76. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde al menos el primer y el segundo polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

77. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde el primer y el segundo polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula lipídica.

78. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde el primer, segundo y tercer polinucleótidos de ARN están formulados en una única nanopartícula

lipídica.

79. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, en donde el primero, segundo, tercero y cuarto polinucleótidos de ARN están formulados en una única LNP.

80. La composición inmunogénica de cualquiera de las cláusulas 36-75, en donde
5 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.

81. La composición inmunogénica de la cláusula 80, 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.

10 82. La composición inmunogénica de la cláusula 80, 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.

15 83. La composición inmunogénica de la cláusula 80, 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.

20 84. La composición inmunogénica de la cláusula 80, 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; el cuarto polinucleótido de ARN está formulado en una cuarta LNP; y el quinto polinucleótido de ARN está formulado en una quinta LNP.

25 85. La composición inmunogénica de la cláusula 80, en donde el primer polinucleótido de ARN se formula en una primera LNP; el segundo polinucleótido de ARN se formula en una segunda LNP; el tercer polinucleótido de ARN se formula en una tercera LNP; el cuarto polinucleótido de ARN se formula en una cuarta LNP; el quinto polinucleótido de ARN se formula en una quinta LNP; y el sexto polinucleótido de ARN se formula en una sexta LNP.

30 86. La composición inmunogénica de la cláusula 80, en donde el primer polinucleótido de ARN se formula en una primera LNP; el segundo polinucleótido de ARN se formula en una segunda LNP; el tercer polinucleótido de ARN se formula en una tercera LNP; el cuarto polinucleótido de ARN se formula en una cuarta LNP; el quinto polinucleótido de ARN se formula en una quinta LNP; el sexto polinucleótido de ARN se formula en una sexta LNP; y el séptimo polinucleótido de ARN se formula en una séptima LNP.

35 87. La composición inmunogénica de la cláusula 80, en donde el primer polinucleótido

de ARN se formula en una primera LNP; el segundo polinucleótido de ARN se formula en una segunda LNP; el tercer polinucleótido de ARN se formula en una tercera LNP; el cuarto polinucleótido de ARN se formula en una cuarta LNP; el quinto polinucleótido de ARN se formula en una quinta LNP; el sexto polinucleótido de ARN se formula en una sexta LNP; el séptimo polinucleótido de ARN se formula en una séptima LNP; y el octavo polinucleótido de ARN se formula en una octava LNP.

88. La composición inmunogénica de cualquier cláusula anterior, para usarse en la provocación de una respuesta inmunitaria contra la influenza.

89. Un método para provocar una respuesta inmunitaria contra la enfermedad de la influenza, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 36-79.

90. Método de purificación de un polinucleótido de ARN sintetizado por transcripción *in vitro*, que comprende la ultrafiltración y la diafiltración.

91. El método de acuerdo con la cláusula 90, en donde el método no comprende una etapa de cromatografía.

92. El método de acuerdo con la cláusula 90, 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.

93. El método de acuerdo con la cláusula 90, en donde el ADN plasmídico residual es ≤ 500 ng de ADN/mg de ARN.

94. El método de acuerdo con la cláusula 90, en donde la pureza del ARNm purificado está comprendida entre alrededor del 60% y alrededor del 100%.

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 hemaglutinina (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.

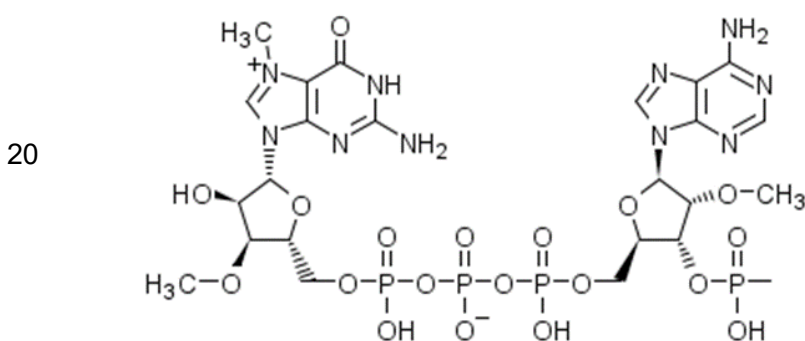
8. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde los polinucleótidos de ARN están presentes en alrededor de proporciones iguales.

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.

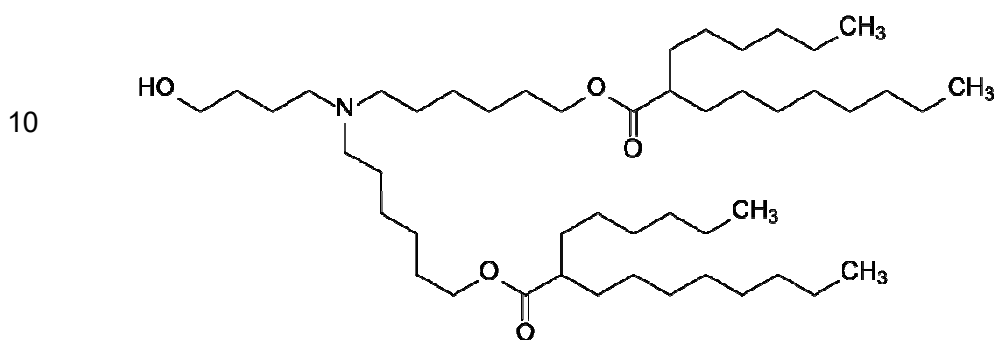
16. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el polinucleótido de ARN tiene una integridad superior al 85%.

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

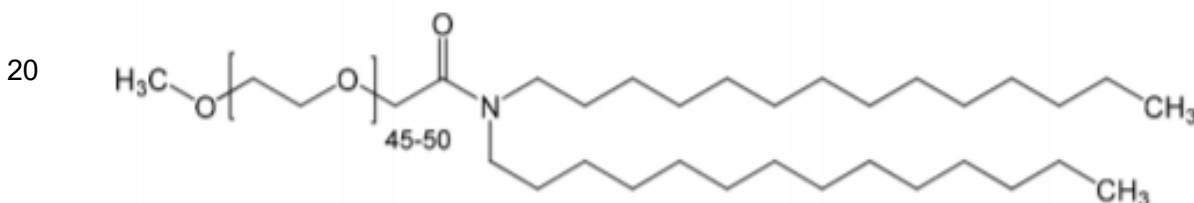
85%.

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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
35 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.

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

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
15 y/o sal residual.

20

25

30

35

RESUMEN

La invención se refiere a composiciones y métodos para la preparación, fabricación y uso terapéutico de vacunas de ácido ribonucleico que comprenden
5 moléculas polinucleotídicas que codifican uno o más antígenos de la influenza, como los antígenos de hemaglutinina.

10

15

20

25

30

35