

ÁCIDOS NUCLEICOS Y USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense No. 63/484,186, presentada 9 de febrero de 2023, solicitud provisional estadounidense No. 63/484,747, presentada 13 de febrero de 2023, y la solicitud provisional de EE. UU. No. 63/621,102, presentada el 15 de enero de 2024, cada una de las cuales se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

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 moléculas de polinucleótidos que codifican uno o más antígenos de influenza, tales como antígenos de hemaglutinina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

El genoma del virus de la influenza A incluye ocho moléculas (siete para el virus de la influenza C) de ARN monocatenarios, lineales y de polaridad negativa, que codifican varios polipéptidos, entre ellos: las proteínas ARN polimerasa dirigidas por ARN (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 incrustada en la membrana del virus); dos glicoproteínas de superficie, que se proyectan desde la envoltura de lipoproteínas: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); y proteínas no estructurales (NS1 y NS2, por sus siglas en inglés).

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

Un desafío para la terapia y profilaxis contra la influenza y otras infecciones usando vacunas tradicionales es la limitación de las vacunas en su amplitud, brindando protección sólo 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 la producción de una vacuna adaptada en una situación de pandemia.

- 5 Existe una necesidad de composiciones mejoradas, preferiblemente composiciones inmunogénicas, contra la influenza.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se describen en el presente documento las necesidades no satisfechas de composiciones mejoradas, preferiblemente composiciones inmunogénicas, contra la influenza, entre otras cosas. En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición que comprende un ARN autoamplificante (ARNsa) que comprende: una caperuza 5'; una región no traducida 5' (5' UTR, por sus siglas en inglés); una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus; un primer promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un primer marco de lectura abierto que codifica un primer gen de interés derivado de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza; un segundo promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un segundo marco de lectura abierto que codifica un segundo gen de interés derivado del virus de la influenza; una región no traducida 3' (3' UTR, por sus siglas en inglés); y una secuencia de poli A 3'.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición que comprende un ARN autoamplificante (ARNsa) que comprende: una caperuza 5'; una región no traducida 5' (5' UTR); una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus; un promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés derivado del virus de la influenza; una región no traducida 3' (3' UTR); y una secuencia de poli A 3'; en donde al menos el 5 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

En modalidades preferidas, el polinucleótido ARNsa tiene una pureza de grado clínico. En algunas modalidades, la pureza del polinucleótido de ARN está entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 100 %. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN purificado tiene una integridad del 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 81 % o más, 82 % o más, 83 % o más, 84 % o más, 85 % o más, 86 % o más, 87 % o más, 88 % o más, 89 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, o 99 % o más, según lo determinado por un método conocido, tal como, por ejemplo, electroforesis capilar. En

algunas modalidades, igual a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de las moléculas de ARN totales en la composición son transcripciones de ARN de longitud completa. Una molécula de ARN de "longitud completa" es aquella que incluye una caperuza 5' y una cola de poli A.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona polinucleótidos aislados (por ejemplo, replicones) o un conjunto de polinucleótidos que comprenden un primer polinucleótido que codifica un inhibidor inmunológico innato, por ejemplo, una proteína no estructural de la influenza (NS1), y un segundo polinucleótido que codifica un ARNm diana heterólogo, por ejemplo, la proteína HA de la influenza. Estos polinucleótidos son capaces de impulsar una expresión mejorada y persistente del ARNm objetivo heterólogo en una célula.

Algunos aspectos de la presente divulgación están dirigidos a un polinucleótido o un conjunto de polinucleótidos que comprenden una primera molécula de ácido nucleico que codifica una proteína no estructural de la influenza (NS1) y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un ARNm diana heterólogo.

En algunos aspectos, la primera molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS 1 de la influenza y la segunda molécula de ácido nucleico que codifica el ARNm objetivo están presentes en un primer vector (al que en el presente documento se puede hacer referencia como "en cis"). En algunos aspectos, la primera molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS1 de influenza está presente en un primer vector, y en donde la segunda molécula de ácido nucleico que codifica el ARNm objetivo está presente en un segundo vector (que puede denominarse en este documento como "en trans").

En algunos aspectos, la primera molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS 1 de la influenza se expresa bajo el control de un primer promotor, por ejemplo, un promotor subgenómico, como uno derivado de un alfavirus. En algunos aspectos, la segunda molécula de ácido nucleico que codifica el ARNm objetivo se expresa bajo el control de un segundo promotor, por ejemplo, un promotor subgenómico, como uno derivado de un alfavirus. En algunos aspectos, el primer promotor y el segundo promotor son el mismo. En algunos aspectos, el primer promotor y el segundo promotor son diferentes.

En algunos aspectos, la primera molécula de ácido nucleico que codifica la proteína

NS1 de influenza y la segunda molécula de ácido nucleico que codifica el ARNm objetivo se expresan bajo el control de un primer promotor, en donde el primer promotor impulsa la expresión tanto de la proteína NS1 de influenza como del ARNm objetivo. En algunos aspectos, la primera molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS1 de la influenza y la segunda molécula de ácido nucleico que codifica el ARNm objetivo están unidas por una secuencia IRES. En algunos aspectos, el primer vector, el segundo vector o ambos comprenden uno o más elementos reguladores.

En algunos aspectos, la expresión del ARNm objetivo aumenta en relación con la expresión del ARNm objetivo en ausencia de la primera molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS1 de la influenza. En algunos aspectos, la expresión del ARNm objetivo aumenta en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 100 %, al menos aproximadamente un 125 %, al menos aproximadamente un 150 %, al menos aproximadamente un 175 %, al menos aproximadamente un 200 %, al menos aproximadamente un 225 %, al menos aproximadamente un 250 %, al menos aproximadamente un 275 % o al menos aproximadamente un 300 % con respecto a la expresión del ARNm objetivo en ausencia de la primera molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS1 de la influenza. En algunos aspectos, el aumento en la expresión del ARNm objetivo persiste durante al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 42 horas o al menos aproximadamente 48 horas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de modalidades específicas presentadas en este documento.

FIG. 1A-1B - Anticuerpos anti-HA funcionales provocados mediante la inmunización de ratones con ARNs formulado con LNP que codifica HA y/o NA de influenza, medidos

mediante HAI; FIG. 1A representa 3 semanas después del cebado; FIG. 1B representa 2 semanas después del refuerzo; se inmunizaron ratones Balb/c hembra IM el día 0 con 20 ng de las preparaciones de vacuna de ARNsa bicistrónico y monocistrónico formuladas con LNP, 40 ng en total (20 ng cada una) de la mezcla 1:1 de ARNsa-HA + ARNsa-NA y 200 ng del comparador de ARNmod que codifica A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) HA. Las respuestas de anticuerpos contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante HAI o un ensayo MNT de 1 día el día 21 (3 semanas después de la inmunización). Se informan los títulos de HAI (media geométrica con DE geométrica).

FIG. 2A-2B - Anticuerpos neutralizantes provocados mediante la inmunización de ratones con ARNsa formulado con LNP que codifica HA y/o NA de influenza, medidos mediante MNT de 1 día; FIG. 2A representa 3 semanas después del cebado; FIG. 2B representa 2 semanas después del refuerzo; se inmunizaron ratones Balb/c hembra IM el día 0 con 20 ng de las preparaciones de vacuna de ARNsa bicistrónico y monocistrónico formuladas con LNP, 40 ng en total (20 ng cada una) de la mezcla 1:1 de ARNsa-HA + ARNsa-NA y 200 ng del comparador de ARNmod que codifica A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) HA. Las respuestas de anticuerpos contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante HAI o un ensayo MNT de 1 día el día 21 (3 semanas después de la inmunización). Se informan títulos de neutralización del 50 % (media geométrica con DE geométrica).

FIG. 3 - Anticuerpos neutralizantes provocados mediante la inmunización de ratones con ARNsa formulado con LNP que codifica HA y/o NA de influenza, medidos mediante MNT de 3 días

FIG. 4A-4B - Anticuerpos anti-NA funcionales provocados mediante la inmunización de ratones con ARNsa formulado con LNP que codifica HA y/o NA de influenza, medidos mediante NAI; FIG. 4A representa 3 semanas después del cebado; FIG. 4B representa 2 semanas después del refuerzo; los ratones Balb/c hembra fueron inmunizados IM el día 0 con 20 ng de las preparaciones de vacunas de ARNsa bicistrónico y monocistrónico formuladas con LNP, 40 ng en total (20 ng de cada una) de la mezcla 1:1 de ARNsa-HA + ARNsa-NA y 200 ng del comparador ARNmod que codifica A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) NA. Las respuestas de anticuerpos contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante NAI el día 21 (3 semanas después de la inmunización). Se informan los títulos medios geométricos con DE geométrica.

FIG. 5 - Citocinas y quimiocinas séricas a las 24 horas después de la inmunización de ratones Balb/c con preparaciones de vacuna de la influenza de ARNsa-HA con diferentes cantidades

de nucleósidos modificados

FIG. 6 - HAI funcional y anticuerpos neutralizantes provocados mediante la inmunización de ratones Balb/c con preparaciones de vacuna de ARNsa-HA formuladas con LNP con diferentes cantidades de nucleósidos modificados

- 5 **FIG. 7** - Citocinas y quimiocinas séricas a las 24 horas después de la inmunización de ratones C57BL6/J con preparaciones de vacuna de la influenza de ARNsa-HA con diferentes cantidades de nucleósidos modificados

FIG. 8 - HAI funcional y anticuerpos neutralizantes provocados mediante la inmunización de ratones C57NL6/J con preparaciones de vacuna de ARNsa-HA formulada con LNP con
10 diferentes cantidades de nucleósidos modificados; los ratones Balb/c hembra se inmunizaron IM el día 0 con 20 ng del ARNsa cuadrivalente formulado con LNP compuesto por 4 constructos bicistrónicos que codifican HA y NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1), A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2), B/Washington/2/2019 (linaje B/Victoria) y B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata), o con 2,4 µg de una vacuna inactivada
15 cuadrivalente adyuvada autorizada (QIV; FluAd). Las respuestas de anticuerpos contra cada componente de la vacuna se midieron mediante HAI o un ensayo MNT de 1 día el día 42 (2 semanas después de la segunda dosis). Se informan los títulos de HAI y neutralización del 50 % (media geométrica con DE geométrica).

FIG. 9- HAI funcional y anticuerpos neutralizantes provocados mediante la inmunización de
20 ratones con ARNsa bicistrónico cuadrivalente formulado con LNP que codifica HA y NA de 4 cepas de influenza estacional

FIG. 10- Anticuerpos NAI funcionales provocados mediante la inmunización de ratones con ARNsa bicistrónico cuadrivalente formulado con LNP que codifica HA y NA de 4 cepas de influenza estacional; se inmunizaron ratones Balb/c hembra por vía intramuscular el día 0 con
25 20 ng de ARNsa cuadrivalente formulado con LNP compuesto por 4 constructos bicistrónicos que codifican HA y NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1), A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2), B/Washington/2/2019 (linaje B/Victoria) y B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata), o con 2,4 µg de una vacuna inactivada cuadrivalente adyuvada autorizada (QIV; FluAd). Las respuestas de anticuerpos contra cada componente de la vacuna se midieron mediante NAI
30 el día 42 (2 semanas después de la segunda dosis). Se informan los títulos de NAI (media geométrica con DE geométrica) para 3 de las 4 cepas. No se pudieron informar los títulos de NAI H3N2 tanto para el ARNsa como para el QIV debido a problemas técnicos con el ensayo

NAI para esta cepa.

FIG. 11 – Títulos medios geométricos y CI del 95 %: HAI – Preparaciones de vacunas 1, 2 y grupos de control – Población con inmunogenicidad evaluable

Abreviaturas: GMT = título medio geométrico; HAI = inhibición de la hemaglutinación; QIV = vacuna de la influenza tetravalente, Vax Prep = preparación de la vacuna.

Nota: V1 = Día 1 antes de la vacunación; V3 = 1 semana; V4 = 2 semanas; V5 = 4 semanas.

Nota: Los puntos representan los niveles de anticuerpos individuales.

Nota: Los números/GMT dentro de cada barra indican la cantidad de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el ensayo especificado en el punto de tiempo de muestreo dado,

y los títulos medios geométricos correspondientes. Para el cálculo de GMT se utilizó el promedio de dos muestras recolectadas el día 1 antes de la vacunación.

Nota: El QIV-15A autorizado incluye a los participantes del estudio que recibieron el QIV autorizado, cuyos datos de VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos de VRD de los grupos CI.

Nota: El QIV-18 autorizado incluye a los participantes del estudio que recibieron el QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C2-C5 y C7.

Nota: El placebo incluye a los participantes en el estudio que reciben placebo de forma aleatoria.

FIG. 12 – Títulos medios geométricos y CI del 95 %: HAI – Preparaciones de vacunas 3, 4, 7 y grupos de control – Población con inmunogenicidad evaluable

Abreviaturas: GMT = título medio geométrico; HAI = inhibición de la hemaglutinación; QIV = vacuna de la influenza tetravalente; Vax Prep = preparación de la vacuna.

Nota: V1 = Día 1 antes de la vacunación; V3 = 1 semana; V4 = 2 semanas; V5 = 4 semanas.

Nota: Los puntos representan los niveles de anticuerpos individuales.

Nota: Los números/GMT dentro de cada barra indican la cantidad de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el ensayo especificado en el punto de tiempo de muestreo dado, y

5 títulos medios geométricos correspondientes. Para el cálculo de GMT se utilizó el promedio de dos muestras recolectadas el día 1 antes de la vacunación.

Nota: El Q1V-18 autorizado incluye a los participantes del estudio que recibieron el QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C2-C5 y C7.

10 Nota: El placebo incluye a los participantes en el estudio que reciben placebo de forma aleatoria.

FIG. 13 – Títulos medios geométricos y CI del 95 %: HAI – Preparaciones de vacunas 5, 6 y grupos de control – Población con inmunogenicidad evaluable

Abreviaturas: GMT = título medio geométrico; HAI = inhibición de la hemaglutinación; QIV = vacuna de la influenza tetravalente; Vax Prep = preparación de la vacuna.

15 Nota: VI = Día 1 antes de la vacunación; V3 = 1 semana, V4 = 2 semanas; V5 = 4 semanas.

Nota: Los puntos representan los niveles de anticuerpos individuales.

Nota: Los números/GMT dentro de cada barra indican la cantidad de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el ensayo especificado en el punto de tiempo de muestreo dado, y

20 títulos medios geométricos correspondientes. Para el cálculo de GMT se utilizó el promedio de dos muestras recolectadas el día 1 antes de la vacunación.

Nota: El QIV-18 autorizado incluye a los participantes del estudio que recibieron el QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C2-C5 y C7.

25 Nota: El QIV-15B autorizado incluye a los participantes del estudio que recibieron el QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C6.

Nota: El placebo incluye a los participantes en el estudio que reciben placebo de forma

aleatoria.

FIG. 14– la adición de modNS1 en trans aumenta la expresión de ARNsa HA y la viabilidad celular en células HeLa. Se transfectaron cantidades crecientes de modNS1 o modGFP (como control) en células HeLa combinadas con 25 ng de ARNsa-HA-Wisconsin. Se midieron el (%) de células HA positivas, los niveles de expresión de proteínas (MFI) y el número total de células para evaluar la viabilidad celular a las 24 h. RMM59 se refiere a ARNsa HA Wisconsin en todo este documento.

FIG. 15– Se transfectó una cantidad total de 25 ng de ARNsa-HA-Wisconsin en células HeLa en combinación con cantidades crecientes bajas de modNS1 (1 ng a 25 ng) en azul (es decir, “RMM59+NS1”) o ARNsa (como control de nivel de dosis coincidente) en rojo (es decir, “RMM59+(X)RMM59”). Las células se fijaron a las 24 horas y se tiñeron con anticuerpo monoclonal humano FI6 HA y anticuerpo secundario de cabra anti-A488 humano. Se midieron el (%) de células HA positivas y el número de células.

FIG. 16– Resultados de la prueba de ARNsa que codifica HA Wisconsin pero que contiene 50 % m1ψ. Se probaron las mismas condiciones que las descritas para la FIG. 15

FIG. 17– La replicación de ARNsa en monocitos humanos podría mejorarse. Las células CD14+ humanas (células madre) se transfectaron con diferentes dosis de ARNsa que expresaba GFP (5 ng a 100 ng) en combinación con dosis crecientes de modNS1 (0 a 50 ng) y utilizando ARNmod GFP como control. El total (%) de células positivas se midió mediante FACS a las 24 horas, así como la viabilidad celular.

FIG. 18– muestra el total (%) de células positivas medido usando tinción de agua viva/muerta.

FIG. 19A-19B– FIG. 19A: ARNsa monocistrónico que expresa HA o una configuración bicistrónica que expresa tanto HA como NS1 se transfectaron en células HeLa solo o en combinación con 10 ng o 25 ng de modNS1. Se midieron el (%) de células HA positivas y los niveles de expresión de proteínas (MFI). Las células se fijaron a las 24 horas y se tiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo contra HA y un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo A647. FIG. 19B: Diagramas de las diferentes configuraciones de ARNsa (monocistrónico y bicistrónico) solo o en combinación con modNS1 como se muestra en la FIG. 19 A.

FIG. 20A-20C– Se agregó una cantidad constante total de 100 ng de ARN por condición a las células HeLa. Se agregaron ARN U (es decir, ARN no modificado) o ARNmod regular en combinación con modNS1 o modGFP (control) en diferentes proporciones y % de células

HA(+) (FIG. 20A) y número de células (FIG. 20B) se evaluaron a las 24 h. Se observaron imágenes confocales en células HeLa que comparaban 100 ng de RMM71 (ARNu HA Wisconsin) y 50 ng de ARNu combinado con 50 ng de modNS1 (datos no mostrados). Las células se fijaron a las 24 horas y se tiñeron con anticuerpo monoclonal humano FI6 HA y anticuerpo secundario de cabra anti-A647 humano. FIG. 20C. Diagramas comparativos de las diferentes configuraciones probadas.

FIG. 21 – representa porcentaje de células HA positivas después de la respectiva administración de moléculas de ARN activas, y además representa el número total de células viables después de la respectiva administración de moléculas de ARN activas. Véase el ejemplo 10 para métodos. El suministro de modNS1 en trans aumenta significativamente la expresión del antígeno ARNsa y ayuda a preservar la viabilidad celular.

FIG. 22– Anticuerpos anti-HA funcionales provocados en ratones después de una dosis de ARNsa-LNP que codifica HA/NA, Quad ARNmod o FluAd medidos por HAI

FIG. 23– Anticuerpos anti-NA funcionales provocados en ratones tras una dosis de ARNsa-LNP que codifican HA/NA o FluAd medidos por NAI

FIG. 24– Anticuerpos neutralizantes del virus provocados en ratones tras una dosis de ARNsa-LNP que codifican HA/NA, Quad ARNmod o FluAd medidos mediante MNT de 1 día

FIG. 25– Anticuerpos anti-HA funcionales provocados en ratones después de dos dosis de ARNsa-LNP que codifican HA/NA, Quad ARNmod o FluAd medidos por HAI

FIG. 26– Anticuerpos anti-NA funcionales provocados en ratones tras dos dosis de ARNsa-LNP que codifican HA/NA o FluAd medidos por NAI

FIG. 27– Anticuerpos neutralizantes del virus provocados en ratones tras dos dosis de ARNsa-LNP que codifican HA/NA, Quad ARNmod o FluAd medidos mediante MNT de 1 día

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las modalidades de la presente divulgación proporcionan composiciones que incluyen un polinucleótido de ARN autoamplificante (ARNsa) que codifica un antígeno del virus de la influenza. Las vacunas de ARN del virus de la influenza, como se proporciona en este documento, pueden usarse para inducir una respuesta inmune equilibrada, que comprende inmunidad celular y humoral.

Se contempla que cualquier modalidad discutida en esta especificación puede implementarse con respecto a cualquier método o composición de la divulgación, y viceversa. Además, las composiciones de la divulgación pueden usarse para lograr métodos de la divulgación.

5 Otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican modalidades específicas de la divulgación, se dan sólo a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la divulgación serán evidentes para los expertos en la materia
10 a partir de esta descripción detallada.

En toda esta solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente del error del método de medición o cuantificación.

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utiliza junto con el término “que comprende” puede significar “uno”, pero también es coherente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.
15

La frase “y/o” significa “y” o “o”. A modo de ejemplo, A, B y/o C incluyen: A solo, B solo, C solo, una combinación de A y B, una combinación de A y C, una combinación de B y C, o una combinación de A, B y C. En otras palabras, “y/o” funciona como un “o” inclusivo.

Las palabras “que comprende” (y cualquier forma de comprender, como “comprender” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de tener, como “tener” y “tiene”), “que incluye”
20 (y cualquier forma de incluir, como “incluye” e “incluir”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, como “contiene” y “contener”) son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o pasos del método adicionales no mencionados.

La frase “esencialmente todos” se define como “al menos el 95 %”; si esencialmente
25 todos los miembros de un grupo tienen una determinada propiedad, entonces al menos el 95 % de los miembros del grupo tienen esa propiedad. En algunos casos, esencialmente todos los medios iguales a cualquiera de, al menos cualquiera de, o entre cualesquiera dos de 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de los miembros del grupo tienen esa propiedad.

Las composiciones y métodos para su uso pueden “comprender”, “consistir
30 esencialmente en” o “consistir en” cualquiera de los ingredientes o pasos descritos a lo largo de la especificación. Las composiciones y métodos que “consisten esencialmente en”

cualquiera de los ingredientes o pasos divulgados limitan el alcance de la reivindicación a los materiales o pasos especificados que no afectan materialmente la característica básica y novedosa de la divulgación reivindicada.

A. ARN autoamplificante (ARNsa)

5 En algunas modalidades, la molécula de ARN, como la primera molécula de ARN, es un ARNsa. “ARNsa”, “ARN autoamplificante” y “replicón” se refieren al ARN con la capacidad de replicarse a sí mismo. Las moléculas de ARN autoamplificantes se pueden producir utilizando elementos de replicación derivados de un virus o virus, por ejemplo, alfavirus, y sustituyendo los polipéptidos virales estructurales con una secuencia de nucleótidos que
10 codifica un polipéptido de interés. Una molécula de ARN autoamplificante es típicamente una molécula de cadena positiva que puede traducirse directamente después de su suministro a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que luego produce transcripciones tanto antisentido como sentido a partir del ARN suministrado. El ARN suministrado conduce a la producción de múltiples ARN hijas. Estos ARN hijas, así como las
15 transcripciones subgenómicas colineales, pueden traducirse para proporcionar expresión *in situ* de un gen codificado de interés, por ejemplo, un antígeno viral, o puede transcribirse para proporcionar transcripciones adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que se traducen para proporcionar expresión *in situ* de la proteína de interés, por ejemplo, un antígeno. El resultado general de esta secuencia de transcripciones es una amplificación del
20 número de ARNsas introducidos y, por lo tanto, el gen de interés codificado, por ejemplo, un antígeno viral, puede convertirse en un producto polipeptídico principal de las células.

En algunas modalidades, el ARN autoamplificante incluye al menos uno o más genes seleccionados de cualquiera de las replicasas virales, proteasas virales, helicasas virales y otras proteínas virales no estructurales. En algunas modalidades, el ARN autoamplificante
25 también puede incluir secuencias de replicación tractivas de extremo 5' y 3' y, opcionalmente, una secuencia heteróloga que codifica una secuencia de aminoácidos deseada (por ejemplo, un antígeno de interés). Se puede incluir en el ARN autoamplificante un promotor subgenómico que dirige la expresión de la secuencia heteróloga. Opcionalmente, la secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de interés) puede fusionarse en marco a otras regiones
30 codificantes en el ARN autoamplificante y/o puede estar bajo el control de un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés).

En algunas modalidades, la molécula de ARN autoamplificante no está encapsulada en una partícula similar a un virus. Las moléculas de ARN autoamplificantes descritas en este

documento pueden diseñarse de modo que la molécula de ARN autoamplificante no pueda inducir la producción de partículas virales infecciosas. Esto puede lograrse, por ejemplo, omitiendo uno o más genes virales que codifican proteínas estructurales que son necesarias para producir partículas virales en el ARN autoamplificante. Por ejemplo, cuando la molécula de ARN autoamplificante se basa en un alfavirus, como el virus Sinbis (SIN), el virus del bosque Semliki y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE, por sus siglas en inglés), se pueden omitir uno o más genes que codifican proteínas estructurales virales, como las glicoproteínas de la cápside y/o la envoltura.

En algunas modalidades, una molécula de ARN autoamplificante descrita en este documento codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN autoamplificante y (ii) un polipéptido de interés, por ejemplo, un antígeno viral. En algunas modalidades, la polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, por ejemplo, incluida cualquiera de las proteínas de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 y cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, las moléculas de ARN autoamplificantes descritas en este documento pueden incluir uno o más nucleótidos modificados (por ejemplo, pseudouridina, N6-metiladenosina, 5-metilcitidina, 5-metiluridina). En algunas modalidades, las moléculas de ARN autoamplificantes no incluyen un nucleótido modificado (por ejemplo, pseudouridina, N6-metiladenosina, 5-metilcitidina, 5-metiluridina).

El constructo ARNsa puede codificar al menos una proteína no estructural (NSP, por sus siglas en inglés), dispuesta en 5' o 3' de la secuencia que codifica al menos un péptido o polipéptido de interés. En algunas modalidades, la secuencia que codifica al menos un NSP está dispuesta en 5' de las secuencias que codifican el péptido o polipéptido de interés. De esta forma, la secuencia que codifica al menos un NSP puede estar dispuesta en el extremo 5' del constructo de ARN. En algunas modalidades, al menos una proteína no estructural codificada por el constructo de ARN puede ser la ARN polimerasa nsP4. En algunas modalidades, el constructo de ARNsa codifica nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. Como se sabe en la técnica, nsP1 es la enzima de capping viral y el ancla de membrana del complejo de replicación (RC, por sus siglas en inglés). nsP2 es una helicasa de ARN y la proteasa responsable del procesamiento de la poliproteína ns. nsP3 interactúa con varias proteínas del huésped y puede modular la poli y mono-ADP-ribosilación de proteínas. nsP4 es la ARN polimerasa dependiente de ARN viral central. En algunas modalidades, la polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, por ejemplo, que comprende una o más de las proteínas de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4.

Mientras que los genomas del alfavirus natural codifican proteínas estructurales del virión además del polipéptido replicasa no estructural, en algunas modalidades, las moléculas de ARN autoamplificantes no codifican proteínas estructurales del alfavirus. En algunas modalidades, el ARN autoamplificante puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de ARN que incluya viriones. Sin limitarnos a ninguna teoría o mecanismo, la incapacidad de producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN autoamplificante no puede perpetuarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales del alfavirus que son necesarias para la perpetuación en virus de tipo silvestre pueden estar ausentes de los ARN autoamplificantes de la presente divulgación y su lugar puede ser ocupado por genes que codifican el inmunógeno de interés, de modo que la transcripción subgenómica codifica el inmunógeno en lugar de las proteínas estructurales del virión del alfavirus.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autoamplificante puede tener dos marcos de lectura abiertos. El primer marco de lectura abierto (5') puede codificar una replicasa; el segundo marco de lectura abierto (3') puede codificar un polipéptido que comprende un antígeno de interés. En algunas modalidades, el ARN puede tener marcos de lectura abiertos adicionales (por ejemplo, aguas abajo), por ejemplo, para codificar más antígenos o para codificar polipéptidos accesorios.

En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN o ARNsa incluye además (1) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus y (2) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus. En algunas modalidades, la secuencia 5' de la molécula de ARN autoamplificante se selecciona para garantizar la compatibilidad con la replicasa codificada.

Opcionalmente, las moléculas de ARN autoamplificantes descritas en este documento también pueden diseñarse para inducir la producción de partículas virales infecciosas que estén atenuadas o sean virulentas, o para producir partículas virales que sean capaces de una única ronda de infección posterior.

En algunas modalidades, la molécula de ARNsa está basada en alfavirus. Los alfavirus incluyen un conjunto de virus transmitidos por artrópodos genética, estructural y serológicamente relacionados de la familia Togaviridae. Los virus y subtipos de virus ejemplares dentro del género alfavirus incluyen el virus Sindbis, el virus del bosque Semliki, el virus del río Ross y el virus de la encefalitis equina venezolana. Como tal, el ARN

autoamplificante descrito en este documento puede incorporar una ARN replicasa derivada de cualquiera de los virus del bosque Semliki (SFV), el virus Sindbis (SIN), el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), el virus del río Ross (RRV, por sus siglas en inglés) u otros virus que pertenecen a la familia de los alfavirus. En algunas modalidades, el ARN autoamplificante descrito en este documento puede incorporar secuencias derivadas de una secuencia de virus mutante o de tipo silvestre, por ejemplo, el mutante TC83 atenuado de VEEV se ha utilizado en ARNSa.

Los ARNSa basados en alfavirus son ARNSa de cadena (+) que pueden traducirse después de su suministro a una célula, lo que conduce a la traducción de una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de cadena (-) genómica del ARN suministrado de cadena (+). Estas transcripciones de cadena (-) pueden transcribirse para dar más copias del ARN parental de cadena (+) y también para dar una transcripción subgenómica que codifica el producto génico deseado. La traducción de la transcripción subgenómica conduce así a expresión *in situ* del producto genético deseado por la célula infectada. Los ARNSa de alfavirus adecuados pueden utilizar una replicasa de un virus sindbis, un virus del bosque semliki, un virus de la encefalitis equina del este, un virus de la encefalitis equina venezolana o variantes mutantes del mismo.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autoamplificante se deriva o se basa en un virus distinto de un alfavirus, como un virus de ARN de cadena positiva y, en particular, un picornavirus, flavivirus, rubivirus, pestivirus, hepacivirus, calicivirus o coronavirus. Las secuencias de alfavirus de tipo silvestre adecuadas son bien conocidas y están disponibles en depósitos de secuencias, como la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Los ejemplos representativos de alfavirus adecuados incluyen Aura (ATCC VR-368), virus Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), virus Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), virus de la encefalomiелitis equina del este (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), virus Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), virus Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), virus del río Ross (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Bosque Semliki (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinita (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), encefalomiелitis equina venezolana (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), encefalomiелitis equina occidental (ATCC VR-70, ATCC VR-1251,

ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926) y Y-62-33 (ATCC VR-375). En algunos aspectos, uno o más de los alfavirus de la lista pueden estar excluidos.

En algunas modalidades, las moléculas de ARN autoamplificantes descritas en este documento son más grandes que otros tipos de ARN (por ejemplo, ARNsa). Normalmente, las moléculas de ARN autoamplificantes descritas en este documento incluyen al menos aproximadamente 4 kb. Por ejemplo, el ARN autoamplificante puede ser igual a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 11 kb, 12 kb, 13 kb, 14 kb, 15 kb, 16 kb. En algunos casos, el ARN autoamplificante puede incluir al menos aproximadamente 5 kb, al menos aproximadamente 6 kb, al menos aproximadamente 7 kb, al menos aproximadamente 8 kb, al menos aproximadamente 9 kb, al menos aproximadamente 10 kb, al menos aproximadamente 11 kb, al menos aproximadamente 12 kb o más de 12 kb. En ciertos ejemplos, el ARN autoamplificante tiene un tamaño de aproximadamente 4 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 6 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 7 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 8 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 9 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 11 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 11 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 9 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 8 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 7 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 6 kb, de aproximadamente 6 kb a aproximadamente 12 kb, de aproximadamente 6 kb a aproximadamente 11 kb, de aproximadamente 6 kb a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 6 kb a aproximadamente 9 kb, aproximadamente de 6 kb a aproximadamente 8 kb, aproximadamente de 6 kb a aproximadamente 7 kb, aproximadamente de 7 kb a aproximadamente 11 kb, aproximadamente de 7 kb a aproximadamente 10 kb, aproximadamente de 7 kb a aproximadamente 9 kb, aproximadamente de 7 kb a aproximadamente 8 kb, aproximadamente de 8 kb a aproximadamente 11 kb, aproximadamente de 8 kb a aproximadamente 10 kb, aproximadamente de 8 kb a aproximadamente 9 kb, aproximadamente de 9 kb a aproximadamente 11 kb, aproximadamente de 9 kb a aproximadamente 10 kb, o aproximadamente de 10 kb a aproximadamente 11 kb.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autoamplificante puede codificar un

único antígeno polipeptídico o, opcionalmente, dos o más antígenos polipeptídicos unidos entre sí de manera que cada una de las secuencias conserva su identidad (por ejemplo, unidas en serie) cuando se expresan como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos generados a partir del ARN autoamplificante pueden luego producirse como un polipéptido de fusión o diseñarse de tal manera que den como resultado secuencias polipeptídicas o peptídicas separadas. En algunas modalidades, la molécula de ARNsa puede codificar un polipéptido de interés o más, como un antígeno o más de un antígeno, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más polipéptidos. Alternativamente, o, además, una molécula de ARNsa también puede codificar más de un polipéptido de interés o más, como un antígeno, por ejemplo, una molécula de ARN bicistrónica o tricistrónica que codifica antígenos diferentes o idénticos.

El término "ligado" como se utiliza en este documento se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o secuencia de polinucleótidos unida covalentemente o no covalentemente a una segunda secuencia de aminoácidos o secuencia de polinucleótidos, respectivamente. La primera secuencia de aminoácidos o polinucleótidos se puede unir o yuxtaponer directamente a la segunda secuencia de aminoácidos o polinucleótidos o, alternativamente, una secuencia intermedia puede unir covalentemente la primera secuencia a la segunda secuencia. El término "ligado" significa no sólo una fusión de una primera molécula de ARN con una molécula de ARN en el extremo 5' o el extremo 3', sino que también incluye la inserción de toda la primera molécula de ARN en cualesquiera dos nucleótidos en la segunda molécula de ARN. La primera segunda molécula de ARN se puede unir a una segunda molécula de ARN mediante un enlace fosfodiéster o un enlazador. El enlazador puede ser, por ejemplo, un polinucleótido.

En algunas modalidades, el ARN autoamplificante descrito en este documento puede codificar uno o más antígenos polipeptídicos que incluyen una variedad de epítomos. En algunas modalidades, el ARN autoamplificante descrito en este documento puede codificar epítomos capaces de provocar una respuesta de células T auxiliares o una respuesta de células T citotóxicas o ambas.

En algunas modalidades, la molécula de ARNsa se purifica, por ejemplo, mediante filtración que puede ocurrir a través de, por ejemplo, ultrafiltración, diafiltración o, por ejemplo, ultrafiltración/diafiltración de flujo tangencial.

Algunas modalidades de la divulgación se dirigen a una composición que comprende una molécula de ARN autoamplificante que comprende una caperuza 5', una región no

traducida 5', una región codificante que comprende una secuencia que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (también denominada "replicasa"), un promotor subgenómico, como uno derivado de un alfavirus, un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés (por ejemplo, un antígeno derivado del virus de la influenza), una región no traducida 3' y una secuencia de poli A 3'. En algunas modalidades, al menos el 5 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula de ARNs ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

En algunas modalidades, la molécula de ARNs no incluye nucleótidos modificados, por ejemplo, no incluye nucleobases modificadas, y todos los nucleótidos en la molécula de ARN son ribonucleótidos estándar convencionales A, U, G y C, con la excepción de una caperuza 5' opcional que puede incluir, por ejemplo, 7-metilguanosina, que se describe más adelante. En algunas modalidades, el ARN puede incluir una caperuza 5' que comprende una 7'-metilguanosina, y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' pueden estar metilados en la posición 2' de la ribosa.

La eficacia del producto depende de la expresión del ARNs suministrado, lo que 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 preferiblemente mediante electroforesis en gel capilar. La especificación inicial se establece para garantizar la integridad suficiente del ARN en las preparaciones de productos farmacéuticos. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una integridad de al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una integridad de aproximadamente el 95 % o más. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una integridad de aproximadamente el 98 % o más. En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN tiene una integridad de aproximadamente el 99 % o más.

En modalidades preferidas, el polinucleótido ARNs tiene una pureza de grado clínico. En algunas modalidades, la pureza del polinucleótido de ARN está entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 100 %. En algunas modalidades, la pureza del polinucleótido de ARN está entre aproximadamente el 80 % y el 99 %. En algunas modalidades, la pureza del polinucleótido de ARN está entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 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 logra a través

de un método que incluye purificación por filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, la pureza de grado clínico se logra sin purificación adicional seleccionada entre purificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), purificación basada en ligando o unión y/o cromatografía de intercambio iónico. En algunas modalidades, el método de producción de polinucleótidos de ARN elimina especies largas de ARN abortivo, ARN bicatenario (ARNdc), ADN plasmídico residual, disolvente residual y/o sal residual. En algunas modalidades, los contaminantes de transcripción abortiva corta comprenden menos de 15 bases. En algunas modalidades, los contaminantes de transcripción abortiva corta comprenden aproximadamente 8 a 12 bases. En algunas modalidades, el método de la invención también elimina el inhibidor de ARNasa.

En algunas modalidades, el polinucleótido ARNsa purificado comprende 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1 % o menos o está sustancialmente libre de contaminantes proteicos según lo determinado 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 alto rendimiento (HPLC). En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN purificado comprende 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1 % o menos o está sustancialmente libre de contaminantes de transcripción abortiva corta determinados por métodos conocidos, tales como, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En algunas modalidades, el polinucleótido de ARN purificado tiene una integridad del 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 81 % o más, 82 % o más, 83 % o más, 84 % o más, 85 % o más, 86 % o más, 87 % o más, 88 % o más, 89 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, o 99 % o más, según lo determinado por un método conocido, tal como, por ejemplo, electroforesis capilar.

B. Nucleobases modificadas

Las nucleobases modificadas que pueden incorporarse en nucleósidos y nucleótidos modificados y estar presentes en las moléculas de ARN incluyen, por ejemplo, m5C (5-metilcitidina), m5U (5-metiluridina), m6A (N6-metiladenosina), s2U (2-tiouridina), Um (2'-O-metiluridina), m1A (1-metiladenosina); m2A (2-metiladenosina); Am (2-1-O-metiladenosina); ms2m6A (2-metiltio-N6-metiladenosina); i6A (N6-isopenteniladenosina); ms2i6A (2-metiltio-N6isopenteniladenosina); io6A (N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms2io6A (2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); g6A (N6-glicinilcarbamoiladenosina); t6A (N6-treonil

carbamoiladenosina); ms2t6A (2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina); m6t6A (N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina); hn6A(N6-hidroxinorvalilcarbamoil adenosina); ms2hn6A (2-metiltio-N6-hidroxinorvalil carbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); mil (1-metilinosina); m'Im (1,2'-O-dimetilinosina); m3C (3-metilcitidina); Cm (2T-O-metilcitidina); s2C (2-tiocitidina); ac4C (N4-acetilcitidina); £5C (5-formilcitidina); m5Cm (5,2-O-dimetilcitidina); ac4Cm (N4acetil2TOMETILcitidina); k2C (lisidina); mIG (1- metilguanosina); m2G (N2-metilguanosina); m7G (7-metilguanosina); Gm (2'-O- metilguanosina); m22G (N2,N2-dimetilguanosina); m2Gm (N2,2'-O- dimetilguanosina); m22Gm (N2,N2,2'-O-trimetilguanosina); Gr(p) (2'-O- ribosilguanosina (fosfato)); yW (wybutosina); o2yW (peroxiwybutosina); OHyW (hidroxiwybutosina); OHyW* (hidroxiwybutosina submodificada); imG (wyosina); mimG (metilguanosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galtactosil-queuosina); manQ (manosil-queuosina); preQo (7-ciano-7-desazaguanosina); preQi (7-aminometil-7-desazaguanosina); G* (arqueosina); D (dihidrouridina); m5Um (5,2'-O-dimetiluridina); s4U (4-tiouridina); m5s2U (5-metil-2-tiouridina); s2Um (2-tio-2'- O-metiluridina); acp3U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho5U (5-hidroxiuridina); mo5U (5-metoxiuridina); cmo5U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo5U (éster metílico del ácido uridina 5-oxiacético); chm5U (5-(carboxihidroximetil)uridina)); mchm5U (éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)uridina); mcm5U (5-metoxicarbonilmetiluridina); mcm5Um (S-metoxicarbonilmetil-2-O-metiluridina); mcm5s2U (5-metoxicarbonilmetil-2-tiouridina); nm5s2U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm5U (5-metilaminometiluridina); mnm5s2U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm5se2U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm5U (5-carbamoilmetil uridina); ncm5Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm5U (5-carboximetilaminometiluridina); cnmm5Um (5-carboximetilaminometil-2-L-OMETILuridina); cmnm5s2U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m62A (N6,N6-dimetiladenosina); Tm (2'-O-metilinosina); m4C (N4-metilcitidina); m4Cm (N4,2-O-dimetilcitidina); hm5C (5-hidroximetilcitidina); m3U (3-metiluridina); cm5U (5-carboximetiluridina); m6Am (N6,T-O-dimetiladenosina); m62Am (N6,N6,O-2-trimetiladenosina); m2'7G (N2,7-dimetilguanosina); m2'2'7G (N2,N2,7- trimetilguanosina); m3Um (3,2T-O-dimetiluridina); m5D (5-metildihidrouridina); f5Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); mIGm (1,2'-O-dimetilguanosina); m'Am (1,2-O-dimetil adenosina) irinometiluridina); tm5s2U (S-taurinometil-2-tiouridina)); imG- 14 (4-desmetilguanosina); imG2 (isoguanosina); ac6A (N6-acetiladenosina), hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7-sustituidos de los mismos, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C1-C6)-alquiluracilo, 5-metiluracilo, 5-(C2-C6)-alqueniluracilo, 5-(C2-C6)-alquiniluracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(C1-C6)-alquilocitosina, 5-metilcitosina, 5-

(C2-C6)-alquencilitosisina, 5-(C2-C6)-alquencilitosisina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 7-desazaguanina, 8-azaguanina, 7-deaza-7-guanina sustituida, 7-deaza-7-(C2-C6)alquiniilguanina, 7-deaza-8-guanina sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-desazapurina sustituida, purina 7-deaza-7-sustituida, purina 7-deaza-8-sustituida, hidrógeno (residuo abásico), m5C, m5U, m6A, s2U, W o 2'-O-metil-U. En algunos aspectos, uno o más de los nucleósidos modificados de la lista pueden estar excluidos.

Otros nucleótidos modificados ejemplares incluyen cualquiera de los siguientes: N-1-metilpseudouridina, pseudouridina, N6-metiladenosina, 5-metilcitidina y 5-metiluridina. En algunas modalidades, el nucleótido modificado es N-1-metilpseudouridina.

En algunas modalidades, la molécula de ARN puede incluir enlaces fosforamidoato, fosforotioato y/o metilfosfonato.

En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye un nucleótido modificado seleccionado de cualquiera de pseudouridina, N1-metilpseudouridina, N1-etilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-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, los nucleótidos modificados o no naturales se seleccionan del grupo que consiste en pseudouridina, N1-metilpseudouridina, N1-etilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-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, los nucleótidos modificados o no naturales se seleccionan del grupo que consiste en 5-metiluridina, N1-metilpseudouridina, 5-metoxiuridina y 5-metilcitosina.

En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula de ARNs ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 25 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total

de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 75 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, esencialmente toda la población de

5 nucleótidos particular en la molécula ha sido reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

En algunas modalidades, al menos una parte o la totalidad de una población total de un nucleótido particular en la molécula de ARNsa ha sido reemplazada por dos nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, los dos nucleótidos modificados o no

10 naturales se proporcionan en una proporción igual a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 1:99 a 99:1, incluyendo 1:99; 2:98; 3:97; 4:96; 5:95; 6:94; 7:93; 8:92; 9:91; 10:90; 11:89; 12:88; 13:87; 14:86; 15:85; 16:84; 17:83; 18:82; 19:81; 20:80; 21:79; 22:78; 23:77; 24:76; 25:75; 26:74; 27:73; 28:72; 29:71; 30:70; 31:69; 32:68; 33:67; 34:66; 35:65; 36:64; 37:63; 38:62; 39:61; 40:60; 41:59; 42:58; 43:57;

15 44:56; 45:55; 46:54; 47:53; 48:52; 49:51; 50:50; 51:49; 52:48; 53:47; 54:46; 55:45; 56:44; 57:43; 58:42; 59:41; 60:40; 61:39; 62:38; 63:37; 64:36; 65:35; 66:34; 67:33; 68:32; 69:31; 70:30; 71:29; 72:28; 73:27; 74:26; 75:25; 76:24; 77:23; 78:22; 79:21; 80:20; 81:19; 82:18; 83:17; 84:16; 85:15; 86:14; 87:13; 88:12; 89:11; 90:10; 91:9; 92:8; 93:7; 94:6; 95:5; 96:4; 97:3; 98:2; y 99:1, o cualquier rango derivable del mismo.

En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en una molécula de ARNsa como se describe en este documento ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 10 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el

20 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el

25 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el

30 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de

una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 75 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha

sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 75 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, esencialmente la totalidad de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

En algunas modalidades, al menos el 25 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula de ARNsa ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 75 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula se ha reemplazado con 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metiluridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con 5-metiluridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de citosina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados por 5-metilcitosina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 2-tiouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con 2-tiouridina.

En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la

molécula ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metiluridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina.

En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados por aproximadamente un 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 50 % de N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con aproximadamente un 75 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 25 % de N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con aproximadamente un 25 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 75 % de N1-metilpseudouridina.

C. UTR

Las regiones no traducidas 5' (UTR) son una región reguladora del ADN situada en el extremo 5' de una secuencia codificante de proteína que se transcribe en ARNm pero no se traduce en proteína. Los UTR 5' pueden contener varios elementos reguladores, por ejemplo, estructura de caperuza 5', estructura de tallo-bucle y un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés), que pueden desempeñar un papel en el control del inicio de la traducción. La UTR 3', situada aguas abajo de una secuencia codificante de proteína, puede estar involucrada en procesos regulatorios que incluyen la escisión de la transcripción, la estabilidad y la poliadenilación, la traducción y la localización del ARNm. En algunas modalidades, el UTR se deriva de un ARNm que es naturalmente abundante en un tejido específico (por ejemplo, tejido linfóide), al cual se dirige la expresión del ARNm. En algunas modalidades, la UTR aumenta la síntesis de proteínas. Sin estar limitado por ningún mecanismo o teoría, la UTR puede aumentar la síntesis de proteínas al aumentar el tiempo que el ARNm permanece en los polisomas traductores (estabilidad del mensaje) y/o la velocidad a la que los ribosomas inician la traducción del mensaje (eficiencia de la traducción del mensaje). Según esto, la secuencia UTR puede prolongar la síntesis de proteínas de una manera específica del tejido. En algunas modalidades, las secuencias 5' UTR y 3' UTR se derivan computacionalmente. En algunas modalidades, las UTR 5' y 3' se derivan de un ARNm naturalmente abundante en un tejido. El tejido puede ser, por ejemplo, hígado, una célula madre o tejido linfóide. El tejido linfóide puede incluir, por ejemplo, cualquiera de los

siguientes: un linfocito (por ejemplo, un linfocito B, un linfocito T colaborador, un linfocito T citotóxico, un linfocito T regulador o una célula asesina natural), un macrófago, un monocito, una célula dendrítica, un neutrófilo, un eosinófilo y un reticulocito. En algunas modalidades, la UTR 5' y la UTR 3' se derivan de un alfavirus. En algunas modalidades, el 5' UTR y el 3' UTR son de un alfavirus de tipo silvestre. A continuación se describen ejemplos de alfavirus.

En algunas modalidades, la primera molécula de ARN incluye un UTR 5' y el UTR 3' derivado de un ARNm naturalmente abundante en un tejido. En algunas modalidades, la primera molécula de ARN incluye un UTR 5' y el UTR 3' derivado de un alfavirus. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN o ARNsa incluye un UTR 5' y el UTR 3' derivado de un alfavirus. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN o ARNsa incluye un UTR 5' y el UTR 3' de un alfavirus de tipo silvestre. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye una caperuza 5'.

D. Marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés)

Los UTR 5' y 3' pueden estar unidos operativamente a un ORF, que puede ser una secuencia de codones que puede traducirse en un polipéptido de interés. Como se indicó anteriormente, la molécula de ARN puede incluir uno (monocistrónico), dos (bicistrónico) o más (multicistrónico) marcos de lectura abiertos (ORF).

En algunas modalidades, el ORF codifica un gen viral no estructural. En algunas modalidades, el ORF incluye además uno o más promotores subgenómicos. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye un promotor subgenómico unido operativamente al ORF. En algunas modalidades, el promotor subgenómico comprende un elemento regulador que actúa en cis. En algunas modalidades, el elemento regulador que actúa en cis se encuentra inmediatamente aguas abajo (5'-3') de B². En algunas modalidades, el elemento regulador que actúa en cis se encuentra inmediatamente aguas abajo (5'-3') de una guanina que se encuentra inmediatamente aguas abajo de B². En algunas modalidades, el elemento regulador que actúa en cis es un elemento rico en AU. En algunas modalidades, el elemento rico en AU es au, auaaaagau, auaaaagau, auag, auauauauau, auauauauau, auaguaugaugau, augau, auaaaagaua o auaaaagaug. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN o ARNsa puede incluir (i) un ORF que codifica una replicasa que puede transcribir ARN de la segunda molécula de ARN o ARNsa y (ii) un ORF que codifica al menos un antígeno o polipéptido de interés. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, por ejemplo, incluida cualquiera de las proteínas no estructurales del alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4, o una combinación de las mismas. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye la

proteína no estructural nsP1 del alfavirus. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye la proteína no estructural nsP2 del alfavirus. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye la proteína no estructural nsP3 del alfavirus. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye la proteína no estructural nsP4 del alfavirus. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye las proteínas no estructurales del alfavirus nsP1, nsP2 y nsP3. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye las proteínas no estructurales del alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye cualquier combinación de nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. En algunas modalidades, la molécula de ARN no incluye nsP4.

- 10 En algunas modalidades, un marco de lectura abierto de una composición de ARN (por ejemplo, ARNsa) está optimizado en cuanto a codones. En algunas modalidades, el marco de lectura abierto en el que se codifica el polipéptido de influenza o un fragmento del mismo está optimizado en cuanto a codones.

E. Genes que codifican polipéptidos antigénicos

- 15 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.

- 25 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 vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, formulados 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 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 influenza A o influenza B o combinaciones de las mismas. En algunas modalidades, la cepa de influenza A o influenza B está asociada con aves, cerdos, caballos, perros, humanos o primates no humanos. En algunas modalidades, el polipéptido antigénico codifica una proteína hemaglutinina o un
5 fragmento de la misma. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina es H7 o H10 o un fragmento de las mismas. En algunas modalidades, la proteína hemaglutinina comprende una porción del dominio de 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 es una proteína hemaglutinina troncada que comprende una porción del dominio transmembrana. En algunas modalidades,
10 el virus se selecciona del grupo que consiste en H7N9 y H10N8. Los fragmentos de proteínas, los dominios de proteínas funcionales y las proteínas homólogas también se consideran dentro del alcance 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 por lo demás idéntica) 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, el al menos un polipéptido antigénico es uno de los subdominios antigénicos definidos de HA, denominados HA1, HA2, o una combinación de
20 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 del mismo que comprenden secuencias antigénicas de HA1 y/o HA2, y al menos un polipéptido
25 antigénico seleccionado entre HA, 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 entre HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2.

Tal como se utiliza en este documento, el término "proteína no estructural" se refiere a
30 una proteína codificada por un virus pero que no es parte de la partícula viral. Más específicamente, las proteínas no estructurales descritas en este documento incluyen, por ejemplo, la proteína NS1 de la influenza, que incluye, entre otras, una NS1 del virus de la influenza tipo A, una NS1 del virus de la influenza tipo B, una NS1 del virus de la influenza

tipo C, una NS1 H1N1, una NS1 H1N2, una NS1 H2N2, una NS1 H3N2, una NS1 H5N1, una NS1 H7N9, una NS1 H7N7, una NS1 H9N2, una NS1 H7N2, una NS1 H7N3, una NS1 H5N2, una NS1 H10N7, combinaciones de las mismas o variantes de las mismas.

En algunas modalidades, la NS1 de influenza es una NS1 H1N1, NS1 H1N2, NS1 H2N2, NS 1 H3N2, NS 1 H5N1, NS 1 H7N9, NS 1 H7N7, NS 1 H9N2, NS 1 H7N2, NS 1 H7N3, NS 1 H5N2, NS 1 H10N7, una variante de las mismas o una combinación de las mismas. En algunas modalidades, la NS1 de la influenza es una NS1 H1N2. En algunas modalidades, la NS1 de la influenza es una NS1 H2N2. En algunas modalidades, la NS1 de la influenza es una NS1 H3N2. En algunas modalidades, la NS1 de influenza es una NS1 H7N9. En algunas modalidades, la NS1 de la influenza es una NS1 H7N7. En algunas modalidades, la NS1 de la influenza es una NS1 H9N2. En algunas modalidades, la NS1 de la influenza es una NS1 H7N2. En algunas modalidades, la NS1 de la influenza es una NS1 H7N3. En algunas modalidades, la NS1 de influenza es una NS1 H5N2. En algunas modalidades, la NS1 de influenza es una NS1 H10N7. En algunas modalidades, la NS1 de la influenza es una NS1 H1N1. En algunas modalidades, la influenza es la variante NS1 del virus H1N1 TX91. En algunas modalidades, la NS1 de influenza codificada por la primera molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos establecida en GenBank (NCBI) AF389122:

```
MDPNTVSSFQ VDCFLWHVRK RVADQELGDA PFLDRLRRDQ KSLRGRGSTL GLDIETATRA 60
GKQIVERILK EESDEALKMT MASVPASRYL TDMTLEEMSR DWSMLIPKQK VAGPLCIRMD 120
QAIMDKNIIL KANFSVIFDR LETLILLRAF TEEGAIVGEI SPLPSLPGHT AEDVKNVAVGV 180
LIGGLEWNDN TVRVSETLQR FAWRSSNENG RPPLTPKQKR EMAGTIRSEV 230 (SEQ ID NO: 33)
```

En algunas modalidades, una composición de ARNsa comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) 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 composición de ARNsa comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tiene un marco de lectura abierto que

codifica múltiples proteínas del virus de la influenza, o fragmentos inmunogénicos de las mismas.

5 En algunas modalidades, una composición de ARNsa comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) 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).

10 En algunas modalidades, una composición de ARNsa comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) 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 cualquiera de o una combinación de cualquiera o todas de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 y/o H18) y al menos otro polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína seleccionada de una proteína HA, proteína NP, una proteína NA, una proteína M1, una proteína M2, una proteína NS1 y una proteína
15 NS2 obtenida del virus de la influenza.

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

25 En algunas modalidades, una composición de ARNsa comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos uno de cualquiera de o una combinación de cualquiera o todos de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 y/o H18) y al menos otros tres
30 polinucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tienen tres marcos de lectura abiertos que codifican tres proteínas seleccionadas de una proteína HA, 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 composición de ARNsa comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos uno de cualquiera de o una combinación de cualquiera o todos de 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 polinucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tienen cuatro marcos de lectura abiertos que codifican cuatro proteínas seleccionadas de una proteína HA, 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 composición de ARNsa comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA, o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos uno de cualquiera de o una combinación de cualquiera o todos de 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 polinucleótidos de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tienen cinco marcos de lectura abiertos que codifican cinco proteínas seleccionadas de una proteína HA, 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 composición de ARNsa comprende al menos un polinucleótido de ARN (por ejemplo, ARNsa) que tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína HA o un fragmento inmunogénico de la misma (por ejemplo, al menos uno de cualquiera de o una combinación de cualquiera o todos de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 y/o H18), una proteína HA, 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 obtenida del virus de la influenza.

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

proteínas de fusión antigénicas, en algunas modalidades, conservan la propiedad funcional de cada proteína original.

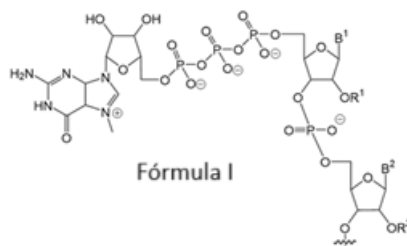
F. Caperuza 5'

En algunas modalidades, la molécula de ARNs descrita en este documento incluye una caperuza 5'. En algunas modalidades, la porción de caperuza 5' es una caperuza 5' natural.

Una "caperuza 5' natural" se define como una caperuza que incluye 7-metilguanosina conectada al extremo 5' de una molécula de ARNm a través de un enlace trifosfato de 5' a 5'. En algunas modalidades, la porción de caperuza 5' es un análogo de caperuza 5'. En algunas modalidades, al extremo 5' del ARN se adiciona caperuza con un ribonucleótido modificado con la estructura m7G (5') ppp (5') N (estructura de caperuza 0) o un derivado del mismo, que puede incorporarse durante la síntesis de ARN (por ejemplo, capping cotranscripcional) o puede modificarse enzimáticamente después de la transcripción del ARN (por ejemplo, capping postranscripcional), en donde "N" es cualquier ribonucleótido. En algunas modalidades, al extremo 5' de la molécula de ARN se adiciona caperuza con un ribonucleótido modificado a través de una reacción enzimática después de la transcripción del ARN. En algunas modalidades, el capping se realiza después de la purificación, por ejemplo, filtración de flujo tangencial, de la molécula de ARN. Una reacción enzimática ejemplar para el capping puede incluir el uso de la enzima de capping del virus (VCE) Vaccinia, que incluye ARNm trifosfatasa, guanililtransferasa y guanina-7-metiltransferasa, que cataliza el constructo de estructuras de caperuza 0 monometiladas N7. La estructura caperuza 0 puede ayudar a mantener la estabilidad y la eficacia traduccional de la molécula de ARN. La caperuza 5' de la molécula de ARN puede modificarse aún más mediante una 2'-O-metiltransferasa, lo que genera una estructura de caperuza 1 (m7Gppp [m2'-O] N), que puede aumentar aún más la eficacia de la traducción. En algunas modalidades, la molécula de ARN puede adicionarse caperuza enzimáticamente en el extremo 5' utilizando guanililtransferasa de Vaccinia, trifosfato de guanosina y S-adenosil-L-metionina para producir la estructura de caperuza 0. Se añade una caperuza de 7-metilguanosina invertida a través de un puente trifosfato de 5' a 5'. Alternativamente, el uso de una 2'O-metiltransferasa con guanililtransferasa de Vaccinia produce la estructura caperuza 1 en donde además de la estructura caperuza 0, el grupo 2'OH está metilado en el penúltimo nucleótido. La S-adenosil-L-metionina (SAM) es un cofactor utilizado como reactivo de transferencia de metilo. Los ejemplos no limitantes de estructuras de caperuza 5' son aquellos que, entre otras cosas, tienen una unión mejorada de polipéptidos

de unión de caperuza, una vida media aumentada, una susceptibilidad reducida a las endonucleasas 5' y/o un decapping 5' reducido, en comparación con las estructuras de caperuza 5' sintéticas conocidas en la técnica (o con una estructura de caperuza 5' de tipo silvestre, natural o fisiológica). Por ejemplo, la enzima de capping del virus vaccinia recombinate y la enzima 2'-O-metiltransferasa recombinate pueden crear un enlace canónico 5'-5'-trifosfato entre el nucleótido 5'-terminal de un ARNm y un nucleótido de caperuza de guanina, en donde la guanina de caperuza incluye una metilación N7 y el nucleótido 5'-terminal del ARNm incluye un 2'-O-metilo. Esta estructura se denomina estructura Caperuza1. Esta caperuza da como resultado una mayor competencia traduccional y estabilidad celular y una activación reducida de las citocinas proinflamatorias celulares, en comparación, por ejemplo, con otras estructuras análogas de caperuza 5' conocidas en la técnica. Las estructuras de caperuza incluyen, pero no se limitan a, 7mG(5')ppp(5')N,pN2p (caperuza 0) y 7mG(5')ppp(5')N1mpNp (caperuza 1). Caperuza 0 es una guanosina N7-metil conectada al nucleótido 5' a través de un enlace trifosfato 5' a 5', normalmente denominado caperuza m7G o m7Gppp. En la célula, la estructura de la caperuza 0 puede ayudar a proporcionar una traducción eficiente del ARNm que lleva la caperuza. Una metilación adicional en la posición 2'O del nucleótido iniciador genera caperuza 1, o se denomina m7GpppNm-, en donde Nm denota cualquier nucleótido con una metilación 2'O. En algunas modalidades, la caperuza terminal 5' incluye un análogo de caperuza, por ejemplo, una caperuza terminal 5' puede incluir un análogo de guanina. Los análogos de guanina ejemplares incluyen, pero no se limitan a, inosina, N1-metil-guanosina, 2'fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina. En algunas modalidades, la región de capping puede incluir una única caperuza o una serie de nucleótidos que forman la caperuza. En esta modalidad, la región de capping puede ser igual a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o al menos 2, o 10 o menos nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la caperuza está ausente. En algunas modalidades, la primera y la segunda región operativa pueden ser iguales a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 3 a 40, por ejemplo, 5-30, 10-20, 15, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, o al menos 4, o 30 o menos nucleótidos de longitud y pueden comprender, además de un codón de inicio y/o de parada, una o más secuencias de señal y/o restricción.

En algunas modalidades, la caperuza 5' está representada por la Fórmula I:



en donde R^1 y R^2 son cada uno independientemente H o Me, y B^1 y B^2 son cada uno independientemente guanina, adenina o uracilo. En algunas modalidades, B^1 y B^2 son bases que se producen de forma natural. En algunas modalidades, R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

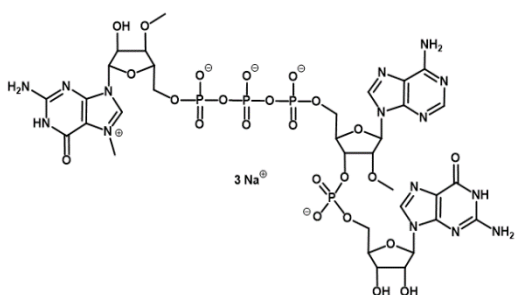
5 En algunas modalidades, B¹ es guanina. En algunas modalidades, B¹ es adenina. En algunas modalidades, B² es adenina. En algunas modalidades, B² es uracilo. En algunas modalidades, B² es uracilo y al menos el 5 % de una población total de nucleótidos de uracilo en la molécula que se encuentran aguas abajo de B² han sido reemplazados por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (dirección 5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina. En algunas modalidades, B¹ es adenina y B² es uracilo. En algunas modalidades, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno. En algunos casos, el ARNsa no comprende una caperuza 5'. En algunos casos, la caperuza 5' no está representada por la Fórmula I. En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno; esta modalidad corresponde a CleanCap AU y la inclusión de B² = uracilo, mientras que opcionalmente se sustituyen los nucleótidos de uracilo aguas abajo de B², se ha demostrado que mejora la funcionalidad del ARNsa en algunas modalidades. En algunas modalidades, la molécula de ARN comprende además: (1) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' del alfavirus, y (2) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' del alfavirus. En algunas modalidades, la molécula de ARN codifica al menos un antígeno. En algunas modalidades, la molécula de ARN comprende al menos 7000 nucleótidos. En algunas modalidades, la molécula de ARN comprende al menos 8000 nucleótidos. En algunas modalidades, al menos el 80 % de las moléculas de ARN totales son de longitud completa. En algunas modalidades, el alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana. En algunas modalidades, el alfavirus es el virus del bosque Semliki.

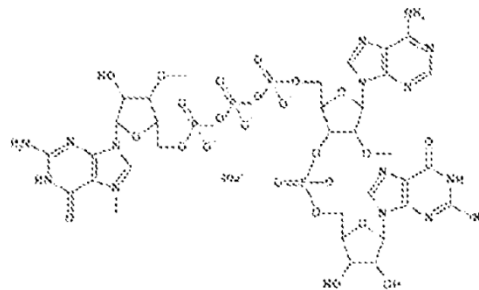
En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de la población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido

reemplazada con N1-metilpseudouridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de la población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de la población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metiluridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados por aproximadamente un 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 50 % de N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados por aproximadamente un 75 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 25 % de N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados por aproximadamente un 25 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 75 % de N1-metilpseudouridina.

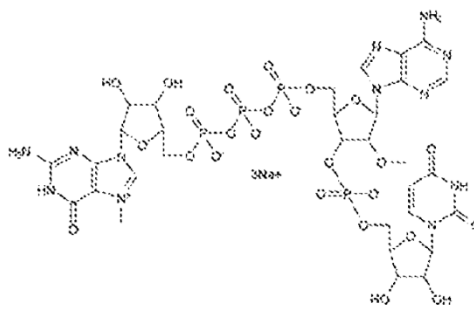
En algunas modalidades, una caperuza terminal 5' es 7mG(5')ppp(5')NlmpNp. En algunas modalidades preferidas, la caperuza 5' comprende:



. En algunas modalidades, la caperuza 5' comprende el reactivo CLEANCAP® AG (3' OMe) para el capping cotranscripcional del



ARNm, m7(3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, . En modalidades alternativas, la caperuza 5' comprende CLEANCAP® AU para ARNm autoamplificante, reactivo CLEANCAP® AU para el capping cotranscripcional de ARNm,



m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU,

5 G. Cola de poli-A

Como se utiliza en este documento, “cola de poli A” se refiere a un tramo de residuos de adenina consecutivos, que pueden estar unidos al extremo 3’ de la molécula de ARN. La cola de poli-A puede aumentar la vida media de la molécula de ARN. Las colas de poli-A pueden desempeñar funciones reguladoras clave para mejorar la eficiencia de la traducción y regular la eficiencia del control de calidad y la degradación del ARNm. Las secuencias cortas o la hiperpoliadenilación pueden indicar la degradación del ARN. Los diseños ejemplares incluyen colas de poli-A de aproximadamente 40 residuos de adenina a aproximadamente 80 residuos de adenina. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye además una secuencia de sitio de reconocimiento de endonucleasa inmediatamente aguas abajo de la secuencia de cola de poli A. En algunas modalidades, como para la segunda molécula de ARN o la molécula de ARNsa, la molécula de ARN incluye además una secuencia de reconocimiento de polimerasa de poli-A (por ejemplo, AAUAAA) cerca de su extremo 3’. Una molécula de ARN de “longitud completa” es aquella que incluye una caperuza 5’ y una cola de poli A.

En algunas modalidades, la cola de poli A incluye entre 5 y 400 nucleótidos de longitud. La longitud del nucleótido de cola de poli A puede ser igual a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15,

20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 y 400. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye una cola de poli A que incluye aproximadamente 25 a aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nucleótidos de adenosina, una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina, una secuencia de aproximadamente 60 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina o una secuencia de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 nucleótidos de adenosina. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye una cola de poli A que incluye una secuencia de más de 30 nucleótidos de adenosina ("As"). En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye una cola de poli A que incluye aproximadamente 40 As. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye una cola de poli A que incluye aproximadamente 80 As. Tal como se utiliza en este documento, el término "aproximadamente" se refiere a una desviación de ± 10 % del valor o valores a los que está asociado. En algunas modalidades, la cola de poli-A 3' tiene un tramo de al menos 10 residuos de adenosina consecutivos y como máximo 300 residuos de adenosina consecutivos. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye al menos 20 residuos de adenosina consecutivos y como máximo 40 residuos de adenosina consecutivos. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye aproximadamente 40 residuos de adenosina consecutivos. En algunas modalidades, la molécula de ARN incluye aproximadamente 80 residuos de adenosina consecutivos.

H. Composición

En algunos casos, las composiciones descritas en este documento incluyen al menos un ARNsa como se describe en este documento. Algunas modalidades de la presente divulgación proporcionan vacunas (o composiciones o composiciones inmunogénicas) contra el virus de la influenza (influenza) que incluyen al menos un polinucleótido de ARNsa 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 inmune a la influenza).

En algunas modalidades, igual a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de las

moléculas de ARN totales (con caperuza y sin caperuza) en la composición tienen caperuza.

En algunas modalidades, igual a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de las moléculas de ARN totales en la composición son transcripciones de ARN de longitud completa. La pureza se puede determinar como se describe en este documento, por ejemplo, mediante HPLC de fase inversa o electroforesis basada en chip Bioanalyzer y medir, por ejemplo, el área del pico de la molécula de ARN de longitud completa en relación con el pico total. En algunas modalidades, se puede utilizar un analizador de fragmentos (FA, por sus siglas en inglés) para cuantificar y purificar el ARN. El analizador de fragmentos automatiza la electroforesis capilar y la HPLC.

En algunas modalidades, la composición está sustancialmente libre de una o más impurezas o contaminantes, incluida la plantilla de ADN lineal y/o los productos de transcripción del complemento inverso y, por ejemplo, incluye moléculas de ARN que son iguales a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % puras; al menos 98 % puras o al menos 99 % puras.

En algunas modalidades, la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN. En algunas modalidades, la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es al menos aproximadamente 1 a 2 veces mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN. En algunas modalidades, la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es al menos aproximadamente 1 a 100 veces mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN.

En algunas modalidades, la composición incluye además un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición incluye además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la composición incluye además un sistema de suministro basado en lípidos, que suministra una molécula de ARN al interior de una célula, donde luego puede replicarse y/o expresar el polipéptido codificado de interés. El sistema de suministro puede tener efectos adyuvantes que mejoran la inmunogenicidad de un antígeno codificado.

En algunas modalidades, la composición incluye además lípidos neutros, lípidos catiónicos, colesterol y polietilenglicol (PEG), y forma nanopartículas que abarcan las moléculas de ARN. En algunas modalidades, la composición incluye además cualquiera de los siguientes: un lípido catiónico, un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico y una nanoemulsión catiónica. En algunas modalidades, la molécula de ARN está encapsulada, unida o adsorbida en cualquiera de los siguientes: un lípido catiónico, un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico y una nanoemulsión catiónica, o una combinación de los mismos.

En algunos casos, las composiciones descritas en este documento incluyen al menos dos moléculas de ARN: una primera molécula de ARNsa y una segunda molécula de ARN como se describe en este documento. Para proteger contra más de una cepa de influenza, se puede administrar una composición de vacuna combinada que incluye ARN (por ejemplo, ARNsa) que codifica al menos una proteína polipeptídica antigénica (o una porción antigénica de la misma) de un primer virus u organismo de influenza e incluye además una segunda molécula de ARN que codifica al menos una proteína polipeptídica antigénica (o una porción antigénica de la misma) de un segundo virus u organismo de influenza. El ARN (por ejemplo, ARNsa) se puede coformular, por ejemplo, en una única nanopartícula lipídica (LNP, por sus siglas en inglés) o se puede formular en LNP separadas para su coadministración.

En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN incluye cualquiera de los siguientes: una caperuza 5', un UTR 5', un marco de lectura abierto, un UTR 3' y una secuencia de poli A, o cualquier combinación de los mismos. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN incluye una porción de caperuza 5'. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN incluye un 5'UTR y un 3'UTR. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN incluye un 5'UTR, un marco de lectura abierto, un 3'UTR y no incluye además una caperuza 5'. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN incluye una porción de caperuza 5', una UTR 5', una región codificante, una UTR 3' y una secuencia de poli A 3'. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN incluye una porción de caperuza 5', una UTR 5', una región no codificante, una UTR 3' y una secuencia de poli A 3'. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN incluye una región no codificante y no

comprende además ninguna de las siguientes: una porción de caperuza 5', una UTR 5', una UTR 3' y una secuencia de poli A 3'. En algunas modalidades, la segunda molécula de ARN incluye una porción de caperuza 5', una región no traducida 5' (5' UTR), un nucleótido modificado, un marco de lectura abierto, una región no traducida 3' (3' UTR) y una secuencia de poli A 3'.

Algunos aspectos de la divulgación están dirigidos a una composición que comprende (i) una primera molécula de ARN que codifica un gen de interés derivado de la influenza; y (ii) una segunda molécula de ARN que comprende un nucleótido modificado o no natural. En algunos casos, la primera molécula de ARN es cualquiera de las moléculas de ARNsa descritas en este documento. En algunos casos, la primera molécula de ARN comprende una caperuza 5', una región no traducida 5', una región codificante para una proteína no estructural que comprende una ARN replicasa, un promotor subgenómico, un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés, una región no traducida 3' y una secuencia de poli A 3'. En algunos casos, al menos el 5 % de la población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunos casos, la molécula de ARNsa está compuesta de nucleótidos naturales, no modificados, y no incluye ningún nucleótido modificado o no natural. En algunos casos, la caperuza 5' está representada por la Fórmula I, donde R1 y R2 son cada uno independientemente H o Me, B1 y B2 son cada uno independientemente guanina, adenina o uracilo, una región no traducida 5', una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus, un promotor subgenómico, como uno derivado de un alfavirus, un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés, una región no traducida 3' y una secuencia poli A 3'. En algunas modalidades, B1 y B2 son bases naturales. En algunas modalidades, R1 es metilo y R2 es hidrógeno. En algunas modalidades, B1 es guanina. En algunas modalidades, B1 es adenina. En algunas modalidades, B2 es adenina. En algunas modalidades, B2 es uracilo. En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (dirección 5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina.

En algunas modalidades, B¹ es adenina y B² es uracilo. En algunas modalidades, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno. En algunas modalidades, el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno; esta modalidad corresponde a CLEANCAP AU (Trilink) y la inclusión de B² = uracilo, mientras que opcionalmente se sustituyen los nucleótidos de uracilo aguas abajo de B², que ha demostrado proporcionar una mayor funcionalidad de ARNsa en algunas modalidades.

En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 25 % de una población total de un nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de un nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 75 % de una población total de un nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, esencialmente la totalidad de una población de nucleótidos particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, los uno o más nucleótidos de reemplazo modificados o no naturales comprenden dos nucleótidos modificados o no naturales proporcionados en una proporción que varía de 1:99 a 99:1, o cualquier rango derivable dentro de los mismos. En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 10 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales. En algunas modalidades, al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la primera o segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos

[illegible]

En algunas modalidades, al menos el 25 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN se ha reemplazado con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN se ha reemplazado con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 75 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN se ha reemplazado con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN se ha reemplazado con 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN se ha reemplazado con 5-metiluridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metiluridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de citosina en la primera molécula de ARN se ha reemplazado con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados por 5-metilcitosina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN se ha reemplazado con 2-tiouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 2-tiouridina.

En algunas modalidades, al menos el 25 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 75 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con 5-metiluridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido

reemplazados con 5-metiluridina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con 2-tiouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 2-tiouridina.

En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con 5-metoxiuridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN se han reemplazado con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN se ha reemplazado con 5-metiluridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN se han reemplazado con 5-metilcitosina.

En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente un 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 50 % de N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente un 75 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 25 % de N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente un 25 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 75 % de N1-metilpseudouridina.

En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina y al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula

de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina y al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metiluridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina. En algunas modalidades, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 50 % de N1-metilpseudouridina.

I. Métodos de uso

Las composiciones de ARNsa se pueden utilizar para tratar y/o prevenir un virus de influenza de varios genotipos, cepas y aislamientos. Algunas modalidades proporcionan métodos para prevenir o tratar la infección viral de la influenza que comprenden administrar a un sujeto cualquiera de las composiciones de ARNsa descritas en este documento. En algunas modalidades, la respuesta inmune específica del antígeno comprende una respuesta de células T. En algunas modalidades, la respuesta inmune específica de antígeno comprende una respuesta de células B. En algunas modalidades, la respuesta inmune específica de antígeno comprende tanto una respuesta de células T como una respuesta de células B. En algunas modalidades, el método para producir una respuesta inmune específica de antígeno implica una única administración de la composición de ARNsa. En algunas modalidades, la composición de ARNsa se administra al sujeto mediante inyección intradérmica, intramuscular, inyección subcutánea, inoculación intranasal o administración oral.

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

Algunos aspectos de la divulgación están dirigidos a un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición como se divulga en este documento. Algunos aspectos

de la divulgación están dirigidos a un método para vacunar a un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición como se divulga en este documento. Algunos aspectos de la divulgación están dirigidos a un método que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición como se divulga en este documento. En algunas modalidades, una composición como se describe en este documento provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de anticuerpos. En algunas modalidades, una composición como se describe en este documento provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de células T.

Algunas modalidades de la presente divulgación proporcionan métodos para inducir una respuesta inmune específica de antígeno en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto cualquiera de las composiciones de ARN (por ejemplo, ARNsa) proporcionadas en este documento en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune específica de antígeno. En algunas modalidades, la composición de ARN (por ejemplo, ARNsa) es una vacuna contra la influenza. En algunas modalidades, la composición de ARN (por ejemplo, ARNsa) es una vacuna combinada que comprende una combinación de vacunas contra la influenza (una vacuna contra la influenza de amplio espectro).

En algunas modalidades, una respuesta inmune específica de antígeno comprende una respuesta de células T o una respuesta de células B. En algunas modalidades, un método para producir una respuesta inmune específica de antígeno comprende administrar a un sujeto una dosis única (sin dosis de refuerzo) de una composición de ARN de influenza (por ejemplo, ARNsa) de la presente divulgación. En algunas modalidades, un método comprende además administrar al sujeto una segunda dosis (de refuerzo) de una composición de ARN de influenza (por ejemplo, ARNsa). Se pueden administrar dosis adicionales de una composición de ARN de influenza (por ejemplo, ARNsa).

En algunas modalidades, los sujetos exhiben una tasa de seroconversión de al menos el 80 % (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %) después de la primera dosis o la segunda dosis (de refuerzo) de la vacuna. La seroconversión es el período de tiempo durante el cual un anticuerpo específico se desarrolla y se vuelve detectable en la sangre. Una vez producida la seroconversión, el virus puede detectarse en análisis de sangre mediante anticuerpos. Durante una infección o inmunización, los antígenos ingresan a la sangre y el sistema inmunitario comienza a producir anticuerpos en respuesta. Antes de la seroconversión, el antígeno en sí puede o no ser detectable, 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.

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

Algunas modalidades de la presente divulgación proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto, incluida la administración a un sujeto de una composición de ARN de influenza (por ejemplo, ARNsa) en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto. Las respuestas inmunes específicas de antígeno en un sujeto se pueden determinar, en algunas modalidades, mediante el análisis del título de anticuerpos (para el título de un anticuerpo que se une a un polipéptido antigénico de influenza) después de la administración al sujeto de cualquiera de las composiciones de ARN de influenza (por ejemplo, ARNsa) de la presente divulgación. En algunas modalidades, el título de anticuerpos antipolipéptido antigénico producido en el sujeto aumenta en al menos 1 log con respecto a un control. En algunas modalidades, el título de anticuerpos antipolipéptido antigénico producido en el sujeto aumenta en 1-3 log con respecto a un control.

En algunas modalidades, el título de anticuerpos antipolipéptido antigénico producido en un sujeto aumenta al menos 2 veces con respecto a un control. En algunas modalidades, el título de anticuerpos antipolipéptido antigénico producido en el sujeto aumenta al menos 5 veces con respecto a un control. En algunas modalidades, el título de anticuerpos antipolipéptido antigénico producido en el sujeto aumenta al menos 10 veces con respecto a un control. En algunas modalidades, el título de anticuerpos antipolipéptido antigénico producido en el sujeto aumenta de 2 a 10 veces con respecto a un control.

En algunas modalidades, el control es un título de anticuerpo anti-polipéptido antigénico producido en un sujeto a quien no se le ha administrado una composición de ARN (por ejemplo, ARNsa) de la presente divulgación. En algunas modalidades, el control es un título de anticuerpo antipolipéptido antigénico producido en un sujeto al que se le ha administrado una influenza viva atenuada o inactivada, o en donde el control es un título de anticuerpo antipolipéptido antigénico producido en un sujeto al que se le ha administrado una vacuna de proteína de influenza recombinante o purificada.

En algunas modalidades, la composición de ARN (por ejemplo, ARNsa) se formula en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune específica de antígeno en un sujeto.

En algunas modalidades, la cantidad efectiva es una dosis total de 1 µg a 1000 µg, o de 1 µg a 100 µg de ARNsa. En algunas modalidades, la cantidad efectiva es una dosis total de 30 µg. En algunas modalidades, la cantidad efectiva es una dosis de 10 µg administrada al sujeto un total de dos veces. En algunas modalidades, la cantidad efectiva es una dosis de 10 µg administrada al sujeto un total de dos veces. En algunas modalidades, la cantidad efectiva es una dosis de 15 µg administrada al sujeto un total de dos veces. En algunas modalidades, la cantidad efectiva es una dosis de 30 µg administrada al sujeto un total de dos veces.

En algunas modalidades, el método incluye administrar al sujeto una composición de ARNsa descrita en este documento en una dosis de entre 10 µg/kg y 400 µg/kg. En algunas modalidades, la dosis del polinucleótido de ARNsa 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 composición de ARNsa se administra al sujeto mediante inyección intradérmica o intramuscular. En algunas modalidades, la composición de ARNsa se administra al sujeto el día cero. En algunas modalidades, se administra una segunda dosis de la composición de ARNsa al sujeto el día veintiuno.

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

En algunas modalidades, el sujeto nació a término (por ejemplo, aproximadamente 37 a 42 semanas). En algunas modalidades, el sujeto nació prematuramente, por ejemplo, aproximadamente a las 36 semanas de gestación o antes (por ejemplo, aproximadamente 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26 o 25 semanas). Por ejemplo, el sujeto puede haber nacido

aproximadamente a las 32 semanas de gestación o antes. En algunas modalidades, el sujeto nació prematuramente entre aproximadamente 32 semanas y aproximadamente 36 semanas de gestación. En estos sujetos, se puede administrar una vacuna de ARN (por ejemplo, ARNm) más tarde en la vida, por ejemplo, entre los 6 meses y los 5 años de edad, o más.

- 5 En algunas modalidades, el sujeto es un adulto joven entre aproximadamente 20 años y aproximadamente 50 años (por ejemplo, aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 años).

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

- 10 En algunas modalidades, el sujeto ha estado expuesto a la influenza (por ejemplo, C. trachomatis); el sujeto está infectado con influenza (por ejemplo, C. trachomatis); o el sujeto corre el riesgo de contraer una infección por influenza (por ejemplo, C. trachomatis).

- En algunas modalidades, el sujeto ha estado expuesto al betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2); el sujeto está infectado con betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2); o el sujeto corre el riesgo de infección por betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2).
- 15

- En algunas modalidades, el sujeto ha recibido al menos una dosis de una composición inmunogénica contra el betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2), por ejemplo, seleccionada de cualquiera de COMIRNATY®, la vacuna contra la COVID-19 de Pfizer-BioNTech, la vacuna contra la COVID-19 mRNA-1273 de Moderna y la vacuna contra la 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 recibiendo al menos una dosis de una composición inmunogénica contra el betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2), por ejemplo, seleccionada de cualquiera de COMIRNATY®, la vacuna contra la COVID-19 de Pfizer-BioNTech, la vacuna contra la COVID-19 mRNA-1273 de Moderna y la vacuna contra la COVID-19 de Janssen; o al sujeto se le está administrando una composición inmunogénica contra betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2), por ejemplo, seleccionada de cualquiera de COMIRNATY®, la vacuna Pfizer-BioNTech COVID-19, la vacuna Moderna mRNA-1273 COVID-19 y la vacuna Janssen COVID-19 con riesgo de infección por betacoronavirus (por ejemplo, SARS-CoV-2) concomitantemente, simultáneamente o dentro de las 12 a 48 horas de cualquiera de las composiciones inmunogénicas contra la influenza divulgadas en este documento.
- 20
- 25
- 30

En algunas modalidades, el sujeto está inmunodeprimido (tiene un sistema inmunológico deteriorado, por ejemplo, tiene un trastorno inmunológico o un trastorno autoinmune).

Aspectos de la divulgación proporcionan composiciones de ARNsa que comprenden uno o más polinucleótidos de ARNsa que tienen un marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido antigénico, en donde el polinucleótido de ARNsa está presente en la formulación para administración in vivo a un huésped, lo que confiere un título de anticuerpos superior al criterio de seroprotección para el primer antígeno (por ejemplo, HA) para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. En algunas modalidades, el título de anticuerpos producido por la composición de ARNsa de la divulgación 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 la composición de ARNsa es mayor que el de una vacuna de proteína adyuvada. En otras modalidades más, el título de anticuerpos neutralizantes producido por la composición de ARNsa 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, 2000-10.000, 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 generalmente se expresa como la dilución de suero más alta requerida para lograr una reducción del 50 % en el número de placas.

J. Ácidos nucleicos

En ciertas modalidades, las secuencias de ácidos nucleicos pueden existir en una variedad de casos, tales como: segmentos aislados y vectores recombinantes de secuencias incorporadas o polinucleótidos recombinantes que codifican polipéptidos, tales como antígenos o una o ambas cadenas de un anticuerpo, o un fragmento, derivado, muteína o variante del mismo, polinucleótidos suficientes para su uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de secuenciación para identificar, analizar, mutar o amplificar un polinucleótido que codifica un polipéptido, ácidos nucleicos antisentido para inhibir la expresión de un polinucleótido, ARNm, ARNsa y secuencias complementarias de los anteriores descritos en este documento. Ácidos nucleicos que codifican un epítipo al que pueden unirse los anticuerpos. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que incluyen estos polipéptidos. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden comprender nucleótidos de ARN y/o ADN y variantes artificiales de los mismos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos).

El término “polinucleótido” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede ser recombinante o que ha sido aislada del ácido nucleico genómico total. Dentro del término “polinucleótido” se incluyen oligonucleótidos (ácidos nucleicos de 100 residuos o menos de longitud), vectores recombinantes, incluidos, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares. Los polinucleótidos incluyen, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente de sus genes o secuencias codificantes de proteínas de origen natural. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser ARN, ADN (genómico, ADNc o sintético), análogos de los mismos o una combinación de los mismos. Es posible que haya secuencias codificantes o no codificantes adicionales dentro de un polinucleótido, aunque no es necesario.

En este sentido, el término “gen” se utiliza para referirse a un ácido nucleico que codifica una proteína, un polipéptido o un péptido (incluidas todas las secuencias necesarias para una transcripción adecuada, modificación postraducciona l o localización). Como comprenderán los expertos en la materia, este término abarca secuencias genómicas, casetes de expresión, secuencias de ADNc y segmentos de ácido nucleico diseñados más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes. Un ácido nucleico que codifica la totalidad o parte de un polipéptido puede contener una secuencia de ácido nucleico contigua que codifica la totalidad o una parte de dicho polipéptido. También se contempla que un polipéptido particular puede estar codificado por ácidos nucleicos que contienen variaciones que tienen secuencias de ácidos nucleicos ligeramente diferentes pero que, no obstante, codifican el mismo polipéptido o un polipéptido sustancialmente similar.

En ciertas modalidades, hay variantes de polinucleótidos que tienen una identidad sustancial con las secuencias divulgadas en este documento; aquellas que comprenden igual a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de polinucleótidos proporcionada en este documento utilizando los métodos descritos en este documento (por ejemplo, análisis BLAST utilizando parámetros estándar). En ciertos aspectos, el polinucleótido aislado comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, a lo largo de toda la longitud de la secuencia; o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho polinucleótido aislado. En algunas modalidades, el polinucleótido aislado comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad

con una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, a lo largo de toda la longitud de la secuencia; o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho polinucleótido aislado.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia 5' UTR que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 15. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 16. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 19. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 21. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia 5' UTR que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70

%, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 15; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 16; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 17; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado entre HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 19; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado entre HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 21; y una cola de poli A que comprende al menos 20 adeninas consecutivas.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia 5' UTR que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 15; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 16; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 17; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 18; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 19; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 20; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 21; y una cola de poli A que comprende al menos 20 adeninas consecutivas.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia UTR 5' que tiene SEQ ID NO: 12; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 13; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 14; una secuencia que tiene SEQ ID NO: 15; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 16; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 17; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado entre HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 19; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado entre HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 21; y una cola de poli A que comprende al menos 20 adeninas consecutivas.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia UTR 5' que tiene SEQ ID NO: 12; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 13; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 14; una secuencia que tiene SEQ ID NO: 15; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 16; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 17; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 18; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 19; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 20; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 21; y una cola de poli A que comprende al menos 20 adeninas consecutivas.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia 5' UTR que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 23. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 28. En

algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 30. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 31. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 32.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia 5' UTR que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 23; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24; una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 26; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 28; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado entre HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 31; y una cola de poli A que comprende al menos 20 adeninas consecutivas.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia 5' UTR que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 23; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24; una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID

NO: 25; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 26; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 27; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 28; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 30; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 31; y una cola de poli A que comprende al menos 20 adeninas consecutivas.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia UTR 5' SEQ ID NO: SEQ ID NO: 23; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 24; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 25; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 26; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 27; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 28; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 29; una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado entre HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 31; y una cola de poli A que comprende al menos 20 adeninas consecutivas.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia UTR 5' SEQ ID NO: SEQ ID NO: 23; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 24; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 25; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 26; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 27; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 28; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 29; una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 30; una secuencia de polinucleótidos que tiene SEQ ID NO: 31; y una cola de poli A que comprende al menos 20 adeninas consecutivas.

Los segmentos de ácido nucleico, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí, pueden combinarse con otras secuencias de ácido nucleico, como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de

clonación múltiple, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Los ácidos nucleicos pueden tener cualquier longitud. Pueden ser, por ejemplo, iguales a cualquiera de, al menos cualquiera de, como máximo cualquiera de, o entre dos cualesquiera de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1500, 3000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000 o más nucleótidos de longitud, y/o pueden comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo, reguladoras secuencias y/o ser parte de un ácido nucleico más grande, por ejemplo, un vector. Por lo tanto, se contempla que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ácido nucleico recombinante previsto. En algunos casos, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia polipeptídica con secuencias codificantes heterólogas adicionales, por ejemplo, para permitir la purificación del polipéptido, el transporte, la secreción, la modificación postraduccional o para obtener beneficios terapéuticos como la focalización o la eficacia. Como se discutió anteriormente, se puede agregar una etiqueta u otro polipéptido heterólogo a la secuencia codificante del polipéptido modificado, en donde “heterólogo” se refiere a un polipéptido que no es el mismo que el polipéptido modificado.

Como se utiliza en este documento, “modNS1” se refiere a “modNS1” se refiere a un polinucleótido que codifica la proteína NS1, en donde el polinucleótido incluye N1-metilpseudouridina (m1ψ). En modalidades preferidas, el modNS1 incluye una caperuza 5', una UTR 5', una UTR 3' y una cola de poli-A.

K. Suministro de lípidos

En algunas modalidades, la composición de ARNsa comprende lípidos. Los lípidos y el ARNsa pueden formar juntos nanopartículas. Los lípidos pueden encapsular el ARNm en forma de nanopartícula lipídica (LNP) para ayudar a la entrada celular y la estabilidad de las nanopartículas de ARN/lípidos.

Las nanopartículas lipídicas pueden incluir un componente lipídico y uno o más componentes adicionales, como un agente terapéutico y/o profiláctico. Una LNP puede estar diseñado para una o más aplicaciones u objetivos específicos. Los elementos de una LNP pueden seleccionarse en función de una aplicación o un objetivo particular y/o en función de la eficacia, la toxicidad, el costo, la facilidad de uso, la disponibilidad u otra característica de uno o más elementos. De manera similar, la formulación particular de una LNP puede seleccionarse para una aplicación o un objetivo particular según, 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 u objetivos específicos. Por ejemplo, una LNP puede diseñarse para suministrar un agente terapéutico y/o profiláctico, como un ARN, a una célula, tejido, órgano o sistema o grupo de ellos en particular en el cuerpo de un mamífero.

10 Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas lipídicas pueden alterarse para aumentar la selectividad hacia objetivos corporales específicos. Por ejemplo, los tamaños de las partículas pueden ajustarse en función del tamaño de las fenestraciones de los diferentes órganos. El tratamiento terapéutico y/o profiláctico incluido en una LNP también puede seleccionarse en función del objetivo o los objetivos de suministro deseados. Por ejemplo, se puede seleccionar un agente terapéutico y/o profiláctico para una indicación, condición, enfermedad o trastorno particular y/o para su suministro a una célula, tejido, órgano o sistema particular o grupo de ellos (por ejemplo, suministro localizado o específico). En ciertas modalidades, una LNP puede incluir un ARNm que codifica un polipéptido de interés capaz de ser traducido dentro de una célula para producir el polipéptido de interés. Dicha composición puede diseñarse para ser suministrada específicamente a un órgano particular. En algunas modalidades, una composición puede diseñarse para suministrarse específicamente al hígado de un mamífero. En algunas modalidades, una composición puede estar diseñada para ser suministrada específicamente a un ganglio linfático. En algunas modalidades, una composición puede estar diseñada para ser suministrada específicamente al bazo de un mamífero.

25 Una LNP puede incluir uno o más componentes descritos aquí. En algunas modalidades, la formulación de LNP de la divulgación incluye al menos un componente de nanopartículas lipídicas. Las nanopartículas lipídicas pueden incluir un componente lipídico y uno o más componentes adicionales, como un agente terapéutico y/o profiláctico, como un ácido nucleico. Una LNP puede estar diseñado para una o más aplicaciones u objetivos específicos. Los elementos de una LNP pueden seleccionarse en función de una aplicación o un objetivo particular y/o en función de la eficacia, la toxicidad, el costo, la facilidad de uso, la disponibilidad u otra característica de uno o más elementos. De manera similar, la formulación particular de una LNP puede seleccionarse para una aplicación o un objetivo particular de acuerdo, por ejemplo, con 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.

En algunas modalidades, por ejemplo, se puede incluir un polímero y/o utilizar para encapsular o encapsular parcialmente una LNP. Un polímero puede ser biodegradable y/o biocompatible. Un polímero puede seleccionarse entre, pero no está limitado a, poliaminas, poliéteres, poliamidas, poliésteres, policarbamatos, poliureas, policarbonatos, poliestirenos, poliiimidas, polisulfonas, poliuretanos, poliacetilenos, polietilenos, polietileniminas, poliisocianatos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilonitrilos y poliarilatos. Por ejemplo, un polímero puede incluir poli(caprolactona) (PCL), polímero de etileno acetato de vinilo (EVA, por sus siglas en inglés), poli(ácido láctico) (PLA, por sus siglas en inglés), poli(ácido L-láctico) (PLLA, por sus siglas en inglés), poli(ácido glicólico) (PGA, por sus siglas en inglés), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA, por sus siglas en inglés), poli(ácido L-láctico-co-ácido glicólico) (PLLGA, por sus siglas en inglés), poli(D,L-láctido) (PDLA), poli(L-láctido) (PLLA), poli(D,L-láctido-co-caprolactona), poli(D,L-láctido-co-caprolactona-co-glicólido), poli(D,L-láctido-co-PEO-co-D,L-láctido), poli(D,L-láctido-co-PPO-co-D,L-láctido), cianoacrilato de polialquilo, poliuretano, poli-L-lisina (PLL), hidroxipropil metacrilato (HPMA), polietilenglicol, ácido poli-L-glutámico, poli(hidroxiácidos), polianhídridos, poliortoésteres, poli(éster amidas), poliamidas, poli(éster éteres), policarbonatos, polialquilenos como polietileno y polipropileno, polialquilenglicoles como poli(etilenglicol) (PEG), óxidos de polialquileno (PEO, por sus siglas en inglés), tereftalatos de polialquileno como poli(tereftalato de etileno), alcoholes polivinílicos (PVA, por sus siglas en inglés), éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo como poli(acetato de vinilo), haluros de polivinilo como poli(cloruro de vinilo) (PVC, por sus siglas en inglés), polivinilpirrolidona (PVP), polisiloxanos, poliestireno, poliuretanos, celulosas derivatizadas como 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(metil(acrilato), poli(isopropil(acrilato), poli(isobutil(acrilato), poli(octadecil(acrilato)) y copolímeros y mezclas de los mismos, polidioxanona y sus copolímeros, polihidroxiálcanoatos, 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-oxazolona) (PMOX), poli(2-etil-2-oxazolona) (PEOZ), derivados de los mismos y poliglicerol.

Los agentes que alteran la superficie pueden incluir, pero no están limitados a,

proteínas aniónicas (por ejemplo, albúmina de suero bovino), surfactantes (por ejemplo, surfactantes catiónicos como bromuro de dimetildioctadecilamonio), azúcares o derivados de azúcar (por ejemplo, ciclodextrina), ácidos nucleicos, polímeros (por ejemplo, heparina, polietilenglicol y poloxámero), agentes mucolíticos (por ejemplo, acetilcisteína, artemisa, bromelaína, papaína, clerodendrum, bromhexina, carbocisteína, eprazinona, mesna, ambroxol, sobrerol, domiodol, letosteína, estepronina, tiopronina, gelsolina, timosina β 4, dornasa alfa, neltenexina y erdosteína) y ADNAsas (por ejemplo, rhADNasa). Un agente alterador de 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).

- 10 Una LNP también puede comprender uno o más lípidos funcionalizados. Por ejemplo, un lípido puede estar funcionalizado con un grupo alquino que, cuando se expone a una azida en condiciones de reacción apropiadas, puede experimentar una reacción de cicloadición. En particular, una bicapa lipídica puede funcionalizarse de esta manera con uno o más grupos útiles para facilitar la permeación de la membrana, el reconocimiento celular o la obtención de
- 15 imágenes. La superficie de una LNP también puede conjugarse con uno o más anticuerpos útiles. Los grupos funcionales y conjugados útiles para el suministro dirigido de células, 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 composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, la nanopartícula lipídica puede
- 20 incluir uno o más excipientes o ingredientes accesorios farmacéuticamente aceptables tales como, pero no limitados a, uno o más solventes, medios de dispersión, diluyentes, coadyuvantes de dispersión, coadyuvantes de suspensión, agentes tensioactivos, agentes tampón, conservantes y otras especies.

- Los agentes tensioactivos y/o emulsionantes pueden incluir, entre otros,
- 25 emulsionantes naturales (por ejemplo, acacia, ácido algínico, alginato de sodio, colesterol y lecitina), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monolaurato de polioxietilen sorbitán [TWEEN®20], polioxietilen sorbitán [TWEEN® 60], monooleato de polioxietilen sorbitán [TWEEN®80], monopalmitato de sorbitán [SPAN®40], monoestearato de sorbitán [SPAN®60], triestearato de sorbitán [SPAN®65], monooleato de glicerilo, monooleato de
- 30 sorbitán [SPAN®80]), ésteres de polioxietileno (por ejemplo, monoestearato de polioxietileno [MYRJ® 45], aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, 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, lauril éter de polioxietileno [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 de sodio y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de conservantes pueden incluir, entre otros, antioxidantes, agentes quelantes, eliminadores de radicales libres, conservantes antimicrobianos, conservantes antimicóticos, conservantes de alcohol, conservantes ácidos y/u otros conservantes. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, 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. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidrato, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato de sodio, ácido tartárico y/o edetato trisódico. Los ejemplos de conservantes antimicrobianos incluyen, entre otros, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal. Los ejemplos de conservantes antimicóticos incluyen, entre otros, butilparabeno, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y/o ácido sórbico. Los ejemplos de conservantes de alcohol incluyen, entre otros, etanol, polietilenglicol, alcohol bencílico, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletílico. Los ejemplos de conservantes ácidos incluyen, entre otros, vitamina A, vitamina C, vitamina E, betacaroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroascórbico, ácido ascórbico, ácido sórbico y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, entre otros, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA, por sus siglas en inglés), hidroxitolueno butilado (BHT, por sus siglas en inglés), etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS, por sus siglas en inglés), lauril éter sulfato de sodio (SLES, por sus siglas en inglés), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, metilparabeno, GERMALL® 115, GERMABEN®II, NEOLONE™, KATHON™ y/o EUXYL®. Un eliminador de radicales libres ejemplar incluye hidroxitolueno butilado (BHT, por sus siglas en inglés o butilhidroxitolueno) o deferoxamina.

Los ejemplos de agentes tampón incluyen, entre otros, soluciones tampón de citrato, soluciones tampón de acetato, soluciones tampón de fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, gluconato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido d-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, lactobionato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, fosfato de hidróxido de calcio, acetato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, mezclas de potasio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de fosfato de sodio, trometamina, tampones de aminosulfonato (por ejemplo, HEPES), hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua libre de pirógenos, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico, tampón Tris y/o combinaciones de los mismos.

En algunas modalidades, la formulación que incluye una LNP puede incluir además una sal, tal como una sal de cloruro. En algunas modalidades, la formulación que incluye una LNP puede incluir además un azúcar tal como un disacárido. En algunas modalidades, la formulación incluye además un azúcar, pero no una sal, como una sal de cloruro. 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 esteroide. Los carbohidratos pueden incluir azúcares simples (por ejemplo, glucosa) y polisacáridos (por ejemplo, glucógeno y derivados y análogos del mismo).

Las características de una LNP pueden depender de sus componentes. Por ejemplo, una LNP que incluye colesterol como lípido estructural puede tener características diferentes a una LNP que incluye un lípido estructural diferente. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “lípido estructural” se refiere a esteroides y también a lípidos que contienen fracciones de esteroides. Según se define en este documento, los “esteroides” son un subgrupo de esteroides que consiste en alcoholes esteroides. 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 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 incluye una fracción molar más alta de un fosfolípido puede tener características diferentes a una LNP que

incluye una fracción molar más baja de un fosfolípido. Las características también pueden variar dependiendo 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.

5 Una porción de fosfolípido se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo no limitante que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, 2-lisofosfatidilcolina y una esfingomielina. Una porción de ácido graso se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo no limitante que consiste en ácido láurico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido
10 linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido erúcico, ácido fitanoico, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido behénico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. Fosfolípidos particulares pueden facilitar la fusión a 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
15 intracelular). La fusión de un fosfolípido a una membrana puede permitir que uno o más elementos (por ejemplo, un agente terapéutico) de una composición que contiene lípidos (por ejemplo, LNP) pasen a través de la membrana, permitiendo, por ejemplo, el suministro de uno o más elementos a un tejido objetivo. También se contemplan especies de fosfolípidos no naturales, incluidas especies naturales con modificaciones y sustituciones que incluyen
20 ramificación, oxidación, ciclización y alquinos. En algunas modalidades, un fosfolípido puede funcionalizarse o reticularse con uno o más alquinos (por ejemplo, un grupo alqueno en el que uno o más enlaces dobles se reemplazan con un enlace triple). En condiciones de reacción adecuadas, un grupo alquino puede experimentar una cicloadición catalizada por cobre al exponerse a una azida. Estas reacciones pueden ser útiles para funcionalizar una
25 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 tal como una porción de orientación o de formación de imágenes (por ejemplo, un colorante). Los fosfolípidos incluyen, entre otros, glicerofosfolípidos como fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, fosfatidiglicerol y ácidos fosfatídicos. Los fosfolípidos también incluyen fosfoesfingolípidos, como la
30 esfingomielina. En algunas modalidades, un fosfolípido útil o potencialmente útil en la presente invención es un análogo o variante de DSPC.

Las nanopartículas lipídicas se pueden caracterizar mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, se puede utilizar 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 de luz dinámica o la potenciometría (por ejemplo, titulaciones potenciométricas) se pueden utilizar para medir potenciales zeta. La dispersión dinámica de luz también se puede utilizar para determinar el tamaño de las partículas.

- 5 También se pueden utilizar instrumentos como el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para medir múltiples características de una LNP, como el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el potencial zeta.

El tamaño medio de una LNP puede estar entre decenas de nm y cientos de nm, por ejemplo, medido mediante dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés). Por
10 ejemplo, el tamaño medio puede ser de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, tal como aproximadamente 40 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 aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 50 nm a
15 aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 70 nm, de
20 aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, o de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm. En ciertas modalidades, el tamaño medio de una LNP puede ser de aproximadamente 70 nm a
25 aproximadamente 100 nm. En una modalidad particular, el tamaño medio puede ser de aproximadamente 80 nm. En otras modalidades, el tamaño medio puede ser de aproximadamente 100 nm.

Una LNP puede ser relativamente homogéneo. Se puede utilizar un índice de polidispersidad para indicar la homogeneidad de una LNP, por ejemplo, la distribución del
30 tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas. Un índice de polidispersidad pequeño (por ejemplo, inferior a 0,3) generalmente indica una distribución estrecha del tamaño de partícula. Una LNP puede tener un índice de polidispersidad de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,25, como por ejemplo 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 algunas

modalidades, el índice de polidispersidad de una LNP puede ser de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 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, positivas o negativas generalmente son deseables, ya que las especies con mayor carga pueden interactuar de manera indeseable con las células, los tejidos y otros elementos del cuerpo. En algunas modalidades, el potencial zeta de una LNP puede ser de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente 0 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente - 5 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente 0 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +15 mV, o de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +10 mV.

La eficiencia de encapsulación de un agente terapéutico y/o profiláctico describe la cantidad de agente terapéutico y/o profiláctico que se encapsula o se asocia de otro modo con una LNP después de la preparación, en relación con la cantidad inicial proporcionada. La eficiencia de encapsulación es deseablemente alta (por ejemplo, cercana al 100 %). La eficiencia de encapsulación se puede medir, por ejemplo, comparando la cantidad de agente terapéutico y/o profiláctico en una solución que contiene la nanopartícula lipídica antes y después de romper la nanopartícula lipídica con uno o más solventes orgánicos o detergentes. La fluorescencia se puede utilizar para medir la cantidad de agente terapéutico y/o profiláctico libre (por ejemplo, ARN) en una solución. Para las nanopartículas lipídicas descritas en este documento, la eficiencia de encapsulación de un agente terapéutico y/o profiláctico puede ser de al menos el 50 %, por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, la eficiencia de encapsulación puede ser al menos del 80 %. En ciertas modalidades, la eficiencia de encapsulación puede ser al menos del 90 %.

Una LNP puede comprender opcionalmente uno o más recubrimientos. Por ejemplo, una LNP puede formularse en una cápsula, película o tableta que tenga un recubrimiento. Una cápsula, película o tableta que incluye una composición descrita en este documento puede tener cualquier tamaño, resistencia a la tracción, dureza o densidad útiles.

5 Las formulaciones que comprenden polímeros anfifílicos y nanopartículas lipídicas pueden formularse total o parcialmente como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más polímeros anfifílicos y una o más nanopartículas lipídicas. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede incluir uno o más polímeros anfifílicos y una o más nanopartículas lipídicas que incluyen uno o más agentes
10 terapéuticos y/o profilácticos diferentes. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además uno o más excipientes o ingredientes accesorios farmacéuticamente aceptables tales como los que se describen en este documento. Las pautas generales para la formulación y fabricación de composiciones y agentes farmacéuticos están disponibles, por ejemplo, en The Science and Practice of Pharmacy de Remington, 21^a edición, A. R. Gennaro; Lippincott,
15 Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006. Se pueden utilizar excipientes e ingredientes accesorios convencionales en cualquier composición farmacéutica, excepto en la medida en que cualquier excipiente o ingrediente accesorio convencional pueda ser incompatible con uno o más componentes de una LNP o con uno o más polímeros anfifílicos en la formulación de la divulgación. Un excipiente o ingrediente accesorio puede ser incompatible con un
20 componente de una LNP o el polímero anfifílico de la formulación si su combinación con el componente o el polímero anfifílico puede resultar en cualquier efecto biológico indeseable o de otro modo efecto perjudicial.

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
25 incluye 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 es al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % puro. En algunas modalidades, un excipiente está aprobado para su uso en humanos y para uso veterinario. En algunas
30 modalidades, un excipiente está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. En algunas modalidades, un excipiente es de grado farmacéutico. En algunas modalidades, un excipiente cumple con los estándares de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), la Farmacopea Europea (EP, por sus siglas en inglés), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional. Las

cantidades relativas de uno o más polímeros anfifílicos, una o más nanopartículas lipídicas, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación variarán, dependiendo de la identidad, tamaño y/o condición del sujeto tratado y además dependiendo de la vía por la cual se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender entre 0,1 % y 100 % (peso/peso) de una o más nanopartículas lipídicas. Como otro ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender entre 0,1 % y 15 % (peso/volumen) de uno o más polímeros anfifílicos (por ejemplo, 0,5 %, 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 % o 12,5 % peso/volumen).

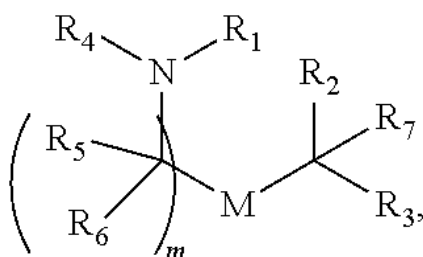
En ciertas modalidades, las nanopartículas lipídicas y/o composiciones farmacéuticas de la divulgación se refrigeran o congelan para su almacenamiento y/o envío (por ejemplo, se almacenan a una temperatura de 4 °C o inferior, como una temperatura entre aproximadamente -150 °C y aproximadamente 0 °C o entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -20 °C (por ejemplo, aproximadamente -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 anfifílicos y una o más nanopartículas lipídicas es una solución o sólido (por ejemplo, mediante liofilización) que se refrigera para su almacenamiento y/o envío a, por ejemplo, aproximadamente -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C o -80 °C. En ciertas modalidades, la divulgación también se refiere a un método para aumentar la estabilidad de las nanopartículas lipídicas mediante la adición de una cantidad eficaz de un polímero anfifílico y mediante el almacenamiento de las nanopartículas lipídicas y/o composiciones farmacéuticas de las mismas a una temperatura de 4 °C o inferior, tal como una temperatura entre aproximadamente -150 °C y aproximadamente 0 °C o entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -20 °C, por ejemplo, aproximadamente -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).

En algunas modalidades, el componente lipídico de una LNP incluye un lípido catiónico, un fosfolípido, un lípido PEG y un lípido estructural. En ciertas modalidades, el componente lipídico de la nanopartícula lipídica incluye aproximadamente entre un 30 % molar y aproximadamente un 60 % molar de lípido catiónico, aproximadamente entre un 0 % molar y aproximadamente un 30 % molar de fosfolípido, aproximadamente entre un 18,5 % molar y aproximadamente un 48,5 % molar de lípido estructural y aproximadamente entre un 0 % molar y aproximadamente un 10 % molar de lípido PEG, siempre que el % molar total no exceda el 100 %. En algunas modalidades, el componente lipídico de la nanopartícula lipídica

incluye aproximadamente entre un 35 % molar y aproximadamente un 55 % molar de compuesto de lípido catiónico, aproximadamente entre un 5 % molar y aproximadamente un 25 % molar de fosfolípido, aproximadamente entre un 30 % molar y aproximadamente un 40 % molar de lípido estructural y aproximadamente entre un 0 % molar y aproximadamente un 10 % molar de lípido PEG. En una modalidad particular, el componente lipídico incluye aproximadamente 50 % molar de dicho lípido catiónico, aproximadamente 10 % molar de fosfolípido, aproximadamente 38,5 % molar de lípido estructural y aproximadamente 1,5 % molar de lípido PEG. En otra modalidad, el componente lipídico incluye aproximadamente 40 % molar de dicho lípido catiónico, aproximadamente 20 % molar de fosfolípido, aproximadamente 38,5 % molar de lípido estructural y aproximadamente 1,5 % molar 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.

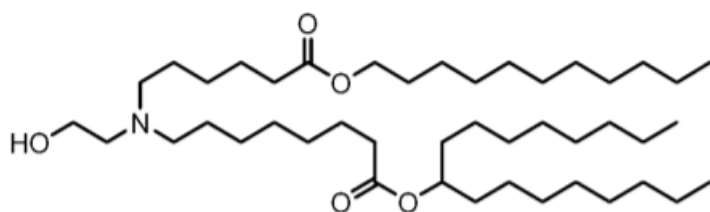
En algunas modalidades, el lípido ionizable es un compuesto de Fórmula (I):

(I)



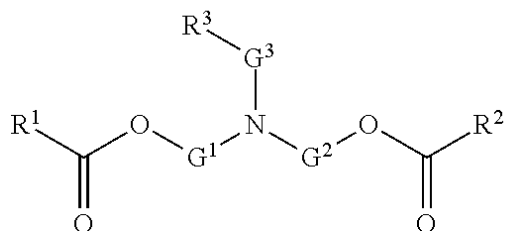
o sus N-óxidos, o sales o isómeros de los mismos, en donde: R_1 se selecciona del grupo que consiste en alquilo de C5-30, alquenilo de C5-20, $-R^*YR''$, $-YR''$ y $-R''M'R'$; R_2 y R_3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo de C1-14, alquenilo de C2-14, $-R^*YR''$, $-YR''$ y $-R^*OR''$, o R_2 y R_3 , junto con el átomo al que están unidos, forman un heterociclo o carbociclo; R_4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un carbociclo de C3-6, $-(CH_2)_nQ$, $-(CH_2)_nCHQR$, $-CHQR$, $-CQ(R)_2$ y alquilo de C1-6 no sustituido, en donde Q se selecciona de un carbociclo, heterociclo, $-OR$, $-O(CH_2)_nN(R)_2$, $-C(0)OR$, $-OC(0)R$, $-CX_3$, $-CX_2H$, $-CXH_2$, $-CN$, $-N(R)_2$, $-C(0)N(R)_2$, $-N(R)C(0)R$, $-N(R)S(0)_2R$, $-N(R)C(0)N(R)_2$, $-N(R)C(S)N(R)_2$, $-N(R)Re$, $N(R)S(0)_2R$, $-O(CH_2)_nOR$, $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$, $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$, $-OC(0)N(R)_2$, $-N(R)C(0)OR$, $-N(OR)C(0)R$, $-N(OR)S(0)_2R$, $-N(OR)C(0)OR$, $-N(OR)C(0)N(R)_2$, $-N(OR)C(S)N(R)_2$, $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$, $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$, $-C(=NR_9)N(R)_2$, $-C(=NR_9)R$, $-C(0)N(R)OR$, y $-C(R)N(R)_2C(0)OR$, y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4 y 5; cada R_5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C1-3, alquenilo de C2-3 y H; cada Re se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C1-3, alquenilo de

C2-3 y H; M y M' se seleccionan independientemente de -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, alquilo de C1-13 o alqueno de C2-13; R7 se selecciona del grupo que consiste en alquilo de C1-3, alqueno de C2-3 y H; Re se selecciona del grupo que consiste en carbociclo de C3-6 y heterociclo; R9 se selecciona del grupo que consiste en H, CN, NO2, alquilo de C1-6, -OR-, -S(O)2R-, -S(O)2N(R)2, alqueno de C2-6, carbociclo de C3-6 y heterociclo; cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C1-3, alqueno de C2-3 y H; cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C1-6, alqueno de C2-6, -R*YR", -YR", y H; cada R" se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C3-15 y alqueno de C3-15; cada R* se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C1-12 y alqueno de C2-12; cada Y es independientemente un carbociclo de C3-6; cada X se selecciona independientemente del grupo que consiste en F, Cl, Br e I; y m se selecciona de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13; y en donde cuando R4 es - (CH2)nQ, -(CH2)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:



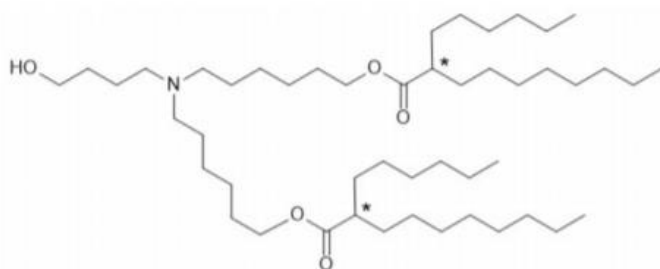
En algunas modalidades, los compuestos tienen la siguiente estructura (I):

(IE)



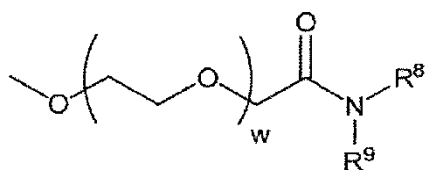
o una sal, tautómero, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde: uno de L1 o L2 es -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)x-, -S-S-, -C(=O)S-, SC(=O)-, -NRaC(=O)-, -C(=O)NRa-, NRaC(=O)NRa-, -OC(=O)NRa- o -NRaC(=O)O-, y el otro de L1 o L2 es -O(C=O)-, -(C=O)O-, -

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 de C1-C12 o alquenileno de C1-C12 no sustituido; G3 es alquileo de C1-C24, alquenileno de C1-C24, cicloalquileo de C3-C8, cicloalquenileno de C3-C8; Ra es H o alquilo de C1-C12; R1 y R2 son cada uno independientemente alquilo de C6-C24 o alquenilo de C6-C24; R3 es H, OR₅, CN, —C(=O)OR₄, —OC(=O)R₄ o —NR₅C(=O)R₄; R₄ es alquilo de C1-C12; R₅ es H o alquilo de C1-C6; y x es 0, 1 o 2. En una modalidad preferida, 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 comprenden polietilenglicol, tales 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 de PEG puede seleccionarse del grupo no limitante 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 mezclas de los mismos. En algunas modalidades, un lípido PEG puede ser PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC o un lípido PEG-DSPE. Tal como se utiliza en este documento, el término “lípido PEG” se refiere a lípidos modificados con polietilenglicol (PEG). Los ejemplos no limitantes de lípidos de PEG incluyen fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico modificados con PEG, conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20), dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. Estos lípidos también se denominan lípidos PEGilados. En algunas modalidades, un lípido PEG puede ser PEG-c-DOMG, 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 varía de 30 a 60.

L. Formulación

En un aspecto, la divulgación 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, incluyendo dicho antígeno al menos un polipéptido antigénico del virus de la influenza o un fragmento inmunogénico del mismo, y (ii) un segundo polinucleótido de ARN que tiene un marco de lectura abierto que codifica un segundo antígeno, incluyendo dicho segundo antígeno 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 (LNP). En algunas modalidades, el primer y segundo antígeno incluyen hemaglutinina (HA), o un fragmento inmunogénico o variante de la misma. En algunas modalidades, el primer antígeno incluye un HA de un subtipo de virus de influenza diferente al polipéptido antigénico del virus de 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 de virus de la influenza diferente al primer y al segundo antígeno. En algunas modalidades, el primer, segundo y tercer polinucleótidos de ARN se formulan 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, incluyendo dicho antígeno 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 diferente del virus de la influenza al primer, segundo y tercer antígenos. En algunas modalidades, el primer, segundo, tercer y cuarto polinucleótido de ARN se formulan en una

nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, los polinucleótidos de ARN se mezclan en proporciones deseadas en un solo recipiente y posteriormente se formulan en nanopartículas lipídicas. En algunas modalidades, la entrada inicial de diferentes polinucleótidos de ARN en una proporción conocida para ser formulados en un único proceso de LNP da como resultado LNP que encapsulan los diferentes polinucleótidos de ARN en aproximadamente la misma proporción que la proporción de entrada. En el presente documento dichas modalidades podrán denominarse "premezcla". Por consiguiente, en algunas modalidades, el primer y el segundo polinucleótido de ARN se formulan en una única nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, el primer, segundo, tercer y cuarto polinucleótido de ARN se formulan en una única LNP. En algunas modalidades, el primer, segundo, tercero, cuarto y quinto polinucleótidos de ARN se formulan en una única LNP. En algunas modalidades, el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto polinucleótidos de ARN se formulan en una única LNP. En algunas modalidades, el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo polinucleótidos de ARN se formulan en una única LNP. En algunas modalidades, el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo polinucleótidos de ARN se formulan en una única LNP.

En algunas modalidades, la relación 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 LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer polinucleótido de ARN al segundo polinucleótido de ARN es mayor que 1:1.

En algunas modalidades, la relación 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 LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer polinucleótido de ARN al tercer polinucleótido de ARN es mayor que 1:1.

En algunas modalidades, la relación 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 aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1: 10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer polinucleótido de ARN al cuarto polinucleótido de ARN es mayor que 1:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer polinucleótido de ARN con respecto al quinto polinucleótido de ARN en la mezcla de polinucleótidos de ARN antes de la formulación en LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer polinucleótido de ARN al quinto polinucleótido de ARN es mayor que 1:1. En algunas modalidades, la relación 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 LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1: 10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer polinucleótido de ARN al sexto polinucleótido de ARN es mayor que 1:1. En algunas modalidades, la relación 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 LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1: 10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer polinucleótido de ARN al séptimo polinucleótido de ARN es mayor que 1:1. En algunas modalidades, la relación 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 LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente

2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer polinucleótido de ARN al octavo polinucleótido de ARN es mayor que 1:1.

En modalidades alternativas, cada polinucleótido de ARN que codifica un antígeno particular se formula en una LNP individual, de modo que cada LNP encapsula un polinucleótido de ARN que codifica antígenos idénticos. En el presente documento, dichas modalidades podrán denominarse "post-mezcla". En consecuencia, en algunas modalidades, el primer polinucleótido de ARN se formula en un primer LNP; el segundo polinucleótido de ARN se formula en un segundo LNP; el tercer polinucleótido de ARN se formula en un tercer LNP; el cuarto polinucleótido de ARN se formula en un cuarto LNP; el quinto polinucleótido de ARN se formula en un quinto LNP; el sexto polinucleótido de ARN se formula en un sexto LNP; el séptimo polinucleótido de ARN se formula en un séptimo LNP; y el octavo polinucleótido de ARN se formula en un octavo LNP.

En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al segundo LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1: 10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al segundo LNP es mayor que 1:1.

En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al tercer LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1: 10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al tercer LNP es mayor que 1:1.

En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al cuarto LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1: 10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50: 1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al

cuarto LNP es mayor que 1:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al quinto LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al quinto LNP es mayor que 1:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al sexto LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al sexto LNP es mayor que 1:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al séptimo LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al séptimo LNP es mayor que 1:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al octavo LNP en la mezcla de LNP antes de la formulación en LNP es de aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:25, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1 o aproximadamente 50:1. En algunas modalidades, la relación molar del primer LNP al octavo LNP es mayor que 1:1.

En algunas modalidades, la cantidad relativa de ARN que codifica un antígeno de un virus de influenza tipo B puede aumentar en comparación con el ARN que codifica un virus de influenza tipo A (por ejemplo, una respuesta inmune que comprende títulos de neutralización más altos contra un virus de influenza tipo B (por ejemplo, títulos de neutralización más altos en comparación con una composición que comprende cantidades iguales de ARN que codifica un antígeno de influenza tipo A y ARN que codifica un antígeno de influenza tipo B (por ejemplo, como se determina mediante un ensayo de neutralización de pseudovirus descrito en este documento))). La presente divulgación también proporciona dosis ejemplares de ARN

que pueden producir fuertes respuestas inmunes contra ambos tipos de virus de influenza (por ejemplo, títulos neutralizantes y/o tasas de seroconversión que están en niveles clínicamente relevantes (por ejemplo, (i) títulos neutralizantes que son comparables o superiores a aquellos previamente demostrados que previenen los síntomas de influenza, y/o
5 (ii) títulos neutralizantes y/o tasas de seroconversión que son comparables o superiores a aquellos inducidos por un comparador relevante (por ejemplo, una vacuna contra la influenza aprobada comercialmente o una vacuna de ARN contra la influenza))). En algunas modalidades, una composición que comprende una mayor cantidad de ARN que codifica antígenos de influenza B en comparación con el ARN que codifica antígenos de influenza A
10 produce una respuesta inmune contra cada uno de los virus de influenza tipo B y virus de influenza tipo A que es comparable o superior a la inducida por una vacuna contra la influenza sin ARN (por ejemplo, una vacuna aprobada) y/o una vacuna de ARN que comprende cantidades iguales de ARN que codifica antígenos de influenza A y ARN que codifica antígenos de influenza B.

15 En algunas modalidades, la concentración de ARN en una preparación farmacéutica de ARN es de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/mL. En algunas modalidades, la concentración de ARN en una preparación farmacéutica de ARN es de aproximadamente 0,1 mg/mL. En algunas modalidades, la concentración de ARN en una preparación farmacéutica de ARN es de aproximadamente 0,12 mg/mL. En algunas modalidades, la concentración de ARN en una
20 preparación farmacéutica de ARN es de aproximadamente 0,14 mg/mL. En algunas modalidades, la concentración de ARN en una preparación farmacéutica de ARN es de aproximadamente 0,16 mg/mL. En algunas modalidades, la concentración de ARN en una preparación farmacéutica de ARN es de aproximadamente 0,18 mg/mL. En algunas modalidades, se administran aproximadamente 30 µg de ARN administrando
25 aproximadamente 200 µL de preparación de ARN. En algunas modalidades, el ARN en una preparación farmacéutica de ARN se diluye antes de la administración (por ejemplo, se diluye a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/mL). En algunas modalidades, los volúmenes de administración están entre aproximadamente 200 µL y aproximadamente 300 µL. En algunas modalidades, el ARN en una preparación farmacéutica de ARN se formula en
30 aproximadamente 10 mM de tampón Tris y aproximadamente 10 % de sacarosa.

En algunas modalidades, una preparación farmacéutica de ARN comprende ARN en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/mL, y está formulada en aproximadamente 10 mM de tampón Tris y aproximadamente 10 % de sacarosa. En algunas modalidades, una preparación farmacéutica de ARN comprende ARN en una concentración de

aproximadamente 0,12 mg/mL, y está formulada en aproximadamente 10 mM de tampón Tris y aproximadamente 10 % de sacarosa. En algunas modalidades, una preparación farmacéutica de ARN comprende ARN en una concentración de aproximadamente 0,14 mg/mL, y está formulada en aproximadamente 10 mM de tampón Tris y aproximadamente 10 % de sacarosa. En algunas modalidades, una preparación farmacéutica de ARN comprende ARN en una concentración de aproximadamente 0,16 mg/mL, y está formulada en aproximadamente 10 mM de tampón Tris y aproximadamente 10 % de sacarosa. En algunas modalidades, una preparación farmacéutica de ARN comprende ARN en una concentración de aproximadamente 0,18 mg/mL, y está formulada en aproximadamente 10 mM de tampón Tris y aproximadamente 10 % de sacarosa. Esta formulación se puede diluir según sea necesario antes de la administración para administrar diferentes dosis de ARN manteniendo el volumen total de inyección relativamente constante. Por ejemplo, se puede administrar una dosis de ARN de aproximadamente 10 µg diluyendo dicha preparación farmacéutica de ARN en aproximadamente 1:1 y administrando aproximadamente 200 µL de preparación farmacéutica de ARN diluida.

En algunas modalidades, una vacuna se formula en un vial (por ejemplo, un vial de vidrio). En algunas modalidades, un vial de vidrio se sella con un tapón elastomérico de bromobutilo y un sello de aluminio con caperuza de plástico de tipo abatible.

En algunas modalidades, una composición comprende un ARN que codifica un antígeno (por ejemplo, una proteína HA) de un virus de influenza que es recomendado por una autoridad sanitaria relevante para su inclusión en una vacuna adaptada estacionalmente (por ejemplo, un virus basado en células, recombinante o vivo atenuado). En algunas modalidades, una composición comprende una pluralidad de ARN que codifican antígenos (por ejemplo, proteínas HA) de cada virus de influenza recomendado por una autoridad sanitaria pertinente para su inclusión en una vacuna adaptada estacionalmente (por ejemplo, un virus atenuado vivo, recombinante o basado en células). En algunas modalidades, el virus de la influenza es un virus de influenza A, influenza B o influenza C. En algunas modalidades, el virus de la influenza A es un virus H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7 o H10N8. En algunas modalidades, el virus de la influenza A es un virus H1N1, H3N2, H5N1 o H5N8. En algunas modalidades, el virus de la influenza A es un virus H1N1 (por ejemplo, A/Wisconsin/588/2019 o A/Sydney/5/2021). En algunas modalidades, el virus de la influenza A es un virus H3N2. En algunas modalidades, el virus H3N2 es A/Cambodia/e0826360/2020 o A/Darwin/6/2021. En algunas modalidades, el virus de la influenza B es de linaje

B/Yamagata o B/Victoria. En algunas modalidades, el virus de influenza de linaje B/Victoria es B/Washington/02/2019. En algunas modalidades, el virus del linaje B/Victoria es B/Austria/1359417/2021. En algunas modalidades, el virus de influenza de linaje B/Yamagata es B/Phuket/3073/2013.

5 En algunas modalidades, una composición descrita en este documento comprende una vacuna de la influenza multivalente. En algunas modalidades, una vacuna de la influenza multivalente comprende de 2 a 50 moléculas de ARN distintas (por ejemplo, de 2 a 40, de 2 a 30 o de 2 a 20 moléculas de ARN), cada una de las cuales, en algunas modalidades, puede codificar un polipéptido antigénico diferente (o una versión diferente de un polipéptido
10 antigénico particular) asociado con la influenza, por ejemplo, como se describe en Arevalo, Claudia P., et al. "A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes." *Science* 378,6622 (2022): 899-904. En algunas modalidades, una composición descrita en este documento comprende una vacuna de la influenza trivalente. En algunas modalidades, una vacuna de la influenza trivalente comprende ARN que codifican un
15 polipéptido antigénico asociado con dos virus de tipo A y un virus de tipo B que se prevé que prevalecerán en una jurisdicción relevante. En algunas modalidades, una composición descrita en este documento comprende una vacuna de la influenza tetravalente. En algunas modalidades, una vacuna de la influenza tetravalente comprende ARN que codifican un polipéptido antigénico asociado con dos virus tipo A y dos virus tipo B que se prevé que
20 prevalecerán en una jurisdicción relevante. En algunas modalidades, una composición descrita en este documento comprende una vacuna de la influenza octavalente. En algunas modalidades, una vacuna de la influenza octavalente comprende ARN que codifican dos polipéptidos antigénicos asociados con cada uno de dos virus tipo A y dos virus tipo B que se prevé que prevalecerán en una jurisdicción relevante (por ejemplo, una proteína HA y una
25 proteína NA asociadas con cada virus, o fragmentos inmunogénicos de las mismas). En algunas modalidades, una composición divulgada en el presente documento comprende una vacuna tetravalente contra la influenza que comprende un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA asociada con un virus H1N1 (por ejemplo, A/Wisconsin/588/2019), un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que
30 codifica una proteína HA asociada con un virus H3N2 (por ejemplo, A/Cambodia/e0826360/2020), un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA asociada con un virus de influenza de linaje B/Victoria (por ejemplo, B/Washington/02/2019) y una proteína HA asociada con un virus de influenza de linaje B/Yamagata (por ejemplo, B/Phuket/3073/2013).

En algunas modalidades, una composición comprende una vacuna de la influenza tetravalente que comprende ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con dos virus tipo A y dos virus tipo B que se prevé que sean prevalentes en una jurisdicción relevante. En algunas modalidades, una vacuna de la influenza tetravalente comprende ARN que
5 codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza H1N1, ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza H3N2, ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza de linaje Victoria y ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza de linaje Yamagata. En algunas modalidades, la vacuna tetravalente contra la influenza comprende ARN asociado con tipos
10 de influenza que se prevé que prevalecerán en una jurisdicción relevante (por ejemplo, polipéptidos HA asociados con los virus de influenza H1N1, H3N2, B/Victoria y B/Yamagata que se prevé que prevalecerán en una jurisdicción relevante).

En algunas modalidades, una composición comprende una vacuna de la influenza octavalente que comprende ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con dos
15 virus tipo A y dos virus tipo B que se prevé que sean prevalentes en una jurisdicción relevante. En algunas modalidades, una vacuna octavalente contra la influenza comprende ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de HA de un virus de influenza tipo A, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de HA de un virus de influenza tipo A, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de HA de un virus de influenza tipo B, ARN que
20 codifica un polipéptido antigénico derivado de HA de un virus de influenza tipo B, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de un polipéptido antigénico seleccionado entre NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2 de un virus de influenza tipo A, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de un polipéptido antigénico seleccionado entre NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2 de un virus de influenza tipo A, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de
25 un polipéptido antigénico seleccionado entre NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2 de un virus de influenza tipo B, y ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de un polipéptido antigénico seleccionado entre NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2 de un virus de influenza tipo B. En algunas modalidades, una vacuna octavalente contra la influenza comprende ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de HA de un virus de influenza tipo A, ARN que
30 codifica un polipéptido antigénico derivado de HA de un virus de influenza tipo A, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de HA de un virus de influenza tipo B, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de HA de un virus de influenza tipo B, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de NA de un virus de influenza tipo A, ARN que codifica un polipéptido antigénico derivado de NA de un virus de influenza tipo A, ARN que
35 codifica un polipéptido antigénico derivado de NA de un virus de influenza tipo B y ARN que

codifica un polipéptido antigénico derivado de NA de un virus de influenza tipo B. En algunas modalidades, una vacuna de la influenza octavalente comprende ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza H1N1, ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza H3N2, ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza de linaje Victoria y ARN que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza de linaje Yamagata. En algunas modalidades, una vacuna de la influenza octavalente comprende ARN asociado con tipos de influenza que se prevé que prevalecerán en una jurisdicción relevante (por ejemplo, polipéptidos HA asociados con los virus de influenza H1N1, H3N2, B/Victoria y B/Yamagata que se prevé que prevalecerán en una jurisdicción relevante).

En algunas modalidades, cada uno de los ARN en una composición divulgada en este documento codifica un polipéptido antigénico asociado con un agente infeccioso que se prevé que prevalecerá en una jurisdicción relevante. Estas composiciones pueden reducir el número de vacunas necesarias.

En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende dos o más moléculas de ARN, cada una de las cuales comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno (por ejemplo, una proteína HA) asociado con un virus de influenza diferente. En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende tres o más moléculas de ARN, cada una de las cuales comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno (por ejemplo, una proteína HA) asociado con un virus de influenza diferente. En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende cuatro o más moléculas de ARN, cada una de las cuales comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno (por ejemplo, una proteína HA) asociado con un virus de influenza diferente. En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza H1N1, una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza H3N2, una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza de linaje B/Victoria y una molécula de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza B/Yamagata. En algunas modalidades, cada ARN en una composición que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza se formula en la misma partícula que contiene ácido nucleico. En algunas modalidades, cada ARN en una

composición que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico asociado con un virus de influenza se formula en partículas separadas que contienen ácido nucleico.

5 En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico (por ejemplo, en algunas modalidades una LNP como se describe en este documento) que comprende dos o más moléculas de ARN, comprende cada molécula de ARN en la misma cantidad (es decir, en una proporción de 1:1).

10 En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico (por ejemplo, en algunas modalidades una LNP como se describe en este documento) que comprende dos o más moléculas de ARN, comprende una cantidad diferente de cada molécula de ARN. Por ejemplo, en algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende una primera molécula de ARN y una segunda molécula de ARN, en donde la primera molécula de ARN está presente en una cantidad que es de 0,01 a 100 veces la de la segunda molécula de ARN (por ejemplo, en donde la cantidad de la primera molécula de ARN es de 0,01 a 50, de 0,01 a 15
15 4, de 0,01 a 30, de 0,01 a 25, de 0,01 a 20, de 0,01 a 15, de 0,01 a 10, de 0,01 a 9, de 0,01 a 8, de 0,01 a 7, de 0,01 a 6, de 0,01 a 5, de 0,01 a 4, de 0,01 a 3, de 0,01 a 2, de 0,01 a 1,5, de 1 a 50, de 1 a 4, de 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 a 1,5 veces mayor que la segunda molécula de ARN). En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende una primera molécula de
20 ARN y una segunda molécula de ARN, en donde la concentración de la primera molécula de ARN es de 1 a 10 veces la de la segunda molécula de ARN. En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende una primera molécula de ARN y una segunda molécula de ARN, en donde la concentración de la primera molécula de ARN es de 1 a 5 veces la de la segunda molécula de ARN. En algunas modalidades, una partícula que
25 contiene ácido nucleico comprende una primera molécula de ARN y una segunda molécula de ARN, en donde la concentración de la primera molécula de ARN es de 1 a 3 veces la de la segunda molécula de ARN. En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende una primera molécula de ARN y una segunda molécula de ARN, en donde la concentración de la primera molécula de ARN es 2 veces la de la segunda molécula
30 de ARN. En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico comprende una primera molécula de ARN y una segunda molécula de ARN, en donde la concentración de la primera molécula de ARN es 3 veces la de la segunda molécula de ARN.

En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico (por ejemplo, en algunas

modalidades una LNP como se describe en este documento) que comprende tres moléculas de ARN, comprende cada molécula de ARN en la misma cantidad (es decir, en una proporción 1:1:1).

- 5 En algunas modalidades, una partícula que contiene ácido nucleico (por ejemplo, en algunas modalidades una LNP como se describe en este documento) que comprende tres moléculas de ARN, comprende una cantidad diferente de cada molécula de ARN. Por ejemplo, en algunas modalidades, la relación entre la primera molécula de ARN: segunda molécula de ARN: tercera molécula de ARN es 1: 0,01-100: 0,01-100 (por ejemplo, 1: 0,01-50: 0,01-50; 1: 0,01-40: 0,01-40; 1: 0,01-30: 0,01-25; 1: 0,01-25: 0,01-25; 1: 0,01-20: 0,01-20; 1: 0,01-15: 0,01-15; 1: 0,01-10: 0,01-9; 1: 0,01-9: 0,01-9; 1: 0,01-8: 0,01-8; 1: 0,01-7: 0,01-7; 1: 0,01-6: 0,01-6; 1: 0,01-5: 0,01-5; 1: 0,01-4: 0,01-4; 1: 0,01-3: 0,01-3; 1: 0,01-2: 0,01-2; o 1: 0,01-1,5: 0,01-1,5). En algunas modalidades, la proporción de la primera molécula de ARN: segunda molécula de ARN: tercera molécula de ARN es 1:1:3. En algunas modalidades, la proporción de la primera molécula de ARN: segunda molécula de ARN: tercera molécula de ARN es 1:3:3.
- 10
- 15 El término "dosis" tal como se utiliza en este documento se refiere en general a una "cantidad de dosis" que se relaciona con la cantidad de ARN administrada por administración, es decir, por dosificación.

- En algunas modalidades, la administración de una composición inmunogénica o vacuna de la presente divulgación puede realizarse mediante una sola administración o reforzarse mediante múltiples administraciones.
- 20

- En algunas modalidades, un régimen descrito en este documento incluye al menos una dosis. En algunas modalidades, un régimen incluye una primera dosis y al menos una dosis posterior. En algunas modalidades, la primera dosis es la misma cantidad que al menos una dosis posterior. En algunas modalidades, la primera dosis es la misma cantidad que todas las dosis posteriores. En algunas modalidades, la primera dosis es una cantidad diferente a la de al menos una dosis posterior. En algunas modalidades, la primera dosis es una cantidad diferente a todas las dosis posteriores. En algunas modalidades, un régimen comprende dos dosis. En algunas modalidades, un régimen proporcionado consta de dos dosis. En algunas modalidades, un régimen comprende tres dosis.
- 25
- 30 En una modalidad, la divulgación prevé la administración de una dosis única. En una modalidad, la divulgación prevé la administración de una dosis de cebado seguida de una o más dosis de refuerzo. La dosis de refuerzo o la primera dosis de refuerzo se puede

administrar entre 7 y 28 días o entre 14 y 24 días después de la administración de la dosis de cebado. En algunas modalidades, se puede administrar una primera dosis de refuerzo entre 1 semana y 3 meses (por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas) después de la administración de una dosis de cebado. En algunas modalidades, se puede administrar una dosis de refuerzo posterior al menos 1 semana o más, incluyendo, por ejemplo, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas, al menos 10 semanas, al menos 11 semanas, al menos 12 semanas, o más, después de una dosis de refuerzo anterior. En algunas modalidades, se pueden administrar dosis de refuerzo posteriores con una diferencia de entre 5 y 9 semanas o de entre 6 y 8 semanas. En algunas modalidades, se puede administrar al menos una dosis de refuerzo posterior (por ejemplo, después de una primera dosis de refuerzo) al menos 3 meses o más, incluidos, por ejemplo, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses o más, después de una dosis anterior.

En algunas modalidades, una dosis comprende una cantidad total de ARN de 0,1 µg a 300 µg, de 0,5 µg a 200 µg o de 1 µg a 100 µg, como aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 3 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 35 µg, aproximadamente 40 µg, aproximadamente 45 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 55 µg, aproximadamente 60 µg, aproximadamente 65 µg, aproximadamente 70 µg, aproximadamente 75 µg, aproximadamente 80 µg, aproximadamente 85 µg, aproximadamente 90 µg, aproximadamente 95 µg, o aproximadamente 100 µg. En algunas modalidades, una dosis comprende una cantidad total de ARN (por ejemplo, ARNmod) de hasta aproximadamente 100 µg. En algunas modalidades, una dosis comprende de 0,1 µg a 100 µg de uno o más primeros ARN y de 0,1 µg a 100 µg de uno o más segundos ARN, en donde el uno o más primeros ARN comprenden cada uno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico asociado con un primer agente infeccioso (por ejemplo, un coronavirus), y el uno o más segundos ARN comprenden cada uno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antigénico asociado con un segundo agente infeccioso (por ejemplo, influenza). En algunas modalidades, una dosis comprende de 3 a 60 µg de uno o más primeros ARN y de 3 a 90 µg de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, una dosis comprende de 3 a 60 µg de uno o más primeros ARN y de 3 a 90 µg de uno o más segundos

ARN, en donde la dosis comprende hasta 100 µg de ARN total. En algunas modalidades, una dosis comprende de 3 a 30 µg de uno o más primeros ARN y de 3 a 60 µg de uno o más segundos ARN, en donde la dosis comprende hasta 100 µg de ARN total. En algunas modalidades, una dosis comprende 3 µg de uno o más primeros ARN y 3 µg de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, una dosis comprende 3 µg de uno o más primeros ARN y 6 µg de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, una dosis comprende 10 µg de uno o más primeros ARN y 10 µg de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, una dosis comprende 10 µg de uno o más primeros ARN y 20 µg de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, una dosis comprende 30 µg de uno o más primeros ARN y 30 µg de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, una dosis comprende 30 µg de uno o más primeros ARN y 60 µg de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, una dosis comprende 60 µg de uno o más primeros ARN y 30 µg de uno o más segundos ARN.

En algunas modalidades, una dosis posterior administrada a un individuo (por ejemplo, como parte de un régimen primario o un régimen de refuerzo) puede tener la misma cantidad de ARN que la administrada previamente al individuo. En algunas modalidades, una dosis posterior administrada a un individuo (por ejemplo, como parte de un régimen primario o un régimen de refuerzo) puede diferir en la cantidad de ARN, en comparación con la cantidad administrada previamente al individuo. Por ejemplo, en algunas modalidades, una dosis posterior puede ser mayor o menor que la dosis anterior, por ejemplo, basándose en la consideración de varios factores, incluyendo, por ejemplo, inmunogenicidad y/o reactogenicidad inducida por la dosis anterior, prevalencia de la enfermedad, etc. En algunas modalidades, una dosis posterior puede ser mayor que una dosis anterior en al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o más. En algunas modalidades, una dosis posterior puede ser al menos 1,5 veces mayor que una dosis anterior, al menos 2 veces mayor, al menos 2,5 veces mayor, al menos 3 veces mayor o mayor. En algunas modalidades, una dosis posterior puede ser mayor que una dosis anterior en al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o más. En algunas modalidades, una dosis posterior puede ser menor que una dosis anterior en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 % o menor. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad de ARN descrita en este documento de 0,1 µg a 300 µg, de 0,5 µg a 200 µg o de 1 µg a 100 µg, tal como aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 3 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg,

aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 35 µg, aproximadamente 40 µg, aproximadamente 45 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 55 µg, aproximadamente 60 µg, aproximadamente 70 µg, aproximadamente 80 µg, aproximadamente 90 µg o aproximadamente 100 µg por dosis (por ejemplo, en una dosis dada).

En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de 60 µg o menos, 55 µg o menos, 50 µg o menos, 45 µg o menos, 40 µg o menos, 35 µg o menos, 30 µg o menos, 25 µg o menos, 20 µg o menos, 15 µg o menos, 10 µg o menos, 5 µg o menos, 3 µg o menos, 2,5 µg o menos, o 1 µg o menos por dosis (por ejemplo, en una dosis determinada).

En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 0,25 µg, al menos 0,5 µg, al menos 1 µg, al menos 2 µg, al menos 3 µg, al menos 4 µg, al menos 5 µg, al menos 10 µg, al menos 15 µg, al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 40 µg, al menos 50 µg o al menos 60 µg por dosis (por ejemplo, en una dosis determinada). En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 3 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 10 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 15 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 20 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 25 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 30 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 50 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de al menos 60 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se pueden administrar combinaciones de las cantidades mencionadas anteriormente en un régimen que comprende dos o más dosis (por ejemplo, una dosis anterior y una dosis posterior pueden ser de cantidades diferentes como se describe en este documento). En algunas modalidades, se pueden administrar combinaciones de las cantidades mencionadas anteriormente en un régimen primario y un régimen de refuerzo (por ejemplo, se pueden administrar diferentes dosis en un régimen primario y un régimen de refuerzo).

En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad de un ARN descrito en este documento de 0,25 µg a 60 µg, de 0,5 µg a 55 µg, de 1 µg a 50 µg, de 5 µg a 40 µg o de 10 µg a 30 µg por dosis. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de 3 µg a 30 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de 3 µg a 20 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de 3 µg a 15 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de 3 µg a 10 µg en al menos una de las dosis dadas. En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad del ARN descrito en este documento de 10 µg a 30 µg en al menos una de las dosis dadas.

En algunas modalidades, un régimen administrado a un sujeto puede comprender una pluralidad de dosis (por ejemplo, al menos dos dosis, al menos tres dosis o más). En algunas modalidades, un régimen administrado a un sujeto puede comprender una primera dosis y una segunda dosis, que se administran con una diferencia de al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas o más. En algunas modalidades, dichas dosis pueden estar separadas por al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses o más. En algunas modalidades, las dosis pueden administrarse con días de diferencia, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o más días de diferencia. En algunas modalidades, las dosis pueden administrarse con una diferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 semanas, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 semanas, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 semanas, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 semanas, o de aproximadamente 1 a más de 6 semanas. En algunas modalidades, las dosis pueden estar separadas por un período de aproximadamente 7 a aproximadamente 60 días, como por ejemplo aproximadamente 14 a aproximadamente 48 días, etc. En algunas modalidades, un número mínimo de días entre dosis puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más. En algunas modalidades, el número máximo de días entre dosis puede ser de aproximadamente 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 o menos. En algunas modalidades, las dosis pueden estar separadas entre aproximadamente 21 y aproximadamente 28 días. En algunas modalidades, las dosis pueden estar separadas entre

aproximadamente 19 y aproximadamente 42 días. En algunas modalidades, las dosis pueden estar separadas entre aproximadamente 7 y aproximadamente 28 días. En algunas modalidades, las dosis pueden ser de aproximadamente 14 a aproximadamente 24 días. En algunas modalidades, las dosis pueden ser de aproximadamente 21 a aproximadamente 42 días.

En algunas modalidades, un régimen de vacunación comprende una primera dosis y una segunda dosis. En algunas modalidades, se administran una primera dosis y una segunda dosis con una diferencia de al menos 21 días. En algunas modalidades, se administran una primera dosis y una segunda dosis con una diferencia de al menos 28 días.

En algunas modalidades, un régimen de vacunación comprende una primera dosis y una segunda dosis, en donde la cantidad de ARN administrada en la primera dosis es la misma que la cantidad de ARN administrada en la segunda dosis. En algunas modalidades, un régimen de vacunación comprende una primera dosis y una segunda dosis en donde la cantidad de ARN administrada en la primera dosis difiere de la administrada en la segunda dosis.

En algunas modalidades, un régimen de vacunación comprende una primera dosis y una segunda dosis, en donde la cantidad de ARN administrada en la primera dosis es menor que la administrada en la segunda dosis. En algunas modalidades, la cantidad de ARN administrada en la primera dosis es del 10 % al 90 % de la segunda dosis. En algunas modalidades, la cantidad de ARN administrada en la primera dosis es del 10 % al 50 % de la segunda dosis. En algunas modalidades, la cantidad de ARN administrada en la primera dosis es del 10 % al 20 % de la segunda dosis. En algunas modalidades, la primera dosis y la segunda dosis se administran con al menos 2 semanas de diferencia, lo que incluye al menos 3 semanas de diferencia, al menos 4 semanas de diferencia, al menos 5 semanas de diferencia, al menos 6 semanas de diferencia o más. En algunas modalidades, la primera dosis y la segunda dosis se administran con al menos 3 semanas de diferencia.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende menos de aproximadamente 30 µg de ARN y una segunda dosis comprende al menos aproximadamente 30 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 1 a menos de aproximadamente 30 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25 o menos de aproximadamente 30 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 30 a aproximadamente 100 µg de ARN (por

ejemplo, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50 o aproximadamente 60 µg de ARN). En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg de ARN, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg de ARN, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 30 a aproximadamente 60 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 30 a aproximadamente 60 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55 o aproximadamente 60 µg de ARN).

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 1 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 5 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 15 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 1 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 5 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 6 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 15 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende

aproximadamente 20 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 25 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN y una segunda
5 dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende menos de aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende al menos aproximadamente 10 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,1 a menos de aproximadamente 10 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,5,
10 aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8 o menos de aproximadamente 10 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 30 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25 o aproximadamente 30 µg de ARN). En algunas
15 modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 µg de ARN, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 µg de ARN, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 30 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,1 a
20 aproximadamente 5 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 20 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 16, aproximadamente 18, aproximadamente 20 µg
25 de ARN).

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,1 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis
30 comprende aproximadamente 1 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende menos de aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende al menos aproximadamente 3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende de aproximadamente 0,1 a menos de aproximadamente 3 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2,0 o aproximadamente 2,5 µg de ARN) y una segunda dosis comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6 o aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 µg de ARN). En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 µg de ARN, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 µg de ARN, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 3 a aproximadamente 10 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9 o aproximadamente 1,0 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 3,0 µg de ARN).

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,1 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 0,5 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 1 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN.

En algunas modalidades, un régimen de vacunación comprende una primera dosis y una segunda dosis, en donde la cantidad de ARN administrada en la primera dosis es mayor que la administrada en la segunda dosis. En algunas modalidades, la cantidad de ARN administrada en la segunda dosis es del 10 % al 90 % de la primera dosis. En algunas modalidades, la cantidad de ARN administrada en la segunda dosis es del 10 % al 50 % de la

primera dosis. En algunas modalidades, la cantidad de ARN administrada en la segunda dosis es del 10 % al 20 % de la primera dosis. En algunas modalidades, la primera dosis y la segunda dosis se administran con al menos 2 semanas de diferencia, lo que incluye al menos 3 semanas de diferencia, al menos 4 semanas de diferencia, al menos 5 semanas de diferencia, al menos 6 semanas de diferencia o más. En algunas modalidades, la primera dosis y la segunda dosis se administran con al menos 3 semanas de diferencia.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende al menos aproximadamente 30 µg de ARN y una segunda dosis comprende menos de aproximadamente 30 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 a aproximadamente 100 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50 o aproximadamente 60 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 30 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25 o aproximadamente 30 µg de ARN). En algunas modalidades, una segunda dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg de ARN, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg de ARN, o aproximadamente 1 a 5 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 a aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 20 µg de ARN, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg de ARN, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 a aproximadamente 60 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55 o aproximadamente 60 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 µg de ARN).

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 5 µg de

ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 15 µg de ARN.

- 5 En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 5 µg de
- 10 ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 6 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende
- 15 aproximadamente 15 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 20 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 25 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 60 µg de ARN y una segunda
- 20 dosis comprende aproximadamente 30 µg de ARN.

- En algunas modalidades, una primera dosis comprende al menos aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende menos de aproximadamente 10 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 30 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20,
- 25 aproximadamente 25 o aproximadamente 30 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,1 a menos de aproximadamente 10 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8 o menos de aproximadamente 10 µg de ARN). En
- 30 algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 30 µg de ARN, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg de ARN, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 20 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 16, aproximadamente 18, aproximadamente 20 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 µg de ARN).

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,1 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende al menos aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende menos de aproximadamente 3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente entre 3 y aproximadamente 10 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6 o aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 µg de ARN) y una segunda dosis comprende entre 0,1 y menos de aproximadamente 3 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2,0 o aproximadamente 2,5 µg de ARN). En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 3 a aproximadamente 10 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 µg de ARN, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 µg de ARN, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 µg de ARN.

En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 1 a aproximadamente 3 µg de ARN (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 3,0 µg de ARN) y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,1 a 0,3 µg de ARN (por ejemplo,

aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9 o aproximadamente 1,0 µg de ARN).

5 En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,1 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,3 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 0,6 µg de ARN. En algunas modalidades, una primera dosis comprende aproximadamente 3 µg de ARN y una segunda dosis comprende aproximadamente 1 µg de ARN.

15 En algunas modalidades, un régimen de vacunación comprende al menos dos dosis, incluidas, por ejemplo, al menos tres dosis, al menos cuatro dosis o más. En algunas modalidades, un régimen de vacunación comprende tres dosis. En algunas modalidades, el intervalo de tiempo entre la primera dosis y la segunda dosis puede ser el mismo que el intervalo de tiempo entre la segunda dosis y la tercera dosis. En algunas modalidades, el intervalo de tiempo entre la primera dosis y la segunda dosis puede ser más largo que el intervalo de tiempo entre la segunda dosis y la tercera dosis, por ejemplo, en días o semanas (incluyendo, por ejemplo, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas o más). En algunas modalidades, el intervalo de tiempo entre la primera dosis y la segunda dosis puede ser más corto que el intervalo de tiempo entre la segunda dosis y la tercera dosis, por ejemplo, en días o semanas (incluidos, por ejemplo, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas o más). En algunas modalidades, el intervalo de tiempo entre la primera dosis y la segunda dosis puede ser más corto que el intervalo de tiempo entre la segunda dosis y la tercera dosis, por ejemplo, al menos 1 mes (incluidos, por ejemplo, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses o más).

En algunas modalidades, una última dosis de un régimen primario y una primera dosis de un régimen de refuerzo se administran con una diferencia de al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos

8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses o más. En algunas modalidades, un régimen primario puede comprender dos dosis. En algunas modalidades, un régimen primario puede comprender tres dosis.

5 En algunas modalidades, se pueden administrar una primera dosis y una segunda dosis (y/u otra dosis posterior) mediante inyección intramuscular. En algunas modalidades, se pueden administrar una primera dosis y una segunda dosis (y/u otra dosis posterior) en el músculo deltoides. En algunas modalidades, se pueden administrar una primera dosis y una segunda dosis (y/u otra dosis posterior) en el mismo brazo.

10 En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra (por ejemplo, mediante inyección intramuscular) como una serie de dos dosis (por ejemplo, 0,3 mL cada una) con 21 días de diferencia. En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra (por ejemplo, mediante inyección intramuscular) como una serie de dos dosis (por ejemplo, 0,2 mL cada una) con 21 días de diferencia. En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra (por ejemplo, mediante inyección intramuscular) como una serie de tres dosis (por ejemplo, 0,3 mL o menos, incluidos, por ejemplo, 0,2 mL), en donde las dosis se administran con al menos 3 semanas de diferencia. En algunas modalidades, la primera y la segunda dosis pueden administrarse con 3 semanas de diferencia, mientras que la segunda y la tercera dosis pueden administrarse con un intervalo de tiempo más largo que el que hay entre la primera y la segunda dosis, por ejemplo, con al menos 4 semanas de diferencia o más (incluyendo al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas o más). En algunas modalidades, cada dosis es de aproximadamente 60 µg. En algunas modalidades, cada dosis es de aproximadamente 50 µg. En algunas modalidades, cada dosis es de aproximadamente 30 µg. En algunas modalidades, cada dosis es de aproximadamente 25 µg. En algunas modalidades, cada dosis es de aproximadamente 20 µg. En algunas modalidades, cada dosis es de aproximadamente 15 µg. En algunas modalidades, cada dosis es de aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, cada dosis es de aproximadamente 3 µg.

30 En algunas modalidades, al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 60 µg. En algunas modalidades, al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 50 µg. En algunas modalidades, al menos

- una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 30 µg. En algunas modalidades, al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de
- 5 aproximadamente 25 µg. En algunas modalidades, al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 20 µg. En algunas modalidades, al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 15 µg. En
- 10 algunas modalidades, al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 3 µg.
- 15 En una modalidad, se administra una cantidad del ARN descrito en este documento de aproximadamente 60 µg por dosis. En una modalidad, se administra una cantidad del ARN descrito en este documento de aproximadamente 50 µg por dosis. En una modalidad, se administra una cantidad del ARN descrito en este documento de aproximadamente 30 µg por dosis. En una modalidad, se administra una cantidad del ARN descrito en este documento de
- 20 aproximadamente 25 µg por dosis. En una modalidad, se administra una cantidad del ARN descrito en este documento de aproximadamente 20 µg por dosis. En una modalidad, se administra una cantidad del ARN descrito en este documento de aproximadamente 15 µg por dosis. En una modalidad, se administra una cantidad del ARN descrito en este documento de aproximadamente 10 µg por dosis. En una modalidad, se administra una cantidad del ARN
- 25 descrito en este documento de aproximadamente 5 µg por dosis. En una modalidad, se administra una cantidad del ARN descrito en este documento de aproximadamente 3 µg por dosis. En una modalidad, se administran al menos dos de dichas dosis. Por ejemplo, se puede administrar una segunda dosis aproximadamente 21 días después de la administración de la primera dosis.
- 30 En algunas modalidades, la eficacia de la vacuna de ARN descrita en este documento (por ejemplo, administrada en dos dosis, en donde una segunda dosis puede administrarse aproximadamente 21 días después de la administración de la primera dosis, y administrarse, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 30 µg por dosis) es al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90, o al menos 95 % comenzando 7 días después de la administración

- de la segunda dosis (por ejemplo, comenzando 28 días después de la administración de la primera dosis si se administra una segunda dosis 21 días después de la administración de la primera dosis). En algunas modalidades, dicha eficacia se observa en poblaciones de al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70 años o más. En algunas
- 5 modalidades, la eficacia de la vacuna de ARN descrita en este documento (por ejemplo, administrada en dos dosis, en donde una segunda dosis puede administrarse aproximadamente 21 días después de la administración de la primera dosis, y administrarse, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 30 µg por dosis) a partir de 7 días después de la administración de la segunda dosis (por ejemplo, a partir de 28 días después de la
- 10 administración de la primera dosis si se administra una segunda dosis 21 días después de la administración de la primera dosis) en poblaciones de al menos 65 años, como de 65 a 80, de 65 a 75 o de 65 a 70, es de al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 % o al menos el 95 %. Esta eficacia puede observarse durante períodos de tiempo de hasta 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses o incluso más.
- 15 En una modalidad, la eficacia de la vacuna se define como la reducción porcentual en el número de sujetos con evidencia de infección (sujetos vacunados vs. sujetos no vacunados).
- En una modalidad, los métodos y agentes descritos en este documento se administran a una población pediátrica. En diversas modalidades, la población pediátrica comprende o consiste en sujetos menores de 18 años, por ejemplo, de 5 a menos de 18 años de edad, de 12 a
- 20 menos de 18 años de edad, de 16 a menos de 18 años de edad, de 12 a menos de 16 años de edad, de 5 a menos de 12 años de edad o de 6 meses a menos de 12 años de edad. En diversas modalidades, la población pediátrica comprende o consiste en sujetos menores de 5 años, por ejemplo, de 2 a menos de 5 años de edad, de 12 a menos de 24 meses de edad, de 7 a menos de 12 meses de edad o menos de 6 meses de edad. En algunas de estas
- 25 modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de menos de 2 años de edad, por ejemplo, de 6 meses a menos de 2 años de edad. En algunas de estas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de menos de 6 meses de edad, por ejemplo, de 1 mes a menos de 4 meses de edad. En algunas modalidades, un régimen de dosificación (por ejemplo, dosis y/o
- 30 programa de dosificación) para una población pediátrica puede variar para diferentes grupos de edad. Por ejemplo, en algunas modalidades, a un sujeto de entre 6 meses y 4 años de edad se le puede administrar de acuerdo con un régimen primario que comprende al menos tres dosis, en el que las dos dosis iniciales se administran con al menos 3 semanas (incluyendo, por ejemplo, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas o

más) de diferencia, seguidas de una tercera dosis administrada al menos 8 semanas (incluyendo, por ejemplo, al menos 9 semanas, al menos 10 semanas, al menos 11 semanas, al menos 12 semanas o más) después de la segunda dosis. En algunas de estas modalidades, al menos una dosis administrada es 3 µg de ARN descrito en este documento. En algunas modalidades, a un sujeto de 5 años de edad o más se le puede administrar de acuerdo con un régimen primario que comprende al menos dos dosis, en el que las dos dosis se administran con al menos 3 semanas de diferencia (incluyendo, por ejemplo, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas o más). En algunas de estas modalidades, al menos una dosis administrada es 10 µg de ARN descrito en este documento. En algunas modalidades, a un sujeto de 5 años de edad o más que esté inmunodeprimido (por ejemplo, en algunas modalidades, sujetos que se han sometido a un trasplante de órgano sólido o que están diagnosticados con afecciones que se consideran que tienen un equivalente de inmunodepresión) se le puede administrar de acuerdo con un régimen primario que comprende al menos tres dosis, en el que las dos dosis iniciales se administran con al menos 3 semanas (incluyendo, por ejemplo, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas o más) de diferencia, seguidas de una tercera dosis administrada al menos 4 semanas (incluyendo, por ejemplo, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas, al menos 10 semanas, al menos 11 semanas, al menos 12 semanas o más) después de la segunda dosis.

En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 12 años o más y cada dosis es de aproximadamente 30 µg. En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 12 años o más (incluidos, por ejemplo, 18 años o más) y cada dosis es superior a 30 µg, incluidos, por ejemplo, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg, 55 µg, 60 µg, 65 µg, 70 µg o más. En algunas de estas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 12 años de edad o más y cada dosis es de aproximadamente 60 µg. En algunas de estas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 12 años de edad o más y cada dosis es de aproximadamente 50 µg. En una modalidad, la población pediátrica comprende o consiste en sujetos de 12 a menos de 18 años de edad, incluidos sujetos de 16 a menos de 18 años de edad y/o sujetos de 12 a menos de 16 años de edad. En esta modalidad, los tratamientos pueden comprender 2 vacunaciones con 21 días de diferencia, en donde, en una modalidad, la vacuna se administra en una cantidad de 30 µg de ARN por dosis, por ejemplo, mediante administración intramuscular. En algunas modalidades, se administran dosis más altas a pacientes

pediátricos y adultos mayores, por ejemplo, a pacientes de 12 años o más, en comparación con niños o bebés más pequeños, por ejemplo, de 2 a menos de 5 años, de 6 meses a menos de 2 años o menos de 6 meses. En algunas modalidades, se administran dosis más altas a niños que tienen entre 2 y menos de 5 años de edad, en comparación con niños pequeños y/o bebés, por ejemplo, que tienen entre 6 meses y menos de 2 años de edad, o menos de 6 meses de edad.

En una modalidad, la población pediátrica comprende o consiste en sujetos de 5 a menos de 18 años de edad, incluidos sujetos de 12 a menos de 18 años de edad y/o sujetos de 5 a menos de 12 años de edad. En esta modalidad, los tratamientos pueden comprender 2 vacunaciones con 21 días de diferencia, en donde, en diversas modalidades, la vacuna se administra en una cantidad de 10 µg, 20 µg o 30 µg de ARN por dosis, por ejemplo, mediante administración intramuscular. En algunas de estas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 5 a 11 años de edad y cada dosis es de aproximadamente 10 µg.

En una modalidad, la población pediátrica comprende o consiste en sujetos menores de 5 años de edad, incluidos sujetos de 2 a menos de 5 años de edad, sujetos de 12 a menos de 24 meses de edad, sujetos de 7 a menos de 12 meses de edad, sujetos de 6 a menos de 12 meses de edad y/o sujetos menores de 6 meses de edad. En esta modalidad, los tratamientos pueden comprender 2 vacunaciones, por ejemplo, con una diferencia de 21 a 42 días, por ejemplo, con una diferencia de 21 días, en donde, en diversas modalidades, la vacuna se administra en una cantidad de 3 µg, 10 µg, 20 µg o 30 µg de ARN por dosis, por ejemplo, mediante administración intramuscular. En algunas de estas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 2 a menos de 5 años de edad y cada dosis es de aproximadamente 3 µg. En algunas de estas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de aproximadamente 6 meses a menos de aproximadamente 5 años y cada dosis es de aproximadamente 3 µg.

En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 12 años o más y al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 60 µg. En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 12 años de edad o más y al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de

vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 30 µg. En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 12 años de edad o más y al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 15 µg. En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 5 a menos de 12 años de edad y al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 2 a menos de 5 años de edad y al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 3 µg. En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a sujetos de 6 meses a menos de 2 años de edad y al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 3 µg o menos, incluyendo, por ejemplo, 2 µg, 1 µg o menos). En algunas modalidades, una composición de ARNm descrita en este documento se administra a bebés menores de 6 meses y al menos una dosis administrada en un régimen de vacunación (por ejemplo, un régimen de vacunación primaria y/o un régimen de vacunación de refuerzo) es de aproximadamente 3 µg o menos, incluyendo, por ejemplo, 2 µg, 1 µg, 0,5 µg o menos).

En algunas modalidades, una dosis administrada a sujetos que la necesitan puede comprender la administración de una única composición de ARNm descrita en este documento.

En algunas modalidades, una dosis administrada a sujetos que la necesitan puede comprender la administración de al menos dos o más (incluidos, por ejemplo, al menos tres o más) productos/formulaciones farmacológicas diferentes. Por ejemplo, en algunas modalidades, al menos dos o más productos/formulaciones farmacológicas diferentes pueden comprender al menos dos composiciones de ARNm diferentes descritas en este documento (por ejemplo, en algunas modalidades cada una comprende un constructo de ARN diferente).

En algunas modalidades, a un sujeto se le administran dos o más ARN (por ejemplo, como parte de un régimen primario o un régimen de refuerzo), en donde los dos o más ARN se administran el mismo día o en la misma visita. En algunas modalidades, los dos o más ARN

se administran en composiciones separadas, por ejemplo, administrando cada ARN a una parte separada del sujeto (por ejemplo, mediante administración intramuscular a diferentes brazos del sujeto o a diferentes sitios del mismo brazo del sujeto). En algunas modalidades, los dos o más ARN se mezclan antes de la administración (por ejemplo, se mezclan inmediatamente antes de la administración, por ejemplo, por el médico administrador). En algunas modalidades, los dos o más ARN se formulan juntos (por ejemplo, (a) mezclando poblaciones separadas de LNP, en donde cada población comprende un ARN diferente; o (b) mezclando dos o más ARN antes de la formulación de LNP, de modo que cada LNP comprenda dos o más ARN).

- 10 En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición o esta comprende uno o más primeros ARN y uno o más segundos ARN, cada uno en la misma cantidad (es decir, en una proporción de 1:1).

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición o esta comprende uno o más primeros ARN y uno o más segundos ARN, cada uno en una cantidad diferente. Por ejemplo, en algunas modalidades, a un sujeto se le administra o una composición comprende uno o más primeros ARN en una cantidad que es de 0,01 a 100 veces la de uno o más segundos ARN (por ejemplo, en donde la cantidad de uno o más primeros ARN es de 0,01 a 50, de 0,01 a 4, de 0,01 a 30, de 0,01 a 25, de 0,01 a 20, de 0,01 a 15, de 0,01 a 10, de 0,01 a 9, de 0,01 a 8, de 0,01 a 7, de 0,01 a 6, de 0,01 a 5, de 0,01 a 4, de 0,01 a 3, de 0,01 a 2, de 0,01 a 1,5, de 1 a 50, de 1 a 4, de 1 a 30, de 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 a 1,5 veces la de uno o más segundos ARN). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición o comprende uno o más primeros ARN y uno o más segundos ARN, en donde la concentración de uno o más primeros ARN es de 1 a 10 veces la de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición o comprende uno o más primeros ARN y uno o más segundos ARN, en donde la cantidad de uno o más primeros ARN es de 1 a 5 veces la de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición o comprende uno o más primeros ARN y uno o más segundos ARN, en donde la concentración de uno o más primeros ARN es de 1 a 3 veces la de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición o comprende uno o más primeros ARN y uno o más segundos ARN, en donde la cantidad de uno o más primeros ARN es 2 veces la de uno o más segundos ARN. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición o comprende uno o más primeros ARN y uno o más segundos ARN, en donde la concentración de uno o más primeros ARN es 3 veces la de uno

o más segundos ARN.

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende dos primeros ARN, cada uno de los cuales codifica un antígeno derivado de una cepa o variante de influenza, en donde la cantidad de cada ARN no es la misma. Por ejemplo, en algunas modalidades, la proporción de los dos primeros ARN es 1:0,01-100 (por ejemplo, 1: 0,01-50; 1: 0,01-40; 1: 0,01-30; 1: 0,01-25; 1: 0,01-20; 1: 0,01-15; 1: 0,01-10; 1: 0,01-9; 1: 0,01-8; 1: 0,01-7; 1: 0,01-6; 1: 0,01-5; 1: 0,01-4; 1: 0,01-3; 1: 0,01-2; 1: 0,01-1,5, 1: 0,1-10, 1: 0,1-5, 1: 0,1-3, 1: 2-10, 1: 2-5, o 1: 2-3). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende dos primeros ARN en una proporción de 1:3. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende dos primeros ARN en una proporción de 1:2.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la proporción de los tres primeros ARN es 1: 0,01-100: 0,01-100 (por ejemplo, 1: 0,01-50: 0,01-50; 1: 0,01-40: 0,01-40; 1: 0,01-30: 0,01-30; 1: 0,01-25: 0,01-25; 1: 0,01-20: 0,01-20; 1: 0,01-15: 0,01-15; 1: 0,01-10: 0,01-10; 1: 0,01-9: 0,01-9; 1: 0,01-8: 0,01-8; 1: 0,01-7: 0,01-7; 1: 0,01-6: 0,01-6; 1: 0,01-5: 0,01-5; 1: 0,01-4: 0,01-4; 1: 0,01-3: 0,01-3; 1: 0,01-2: 0,01-2; 1: 0,01-1,5: 0,01-1,5; 1: 0,1-10: 0,1-10, 1: 0,1-5: 0,1-5, 1: 0,1-3: 0,1-3, 1: 2-10: 2-10, 1: 2-5: 2-5, o 1: 2-3: 2-3). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende tres primeros ARN en una proporción de 1:1:3. En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende tres primeros ARN en una proporción de 1:3:3.

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra o una composición comprende dos o más segundos ARN, uno o más de los cuales codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A, y uno o más de los cuales codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo B. En algunas modalidades, el uno o más segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A y el uno o más segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo B están presentes o se administran en la misma cantidad (es decir, en una proporción de 1:1). En algunas modalidades, el uno o más segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A y el uno o más segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo B se administran en diferentes cantidades (por ejemplo, en una proporción de entre 1:10 y 10:1, o en una proporción de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1 o 5:1 (ARN total que codifica un antígeno A: ARN total que codifica un antígeno B).

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra o una composición comprende dos

segundos ARN, cada uno de los cuales codifica una proteína HA de un tipo de virus de influenza diferente (por ejemplo, un segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo A y un segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B). En algunas modalidades, los segundos ARN se administran o están presentes en la misma cantidad (es decir, en una proporción de 1:1). En algunas modalidades, los segundos ARN se administran o están presentes en diferentes cantidades (por ejemplo, en una proporción de entre 1:10 y 10:1, o en una proporción de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1 o 5:1 (A:B)).

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra o una composición comprende tres segundos ARN, cada uno de los cuales codifica una proteína HA de un subtipo de virus de influenza diferente (por ejemplo, una proteína HA de un virus A/Wisconsin (H1N1), un virus A/Darwin (H3N2) y un virus B/Austria (Victoria)). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende cada uno de los tres segundos ARN en la misma cantidad (es decir, en una proporción 1:1:1). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra o una composición comprende una cantidad diferente de uno o más de los tres segundos ARN (por ejemplo, en una proporción de entre 1:1:2 y 1:1:10 (por ejemplo, en una proporción de 1:1:2, 1:1:3, 1:1:4 o 1:1:5), o en una proporción de entre 2:2:1 y 2:2:10 (por ejemplo, en una proporción de 2:2:1, 3:3:1, 4:4:1 o 5:5:1). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende tres segundos ARN, dos de los cuales codifican proteínas HA de diferentes virus de influenza tipo A, y uno de los cuales codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B. En algunas de estas modalidades, el segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B está presente o se administra en una cantidad mayor en comparación con cualquier segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus tipo A (por ejemplo, en algunas modalidades, las proporciones de los dos segundos ARN que codifican proteínas HA de virus de influenza tipo A en relación con el segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B son 1:1:1-10, 1:1:2, 1:1:3, 1:1:4 o 1:1:5 (A:A:B)). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende tres segundos ARN, dos que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A y uno que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B, en donde la proporción de los tres segundos ARN es 1:1:4 (A:A:B). En algunas modalidades, los dos segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A están presentes cada uno o se administran cada uno en una cantidad mayor en comparación con el segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B (por ejemplo, en algunas modalidades, las proporciones de los dos segundos ARN que codifican proteínas HA de virus de influenza tipo A en relación con el segundo ARN que codifica una proteína HA de

un virus de influenza tipo B son 1-10:1-10:1, 2:2:1, 3:3:1, 4:4:1 o 5:5:1 (A:A:B)).

- En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende cuatro segundos ARN, cada uno de los cuales codifica una proteína HA de un subtipo de virus de influenza diferente. En algunas de estas modalidades, los cuatro segundos ARN comprenden
- 5 dos segundos ARN que codifican proteínas HA de diferentes virus de influenza tipo A y dos segundos ARN que codifican proteínas HA de diferentes virus de influenza tipo B (por ejemplo, una proteína HA de un virus H1N1, una proteína HA de un virus H3N2, una proteína HA de un virus de linaje B/Victoria y una proteína HA de un virus de linaje B/Yamagata). En algunas modalidades, cada uno de los dos segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus
- 10 de influenza tipo A y cada uno de los dos segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo B están presentes en la misma cantidad (es decir, la proporción de los cuatro segundos ARN es 1:1:1:1). En algunas modalidades, los dos segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo B se administran cada uno o están presentes cada uno en una cantidad mayor en comparación con cualquier segundo ARN que
- 15 codifica una proteína HA de un virus tipo A (por ejemplo, en algunas modalidades, las proporciones de los dos segundos ARN que codifican proteínas HA de virus de influenza tipo A en relación con los dos segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo B son 1:1:2-10:2-10, 1:1:2-5:2-5, 1:1:2:2, 1:1:3:3, 1:1:4:4, 1:1:5:5, 1:1:6:6, 1:1:7:7, 1:1:8:8, 1:1:9:9, 1:1:10:10 (A:A:B:B)). En algunas modalidades, a un sujeto se le
- 20 administra una composición que comprende cuatro segundos ARN, dos que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A y dos que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo B, en donde la proporción de los cuatro segundos ARN es 1:1:5:5 (A:A:B:B). En algunas modalidades, los dos segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A se administran cada uno o están presentes cada uno en una cantidad
- 25 mayor en comparación con cualquier segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus tipo B (por ejemplo, en algunas modalidades, las proporciones de los dos segundos ARN que codifican proteínas HA de virus de influenza tipo A en relación con los dos segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo B son 2-10:2-10:1:1, 2-5:2-5:1:1, 2:2:1:1, 3:3:1:1, 4:4:1:1, 5:5:1:1, 6:6:1:1, 7:7:1:1, 8:8:1:1, 9:9:1:1, 10:10:1:1 (A:A:B:B)).
- 30 En algunas modalidades, una composición comprende o se le administra a un sujeto cuatro segundos ARN, que comprenden tres segundos ARN que codifican proteínas HA de diferentes virus de influenza tipo A y un segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B (por ejemplo, A/Wisconsin (H1N1), A/Darwin (H3N2), A/Cambodia (H3N2) y B/Austria (Victoria)). En algunas de estas modalidades, cada uno de los cuatro

segundos ARN se administra o está presente en la misma cantidad (es decir, en una proporción 1:1:1:1). En algunas modalidades, la cantidad de segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B es mayor que cualquiera de los segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A (por ejemplo, en algunas modalidades, la proporción de segundos ARN es 1:1:1:1-10, 1:1:1:1-5, 1:1:1:2, 1:1:1:3, 1:1:1:4 o 1:1:1:5 (A:A:A:B)). En algunas modalidades, la proporción de segundos ARN administrados o en una composición es 1:1:1:5 (A:A:A:B). En algunas modalidades, la cantidad de cada uno de los segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza tipo A es mayor que la del segundo ARN que codifica una proteína HA de un virus de influenza tipo B (por ejemplo, en algunas modalidades, la proporción de los segundos ARN es 1-10:1-10:1-10:1, 1-5:1-5:1-5:1, 2:2:2:1, 3:3:3:1, 4:4:4:1 o 5:5:5:1 (A:A:A:B)).

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra o una composición comprende uno o más segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza (por ejemplo, dos segundos ARN, tres segundos ARN o cuatro segundos ARN, cada uno codificando una proteína HA de un virus de influenza diferente) en una cantidad total de 0,1 a 100 µg (por ejemplo, 1 a 90 µg, 3 a 90 µg, 1 a 60 µg, 3 a 60 µg, 5 a 60 µg, 10 a 60 µg, 30 a 60 µg, 3 a 30 µg). En algunas modalidades, a un sujeto se le administra o una composición comprende uno o más segundos ARN que codifican una proteína HA de un virus de influenza en una cantidad total de 3 µg, 5 µg, 6 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 45 µg, 60 µg, 75 µg o 90 µg.

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra una composición que comprende tres o cuatro segundos ARN, cada uno de los cuales codifica un antígeno HA de una cepa de influenza diferente, en una de las cantidades enumeradas en la siguiente Tabla C (cada "Componente de influenza" corresponde a un segundo ARN que codifica un antígeno HA (por ejemplo, un segundo ARN como se describe en este documento)).

En algunas modalidades, una composición descrita en este documento se caracteriza porque produce títulos de anticuerpos neutralizantes de la influenza que están al menos al doble de los producidos por una vacuna de referencia para cada virus de influenza del cual codifica antígenos (por ejemplo, en donde la vacuna de referencia es una vacuna de ARN de influenza cuadrivalente administrada sola, o una vacuna de influenza aprobada (sin ARN)).

En algunas modalidades, la vacuna contra la influenza es un virus de influenza alfa, un virus de influenza beta, un virus de influenza gamma o una vacuna contra el virus de influenza delta. En algunas modalidades, la vacuna es un virus de influenza A, un virus de influenza B, un virus de influenza C o una vacuna contra el virus de influenza D. En algunas modalidades, la

vacuna contra el virus de la influenza A comprende una hemaglutinina seleccionada entre H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 y H18, o un fragmento o variante inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico (por ejemplo, ARN) que codifica cualquiera de las mismas. En algunas modalidades, la vacuna contra la influenza A comprende o codifica una neuraminidasa (NA) seleccionada entre N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10 y N11, o un fragmento o variante inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico (por ejemplo, ARN) que codifica cualquiera de las mismas. En algunas modalidades, la vacuna contra la influenza comprende al menos una hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1), proteína no estructural 2 (NS2), proteína de exportación nuclear (NEP, por sus siglas en inglés), proteína ácida de la polimerasa (PA), proteína básica de la polimerasa PB1, PB1-F2 y/o proteína básica de la polimerasa 2 (PB2) del virus de la influenza, o un fragmento o variante inmunogénica de las mismas, o un ácido nucleico (por ejemplo, ARN) que codifica cualquiera de las mismas.

15 EJEMPLOS

EJEMPLO 1: DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN

En esta sección se proporciona una descripción del proceso de fabricación y los controles del proceso para las sustancias farmacológicas de la vacuna de ARNsa contra la influenza. El proceso de fabricación incluye la síntesis de ARN mediante un paso de transcripción in vitro (IVT, por sus siglas en inglés) y un paso de purificación mediante ultrafiltración/diafiltración (UFDF-1). Luego, el ARN se adiciona caperuza enzimáticamente y se purifica mediante cromatografía y un UFDF-2 final, seguido de una filtración final y dispensación.

El proceso se ha ampliado a una escala de volumen IVT inicial de 1,5 L para la fabricación de material clínico. No hubo cambios significativos en el proceso de desarrollo/toxicología no clínica aparte de los necesarios para ampliar el proceso a 1,5 L.

RT-ddPCR (Identidad de la secuencia de ARN codificada)

La identidad del ARNsa de la influenza se confirma si la muestra analizada es positiva para la secuencia de replicasa (confirma la autoamplificación del constructo de ARN) y la secuencia de interés (confirma la secuencia de la gripe codificada) al realizar un ensayo de transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés)-ddPCR de un solo paso del ARN en la

muestra. La tecnología de reacción en cadena de la polimerasa con gotitas digitales (ddPCR) es una forma digital de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) que utiliza un sistema de emulsión de agua y aceite para cuantificar los ácidos nucleicos objetivo. La muestra de ARN se diluye a una concentración de entrada teórica final que está
5 dentro del rango lineal del ensayo ddPCR. Una mezcla de reacción que contiene transcriptasa inversa, ADN polimerasa y cebadores y sondas específicos de secuencia se divide en gotitas y la reacción de PCR se lleva a cabo en cada partición individualmente. Los resultados se calculan contando la secuencia objetivo amplificada (gotas positivas, medidas por la amplitud de fluorescencia por encima del fondo) y el número de particiones en donde no hay
10 amplificación (gotas negativas). La identidad se confirma si los recuentos de gotas positivas superan un umbral establecido, después de que se hayan examinado los controles positivos y negativos y se haya determinado que son válidos y aceptables.

HPLC de fase inversa (presencia de pseudouridina)

La presencia de pseudouridina se determina mediante cromatografía líquida de alto
15 rendimiento de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) después de la digestión completa del ARNm. Los nucleósidos individuales resultantes tienen un patrón de elución característico que incluye la resolución de uridina y pseudouridina. La presencia de pseudouridina se confirma mediante comparación con una referencia de uridina y pseudouridina, así como con un estándar límite.

20 Electroforesis capilar en gel (integridad del ARN)

La integridad del ARN se determina mediante electroforesis capilar en gel (CGE, por sus siglas en inglés) basada en la migración diferencial de ARN de diferentes pesos moleculares en un campo eléctrico aplicado. El ARN se somete a un desnaturalizante que
25 desdobla el ARN y disocia los complejos no covalentes. Cuando se someten a un campo eléctrico, las especies de ARN desnaturalizadas migran a través de la matriz de gel, en función de la longitud y el tamaño, hacia el ánodo. Un colorante intercalante se une al ARN y a los fragmentos asociados durante la migración, lo que permite la detección de fluorescencia. El ARN intacto se separa de cualquier especie fragmentada, lo que permite cuantificar la integridad del ARN determinando el porcentaje relativo del área corregida en el tiempo para
30 el pico intacto (principal).

qPCR (plantilla de ADN residual)

El nivel de plantilla de ADN residual se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés) utilizando tecnología de fluorescencia. Se agrega una mezcla maestra de qPCR que contiene cebadores específicos del objetivo y un reactivo de cuantificación de qPCR fluorescente a todos los pocillos de muestra. Las muestras se preparan en una serie de diluciones y se analizan mediante qPCR en tiempo real. La señal de fluorescencia medida es proporcional a la cantidad de producto de PCR. La cuantificación del ADN se realiza durante la fase exponencial de la reacción en un umbral de ciclo (Ct, por sus siglas en inglés) en donde se detecta por primera vez la amplificación de una secuencia objetivo por encima del umbral de señal establecido. Este punto Ct depende de la cantidad de ADN presente originalmente en la muestra. La concentración de ADN en la muestra de prueba se interpola a partir de la regresión lineal de la curva estándar, teniendo en cuenta el factor de dilución. Los resultados se informan en ng de ADN/mg de ARN.

Los detalles del lote y los datos resumidos del análisis del lote se proporcionan en Tabla 1 para 1 lote de material toxicológico reglamentario y 1 lote GMP de sustancia farmacológica que se utilizará en ensayos clínicos.

Tabla 1

S,4,4,6-2. Resultados del lote de la sustancia farmacológica de la vacuna de la influenza de ARNsa TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A

Atributo de calidad	Procedimiento analítico	Criterios de aceptación	Toxicología no clínica (Lote 00714477-0135)	Sustancia farmacológica clínica (Lote 22V541F101)
Apariencia (Claridad)	Claridad	≤ 6 NTU	Claro	2 NTU
Apariencia (coloración)	Coloración	No más intensamente coloreado que el nivel 7 del estándar de color marrón (B).	Solución incolora	≤ B9
pH	Potenciometría	7,0 ± 0,5	6,7	7,0
Contenido (concentración de ARN)	espectroscopia UV	1,25 ± 0,25 mg/mL	1,81 mg/mL	1,22 mg/mL
ddPCR	Identidad de la secuencia de ARN codificada	Identidad confirmada	Positivo ^a	Confirmado

Integridad del ARN	Electroforesis capilar en gel	≥ 60 %	79 %	85 %
Plantilla de ADN residual	qPCR	≤ 990 ng de ADN/mg de ARN	31 ng/mg	NMT 1 ng/mg
Endotoxina	Endotoxina (LAL)	≤ 12,5 EU/mL	<0,06 EU/mg	0,2 EU/mL
Carga biológica	Carga biológica	≤ 1 UFC/10 mL	≤ 10 UFC/mL	0 UFC/10 mL

a. La identidad se determinó mediante transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Las especificaciones solo se aplican a suministros clínicos.

Abreviaturas: NTU = unidades de turbidez nefelométricas; NT = no probado; TBP = se proporcionará en la enmienda IND; ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa en gotas digitales; qPCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; LAL = lisado de amebocitos de Limulus; NMT = no más de; EU = Unidad de endotoxina; UFC = Unidad formadora de colonias

EJEMPLO 2: S. 4. 1 DESCRIPCIÓN Y COMPOSICIÓN DEL PRODUCTO FARMACOLÓGICO

El PF-07867246 (Construto 6 (TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A)(SEQ ID NO: 1)) el producto farmacológico es una dispersión estéril, sin conservantes, de nanopartículas líquidas (LNP) en un tampón crioprotector acuoso para administración intramuscular. El producto farmacológico está formulado con 0,06 mg/mL de ARN en tampón Tris 10 mM, 10 % de sacarosa y, opcionalmente, 20 mM de ácido glutámico, pH 7,4. El producto farmacológico se suministra en un vial de vidrio de 2 mL sellado con un tapón elastomérico de clorobutilo y un sello de aluminio con caperuza de plástico abatible (volumen nominal de 0,5 mL). La composición del producto farmacológico, incluyendo la fórmula unitaria, las cantidades por vial, la función y el estándar de calidad aplicable a cada componente, se detalla en Tabla 2.

Tabla 2

P,1-4. Composición de la sustancia farmacológica de PF-07867246 (TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A)					
Nombre del ingrediente	Estándar de calidad/calidad	Función	Fórmula de unidad (mg/mL)	Cantidad llenada (Total mg/vial) ^a	Cantidad nominal o cantidad neta (mg netos/vial)
Sustancia farmacológica PF-07867246 (TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A)	Especificación interna	Ingrediente activo	0,06	0,042	0,030

ALC-0315 ^b	Especificación interna	Lípido funcional	0,86	0,60	0,43
ALC-0159 ^c	Especificación interna	Lípido funcional	0,11	0,08	0,06
DSPC ^d	Especificación interna	Lípido estructural	0,19	0,13	0,10
Colesterol	Ph. Eur., NF	Lípido estructural	0,37	0,26	0,19
Sacarosa	Ph. Eur., NF	Crioprotector	100	70	50
Trometamina ^e (Base de Tris)	Ph. Eur., USP	Componente de tampón	0,20	0,14	0,10
Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano (Tris HCl)	Especificación interna	Componente de tampón	1,32	0,92	0,66
Ácido glutámico	FCC, Ph. Eur., JP	Componente de tampón	2,94	2,06	1,47
Agua para inyección	Ph. Eur., USP, JP	Solvente	q.s. ^f hasta 1,00 mL	q.s. ^f hasta 0,70 mL	q.s. ^f hasta 0,50 mL
a. La cantidad llenada incluye el exceso de llenado. Esto se calcula multiplicando la fórmula de la unidad (mg/mL) por el volumen de llenado real (0,7 mL). b. ALC-0315 = ((4-hidroxibutil)azanediil)bis(hexano-6,1-diil)bis(2-hexildecanoate) c. ALC-0159 = 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida d. DSPC = 1,2-Distearoilo-<i>sn</i>-glicero-3-fosfocolina e. También conocido como Trometamol f. q.s. es una abreviatura de <i>quantum satis</i> es decir, tanto como sea suficiente. Hidróxido de sodio (Ph. Eur., NF) se utiliza para el ajuste del pH del tampón					

Tabla 3

3,6. TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A (A/Wisconsin/588/2019) -- VV00050 (Constructo 6)

Secuencia de nucleótidos 5'-->3'

Longitud de la secuencia: 10936 nucleótidos; 3113 A; 2761 C; 2796 G; 2266 U

5 A = Adenina; C = Citosina; G = Guanina; U = Uridina

Elemento	Origen	Comienzo	Fin	Función esperada	SEQ ID NO:
Caperuza	<i>In vitro</i> (VCE)	1	1	Proporciona transcripciones de ARN caperuza1	
5' UTR	Virus de la encefalitis equina venezolana	2	45	5' UTR del ARN	12

Nsp1	Virus de la encefalitis equina venezolana (TC83)	46	1650	Subunidad poliproteica no estructural de la replicasa del ARN viral	13
Nsp2	Virus de la encefalitis equina venezolana (TC83)	1651	4032	Subunidad poliproteica no estructural de la replicasa del ARN viral	14
Nsp3	Virus de la encefalitis equina venezolana (TC83)	4033	5703	Subunidad poliproteica no estructural de la replicasa del ARN viral	15
Nsp4	Virus de la encefalitis equina venezolana (TC83)	5704	7527	Subunidad poliproteica no estructural de la replicasa del ARN viral	16
<u>Promotor subgenómico de VEEV</u>	Virus de la encefalitis equina venezolana	7502	7562	Impulsa la transcripción del gen de la gripe	17
HA_Wisconsin	A/Wisconsin/588/2019 H1N1	7563	9268	Media la absorción del virus a los receptores celulares y ayuda a la posterior desintegración del virus	18
<u>Promotor subgenómico de VEEV</u>	Virus de la encefalitis equina venezolana	9269	9327	Impulsa la transcripción del gen de la gripe	19
NA	neuraminidasa	9328	10740		20
3' UTR	Virus de la encefalitis equina venezolana	10741	10857	3' UTR del ARN	21
poliA (40A)	Artificial	10858	10936	Una cola de poli(A) de 40 nucleótidos de longitud diseñada para mejorar la estabilidad del ARN	22

Cap- GAUAGGCGGC GCAUGAGAGA AGCCAGACC AAUUACCUAC CCAAAUGGA
GAAAGUUCAC 60 GUUGACAUCG AGGAAGACAG CCCAUUCCUC AGAGCUUUGC

AGCGGAGCUU CCCGCAGUUU 120 GAGGUAGAAG CCAAGCAGGU CACUGAUAAU
 GACCAUGCUA AUGCCAGAGC GUUUUCGCAU 180 CUGGCUUCAA AACUGAUCGA
 AACGGAGGUG GACCCAUCCG ACACGAUCCU UGACAUUGGA 240 AGUGCGCCCCG
 CCCGCAGAAU GUAUUCUAAG CACAAGUAUC AUUGUAUCUG UCCGAUGAGA 300
 UGUGCGGAAG AUCCGGACAG AUUGUAUAAG UAUGCAACUA AGCUGAAGAA AAACUGUAAG
 360 GAAUAACUG AUAAGGAAU GGACAAGAAA AUGAAGGAGC UCGCCGCCGU
 CAUGAGCGAC 420 CCUGACCUGG AACUGAGAC UAUGUGCCUC CACGACGACG
 AGUCGUGUCG CUACGAAGGG 480 CAAGUCGCUG UUUACCAGGA UGUUAUCGCG
 GUUGACGGAC CGACAAGUCU CUAUCACCAA 540 GCCAAUAAGG GAGUUAGAGU
 CGCCUACUGG AUAGGCUUUG ACACCACCCC UUUUAUGUUU 600 AAGAACUUGG
 CUGGAGCAUA UCCAUCAUAC UCUACCAACU GGGCCGACGA AACCGUGUUA 660
 ACGGCUCGUA ACAUAGGCCU AUGCAGCUCU GACGUUAUGG AGCGGUCACG
 UAGAGGGAUG 720 UCCAUUCUUA GAAAGAAGUA UUUGAAACCA UCCAACAAUG
 UUCUAUUCUC UGUUGGCUCG 780 ACCAUCUACC ACGAGAAGAG GGACUUACUG
 AGGAGCUGGC ACCUGCCGUC UGUUUUUCAC 840 UUACGUGGCA AGCAAAUUA
 CACAUGUCGG UGUGAGACUA UAGUUAGUUG CGACGGGUAC 900 GUCGUUAAAA
 GAAUAGCUAU CAGUCCAGGC CUGUAUGGGA AGCCUUCAGG CUAUGCUGCU 960
 ACGAUGCACC GCGAGGGAUU CUUGUGCUGC AAAGUGACAG ACACAUUGAA
 CGGGGAGAGG 1020 GUCUCUUUUC CCGUGUGCAC GUAUGUGCCA GCUACAUUGU
 GUGACCAAU GACUGGCAUA 1080 CUGGCAACAG AUGUCAGUGC GGACGACGCG
 CAAAACUCG UGGUUGGGCU CAACCAGCGU 1140 AUAGUCGUCA ACGGUCGCAC
 CCAGAGAAAC ACCAAUACCA UGAAAAUUA CCUUUUGCCC 1200 GUAGUGGCCC
 AGGCAUUUGC UAGGUGGGCA AAGGAAUUA AGGAAGAUCA AGAAGAUGAA 1260
 AGGCCACUAG GACUACGAGA UAGACAGUUA GUCAUGGGGU GUUGUUGGGC
 UUUUAGAAGG 1320 CACAAGAUAA CAUCUAUUUA UAAGCGCCCG GAUACCCAAA
 CCAUCAUCAA AGUGAACAGC 1380 GAUUUCCACU CAUUCGUGCU GCCCAGGAUA
 GGCAGUACA CAUUGGAGAU CGGGCUGAGA 1440 ACAAGAAUCA GAAAAUGUU
 AGAGGAGCAC AAGGAGCCGU CACCUCUCAU UACCGCCGAG 1500 GACGUACAAG
 AAGCUAAGUG CGCAGCCGAU GAGGCUAAGG AGGUGCGUGA AGCCGAGGAG 1560
 UUGCGCGCAG CUCUACCACC UUUGGCAGCU GAUGUUGAGG AGCCACUCU
 GGAAGCCGAU 1620 GUCGACUUGA UGUUACAAGA GGCUGGGGCC GGCUCAGUGG
 AGACACCUCG UGGCUUGAUA 1680 AAGGUUACCA GCUACGAUGG CGAGGACAAG
 AUCGGCUCUU ACGCUGUGCU UUCUCCGAG 1740 GCUGUACUCA AGAGUGAAAA
 AUUAUCUUGC AUCCACCCUC UCGCUGAACA AGUCAUAGUG 1800 AUAACACACU
 CUGGCCGAAA AGGGCGUUAU GCCGUGGAAC CAUACCAUGG UAAAGUAGUG 1860
 GUGCCAGAGG GACAUGCAAU ACCCGUCCAG GACUUUCAAG CUCUGAGUGA
 AAGUGCCACC 1920 AUUGUGUACA ACGAACGUGA GUUCGUAAAC AGGUACCGUC
 ACCAUUUUGC CACACAUGGA 1980 GGAGCGCUGA ACACUGAUGA AGAAUUAUAC

AAAACUGUCA AGCCCAGCGA GCACGACGGC 2040 GAAUACCUGU ACGACAUCGA
 CAGGAAACAG UGCGUCAAGA AAGAACUAGU CACUGGGCUA 2100 GGGCUCACAG
 GCGAGCUGGU GGAUCCUCCC UUCAUGAAU UCGCCUACGA GAGUCUGAGA 2160
 ACACGACCAG CCGCUCCUUA CCAAGUACCA ACCAUAGGGG UGUUUGGCGU
 GCCAGGAUCA 2220 GGCAAGUCUG GCAUCAUUA AAGCGCAGUC ACCAAAAAAG
 AUCUAGUGGU GAGCGCCAAG 2280 AAAGAAAACU GUGCAGAAU UAUUAGGGAC
 GUCAAGAAAA UGAAAGGGCU GGACGUCAAU 2340 GCCAGAACUG UGGACUCAGU
 GCUCUUGAAU GGAUGCAAAC ACCCCGUAGA GACCCUGUAU 2400 AUUGACGAAG
 CUUUUGCUUG UCAUGCAGGU ACUCUCAGAG CGCUCAUAGC CAUUUAUAGA 2460
 CCUAAAAAGG CAGUGCUCUG CGGGGAUCCC AAACAGUGCG GUUUUUUUUA
 CAUGAUGUGC 2520 CUGAAAGUGC AUUUUAACCA CGAGAUUUGC ACACAAGUCU
 UCCACAAAAG CAUCUCUCGC 2580 CGUUGCACUA AAUCUGUGAC UUCGGUCGUC
 UCAACCUUGU UUUACGACAA AAAAUUGAGA 2640 ACGACGAAUC CGAAAGAGAC
 UAAGAUUGUG AUUGACACUA CCGGCAGUAC CAAACCUAAG 2700 CAGGACGAUC
 UCAUUCUCAC UUGUUUCAGA GGGUGGGUGA AGCAGUUGCA AAUAGAUUAC 2760
 AAAGGCAACG AAUAAUGAC GGCAGCUGCC UCUCAGGGC UGACCCGUAA
 AGGUGUGUAU 2820 GCCGUUCGGU ACAAGGUGAA UGAAAAUCCU CUGUACGCAC
 CCACCUCAGA ACAUGUGAAC 2880 GUCCUACUGA CCCGCACGGA GGACCGCAUC
 GUGUGGAAAA CACUAGCCGG CGACCCAUGG 2940 AUAAAAACAC UGACUGCCAA
 GUACCCUGGG AAUUUCACUG CCACGAUAGA GGAGUGGCAA 3000 GCAGAGCAUG
 AUGCCAUCAU GAGGCACAUC UUGGAGAGAC CGGACCCUAC CGACGUCUUC 3060
 CAGAAUAAGG CAAACGUGUG UUGGGCCAAG GCUUUAGUGC CGGUGCUGAA
 GACCGCUGGC 3120 AUAGACAUGA CCACUGAACA AUGGAACACU GUGGAUUUUU
 UUGAAACGGA CAAAGCUCAC 3180 UCAGCAGAGA UAGUAUUGAA CCAACUAUGC
 GUGAGGUUCU UUGGACUCGA UCUGGACUCC 3240 GGUCUAUUUU CUGCACCCAC
 UGUUCCGUUA UCAUUAGGA AUAAUCACUG GGAUAACUCC 3300 CCGUCGCCUA
 ACAUGUACGG GCUGAAUAAA GAAGUGGUCC GUCAGCUCUC UCGCAGGUAC 3360
 CCACAACUGC CUCGGGCAGU UGCCACUGGA AGAGUCUAUG ACAUGAACAC
 UGGUACACUG 3420 CGCAUUUAUG AUCCGCGCAU AAACCUAGUA CCUGUAAACA
 GAAGACUGCC UCAUGCUIUA 3480 GUCCUCCACC AUAAUGAACA CCCACAGAGU
 GACUUUUCUU CAUUCGUCAG CAAAUUGAAG 3540 GGCAGAACUG UCCUGGUGGU
 CGGGGAAAAG UUGUCCGUCC CAGGCAAAAU GGUUGACUGG 3600 UUGUCAGACC
 GGCCUGAGGC UACCUUCAGA GCUCGGCUGG AUUUAGGCAU CCCAGGUGAU 3660
 GUGCCCAAU AUGACAUAU AUUUGUUAU GUGAGGACCC CAUAUAAUA CCAUCACUAU
 3720 CAGCAGUGUG AAGACCAUGC CAUUAAGCUU AGCAUGUUGA CCAAGAAAGC
 UUGUCUGCAU 3780 CUGAAUCCCG GCGGAACCUG UGUCAGCAUA GGUUAUGGUU
 ACGCUGACAG GGCCAGCGAA 3840 AGCAUCAUUG GUGCUAUAGC GCGGCAGUUC
 AAGUUUUCUCC GGGUAUGCAA ACCGAAAUCC 3900 UCACUUGAAG AGACGGAAGU

UCUGUUUGUA UUCAUUGGGU ACGAUCGCAA GGCCCGUACG 3960 CACAAUCCUU
 ACAAGCUUUC AUCAACCUUG ACCAACAUUU AUACAGGUUC CAGACUCCAC 4020
 GAAGCCGGAU GUGCACCCUC AUAUCAUGUG GUGCGAGGGG AUAUUGCCAC
 GGCCACCGAA 4080 GGAGUGAUUA UAAUUGCUGC UAACAGCAA GGACAACCUG
 GCGGAGGGGU GUGCGGAGCG 4140 CUGUAUAAGA AAUUCCCGGA AAGCUUCGAU
 UUACAGCCGA UCGAAGUAGG AAAAGCGCGA 4200 CUGGUCAAAG GUGCAGCUAA
 ACAUAUCAUU CAUGCCGUAG GACCAAACUU CAACAAAGUU 4260 UCGGAGGUUG
 AAGGUGACAA ACAGUUGGCA GAGGCUUAUG AGUCCAUCGC UAAGAUUGUC 4320
 AACGAUAACA AUUACAAGUC AGUAGCGAUU CCACUGUUGU CCACCGGCAU
 CUUUUCCGGG 4380 AACAAAGAUC GACUAACCCA AUCAUUGAAC CAUUUGCUGA
 CAGCUUUAGA CACCACUGAU 4440 GCAGAUGUAG CCAUAUACUG CAGGGACAAG
 AAAUGGGAAA UGACUCUCAA GGAAGCAGUG 4500 GCUAGGAGAG AAGCAGUGGA
 GGAGAUUAGC AUAUCCGACG ACUCUUCAGU GACAGAACCU 4560 GAUGCAGAGC
 UGGUGAGGGU GCAUCCGAAG AGUUCUUUGG CUGGAAGGAA GGGCUACAGC 4620
 ACAAGCGAUG GCAAAACUUU CUCAUAUUUG GAAGGGACCA AGUUUCACCA
 GGCGGCCAAG 4680 GAUAUAGCAG AAUUAUUGC CAUGUGGCCC GUUGCAACGG
 AGGCCAAUGA GCAGGUAUGC 4740 AUGUAUAUCC UCGGAGAAAG CAUGAGCAGU
 AUUAGGUCGA AAUGCCCCGU CGAAGAGUCG 4800 GAAGCCUCCA CACCACCUAG
 CACGCUGCCU UGCUUGUGCA UCCAUGCCAU GACUCCAGAA 4860 AGAGUACAGC
 GCCUAAAAGC CUCACGUCCA GAACAAAUUA CUGUGUGCUC AUCCUUUCCA 4920
 UUGCCGAAGU AUAGAAUCAC UGGUGUGCAG AAGAUCCAAU GCUCCCAGCC
 UAUUUUGUUC 4980 UCACCGAAAG UGCCUGCGUA UAUUCAUCCA AGGAAGUAUC
 UCGUGGAAAC ACCACCGGUA 5040 GACGAGACUC CGGAGCCAUC GGCAGAGAAC
 CAUCCACAG AGGGGACACC UGAACAACCA 5100 CCACUUAUAA CCGAGGAUGA
 GACCAGGACU AGAACGCCUG AGCCGAUCAU CAUCGAAGAG 5160 GAAGAAGAGG
 AUAGCAUAAG UUUGCUGUCA GAUGGCCCGA CCCACCAGGU GCUGCAAGUC 5220
 GAGGCAGACA UUCACGGGCC GCCCUCUGUA UCUAGCUCAU CCUGGUCCAU
 UCCUCAUGCA 5280 UCCGACUUUG AUGUGGACAG UUUAUCCAUA CUUGACACCC
 UGGAGGGAGC UAGCGUGACC 5340 AGCGGGGCAA CGUCAGCCGA GACUAACUCU
 UACUUCGCAA AGAGUAUGGA GUUUCUGGCG 5400 CGACCGGUGC CUGCGCCUCG
 AACAGUAUUC AGGAACCCUC CACAUCCCGC UCCGCGCACA 5460 AGAACACCGU
 CACUUGCACC CAGCAGGGCC UGCUCGAGAA CCAGCCUAGU UUCCACCCCG 5520
 CCAGGCGUGA AUAGGGUGAU CACUAGAGAG GAGCUCGAGG CGCUUACCCC
 GUCACGCACU 5580 CCUAGCAGGU CGGUCUCGAG AACCAGCCUG GUCUCCAACC
 CGCCAGGCGU AAUAGGGUG 5640 AUUACAAGAG AGGAGUUUGA GCGGUUCGUA
 GCACAACAAC AAUGACGGUU UGAUGCGGGU 5700 GCAUACAUCU UUUCCUCCGA
 CACCGGUCAA GGGCAUUUAC AACAAAAUC AGUAAGGCAA 5760 ACGGUGCUAU
 CCGAAGUGGU GUUGGAGAGG ACCGAAUUGG AGAUUUCGUA UGCCCCGCGC 5820

CUCGACCAAG AAAAGAAGA AUUACUACGC AAGAAAUUAC AGUAAAUCC CACACCUGCU
 5880 AACAGAAGCA GAUACCAGUC CAGGAAGGUG GAGAACAUGA AAGCCAUAAC
 AGCUAGACGU 5940 AUUCUGCAAG GCCUAGGGCA UUAUUUGAAG GCAGAAGGAA
 AAGUGGAGUG CUACCGAACC 6000 CUGCAUCCUG UUCCUUUGUA UUCAUCUAGU
 GUGAACCGUG CCUUUUCAAG CCCCAAGGUC 6060 GCAGUGGAAG CCUGUAACGC
 CAUGUUGAAA GAGAACUUUC CGACUGUGGC UUCUUACUGU 6120 AUUAUCCAG
 AGUACGAUGC CUAUUUGGAC AUGGUUGACG GAGCUUCAUG CUGCUUAGAC 6180
 ACUGCCAGUU UUGCCCGC AAAGCUGCGC AGCUUCCAA AGAAACACUC
 CUAUUUGGAA 6240 CCCACAAUAC GAUCGGCAGU GCCUUCAGCG AUCCAGAACA
 CGCUCCAGAA CGUCCUGGCA 6300 GCUGCCACAA AAAGAAAUUG CAAUGUCACG
 CAAUGAGAG AAUUGCCCGU AUUGGAUUCG 6360 GCGGCCUUUA AUGUGGAAUG
 CUUCAAGAAA UAUGCGUGUA AUAUGAAUA UUGGAAACG 6420 UUUAAAGAAA
 ACCCAUCAG GCUUACUGAA GAAACGUGG UAAAUUACAU UACCAAUUA 6480
 AAAGGACCAA AAGCUGCUGC UCUUUUUGCG AAGACACUA AUUUGAAUAU GUUGCAGGAC
 6540 AUACCAUUG ACAGGUUUGU AAUGGACUUA AAGAGAGACG UGAAAGUGAC
 UCCAGGAACA 6600 AAACAUACUG AAGAACGGCC CAAGGUACAG GUGAUCCAGG
 CUGCCGAUCC GCUAGCAACA 6660 GCGUAUCUGU GCGGAAUCCA CCGAGAGCUG
 GUUAGGAGAU UAAUGCGGU CCUGCUUCCG 6720 ACAUUCAUA CACUGUUUGA
 UAUGUCGGCU GAAGACUUUG ACGCUAUUAU AGCCGAGCAC 6780 UUCCAGCCUG
 GGAUUGUGU UCUGGAAACU GACAUCGCGU CGUUUGAUAA AAGUGAGGAC 6840
 GACGCCAUGG CUCUGACCGC GUUAAUGAUU CUGGAAGACU UAGGUGUGGA
 CGCAGAGCUG 6900 UUGACGCUGA UUGAGGCGGC UUUCGGCGAA AUUUCAUCA
 UACAUUUGCC CACUAAAACU 6960 AAUUAUAAU UCGGAGCCAU GAUGAAAUCU
 GGAAUGUUC UCACACUGUU UGUGAACACA 7020 GUCAUUAACA UUGUAAUCGC
 AAGCAGAGUG UUGAGAGAAC GGCUAACCGG AUCACCAUGU 7080 GCAGCAUUA
 UUGGAGAUGA CAUAUCGUG AAAGGAGUCA AAUCGGACAA AUUAAUGGCA 7140
 GACAGGUGCG CCACCUGGUU GAAUAUGGAA GUCAAGAUUA UAGAUGCUGU
 GGUGGGCGAG 7200 AAAGCGCCU AUUUCUGUGG AGGGUUUAU UUGUGUGACU
 CCGUGACCGG CACAGCGUGC 7260 CGUGUGGCAG ACCCCUAAA AAGGCUGUUU
 AAGCUUGGCA AACCUCUGGC AGCAGACGAU 7320 GAACAUGAUG AUGACAGGAG
 AAGGGCAUUG CAUGAAGAGU CAACACGCUG GAACCGAGUG 7380 GGUUUUUU
 CAGAGCUGUG CAAGGCAGUA GAAUCAAGGU AUGAAACCGU AGGAACUCC 7440
 AUCAUAGUUA UGGCCAUGAC UACUCUAGCU AGCAGUGUUA AAUCAUUCAG CUACCUGAGA
 7500 GGGGCCCCUA UAACUCUCUA CGGCUAACCU GAAUGGACUA CGACAUAGUC
 UAGUCCGCCA 7560 AGAUGAAGGC CAUCCUGGUG GUCAUGCUGU ACACCUUCAC
 CACCGCCAAC GCCGACACAC 7620 UGUGUAUCGG CUACCACGCC AACAACAGCA
 CCGACACCGU GGAUACCGUG CUGGAAAAGA 7680 ACGUGACCGU GACACACAGC
 GUGAACCGC UGGAAGAUAA GCACAACGGC AAGCUGUGCA 7740 AGCUGAGAGG

CGUGGCACCU CUGCACCUGG GCAAGUGUAA UAUCGCCGGC UGGAUCCUGG 7800
 GCAACCCUGA GUGUGAAAGC CUGAGCACCG CCAGAUCCUG GUCCUACAUC
 GUGGAAACCA 7860 GCAACAGCGA CAACGGCACA UGCUACCCCG GCGACUUCAU
 CAACUACGAG GAACUGCGGG 7920 AACAGCUGAG CAGCGUGUCC AGCUUCGAGA
 GAUUCGAGAU CUUCCCCAAG ACCAGCAGCU 7980 GGCCCAACCA CGACUCUGAC
 AAUGGCGUGA CAGCCGCCUG UCCUCAUGCC GGCGCUAAGA 8040 GCUUCUACAA
 GAACCUGAUC UGGCUGGUCA AGAAGGGCAA GAGCUACCCC AAGAUCAACC 8100
 AGACCUACAU CAACGACAAG GGCAAAGAGG UGCUGGUCCU CUGGGGCAUC
 CACCAUCCUC 8160 CAACAAUCGC CGAUCAGCAG AGCCUGUACC AGAACGCCGA
 UGCCUAUGUG UUCGUGGGCA 8220 CCAGCCGGUA CAGCAAGAAG UUCAAGCCCG
 AGAUCGCCAC CAGGCCUAAA GUGCGGGAUC 8280 AAGAGGGCAG AAUGAACUAC
 UACUGGACCC UGGUGGAACC CGGCGACAAG AUCACAUUUG 8340 AGGCCACCGG
 CAAUCUGGUG GCCCCUAGAU ACGCCUUCAC CAUGGAAAGA GAUGCCGGCA 8400
 GCGGCAUCAU CAUCAGCGAU ACCCCUGUGC ACGACUGCAA CACCACCUGU
 CAGACACCUG 8460 AGGGCGCCAU CAAUACCAGC CUGCCUUUCC AGAACGUGCA
 CCCAUCACC AUCGGCAAGU 8520 GCCCAAUA CGUGAAGUCC ACCAAGCUGA
 GGCUGGCCAC AGGCCUGAGA AAUGUGCCCU 8580 CCAUCCAGAG CAGAGGCCUG
 UUUGGAGCCA UUGCCGGCUU UAUCGAAGGC GGCUGGACAG 8640 GCAUGGUGGA
 CGGAUGGUAC GGAUACCACC ACCAGAACGA GCAAGGCUCU GGCUAUGCCG 8700
 CCGACCUGAA GUCUACCCAG AAUGCCAUCG AUAAGAUCAC CAACAAAGUG AACAGCGUGA
 8760 UCGAGAAGAU GAACACCCAG UUCACCGCCG UGGGAAAAGA GUUCAACCAC
 CUGGAAAAGC 8820 GCAUCGAGAA CCUGAACAAAG AAGGUGGACG ACGGCUUCCU
 GGACAUCUGG ACCUACAAUG 8880 CCGAACUGCU GGUGCUGCUG GAGAACGAGA
 GAACCCUGGA CUACCACGAC AGCAACGUGA 8940 AGAACCGUA CGAGAAAGUG
 CGCAACCAGC UGAAGAACAA CGCCAAAGAG AUCGGCAACG 9000 GCUGCUUCGA
 GUUCUACCAC AAGUGCGACA AUACCUGCAU GGAAAGCGUG AAGAAUGGCA 9060
 CCUACGACUA CCCUAAGUAC AGCGAGGAAG CCAAGCUGAA CCGCGAGAAG
 AUCGACGGCG 9120 UGAAGCUGGA UAGCACCCCG AUCUACCAGA UUCUGGCCAU
 CUACAGCACC GUGGCCUCUA 9180 GCCUGGUGCU GGUGGUUUUCU CUGGGCGCUA
 UCAGCUUCUG GAUGUGCAGC AAUGGCAGCC 9240 UGCAGUGCCG GAUCUGCAUC
 UGAUGAGGGC CCCUAUAACU CUCUACGGCU AACCUGAAUG 9300 GACUACGACA
 UAGUCUAGUC CGCCAAGAUG AACCCCAACC AGAAGAUCAU CACCAUCGGC 9360
 AGCAUCUGCA UGACAAUCGG CACCGCCAAC CUGAUCCUGC AGAUCGGCAA
 CAUCAUCAGC 9420 AUCUGGGUGU CCCACAGCAU CCAGAUCGGA AACCAGAGCC
 AGAUCGAGAC AUGCAACAAG 9480 AGCGUGAUCA CCUACGAGAA CAACACCUGG
 GUCAACCAGA CCUUCGUGAA CAUCAGCAAC 9540 ACCAACAGCG CCGCCAGACA
 GUCUGUGGCC UCUGUGAAAC UGGCCGGCAA CAGCUCUCUG 9600 UGUCCUGUGU
 CUGGCUGGGC CAUCUACAGC AAGGACAACU CUGUGCGGAU CGGCUCCAAG 9660

GGCGACGUGU UCGUGAUCAG AGAGCCCUUC AUCAGCUGCA GCCCUCUGGA
 AUGCCGGACA 9720 UUCUUUCUGA CCCAAGGCGC CCUGCUGAAC GACAAGCACA
 GCAACGGCAC CAUCAAGGAC 9780 AGAAGCCCCU ACAGAACCCU GAUGAGCUGC
 CCUAUCGGCG AGGUGCCCUC UCCAUACAAC 9840 AGCAGAUUCG AGUCCGUGGC
 UUGGAGCGCC UCUGCCUGUC ACGAUGGCAC CAACUGGCUG 9900 ACCAUCGGAA
 UCAGCGGACC UGAUUCUGGC GCUGUGGCCG UGCUGAAGUA CAAUGGCAUC 9960
 AUCACCGAUA CCAUCAAGAG CUGGCGGAAC AAGAUCCUGC GGACCCAAGA
 GUCCGAGUGC 10020 GCCUGUGUGA AUGGCAGCUG CUUCACCAUC AUGACAGACG
 GCCCAUCUGA UGGCCAGGCC 10080 AGCUACAAGA UCUUCCGGAU CGAGAAGGGC
 AAGAUCAUUA AGAGCGUGGA AAUGAAGGCC 10140 CCGAACUACC ACUACGAGGA
 AUGCAGCUGU UACCCCGACA GCAGCGAGAU CACCUGUGUG 10200 UGCAGAGACA
 ACUGGCACGG CAGCAACAGA CCUUGGGUGU CCUUCAACCA GAACCUGGAA 10260
 UACCAGAUGG GCUACAUCUG CAGCGGCGUG UUCGGCGACA ACCCCAGACC
 UAAUGAUAAG 10320 ACCGGCAGCU GCGGCCUGU GUCUAGCAAU GGUGCCAAUG
 GCGUGAAGGG CUUCAGCUUU 10380 AAGUACGGCA ACGGCGUGUG GAUCGGCCGG
 ACAAAGAGCA UCAGCAGCAG AAAGGGCUUC 10440 GAGAUGAUCU GGGACCCCAA
 UGGCUGGACC GGCACCGACA ACAAGUUCAG CAAGAAACAG 10500 GACAUCGUGG
 GCAUCAACGA GUGGAGCGGC UACAGCGGCU CUUUCGUGCA GCACCCUGAA 10560
 CUGACCGGCC UGAACUGCAU CAGACCCUGC UUUUGGGUCG AGCUGAUCCG
 GGGCAGACCC 10620 GAGGAAAACA CCAUCUGGAC AAGCGGCAGC AGCAUCAGCU
 UUUGCGGCGU GGACUCUGAC 10680 AUCGUCGGCU GGUCUUGGCC UGAUGGCGCC
 GAGCUGCCUU UCACCAUCGA CAAGUGAUGA 10740 AUACAGCAGC AAUUGGCAAG
 CUGCUUACAU AGAACUCGCG GCGAUUGGCA UGCCGCCUUA 10800 AAUUUUUUAU
 UUUUUUUUUC UUUUCUUUUC CGAAUCGGAU UUUGUUUUUA AUUUUUUCAA 10860
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
 10920 AAAAAAAAAA AAAAAA (SEQ ID NO: 1) 10936

EJEMPLO 3: S.4. 1. DESCRIPCIÓN Y COMPOSICIÓN DEL PRODUCTO FARMACOLÓGICO

El producto farmacológico PF-07871987 (Constructo 7 TC83-HA-40A 50U-50pU (SEQ ID NO: 2)) es una dispersión estéril, libre de conservantes, de nanopartículas líquidas (LNP) en un
 5 tampón crioprotector acuoso para administración intramuscular. El producto farmacológico está formulado con 0,06 mg/mL de ARN en tampón Tris 10 mM, 10 % de sacarosa y, opcionalmente, 20 mM de ácido glutámico, pH 7,4.

El producto farmacológico se suministra en un vial de vidrio de 2 mL sellado con un tapón elastomérico de clorobutilo y un sello de aluminio con caperuza de plástico abatible (volumen

nominal de 0,5 mL).

La composición del producto farmacológico, incluyendo la fórmula unitaria, las cantidades por vial, la función y el estándar de calidad aplicable a cada componente, se detalla en Tabla 4.

5 **Tabla 4:**

P,1-5. Composición del producto farmacológico PF-07871987 (TC83-HA-40A 50U-50pU)					
Nombre del ingrediente	Estándar de calidad/calidad	Función	Fórmula de unidad (mg/mL)	Cantidad llenada (Total mg/vial)^a	Formulación unitaria (mg/vial)
PF-07871987 sustancia farmacológica (TC83-HA-40A 50U-50pU)	Especificación interna	Ingrediente activo	0,06	0,042	0,030
ALC-0315 ^b	Especificación interna	Lípido funcional	0,86	0,60	0,43
ALC-0159 ^c	Especificación interna	Lípido funcional	0,11	0,08	0,06
DSPC ^d	Especificación interna	Lípido estructural	0,19	0,13	0,10
Colesterol	Ph. Eur., NF	Lípido estructural	0,37	0,26	0,19
Sacarosa	Ph. Eur., NF	Crioprotector	100	70	50
Trometamina ^e (Base de Tris)	Ph. Eur., USP	Componente de tampón	0,20	0,14	0,10
Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano (Tris HCl)	Especificación interna	Componente de tampón	1,32	0,92	0,66
Ácido glutámico	FCC, Ph. Eur., JP	Componente de tampón	2,94	2,06	1,47
Agua para inyección	Ph. Eur., USP, JP	Solvente	q.s. ^f hasta 1,00 mL	q.s. ^f hasta 0,70 mL	q.s. ^f hasta 0,50 mL
<i>g. La cantidad llenada incluye el exceso de llenado. Esto se calcula multiplicando la fórmula de la unidad (mg/mL) por el volumen de llenado real (0,7 mL).</i> <i>h. ALC-0315 = ((4-hidroxibutil)azanediil)bis(hexano-6,1-diil)bis(2-hexildecanoate)</i> <i>i. ALC-0159 = 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida</i> <i>j. DSPC = 1,2-Distearoilo-sn-glicero-3-fosfolina</i> <i>k. También conocido como Trometamol</i> <i>l. q.s. es una abreviatura de <i>quantum satis</i> es decir, tanto como sea suficiente.</i> Hidróxido de sodio (Ph. Eur., NF) se utiliza para el ajuste del pH del tampón					

Tabla 5

S,4,4,6-4. Resultados del lote de la sustancia farmacológica de la vacuna de la influenza de ARNsa TC83-HA-40A 50 U-50 pU

Atributo de calidad	Procedimiento analítico	Criterios de aceptación	Toxicología no clínica (Lote 00710958-0369)	Sustancia farmacológica clínica (Lote 22V543F101)
Apariencia (Claridad)	Claridad	≤ 6 NTU	Claro	0 NTU
Apariencia (coloración)	Coloración	No más intensamente coloreado que el nivel 7 del estándar de color marrón (B).	Solución incolora	≤ B9
pH	Potenciometría	7,0 ± 0,5	7,1	6,9
Contenido (concentración de ARN)	espectroscopia UV	1,25 ± 0,25 mg/mL	2,00 mg/mL	1,27 mg/mL
ddPCR	Identidad de la secuencia de ARN codificada	Identidad confirmada	Positivo ^a	Confirmado
Presencia de pseudoU	RP-HPLC	Identidad confirmada	Confirmado ^b	Confirmado
Integridad del ARN	Electroforesis capilar en gel	≥ 60 %	88 %	87 %
Plantilla de ADN residual	qPCR	≤ 990 ng de ADN/mg de ARN	37 ng/mg	NMT 1 ng/mg
Endotoxina	Endotoxina (LAL)	≤ 12,5 EU/mL	<0,025 EU/mg	NMT 0,2 EU/mL
Carga biológica	Carga biológica	≤ 1 UFC/10 mL	≤ 10 UFC/mL	0 UFC/10 mL

a. La identidad se determinó mediante transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

b. La toxicología no clínica informó un porcentaje aproximado de pseudoU. Su presencia puede inferirse como “confirmada” a partir del resultado informado de su presencia.

Las especificaciones solo se aplican a suministros clínicos.

Abreviaturas: NTU = unidades de turbidez nefelométricas; NT = no probado; TBP = se proporcionará en la enmienda IND; ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa en gotas

digitales; qPCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; LAL = lisado de amebocitos de *Limulus*; NMT = no más de; EU = Unidad de endotoxina; UFC = Unidad formadora de colonias

Tabla 6 Secuencia 3,1. TC83-HA-40-50U-50pU (A/Wisconsin/588/2019) pKT177 con 50 % U + 50 % pseudo

Construto 7; Secuencia de nucleótidos 5' --> 3'; Longitud de la secuencia: 9433 nucleótidos; 2703 A; 2327 C; 2396 G; 2007 U; A = Adenina; C = Citosina; G = Guanina; (*)U = Uridina o N1-Metilpseudouridina; (*) El ARN derivado de este construto está compuesto por 50 % de Uridina y 50 % de N1-Metilpseudouridina.

Elemento	Origen	Comienzo	Fin	Función esperada	SEQ ID NO:
Caperuza	<i>In vitro</i> (VCE)	1	1	Proporciona transcripciones de ARN caperuza1	
5' UTR	Virus de la encefalitis equina venezolana	2	45	5' UTR del ARN	23
Nsp1	Virus de la encefalitis equina venezolana (TC83)	46	1650	Subunidad poliproteica no estructural de la replicasa del ARN viral	24
Nsp2	Virus de la encefalitis equina venezolana (TC83)	1651	4032	Subunidad poliproteica no estructural de la replicasa del ARN viral	25
Nsp3	Virus de la encefalitis equina venezolana (TC83)	4033	5703	Subunidad poliproteica no estructural de la replicasa del ARN viral	26
Nsp4	Virus de la encefalitis equina venezolana (TC83)	5704	7527	Subunidad poliproteica no estructural de la replicasa del ARN viral	27
Promotor subgenómico de VEEV	Virus de la encefalitis equina venezolana	7502	7562	Impulsa la transcripción del gen de la gripe	28
Secuencia de Kozak	Origen eucariota	7563	7572	Sitio de iniciación de la traducción de proteínas	29
HA_Wisconsin	A/Wisconsin/588/2019 H1N1	7573	9276	Media la absorción del virus a los	30

Elemento	Origen	Comienzo	Fin	Función esperada	SEQ ID NO:
				receptores celulares y ayuda a la posterior desintegración del virus.	
3' UTR	Virus de la encefalitis equina venezolana	9277	9393	3' UTR del ARN	31
poliA (40A)	Artificial	9394	9433	Una cola de poli(A) de 40 nucleótidos de longitud diseñada para mejorar la estabilidad del ARN	32

Cap- GAUAGGCGGC GCAUGAGAGA AGCCCAGACC AAUUACCUAC CAAAAUUGGA
 GAAAGUUCAC 60 GUUGACAUCG AGGAAGACAG CCCAUUCCUC AGAGCUUUGC
 AGCGGAGCUU CCCGCAGUUU 120 GAGGUAGAAG CCAAGCAGGU CACUGAUAAU
 GACCAUGCUA AUGCCAGAGC GUUUUCGCAU 180 CUGGCUUCAA AACUGAUCGA
 5 AACGGAGGUG GACCCAUCCG ACACGAUCCU UGACAUUGGA 240 AGUGCGCCCG
 CCCGCAGAAU GUAUUCUAAG CACAAGUAUC AUUGUAUCUG UCCGAUGAGA 300
 UGUGCGGAAG AUCCGGACAG AUUGUAUAAG UAUGCAACUA AGCUGAAGAA AACUGUAAG
 360 GAAUAACUG AUAAGGAAUU GGACAAGAAA AUGAAGGAGC UCGCCGCCGU
 CAUGAGCGAC 420 CCUGACCUGG AACUGAGAC UAUGUGCCUC CACGACGACG
 10 AGUCGUGUCG CUACGAAGGG 480 CAAGUCGCUG UUUACCAGGA UGUUAUCGCG
 GUUGACGGAC CGACAAGUCU CUAUCACCAA 540 GCCAAUAAGG GAGUUAGAGU
 CGCCUACUGG AUAGGCUUUG ACACCACCCC UUUUAUGUUU 600 AAGAACUUGG
 CUGGAGCAUA UCCAUCAUAC UCUACCAACU GGGCCGACGA AACCGUGUUA 660
 ACGGCUCGUA ACAUAGGCCU AUGCAGCUCU GACGUUAUGG AGCGGUCACG UAGAGGGAUG
 15 720 UCCAUUCUUA GAAAGAAGUA UUUGAAACCA UCCAACAAG UUCUAUUCUC
 UGUUGGCUCG 780 ACCAUCUACC ACGAGAAGAG GGACUUACUG AGGAGCUGGC
 ACCUGCCGUC UGUUUUUCAC 840 UUACGUGGCA AGCAAAAUUA CACAUGUCGG
 UGUGAGACUA UAGUUAGUUG CGACGGGUAC 900 GUCGUUAAAA GAAUAGCUAU
 CAGUCCAGGC CUGUAUGGGA AGCCUUCAGG CUAUGCUGCU 960 ACGAUGCACC
 20 GCGAGGGAUU CUUGUGCUGC AAAGUGACAG ACACAUUGAA CGGGGAGAGG 1020
 GUCUCUUUUC CCGUGUGCAC GUAUGUGCCA GCUACAUUGU GUGACCAAAU GACUGGCAUA
 1080 CUGGCAACAG AUGUCAGUGC GGACGACGCG CAAAACUGC UGGUUGGGCU
 CAACCAGCGU 1140 AUAGUCGUCA ACGGUCGCAC CCAGAGAAAC ACCAAUACCA
 UGAAAAAUUA CCUUUUGCCC 1200 GUAGUGGCC AGGCAUUUGC UAGGUGGGCA
 25 AAGGAAUAUA AGGAAGAUCA AGAAGAUGAA 1260 AGGCCACUAG GACUACGAGA
 UAGACAGUUA GUCAUGGGGU GUUGUUGGC UUUUAGAAGG 1320 CACAAGAUAA
 CAUCUAUUUA UAAGCGCCCG GAUACCCAAA CCAUCAUCAA AGUGAACAGC 1380
 GAUUUCCACU CAUUCGUGCU GCCCAGGAUA GGCAGUAACA CAUUGGAGAU CGGGCUGAGA

1440 ACAAGAAUCA GGAAAAUGUU AGAGGAGCAC AAGGAGCCGU CACCUCUCAU
UACCGCCGAG 1500 GACGUACAAG AAGCUAAGUG CGCAGCCGAU GAGGCUAAGG
AGGUGCGUGA AGCCGAGGAG 1560 UUGCGCGCAG CUCUACCACC UUUGGCAGCU
GAUGUUGAGG AGCCCACUCU GGAAGCCGAU 1620 GUCGACUUGA UGUUACAAGA
5 GGCUGGGGCC GGCUCAGUGG AGACACCUCG UGGCUUGAUA 1680 AAGGUUACCA
GCUACGAUGG CGAGGACAAG AUCGGCUCUU ACGCUGUGCU UUCUCCGCAG 1740
GCUGUACUCA AGAGUGAAAA AUUAUCUUGC AUCCACCCUC UCGCUGAACA AGUCAUAGUG
1800 AUAACACACU CUGGCCGAAA AGGGCGUUUAU GCCGUGGAAC CAUACCAUGG
UAAAGUAGUG 1860 GUGCCAGAGG GACAUGCAAU ACCCGUCCAG GACUUUCAAG
10 CUCUGAGUGA AAGUGCCACC 1920 AUUGUGUACA ACGAACGUGA GUUCGUAAAC
AGGUACCUGC ACCAUUUUGC CACACAUGGA 1980 GGAGCGCUGA ACACUGAUGA
AGAAUUAUAC AAAACUGUCA AGCCCAGCGA GCACGACGGC 2040 GAAUACCUGU
ACGACAUCGA CAGGAAACAG UGCGUCAAGA AAGAACUAGU CACUGGGCUA 2100
GGGCUCACAG GCGAGCUGGU GGAUCCUCCC UUCAUGAAU UCGCCUACGA GAGUCUGAGA
15 2160 ACACGACCAG CCGCUCCUUA CCAAGUACCA ACCAUAGGGG UGUUUGGCGU
GCCAGGAUCA 2220 GGCAAGUCUG GCAUCAUUAA AAGCGCAGUC ACCAAAAAAG
AUCUAGUGGU GAGCGCCAAG 2280 AAAGAAAACU GUGCAGAAAU UAUAAGGGAC
GUCAAGAAAA UGAAAGGGCU GGACGUCAAU 2340 GCCAGAACUG UGGACUCAGU
GCUCUUGAAU GGAUGCAAAC ACCCCGUAGA GACCCUGUAU 2400 AUUGACGAAG
20 CUUUUGCUUG UCAUGCAGGU ACUCUCAGAG CGCUCAUAGC CAUUAUAAGA 2460
CCUAAAAAGG CAGUGCUCUG CGGGGAUCCC AAACAGUGCG GUUUUUUUUA CAUGAUGUGC
2520 CUGAAAGUGC AUUUUAACCA CGAGAUUUGC ACACAAGUCU UCCACAAAAG
CAUCUCUCGC 2580 CGUUGCACUA AAUCUGUGAC UUCGGUCGUC UCAACCUUGU
UUUACGACAA AAAAUUGAGA 2640 ACGACGAAUC CGAAAGAGAC UAAGAUUGUG
25 AUUGACACUA CCGGCAGUAC CAAACCUAAG 2700 CAGGACGAUC UCAUUCUCAC
UUGUUUCAGA GGGUGGGUGA AGCAGUUGCA AAUAGAUUAC 2760 AAAGGCAACG
AAUUAUGAC GGCAGCUGCC UCUCAGGGC UGACCCGUAA AGGUGUGUAU 2820
GCCGUUCGGU ACAAGGUGAA UGAAAAUCCU CUGUACGCAC CCACCUCAGA ACAUGUGAAC
2880 GUCCUACUGA CCCGCACGGA GGACCGCAUC GUGUGGAAAA CACUAGCCGG
30 CGACCCAUGG 2940 AUAAAAACAC UGACUGCCAA GUACCCUGGG AAUUUCACUG
CCACGAUAGA GGAGUGGCAA 3000 GCAGAGCAUG AUGCCAUCAU GAGGCACAUC
UUGGAGAGAC CGGACCCUAC CGACGUCUUC 3060 CAGAAUAAGG CAAACGUGUG
UUGGGCCAAG GCUUUAGUGC CGGUGCUGAA GACCGCUGGC 3120 AUAGACAUGA
CCACUGAACA AUGGAACACU GUGGAUUUUU UUGAAACGGA CAAAGCUCAC 3180
35 UCAGCAGAGA UAGUAUUGAA CCAACUAUGC GUGAGGUUCU UUGGACUCGA UCUGGACUCC
3240 GGUCUAUUUU CUGCACCCAC UGUUCCGUUA UCCAUAAGGA AUAAUCACUG
GGAUAACUCC 3300 CCGUCGCCUA ACAUGUACGG GCUGAAUAAA GAAGUGGUCC
GUCAGCUCUC UCGCAGGUAC 3360 CCACAACUGC CUCGGGCAGU UGCCACUGGA
AGAGUCUAUG ACAUGAACAC UGGUACACUG 3420 CGCAAUUAUG AUCCGCGCAU

AAACCUAGUA CCUGUAAACA GAAGACUGCC UCAUGCUUUA 3480 GUCCUCCACC
AUA AUGAACA CCCACAGAGU GACUUUUCUU CAUUCGUCAG CAAAUUGAAG 3540
GGCAGAACUG UCCUGGUGGU CGGGGAAAAG UUGUCCGUCC CAGGCAAAAU GGUUGACUGG
3600 UUGUCAGACC GGCCUGAGGC UACCUUCAGA GCUCGGCUGG AUUUAGGCAU
5 CCCAGGUGAU 3660 GUGCCCAAU AUGACAUAAU AUUUGUAAU GUGAGGACCC
CAUAUAAUA CCAUCACUAU 3720 CAGCAGUGUG AAGACCAUGC CAUUAAGCUU
AGCAUGUUGA CCAAGAAAGC UUGUCUGCAU 3780 CUGAAUCCCG GCGGAACCUG
UGUCAGCAUA GGUUAUGGUU ACGCUGACAG GGCCAGCGAA 3840 AGCAUCAUUG
GUGCUAUAGC GCGGCAGUUC AAGUUUUC C GGUUAUGCAA ACCGAAAUCC 3900
10 UCACUUGAAG AGACGGAAGU UCUGUUUGUA UUCAUUGGGU ACGAUCGCAA GGCCCGUACG
3960 CACAAUCCUU ACAAGCUUUC AUCAACCUUG ACCAACAUUU AUACAGGUUC
CAGACUCCAC 4020 GAAGCCGGAU GUGCACCCUC AUAUCAUGUG GUGCGAGGGG
AUUUGCCAC GGCCACCGAA 4080 GGAGUGAUUA UAAUUGCUGC UAACAGCAAA
GGACAACCUG GCGGAGGGGU GUGCGGAGCG 4140 CUGUAUAAGA AAUUCCCGGA
15 AAGCUUCGAU UUACAGCCGA UCGAAGUAGG AAAAGCGCGA 4200 CUGGUCAAAG
GUGCAGCUAA ACAUAUCAU CAUGCCGUAG GACCAAACUU CAACAAAGUU 4260
UCGGAGGUUG AAGGUGACAA ACAGUUGGCA GAGGCUUAUG AGUCCAUCGC UAAGAUUGUC
4320 AACGAUAACA AUUACAAGUC AGUAGCGAUU CCACUGUUGU CCACCGGCAU
CUUUUCCGGG 4380 AACAAAGAUC GACUAACCCA AUCAUUGAAC CAUUUGCUGA
20 CAGCUUUGA CACCACUGAU 4440 GCAGAUGUAG CCAUAUACUG CAGGGACAAG
AAUUGGAAA UGACUCUCAA GGAAGCAGUG 4500 GCUAGGAGAG AAGCAGUGGA
GGAGAUUGC AUAUCCGACG ACUCUUCAGU GACAGAACCU 4560 GAUGCAGAGC
UGGUGAGGGU GCAUCCGAAG AGUUCUUUGG CUGGAAGGAA GGGCUACAGC 4620
ACAAGCGAUG GCAAACUUU CUCAUAUUUG GAAGGGACCA AGUUUCACCA GGCGGCCAAG
25 4680 GAUAUAGCAG AAUUAUUGC CAUGUGGCCC GUUGCAACGG AGGCCAAUGA
GCAGGUAUGC 4740 AUGUAUAUCC UCGGAGAAAG CAUGAGCAGU AUUAGGUCGA
AAUGCCCCGU CGAAGAGUCG 4800 GAAGCCUCCA CACCACCUAG CACGCUGCCU
UGCUUGUGCA UCCAUGCCA UGACUCCAGAA 4860 AGAGUACAGC GCCUAAAAGC
CUCACGUCCA GAACAAUUA CUGUGUGCUC AUCCUUUCCA 4920 UUGCCGAAGU
30 AUAGAAUAC UGGUGUGCAG AAGAUCCAAU GCUCCAGCC UAUUUUGUUC 4980
UCACCGAAAG UGCCUGCGUA UAUUCAUCCA AGGAAGUAUC UCGUGGAAAC ACCACCGGUA
5040 GACGAGACUC CGGAGCCAUC GGCAGAGAAC CAAUCCACAG AGGGGACACC
UGAACAAACA 5100 CCACUUAUA CCGAGGAUGA GACCAGGACU AGAACGCCUG
AGCCGAUCAU CAUCGAAGAG 5160 GAAGAAGAGG AUAGCAUAAG UUUGCUGUCA
35 GAUGGCCCGA CCCACCAGGU GCUGCAAGUC 5220 GAGGCAGACA UUCACGGGCC
GCCUCUGUA UCUAGCUCAU CCUGGUCCA UCCUCAUGCA 5280 UCCGACUUUG
AUGUGGACAG UUUAUCCAUA CUUGACACCC UGGAGGGAGC UAGCGUGACC 5340
AGCGGGGCAA CGUCAGCCGA GACUAACUCU UACUUCGCAA AGAGUAUGGA GUUUCUGGCG
5400 CGACCGGUGC CUGCGCCUCG AACAGUAUUC AGGAACCCUC CACAUCCCGC

UCCGCGCACA 5460 AGAACACCGU CACUUGCACC CAGCAGGGCC UGCUCGAGAA
 CCAGCCUAGU UUCCACCCCG 5520 CCAGGCGUGA AUAGGGUGAU CACUAGAGAG
 GAGCUCGAGG CGCUUACCCC GUCACGCACU 5580 CCUAGCAGGU CGGUCUCGAG
 AACCAGCCUG GUCUCCAACC CGCCAGGCGU AAAUAGGGUG 5640 AUUACAAGAG
 5 AGGAGUUUGA GGCGUUCGUA GCACAACAAC AAUGACGGUU UGAUGCGGGU 5700
 GCAUACAUCU UUUCCUCCGA CACCGGUCAA GGGCAUUUAC AACAAAAAUC AGUAAGGCAA
 5760 ACGGUGCUAU CCGAAGUGGU GUUGGAGAGG ACCGAUUUGG AGAUUUCGUA
 UGCCCCGCGC 5820 CUCGACCAAG AAAAAGAAGA AUUACUACGC AAGAAAUUAC
 AGUAAAAUCC CACACCUGCU 5880 AACAGAAGCA GAUACCAGUC CAGGAAGGUG
 10 GAGAACAUGA AAGCCAUAAC AGCUAGACGU 5940 AUUCUGCAAG GCCUAGGGCA
 UUAUUUGAAG GCAGAAGGAA AAGUGGAGUG CUACCGAACC 6000 CUGCAUCCUG
 UUCCUUUGUA UUCAUCUAGU GUGAACCGUG CCUUUUAAG CCCCAAGGUC 6060
 GCAGUGGAAG CCUGUAACGC CAUGUUGAAA GAGAACUUUC CGACUGUGGC UUCUUACUGU
 6120 AUUAUUCAG AGUACGAUGC CUAUUUGGAC AUGGUUGACG GAGCUUCAUG
 15 CUGCUUAGAC 6180 ACUGCCAGUU UUUGCCCUGC AAAGCUGCGC AGCUUUCCAA
 AGAAACACUC CUAUUUGGAA 6240 CCCACAAUAC GAUCGGCAGU GCCUUCAGCG
 AUCCAGAACA CGCUCCAGAA CGUCCUGGCA 6300 GCUGCCACAA AAAGAAAUUG
 CAAUGUCACG CAAUGAGAG AAUUGCCCGU AUUGGAUUCG 6360 GCGGCCUUUA
 AUGUGGAAUG CUUCAAGAAA UAUGCGUGUA AUAAUGAAUA UUGGGAAACG 6420
 20 UUUAAAGAAA ACCCCAUCAG GCUUACUGAA GAAAACGUGG UAAAUUACAU UACCAAUUA
 6480 AAAGGACCAA AAGCUGCUGC UCUUUUUGCG AAGACACAU AUUUGAAUUA
 GUUGCAGGAC 6540 AUACCAAUGG ACAGGUUUGU AAUGGACUUA AAGAGAGACG
 UGAAAGUGAC UCCAGGAACA 6600 AAACAUACUG AAGAACGGCC CAAGGUACAG
 GUGAUCCAGG CUGCCGAUCC GCUAGCAACA 6660 GCGUAUCUGU GCGGAAUCCA
 25 CCGAGAGCUG GUUAGGAGAU UAAUGCGGU CCUGCUUCCG 6720 AACAUUCAUA
 CACUGUUUGA UAUGUCGGCU GAAGACUUUG ACGCUAUUAU AGCCGAGCAC 6780
 UUCCAGCCUG GGAUUGUGU UCUGGAAACU GACAUCGCGU CGUUUGAUAA AAGUGAGGAC
 6840 GACGCCAUGG CUCUGACCGC GUUAAUGAUU CUGGAAGACU UAGGUGUGGA
 CGCAGAGCUG 6900 UUGACGCUGA UUGAGGCGGC UUUCGGCGAA AUUUCAUCAA
 30 UACAUUUGCC CACUAAAACU 6960 AAUUAUAAU UCGGAGCCAU GAUGAAAUCU
 GGAAUGUUC UACACUGUU UGUGAACACA 7020 GUCAUUAACA UUGUAAUCGC
 AAGCAGAGUG UUGAGAGAAC GGCUAACCGG AUCACCAUGU 7080 GCAGCAUUCA
 UUGGAGAUGA CAUAUUCGUG AAAGGAGUCA AAUCGGACAA AUUAAUGGCA 7140
 GACAGGUGCG CCACCUGGUU GAAUAUGGAA GUCAAGAUUA UAGAUGCUGU GGUGGGCGAG
 35 7200 AAAGCGCCUU AUUUCUGUGG AGGGUUUAUU UUGUGUGACU CCGUGACCGG
 CACAGCGUGC 7260 CGUGUGGCAG ACCCCUAAA AAGGCUGUUU AAGCUUGGCA
 AACCUCUGGC AGCAGACGAU 7320 GAACAUGAUG AUGACAGGAG AAGGGCAUUG
 CAUGAAGAGU CAACACGCUG GAACCGAGUG 7380 GGUUUUCUUU CAGAGCUGUG
 CAAGGCAGUA GAAUCAAGGU AUGAAACCGU AGGAACUUC 7440 AUCAUAGUUA

UGGCCAUGAC UACUCUAGCU AGCAGUGUUA AAUCAUUCAG CUACCUGAGA 7500
GGGGCCCCUA UAACUCUCUA CGGCUAACCU GAAUGGACUA CGACAUAGUC UAGUCCGCCA
 7560 AGAUUUCGCA CCAUGAAGGC CAUCCUGGUG GUCAUGCUGU ACACCUUCAC
 CACCGCCAAC 7620 GCCGACACAC UGUGUAUCGG CUACCACGCC AACACAGCA
 5 CCGACACCGU GGAUACCGUG 7680 CUGGAAAAGA ACGUGACCGU GACACACAGC
 GUGAACCUGC UGGAAGAUAA GCACAACGGC 7740 AAGCUGUGCA AGCUGAGAGG
 CGUGGCACCU CUGCACCUGG GCAAGUGUAA UAUCGCCGGC 7800 UGGAUCCUGG
 GCAACCCUGA GUGUGAAAGC CUGAGCACCG CCAGAUCCUG GUCCUACAUC 7860
 GUGGAAACCA GCAACAGCGA CAACGGCACA UGCUACCCCG GCGACUUCAU CAACUACGAG
 10 7920 GAACUGCGGG AACAGCUGAG CAGCGUGUCC AGCUUCGAGA GAUUCGAGAU
 CUUCCCCAAG 7980 ACCAGCAGCU GGCCCAACCA CGACUCUGAC AAUGGCGUGA
 CAGCCGCCUG UCCUCAUGCC 8040 GGCGCUAAGA GCUUCUACAA GAACCUGAUC
 UGGCUGGUCA AGAAGGGCAA GAGCUACCCC 8100 AAGAUCAACC AGACCUACAU
 CAACGACAAG GGCAAAGAGG UGCUGGUCCU CUGGGGCAUC 8160 CACCAUCCUC
 15 CAACAUUCG CGAUCAGCAG AGCCUGUACC AGAACGCCGA UGCCUAUGUG 8220
 UUCGUGGGCA CCAGCCGGUA CAGCAAGAAG UUCAAGCCCG AGAUCGCCAC CAGGCCUAAA
 8280 GUGCGGGAUC AAGAGGGCAG AAUGAACUAC UACUGGACCC UGGUGGAACC
 CGGCGACAAG 8340 AUCACAUUUG AGGCCACCGG CAAUCUGGUG GCCCCUAGAU
 ACGCCUUCAC CAUGGAAAGA 8400 GAUGCCGGCA GCGGCAUCAU CAUCAGCGAU
 20 ACCCUGUGC ACGACUGCAA CACCACCGU 8460 CAGACACCUG AGGGCGCCAU
 CAAUACCAGC CUGCCUUUCC AGAACGUGCA CCCAUCACC 8520 AUCGGCAAGU
 GCCCCAAUA CGUGAAGUCC ACCAAGCUGA GGCUGGCCAC AGGCCUGAGA 8580
 AAUGUGCCCU CCAUCCAGAG CAGAGGCCUG UUUGGAGCCA UUGCCGGCUU UAUCGAAGGC
 8640 GGCUGGACAG GCAUGGUGGA CGGAUGGUAC GGAUACCACC ACCAGAACGA
 25 GCAAGGCUCU 8700 GGCUAUGCCG CCGACCUGAA GUCUACCCAG AAUGCCAUCG
 AUAAGAUCAC CAACAAAGUG 8760 AACAGCGUGA UCGAGAAGAU GAACACCCAG
 UUCACCGCCG UGGGAAAAGA GUUCAACCAC 8820 CUGGAAAAGC GCAUCGAGAA
 CCUGAACAAAG AAGGUGGACG ACGGCUUCCU GGACAUCUGG 8880 ACCUACAAUG
 CCGAACUGCU GGUGCUGCUG GAGAACGAGA GAACCCUGGA CUACCACGAC 8940
 30 AGCAACGUGA AGAACUGUA CGAGAAAGUG CGCAACCAGC UGAAGAACAA CGCCAAAGAG
 9000 AUCGGCAACG GCUGCUUCGA GUUCUACCAC AAGUGCGACA AUACCUGCAU
 GGAAAGCGUG 9060 AAGAAUGGCA CCUACGACUA CCCUAAGUAC AGCGAGGAAG
 CCAAGCUGAA CCGCGAGAAG 9120 AUCGACGGCG UGAAGCUGGA UAGCACCCGG
 AUCUACCAGA UUCUGGCCAU CUACAGCACC 9180 GUGGCCUCUA GCCUGGUGCU
 35 GGUGGUUUUCU CUGGGCGCUA UCAGCUUCUG GAUGUGCAGC 9240 AAUGGCAGCC
 UGCAGUGCCG GAUCUGCAUC UGAUGAAUAC AGCAGCAAUU GGCAAGCUGC 9300
 UUACAUAGAA CUCGCGGCGA UUGGCAUGCC GCCUAAAAU UUUUUAUUUA UUUUUCUUUU
 9360 CUUUUCCGAA UCGGAUUUUG UUUUUAAUUA UUCAAAAAA AAAAAAAA
 AAAAAAAA 9420 AAAAAAAA AAA(SEQ ID NO: 2) 9433

EJEMPLO 4: S,4,4,1 CONSTRUCTO 7: TC83-HA-40A 50U-50PU (PF-07871987)

Los detalles del lote y los datos resumidos del análisis del lote se proporcionan en Tabla 7 para 1 lote de material toxicológico reglamentario y 1 lote GMP de sustancia farmacológica que se utilizará en ensayos clínicos.

5 Tabla 7

S,4,4,6-7. Resultados del lote de la sustancia farmacológica de la vacuna de la influenza de ARNs TC83-HA-40A 50 U-50 pU

Atributo de calidad	Procedimiento analítico	Criterios de aceptación	Toxicología no clínica (Lote 00710958-0369)	Sustancia farmacológica clínica (Lote 22V543F101)
Apariencia (Claridad)	Claridad	≤ 6 NTU	Claro	0 NTU
Apariencia (coloración)	Coloración	No más intensamente coloreado que el nivel 7 del estándar de color marrón (B).	Solución incolora	≤ B9
pH	Potenciometría	7,0 ± 0,5	7,1	6,9
Contenido (concentración de ARN)	espectroscopia UV	1,25 ± 0,25 mg/mL	2,00 mg/mL	1,27 mg/mL
ddPCR	Identidad de la secuencia de ARN codificada	Identidad confirmada	Positivo ^a	Confirmado
Presencia de pseudoU	RP-HPLC	Identidad confirmada	Confirmado ^b	Confirmado
Integridad del ARN	Electroforesis capilar en gel	≥ 60 %	88 %	87 %
Plantilla de ADN residual	qPCR	≤ 990 ng de ADN/mg de ARN	37 ng/mg	NMT 1 ng/mg
Endotoxina	Endotoxina (LAL)	≤ 12,5 EU/mL	<0,025 EU/mg	NMT 0,2 EU/mL
Carga biológica	Carga biológica	≤ 1 UFC/10 mL	≤ 10 UFC/mL	0 UFC/10 mL

a. La identidad se determinó mediante transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

b. La toxicología no clínica informó un porcentaje aproximado de pseudoU. Su presencia puede inferirse como “confirmada” a partir del resultado informado de su presencia.

Las especificaciones solo se aplican a suministros clínicos.

Abreviaturas: NTU = unidades de turbidez nefelométricas; NT = no probado; TBP = se

proporcionará en la enmienda IND; ddPCR = reacción en cadena de la polimerasa en gotas digitales; qPCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; LAL = lisado de amebocitos de Limulus; NMT = no más de; EU = Unidad de endotoxina; UFC = Unidad formadora de colonias

EJEMPLO 5: ENSAYOS

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

El principal ensayo serológico utilizado para medir las respuestas inmunes inducidas por la vacuna contra la influenza es el ensayo de inhibición de la hemaglutinina (HAI, por sus siglas en inglés). El HAI mide cuantitativamente los anticuerpos funcionales en suero que previenen la aglutinación de glóbulos rojos mediada por HA en reacciones que contienen muestras de suero pretratadas con enzimas destructoras de receptores, virus de la influenza y glóbulos rojos derivados de pavo o cobaya. El título de HAI es el recíproco de la dilución sérica más alta que produce pérdida de actividad de HA, visualizada como una lágrima cuando se inclina la placa de microtitulación. Los títulos de múltiples determinaciones por muestra se informan como títulos de media geométrica (GMT, por sus siglas en inglés). Un título de HAI de $\geq 1:40$ generalmente se acepta como protector en humanos.

Ensayo de microneutralización de la influenza

El ensayo de microneutralización del virus de la influenza (MNT, por sus siglas en inglés) mide cuantitativamente los anticuerpos funcionales en suero que neutralizan la actividad del virus de la influenza, previniendo la infección productiva de una monocapa de células huésped. Se produce una reacción de neutralización cuando el virus de la influenza se incuba con muestras de suero; luego, esta mezcla de reacción se aplica a una monocapa de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK, por sus siglas en inglés) para medir el grado de neutralización. Los títulos de MNT se informan como el recíproco de la dilución que da como resultado una reducción del 50 % o 90 % de la infección en comparación con un control sin suero. La MNT de 1 día mide los anticuerpos neutralizantes anti-HA y la MNT de 3 días mide los anticuerpos neutralizantes anti-HA y anti-NA.

Ensayo de inhibición de la neuraminidasa

El ensayo de inhibición de la neuraminidasa (NAI, por sus siglas en inglés) mide cuantitativamente los anticuerpos funcionales en suero que previenen la escisión mediada por

NA de la escisión del ácido siálico en un ensayo de lectina ligada a enzima. Brevemente, el suero que contiene anticuerpos se incubaba con el virus de la influenza y la mezcla se transfirió a una placa recubierta con lectina fetuina. La escisión del ácido siálico de la fetuina se controla a través de una reacción colorimétrica después de la unión de la aglutinina de maní conjugada con peroxidasa de rábano picante a las fracciones de galactosa expuestas y la adición del sustrato. El título de NAI es el recíproco de la dilución de suero más alta que resulta en una reducción de la actividad de NA en un 50 % en comparación con un control sin suero. Los títulos de múltiples determinaciones por muestra se informan como títulos de media geométrica (GMT).

10 **EJEMPLO 6: EVALUACIÓN DE DISEÑOS DE VACUNAS ANTIGRIPALES DE ARNSA BICISTRÓNICO HA-NA EN RATONES**

Este estudio se realizó para comparar la inmunogenicidad de los candidatos a vacuna de ARNSa bicistrónico que codifican hemaglutinina de influenza (HA) y neuraminidasa (NA) para determinar el diseño óptimo de la vacuna de ARNSa HA-NA bicistrónico. Los vectores de ARNSa utilizados en este estudio se basaron todos en la estructura principal TC-83, sin embargo, el estudio fue diseñado para evaluar la inmunogenicidad con o sin una secuencia kozak exógena aguas arriba del primer gen de interés y el efecto de la longitud de la cola de poli A (40A o 80A).

Los elementos clave del diseño bicistrónico que se evaluaron en este estudio incluyen el elemento regulador utilizado para impulsar la expresión del segundo gen de interés (promotor subgenómico (SGP, por sus siglas en inglés) vs. sitio de entrada ribosomal interno (IRES)) y el orden de colocación del antígeno en el vector (HA-NA o NA-HA).

La inmunización intramuscular de ratones Balb/c con vacunas de ARNSa formuladas con LNP que codifican el antígeno HA y/o NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) indujo respuestas de anticuerpos funcionales y neutralizantes.

En general, se provocaron títulos similares con todas las vacunas de ARNSa bicistrónico analizadas, y estos títulos también fueron similares a los de la vacuna de ARNSa compuesta por ARNSa-HA + ARNSa-NA formulados individualmente. Estos resultados confirmaron que el método ARNSa bicistrónico provocó títulos y es factible.

Los vectores de ARNSa utilizados en este estudio se basaron todos en la estructura principal TC-83, sin embargo, el estudio fue diseñado para evaluar la inmunogenicidad con o

sin una secuencia kozak exógena aguas arriba del primer gen de interés y el efecto de la longitud de la cola de poli A (40A o 80A). Los elementos clave del diseño bicistrónico que se evaluaron en este estudio incluyen el elemento regulador necesario para impulsar la expresión del segundo gen de interés y el orden de colocación del antígeno en el vector (HA-NA o NA-HA). Los elementos reguladores seleccionados para la comparación fueron el promotor subgenómico nativo VEEV (SGP; 61 nucleótidos) y el sitio de entrada ribosomal interno (IRES, 587 nucleótidos) derivado de un virus de encefalomiocarditis. Como comparadores, también se incluyeron en el estudio vacunas de ARNmod que codifican la influenza HA o NA.

Los ratones fueron inmunizados con formulaciones de LNP de ARNsa o ARNmod los días 0 y 28, y los sueros se recolectaron 21 días después del cebado y 14 días después del refuerzo. Se midieron los anticuerpos neutralizantes y funcionales los días 21 y 42 para determinar la inmunogenicidad.

Este estudio fue diseñado con 15 grupos como se muestra en Tabla 8 cada uno con un total de 10 ratones hembra (cepa de ratones: BALB/c). Los productos farmacológicos de ARNm se evaluaron en un volumen de dosis de 0,05 mL.

Tabla 8. Diseño del estudio

Gp#	Ratones	Descripción del ARN DP autoamplificante	Dosis (µg)	Dosis vol / ruta	Vax (Día)	Sangrado (Día)
1	10	Salina	-	50 µL / IM	0, 28	21, 42
2	10	TC83-Kan-Wisc-HA-IRES-NA (kozak, 40A) – conjunto 1	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
3	10	TC83-Kan-Wisc-HA-SGP-NA (kozak, 40A) – conjunto 1	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
4	10	TC83-Kan-Wisc-NA-SGP-HA (kozak, 40A) – conjunto 1	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
5	10	TC83-Wisc-HA-IRES-NA (sin kozak, 40A) – conjunto 2	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
6	10	TC83-Wisc-HA-SGP-NA (sin kozak, 40A) – conjunto 2	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
7	10	TC83-Wisc-NA-SGP-HA (sin kozak, 40A) – conjunto 2	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
8	10	TC83-Wisc-HA-IRES-NA (sin kozak, 80A) – conjunto 3	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
9	10	TC83-Wisc-HA-SGP-NA (sin kozak, 80As) – conjunto 3	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
10	10	TC83-Wisc-NA-SGP-HA (sin kozak, 80As) – conjunto 3	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
11	10	ARNsa AWisc. H1 (RMM59) –	0,02	50 µL /	0, 28	21, 42

Gp#	Ratones	Descripción del ARN DP autoamplificante	Dosis (µg)	Dosis vol / ruta	Vax (Día)	Sangrado (Día)
		kozak 40As		IM		
12	10	ARNsa AWisc. N1 (RMM65) – kozak 40As	0,02	50 µL / IM	0, 28	21, 42
13	10	ARNsa AWisc. H1 (RMM59) + ARNsa AWisc. N1 (RMM65) – kozak 40As (RMM59 + RMM65) post-mezcla	0,04	50 µL / IM	0, 28	21, 42
14	10	ARNmod H1 (RMM71)	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
15	10	ARNmod N1 (RMM72)	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42

Tabla 9. Programa de estudio

Día	Procedimiento
0	Vax #1
21	Sangrado
28	Vax #2
42	Sangrado terminal

Tabla 10. Artículos de prueba y diluyentes para el estudio (proporcionados para cebado y refuerzo)

Artículo #	Artículos de prueba/diluyente	DP Lot #	Matriz de formulación e información	GPS para usarse	*Viales#/ Almacenamiento
1	Salina	B2011082	0,9 % de NaCl en agua	1 y diluyente para los grupos 2-15	2 botellas RT
2	TC83-Kan-Wisc-HA-IRES-NA (kozak, 40A) – conjunto 1	00715982-0018-F1	0,066 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	2	3 viales de 0,3 mL -80°C

3	TC83-Kan-Wisc-HA-SGP-NA (kozak, 40A) – conjunto 1	00715982-0018-F2	0,065 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	3	3 viales de 0,3 mL -80°C
4	TC83-Kan-Wisc-NA-SGP-HA (kozak, 40A) – conjunto 1	00715982-0018-F3	0,068 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	4	3 viales de 0,3 mL -80°C
5	TC83-Wisc-HA-IRES-NA (sin kozak, 40As) – conjunto 2	00715725-0035-F2	0,077 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	5	3 viales de 0,3 mL -80°C
6	TC83-Wisc-HA-SGP-NA (sin kozak, 40As) – conjunto 2	00715725-0035-F4	0,074 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	6	3 viales de 0,3 mL -80°C
7	TC83-Wisc-NA-SGP-HA (sin kozak, 40As) – conjunto 2	00715725-0035-F6	0,069 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	7	3 viales de 0,3 mL -80°C

8	TC83-Wisc-HA-IRES-NA (sin kozak, 80As) – conjunto 3	00715725-0035-F1	0,079 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	8	3 viales de 0,3 mL -80°C
9	TC83-Wisc-HA-SGP-NA (sin kozak, 80As) – conjunto 3	00715725-0035-F3	0,069 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	9	3 viales de 0,3 mL -80°C
10	TC83-Wisc-NA-SGP-HA (sin kozak, 80As) – conjunto 3	00715725-0035-F5	0,069 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	10	3 viales de 0,3 mL -80°C
11	ARNsa AWisc. H1 (RMM59) – kozak 40As	00715982-0018-F4	0,061 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	11 y 13	3 viales de 0,3 mL -80°C
12	ARNsa AWisc. N1 (RMM65) – kozak 40As	00715982-0018-F5	0,062 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris/10 % sacarosa/20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	12 y 13	3 viales de 0,3 mL -80°C

13	ARNmod H1 (RMM71)	00715725- 0032-F10	0,093 mg/mL de LNP de ARNmod en 10 mM Tris/300 mM sacarosa, pH 7,4	14	3 viales de 0,3 mL -80°C
14	ARNmod N1 (RMM72)	000715982- 0018-F6	0,099 mg/mL de LNP de ARNmod en 10 mM Tris/300 mM sacarosa, pH 7,4	15	3 viales de 0,3 mL -80°C

M. Resultados de pruebas analíticas de artículos de prueba

Tabla 11. Materiales de productos farmacéuticos y resultados analíticos

DP #Lote	Concentrac ión (µg/mL)	Encapsulac ión	Tama ño (nm)	PD I	Integrid ad por FA	% de Ca p (D S)	IVE EC5 0 (ng)	Endotoxi na (EU/mL)
0071598 2-0018- F1	66	97 %	70	0,0 7	72 %	100 %	HA: 43,3 NA: 67,8	0,12
0071598 2-0018- F2	65	98 %	69	0,0 6	64 %	100 %	HA: 37,6 NA: 47,5	0,14
0071598 2-0018- F3	68	98 %	67	0,0 6	78 %	100 %	HA: 25,1 NA: 110, 9	0,12
0071598 2-0018- F4	61	97 %	70	0,0 5	78 %	100 %	HA: 22,6	0,58
0071598 2-0018- F5	62	≥ 98 %	66	0,0 7	79 %	100 %	NA: 31,5	< 0,12
0071598 2-0018- F6	99	97 %	70	0,1 0	92 %	80 %	NA: 51,5	0,22
0071572	79	95 %	74	0,0	78 %	99	HA:	<0,05

5-0035-F1				6		%	11,4 NA: 13,1	
0071572 5-0035-F2	77	96 %	72	0,1 2	77 %	99 %	HA: 32,8 NA: 61,5	<0,07
0071572 5-0035-F3	69	96 %	73	0,0 8	75 %	98 %	HA: 13,6 NA: 22,7	<0,05
0071572 5-0035-F4	74	95 %	74	0,1 2	79 %	99 %	HA: 15,9 NA: 33,0	<0,05
0071572 5-0035-F5	69	96 %	69	0,1 1	74 %	99 %	HA: 28,8 NA: 36,4	0,06
0071572 5-0035-F6	69	96 %	69	0,1 4	80 %	99 %	HA: 40,9 NA: 55,0	0,07
0071572 5-0032-F10	93	94 %	65	0,0 9	87 %	79 %	HA: 43,5	< 0,3

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inmunización intramuscular de ratones Balb/c con vacunas de ARNsa formuladas con LNP que codifican el antígeno HA y/o NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) indujo respuestas de anticuerpos funcionales y neutralizantes medidas por HAI, MNT de 1 día, MNT de 3 días y NAI (FIG. 1A-1B, FIG. 2A-2B, FIG. 3, y FIG. 4A-4B, respectivamente) con un claro efecto potenciador dos semanas después de la segunda inmunización. Los resultados del MNT de 3 días en el día 42 mostraron que NA contribuyó mínimamente a la neutralización en comparación con HA en este ensayo. En general, se lograron títulos similares con todos los diseños de vacunas de ARNsa bicistrónico evaluados, y estos títulos también fueron similares a la vacuna de ARNsa compuesta por ARNsa monocistrónico HA y NA formuladas individualmente (HA/NA Post-Mezcla) y ARNmod. Los títulos de las vacunas de ARNsa que expresaban dos antígenos fueron similares o apenas inferiores a los de los controles de ARNsa-HA o -NA únicamente. Estos datos confirmaron que el enfoque del ARNsa bicistrónico es factible.

Ni la eliminación de la secuencia Kozak, la longitud de la cola de poliA, el elemento regulador utilizado para impulsar el segundo gen de interés (IRES vs. SGP) ni el orden de

colocación del antígeno (HA-NA o NA-HA) tuvieron un impacto claro en los títulos provocados.

Con respecto a la FIG. 1A-1B, se inmunizaron ratones Balb/c hembra por vía intramuscular los días 0 y 28 con diferentes constructos de vacuna de ARNsa contra la influenza formuladas con LNP y con el comparador ARNmod de influenza que codifica HA y/o NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). La preparación posterior a la mezcla de HA/NA estuvo compuesta por una mezcla 1:1 de ARNsa-HA formulada individualmente más ARNsa-NA. Las respuestas de anticuerpos funcionales contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante HAI el día 21 (3 semanas después del cebado) y el día 42 (2 semanas después del refuerzo).

Con respecto a la FIG. 2, se inmunizaron ratones Balb/c hembra por vía intramuscular los días 0 y 28 con diferentes constructos de vacuna de ARNsa contra la influenza formuladas con LNP y con el comparador ARNmod de influenza que codifica HA y/o NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). La preparación posterior a la mezcla de HA/NA estuvo compuesta por una mezcla 1:1 de ARNsa-HA formulada individualmente más ARNsa-NA. Las respuestas de anticuerpos funcionales contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante un ensayo MNT de 1 día el día 21 (3 semanas después del cebado) y el día 42 (2 semanas después del refuerzo). Se reportan títulos neutralizantes del 50 %.

Con respecto a la FIG. 3, se inmunizaron ratones Balb/c hembra por vía intramuscular los días 0 y 28 con diferentes constructos de vacuna de ARNsa contra la influenza formuladas con LNP y con el comparador ARNmod de influenza que codifica HA y/o NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). La preparación posterior a la mezcla de HA/NA estuvo compuesta por una mezcla 1:1 de ARNsa-HA formulada individualmente más ARNsa-NA. Las respuestas de anticuerpos funcionales contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante un ensayo MNT de 3 días el día 42 (2 semanas después del refuerzo). Se reportan títulos neutralizantes del 50 %.

Con respecto a la FIG. 4A-4B, se inmunizaron ratones Balb/c hembra por vía intramuscular los días 0 y 28 con diferentes constructos de vacuna de ARNsa contra la influenza formuladas con LNP y con el comparador ARNmod de influenza que codifica HA y/o NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). La preparación posterior a la mezcla de HA/NA estuvo compuesta por una mezcla 1:1 de ARNsa-HA formulada individualmente más ARNsa-NA. Las respuestas de anticuerpos funcionales contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante NAI en el Día 21 (3 semanas después del cebado) y el día 42 (2 semanas después del refuerzo).

3. CONCLUSIÓN

La vacuna de ARNsa contra la influenza estacional está diseñada para expresar 4 proteínas HA diferentes y 4 proteínas NA diferentes para que coincidan con las cepas de influenza circulantes dominantes cada temporada. Potencialmente, esto podría lograrse utilizando 8 componentes ARNsa individuales o 4 componentes ARNsa bicistrónicos. Con ese fin, se evaluó la viabilidad de un enfoque ARNsa bicistrónico en un estudio de inmunogenicidad en ratones. Se comparó un candidato a vacuna de ARNsa bicistrónico que codifica antígenos HA y NA (TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A) con un control ARNsa-HA o ARNsa-NA monocistrónico que codifica un solo antígeno (TC83-HA-40A o TC83-NA-40A), y también con una mezcla 1:1 de componentes ARNsa-HA + ARNsa-NA formulados individualmente. También se incluyeron como comparadores adicionales los candidatos a vacuna de ARNmod que codifican los mismos antígenos HA o NA del virus A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). Los ratones Balb/c fueron inmunizados IM el día 0 con 20 ng de las preparaciones de vacunas de ARNsa bicistrónico y monocistrónico, 40 ng en total (20 ng de cada una) de la mezcla 1:1 de ARNsa-HA + ARNsa-NA y 200 ng de los comparadores ARNmod. Todas las LNP de ARNsa estaban en la matriz 10 mM Tris/10 % sacarosa + 20 mM ácido glutámico, pH 7,4, que se selecciona para uso clínico. El día 21 (3 semanas después de la inmunización primaria), se indujeron respuestas de anticuerpos anti-HA medidas mediante HAI y MNT (FIG. 1A-1B y FIG. 2A-2B) y también se indujeron respuestas de anticuerpos anti-NA medidas mediante NAI (FIG. 4A-4B). La vacuna candidata de ARNsa bicistrónico logró títulos similares a los de la vacuna de ARNsa compuesta por una mezcla 1:1 de ARNsa HA monocistrónico formulado individualmente + ARNsa-NA. Los títulos de las formulaciones de vacunas de ARNsa que expresaban dos antígenos fueron similares o apenas inferiores a los títulos producidos por los controles ARNsa que expresaban solo un antígeno. Estos resultados confirmaron que el enfoque del ARNsa bicistrónico es factible e indicaron que las vacunas de ARNsa proporcionaron ahorro de dosis en comparación con el ARNmod en ratones Balb/c según los títulos de anticuerpos después de una única inmunización.

En general, el constructo de ARNsa bicistrónico evaluado produjo títulos de anticuerpos funcionales y neutralizantes que fueron similares a los niveles inducidos por una vacuna de ARNsa compuesta por ARNsa monocistrónicos HA y NA formulados individualmente. Los títulos de las vacunas de ARNsa que expresaban dos antígenos fueron similares o apenas inferiores a los de los controles de ARNsa-HA o -NA únicamente. Estos resultados preliminares confirmaron que el enfoque del ARNsa bicistrónico es factible,

independientemente del elemento regulador utilizado para impulsar el segundo gen de interés (IRES vs. SGP), el orden de colocación del antígeno (HA-NA o NA-HA), la eliminación de la secuencia kozak y la longitud de la cola de poliA (40A vs. 80A).

EJEMPLO 7: INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA DE LA INFLUENZA DE ARNSA QUE CONTIENE NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS

Para determinar si la incorporación de bases modificadas puede producir una vacuna de ARNSa más tolerable y potente, se generaron preparaciones de ARNSa que expresaban la HA de la influenza reemplazando la uridina con cantidades variables de N1-metilpseudouridina del 0 % al 100 %. El impacto del aumento del porcentaje de bases modificadas en la expresión del antígeno in vitro dependió del tipo de célula. En particular, en una línea celular humana inmunocompetente como HeLa, el ARNSa que contiene 25-75 % de N1-metilpseudouridina resultó en una expresión de antígeno in vitro más alta que el control de ARNSa no modificado (0 %). Sin embargo, el ARNSa con una modificación de bases del 100 % produjo consistentemente niveles bajos de antígeno independientemente del tipo de célula, probablemente debido a un deterioro en la función de la replicasa. El aumento del porcentaje de nucleósidos modificados incorporados al ARNSa también se correlacionó con una reducción en el nivel de activación de diferentes PRR o sensores de ARN, como TLR3, TLR7 y RIG-1 en líneas de células reporteras (datos no mostrados).

Para evaluar la inmunogenicidad, los ratones Balb/c fueron inmunizados IM el día 0 con 200 ng de preparaciones de vacuna de ARNSa que contenían diferentes cantidades de N1-metilpseudouridina. La incorporación de mayores cantidades de nucleósidos modificados se correlacionó con una menor activación inmune innata, medida mediante la secreción de citocinas y quimiocinas en el suero el día 1 después de la vacunación (FIG. 5), lo que puede mejorar la tolerabilidad de la vacuna. Sin embargo, mayores cantidades de nucleósidos modificados en ARNSa también se correlacionaron con una reducción en los títulos de anticuerpos neutralizantes a las 3 semanas después de la vacunación (FIG. 6), lo que podría reflejar potencialmente el impacto en la actividad de la replicasa. Estos resultados se confirmaron en una especie diferente de ratón C57BL6/J (FIG. 7 y la FIG. 8). Con base en los datos de los ratones, un constructo de ARNSa con 50 % de incorporación de nucleósidos modificados redujo sustancialmente la secreción de citocinas y quimiocinas en comparación con el control no modificado, con una disminución más modesta en los títulos de anticuerpos a niveles que fueron similares o superiores al punto de referencia de ARNmod-HA. En general, los datos sugieren que el ARNSa puede tolerar la incorporación parcial de bases modificadas

para reducir la estimulación inmunitaria innata temprana y, al mismo tiempo, provocar fuertes respuestas humorales adaptativas.

El uso de bases modificadas al 50 % puede afectar parcialmente la función de la replicasa, pero la tolerabilidad mejorada podría potencialmente resultar en una vacuna de ARNsa mejorada en humanos.

Con respecto a la FIG. 5, se inmunizaron por vía intramuscular ratones Balb/c hembras el día 0 con 200 ng de preparaciones de vacuna de la influenza de ARNsa formuladas con LNP que contenían diferentes cantidades (del 0 % al 100 %) de N1-metilpseudouridina o con el comparador de ARNmod de influenza que codifica HA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). Las citocinas y quimiocinas séricas se midieron 24 horas después de la primera inmunización utilizando un ensayo LEGENDplex del panel de respuesta antiviral de ratón. Datos informados como mediana con rango intercuartil.

Con respecto a la FIG. 6, se inmunizaron ratones Balb/c hembra por vía intramuscular el día 0 con 200 ng de preparaciones de vacuna de la influenza de ARNsa formuladas con LNP que contenían diferentes cantidades (del 0 % al 100 %) de N1-metilpseudouridina o el comparador de ARNmod que codifica la HA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). Las respuestas de anticuerpos contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante HAI o un ensayo MNT de 1 día el día 21 (3 semanas después de la inmunización). Se informan los títulos de HAI y neutralización del 50 % (media geométrica con DE geométrica).

Con respecto a la FIG. 7, se inmunizaron ratones hembra C57BL6/J por vía intramuscular el día 0 con 200 ng de preparaciones de vacuna de la influenza de ARNsa formuladas con LNP que contenían diferentes cantidades (0 % o 50 %) de N1-metilpseudouridina o con el comparador de ARNmod de influenza que codifica HA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). Las citocinas y quimiocinas séricas se midieron 24 horas después de la primera inmunización utilizando un ensayo LEGENDplex del panel de respuesta antiviral de ratón. Datos informados como mediana con rango intercuartil.

Con respecto a la FIG. 8, se inmunizaron ratones hembra C57BL6/J por vía intramuscular el día 0 con 200 ng de preparaciones de vacuna de la influenza de ARNsa formuladas con LNP que contenían diferentes cantidades (0 % o 50 %) de N1-metilpseudouridina o el comparador de ARNmod que codifica HA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). Las respuestas de anticuerpos contra A/Wisconsin/588/2019 se midieron mediante HAI o un ensayo MNT de 1 día el día 21 (3 semanas después de la inmunización). Se informan

los títulos de HAI y neutralización del 50 % (media geométrica con DE geométrica).

EJEMPLO 8: INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA DE LA INFLUENZA DE ARNSA BICISTRÓNICO CUADRIVALENTE QUE CODIFICA HA Y NA DE CUATRO CEPAS DE INFLUENZA ESTACIONAL

5 La farmacología primaria de la vacuna de ARNs contra la influenza se evaluó en estudios no clínicos in vitro e in vivo. Estudios in vitro e in vivo demostraron que la vacuna de ARNs contra la influenza codifica proteínas HA y/o NA de la influenza que inducen fuertes respuestas de anticuerpos funcionales y neutralizantes y respuestas robustas de células T CD4+ y CD8+, y permiten dosis significativamente más pequeñas en comparación con el ARNmod en
10 ratones. La replicación del ARNs también produce una activación inmunitaria innata, que puede potenciar la respuesta inmunitaria adaptativa a los antígenos expresados. Se demostró la expresión in vitro eficiente de las glicoproteínas HA y NA de las vacunas de ARNs contra la influenza en células cultivadas. Estudios de inmunogenicidad en ratones, ratas y hurones demostraron que diferentes preparaciones de vacunas de ARNs contra la influenza
15 provocaron fuertes respuestas de anticuerpos funcionales y neutralizantes y respuestas de células T. También se demostró en ratones y ratas la activación inmune innata, medida mediante la liberación de citocinas y quimiocinas séricas 24 horas después de la inmunización. Los estudios de inmunogenicidad en ratones, comparados con vacunas de ARNmod de influenza, también respaldan el uso de un constructo de ARNs de influenza bicistrónico que expresa dos antígenos de influenza separados (HA y NA) a partir del mismo vector de ARNs.
20 Los estudios de inmunogenicidad en ratones también muestran que el ARNs puede tolerar la incorporación parcial de nucleósidos modificados para reducir la estimulación inmunitaria innata temprana y al mismo tiempo provocar fuertes respuestas humorales adaptativas. Por último, los estudios de inmunogenicidad en ratones también respaldan la combinación de
25 cuatro constructos de ARNs bicistrónico de influenza, cada una de las cuales codifica un HA y un NA diferentes, para atacar cuatro cepas de influenza estacional.

Los candidatos a la vacuna de ARNs contra la influenza seleccionados para las pruebas POC iniciales contienen la secuencia codificante de longitud completa, optimizada para codones, de la glicoproteína HA o NA de la cepa del virus de origen celular
30 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) recomendada para su uso en las temporadas de influenza del hemisferio norte de 2021, 2022 y 2022-2023 y del hemisferio sur de 2022.

Tabla 12. Preparaciones de ARNsa

Constructo de ARN	Número de ARN	Estructura principal del vector	Antígeno(s) de la vacuna	Longitud de la cola del poli A
1. TC83-HA-40A-Wisconsin	PF-07852352	TC-83	HA de A/Wisconsin/588/2019	40
2. TC83-HA-80A-Wisconsin	PF-07836391	TC-83	HA de A/Wisconsin/588/2019	80
3. TC83-Mit2 aBc1-HA-40A-Wisconsin	PF-07836394	TC-83-Mit2 aBc1	HA de A/Wisconsin/588/2019	40
4. TRD-HA-40A-Wisconsin	PF-07836395	TRD	HA de A/Wisconsin/588/2019	40
5. TC83-NA-80A-Wisconsin	PF-07836396	TC-83	NA de A/Wisconsin/588/2019	80
6. TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80 ^a -Wisconsin	PF-07867246	TC-83	HA y NA de A/Wisconsin/588/2019	80
7. TC83-HA-40A-50U-50pU-Wisconsin	PF-07871987	TC-83	HA de A/Wisconsin/588/2019	40
8. TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A-Austria	PF-07914705	TC-83	HA y NA de B/Austria/1359417/2021	80
9. TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A-Cuadrivalente	PF-07915048	TC-83	HA y NA de A/Wisconsin/588/2019, A/Darwin/6/2021, B/Austria/1359417/2021 y B/Phuket/3073/2013	80

Se puede lograr una vacuna de ARNsa contra la influenza estacional que exprese 4 proteínas HA diferentes y 4 proteínas NA diferentes para que coincidan con las cepas de influenza circulantes dominantes cada temporada utilizando 4 componentes ARNsa bicistrónicos. Se evaluó la viabilidad de un enfoque de ARNsa bicistrónico cuadrivalente en un estudio de inmunogenicidad en ratones, comparado con la vacuna de la influenza cuadrivalente estacional adyuvada autorizada para el hemisferio norte 2021-22 (QIV; FluAd). Los ratones BALB/c fueron inmunizados IM los días 0 y 28 con una dosis total de 0,8 µg de una vacuna de ARNsa cuadrivalente (0,2 µg por componente) o 2,4 µg del comparador QIV autorizado. El día 42 (2 semanas después de la segunda inmunización), se indujeron respuestas de anticuerpos anti-HA contra cada uno de los cuatro componentes, medidas mediante HAI y MNT (FIG. 9) y también se indujeron respuestas de anticuerpos anti-NA medidas mediante NAI (FIG. 10). La vacuna candidata de ARNsa bicistrónico cuadrivalente logró títulos de HA y NA similares o superiores a los del comparador QIV.

Con respecto a la FIG. 9, se inmunizaron ratones Balb/c hembra por vía intramuscular el día 0 con 20 ng del ARNsa cuadrivalente formulado con LNP compuesto por 4 constructos bicistrónicos que codifican HA y NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1), A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2), B/Washington/2/2019 (linaje B/Victoria) y B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata), o con 2,4 µg de una vacuna inactivada cuadrivalente adyuvada autorizada (QIV; FluAd). Las respuestas de anticuerpos contra cada componente de la vacuna se midieron mediante HAI o un ensayo MNT de 1 día el día 42 (2 semanas después de la segunda dosis). Se informan los títulos de HAI y neutralización del 50 % (media geométrica con DE geométrica).

Con respecto a la FIG. 10, se inmunizaron ratones Balb/c hembra por vía intramuscular el día 0 con 20 ng del ARNsa cuadrivalente formulado con LNP compuesto por 4 constructos bicistrónicos que codifican HA y NA de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1), A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2), B/Washington/2/2019 (linaje B/Victoria) y B/Phuket/3073/2013 (linaje B/Yamagata), o con 2,4 µg de una vacuna inactivada cuadrivalente adyuvada autorizada (QIV; FluAd). Las respuestas de anticuerpos contra cada componente de la vacuna se midieron mediante NAI el día 42 (2 semanas después de la segunda dosis). Se informan los títulos de NAI (media geométrica con DE geométrica) para 3 de las 4 cepas. No se pudieron informar los títulos de NAI H3N2 tanto para el ARNsa como para el QIV debido a problemas técnicos con el ensayo NAI para esta cepa.

EJEMPLO 9: EFECTOS EN HUMANOS

C4861001 es un estudio FIH de fase 1 en curso que evalúa la seguridad, la tolerabilidad y la inmunogenicidad de PF-07845104. En la fecha límite de datos del 15 de noviembre de 2022, se asignaron al azar 253 participantes y 248 participantes recibieron la vacuna. Un total de 5 participantes no fueron vacunados (1 participante de la preparación de vacuna 4 en el grupo de 2,5 µg, 2 participantes de la preparación de vacuna 5 en el grupo de 2,5 µg, 1 participante de la preparación de vacuna 5 en el grupo de 10 µg y 1 participante de la preparación de vacuna 6 en el grupo de 2,5 µg). Se utilizó un QIV autorizado como comparador.

Seguridad y eficacia - Estudio C4861001

C4861001 es un estudio FIH de fase 1, aleatorizado, controlado con placebo, ciego para el observador y no ciego para el patrocinador, de búsqueda de dosis y selección de composición/formulación de vacunas en adultos sanos. Este estudio evalúa la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de una dosis única de diferentes preparaciones de vacunas

de ARNsa monocistronicos y, en última instancia, bicistronicos contra la influenza. Los participantes de 18 a 49 años de edad son asignados aleatoriamente 4:1 para recibir una preparación de vacuna de ARNsa o un placebo, respectivamente. Un grupo adicional de participantes se inscribe de forma independiente para recibir QIV autorizado como control.

- 5 En la Tabla 4 se proporcionan los detalles de la preparación de la vacuna de ARNsa.

Tabla 13. Detalles de la preparación de la vacuna

Preparación de la vacuna	Estructura principal del vector	Antígeno(s) de la vacuna	Longitud de la cola de Poli A
1. PF-07852352: ARNsa de la influenza (TC83-HA-40A)	TC83	HA (monocistronico)	40
2. PF-07836391: ARNsa de la influenza (TC83-HA-80A)	TC83	HA (monocistronico)	80
3. PF-07836394: ARNsa de la influenza (TC83-MIT2 aBc1-HA-40A)	TC83-MIT2 aBc1	HA (monocistronico)	40
4. PF-07836395: ARNsa de la influenza (TRD-HA-40A)	TRD	HA (monocistronico)	40
5. PF-07836396: ARNsa de la influenza (TC83-NA-80A)	TC83	NA (monocistronico)	80
6. PF-07867246: ARNsa de la influenza (TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A) (bicistronico)	TC83	HA y NA (bicistronico)	80
7. PF-07871987: ARNsa de la influenza (TC83-HA-40A-50U-50pU)	TC83	HA (monocistronico)	40

Abreviaturas: 50pU = 50 % de N1-metilpseudouridina; 50U = 50 % de uridina; HA = hemaglutinina; NA = neuraminidasa; poli A = poliadenilado; SGP = promotor subgenómico; TRD = cepa de burro Trinidad.

Nota: Esta lista no es exhaustiva y se pueden agregar u omitir preparaciones.

Preparaciones de vacunas 1, 2 y grupos de control: participantes aleatorizados

Un total de 36 participantes fueron asignados aleatoriamente a los grupos Preparación de vacuna 1 y Preparación de vacuna 2, 63 participantes en el grupo placebo y 33 participantes en los grupos de control.

Preparación de vacuna 1

En este grupo, 11 participantes recibieron 1 µg, 13 participantes recibieron 2,5 µg y 12 participantes recibieron 10 µg de vacunación. Un participante fue asignado aleatoriamente a 2,5 µg, pero erróneamente recibió una dosis de 1 µg y, por lo tanto, se lo incluyó en el grupo de 1 µg a los efectos del análisis de seguridad.

- 5 Cinco participantes (1 participante del grupo de 1 µg y 2 participantes de cada uno de los grupos de 2,5 µg y 10 µg) se retiraron del estudio después de la vacunación.

Preparación de vacuna 2

En este grupo, 12 participantes recibieron 1 µg, 2,5 µg y 10 µg de vacuna. Un participante del grupo de 1 µg se perdió el seguimiento después de la vacunación.

10 Preparaciones de vacunas 3, 4, 7 y grupos de control: participantes aleatorizados

Un total de 36 participantes fueron asignados aleatoriamente a los grupos de Preparación de vacuna 3, Preparación de vacuna 4 y Preparación de vacuna 7 y 63 participantes al grupo placebo. Un participante del grupo de preparación de vacuna 4, 2,5 µg no fue vacunado.

Preparación de vacuna 3

- 15 En este grupo, 12 participantes recibieron 1 µg, 2,5 µg y 10 µg de vacuna.

Dos participantes del grupo de 1 µg se retiraron del estudio después de la vacunación.

Preparación de vacuna 4

En este grupo, 12 participantes recibieron 1 µg y 10 µg de vacuna, y 11 participantes recibieron 2,5 µg de vacuna.

- 20 Dos participantes (un participante de cada grupo de 1 µg y uno de 10 µg) se retiraron del estudio después de la vacunación.

Preparación de vacuna 7

En este grupo, 12 participantes recibieron 1 µg, 2,5 µg y 10 µg de vacuna.

Preparaciones de vacunas 5, 6 y grupos de control: participantes aleatorizados

- 25 Un total de 38 participantes fueron asignados aleatoriamente a la preparación de vacuna 5, 35 participantes a la preparación de vacuna 6, 63 participantes al grupo placebo y 33

participantes al grupo de control. Tres participantes de la preparación de vacuna 5 (2 participantes del grupo de 2,5 µg y 1 participante del grupo de 10 µg) y 1 participante de la preparación de vacuna 6 de 2,5 µg no fueron vacunados.

Preparación de vacuna 5

- 5 En este grupo, 12 participantes recibieron 1 µg y 2,5 µg de vacuna cada uno, y 11 participantes recibieron 10 µg de vacuna. Dos participantes del grupo de 2,5 µg y un participante del grupo de 10 µg no fueron vacunados.

Dos participantes del grupo de 1 µg se retiraron del estudio después de la vacunación.

Preparación de vacuna 6

- 10 En este grupo, 11 participantes recibieron 1 µg y 2,5 µg de vacuna, y 12 participantes recibieron 10 µg de vacuna. Un participante del grupo de 2,5 µg no fue vacunado.

Cinco participantes (1 participante del grupo de 1 µg y 4 participantes del grupo de 2,5 µg) se retiraron del estudio después de la vacunación.

Inmunogenicidad

- 15 Un total de 253 participantes fueron asignados aleatoriamente para recibir la vacuna, de los cuales 196 fueron evaluables en cuanto a inmunogenicidad.

Se observó un aumento dependiente de la dosis en los GMT de HAI 4 semanas después de la administración de la vacuna. Los GMT de HAI en el día 1 (antes de la vacunación) y a las 1, 2 y 4 semanas después de la administración de la vacuna se muestran en la FIG. 11, FIG.

- 20 12, y FIG. 13.

Preparación de vacunación 1 y 2

La proporción de participantes que logran la seroconversión 4 semanas después de 10 µg es mayor que la proporción de participantes que logran la seroconversión después de 1 µg y 2,5 µg (Tabla 14).

- 25 Preparación de vacunación 3, 4 y 7

En la preparación de vacunación 3, la proporción de participantes que lograron la seroconversión 4 semanas después de 10 µg es mayor que la proporción de participantes que

lograron la seroconversión después de 1 µg y 2,5 µg (Tabla 15).

Tabla 14. Proporción de participantes que lograron seroconversión de HAI para la cepa A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) después de la vacunación - Preparaciones de vacuna 1, 2 y grupos de control - Población de inmunogenicidad evaluable

	Grupo de vacunación (aleatorio)								
	Vax Prep 1				Vax Prep 2				Placebo ^c
	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-15A ^a autorizado	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-18 ^b autorizado	
Punto de tiempo de muestreo ^d	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)
1 semana	10 1 (10,0) (0,3, 44,5)	11 2 (18,2) (2,3, 51,8)	10 1 (10,0) (0,3, 44,5)	15 10 (66,7) (38,4, 88,2)	9 0 (0,0) (0,0, 33,6)	11 2 (18,2) (2,3, 51,8)	11 3 (27,3) (6,0, 61,0)	15 7 (46,7) (21,3, 73,4)	48 1 (2,1) (0,1, 11,1)
2 semanas	10 4 (40,0) (12,2, 73,8)	11 6 (54,5) (23,4, 83,3)	9 8 (88,9) (51,8, 99,7)	15 12 (80,0) (51,9, 95,7)	10 1 (10,0) (0,3, 44,5)	12 7 (58,3) (27,7, 84,8)	11 7 (63,6) (30,8, 89,1)	16 9 (56,3) (29,9, 80,2)	50 2 (4,0) (0,5, 13,7)
4 semanas	10 2 (20,0) (2,5, 55,6)	11 5 (45,5) (16,7, 76,6)	10 8 (80,0) (44,4, 97,5)	15 10 (66,7) (38,4, 88,2)	10 0 (0,0) (0,0, 30,8)	12 7 (58,3) (27,7, 84,8)	11 8 (72,7) (39,0, 94,0)	16 6 (37,5) (15,2, 64,6)	50 3 (6,0) (1,3, 16,5)

	Grupo de vacunación (aleatorio)								
	Vax Prep 1				Vax Prep 2				
	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-15A ^a autorizado	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-18 ^b autorizado	Placebo ^c
Punto de tiempo de muestreo ^d	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)

a. Incluye a los participantes del estudio que recibieron QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C1.

b. Incluye a los participantes del estudio que recibieron QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C2-C5 y C7.

c. Incluye a los participantes en el estudio que recibieron placebo de forma aleatoria.

d. Momento especificado en el protocolo para la toma de muestras de sangre.

e. N = número de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el ensayo especificado tanto antes de la vacunación como en el momento de muestreo especificado.

f. n = Número de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el ensayo especificado que lograron seroconversión de HAI en el momento de muestreo especificado.

g. CI exacto de dos caras basado en el método de Clopper y Pearson.

Nota: HAI se refiere al nombre del ensayo de FLU_HAI_H1N1_WIS19 probado al inicio, 1 semana, 2 semanas después de la vacunación, y FLU_HAI_H1N1_II_WIS19 probado al inicio, 4 semanas después de la vacunación.

Nota: La seroconversión se define como un título de HAI <1:10 antes de la vacunación y ≥1:40 en el momento de interés, o un título de HAI de ≥1:10 antes de la vacunación con un aumento de 4 veces en el momento de interés.

Tabla 15. Proporción de participantes que lograron seroconversión de HAI para la cepa A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) después de la vacunación - Preparaciones de vacuna 3, 4, 7 y grupos de control - Población de inmunogenicidad evaluable

	Grupo de vacunación (aleatorio)									
	Vax Prep 3			Vax Prep 4			Vax Prep 7			
	1 µg	2,5 µg	10 µg	1 µg	2,5 µg	10 µg	1 µg	2,5 µg	QIV-18 ^a autorizado	Placebo ^b

	Grupo de vacunación (aleatorio)									
	Vax Prep 1				Vax Prep 2					
	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-15A ^a autorizado	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-18 ^b autorizado	Placebo ^c	
Punto de tiempo de muestreo ^d	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)
Punto de tiempo de muestreo ^c	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)	N ^d n ^e (%) (CI del 95 % ^f)
1 semana	8 4 (50,0) (15,7 , 84,3)	12 2 (16,7) (2,1, 48,4)	12 3 (25,0) (5,5, 57,2)	9 3 (33,3) (7,5 , 70,1)	8 1 (12,5) (0,3, 52,7)	9 1 (11,1) (0,3, 48,2)	10 1 (10,0) (0,3, 44,5)	12 0 (0,0) (0,0, 26,5)	15 7 (46,7) (21,3, 73,4)	48 1 (2,1) (0,1, 11,1)
2 semanas	8 6 (75,0) (34,9 , 96,8)	12 5 (41,7) (15,2 , 72,3)	12 8 (66,7) (34,9 , 90,1)	11 9 (81,8) (48,2, 97,7)	9 2 (22,2) (2,8, 60,0)	10 3 (30,0) (6,7, 65,2)	11 4 (36,4) (10,9 , 69,2)	12 5 (41,7) (15,2, 72,3)	16 9 (56,3) (29,9, 80,2)	50 2 (4,0) (0,5, 13,7)
4 semanas	8 6 (75,0) (34,9 , 96,8)	12 5 (41,7) (15,2 , 72,3)	12 7 (58,3) (27,7 , 84,8)	11 7 (63,6) (30,8, 89,1)	9 2 (22,2) (2,8, 60,0)	10 4 (40,0) (12,2 , 73,8)	11 4 (36,4) (10,9 , 69,2)	12 4 (33,3) (9,9, 65,1)	16 6 (37,5) (15,2, 64,6)	50 3 (6,0) (1,3, 16,5)

a. Incluye a los participantes del estudio que recibieron QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C2-C5 y C7.

b. Incluye a los participantes en el estudio que recibieron placebo de forma aleatoria.

c. Momento especificado en el protocolo para la toma de muestras de sangre.

d. N = número de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el

	Grupo de vacunación (aleatorio)								
	Vax Prep 1				Vax Prep 2				
	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-15A ^a autorizado	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-18 ^b autorizado	Placebo ^c
Punto de tiempo de muestreo ^d	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)

ensayo especificado tanto antes de la vacunación como en el momento de muestreo especificado.

e. n = Número de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el ensayo especificado que lograron seroconversión de HAI en el momento de muestreo especificado.

f. CI exacto de dos caras basado en el método de Clopper y Pearson.

Nota: HAI se refiere al nombre del ensayo de FLU_HAI_H1N1_WIS19 probado al inicio, 1 semana, 2 semanas después de la vacunación, y FLU_HAI_H1N1_II_WIS19 probado al inicio, 4 semanas después de la vacunación.

Nota: La seroconversión se define como un título de HAI <1:10 antes de la vacunación y ≥1:40 en el momento de interés, o un título de HAI de ≥1:10 antes de la vacunación con un aumento de 4 veces en el momento de interés.

Tabla 16. Proporción de participantes que lograron seroconversión de HAI para la cepa A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) después de la vacunación - Preparaciones de vacuna 5, 6 y grupos de control - Población de inmunogenicidad evaluable

	Grupo de vacunación (aleatorio)							
	Vax Prep 5			Vax Prep 6				
	1 µg	2,5 µg	QIV-18 ^a autorizado	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV - 15B ^b autorizado	Placebo ^c
Punto de tiempo de muestreo ^d	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^f n ^g (%) (CI del 95 % ^h)	N ^f n ^g (%) (CI del 95 % ^h)	N ^f n ^g (%) (CI del 95 % ^h)	N ^f n ^g (%) (CI del 95 % ^h)	N ^f n ^g (%) (CI del 95 % ^h)	N ^f n ^g (%) (CI del 95 % ^h)	N ^f n ^g (%) (CI del 95 % ^h)

	Grupo de vacunación (aleatorio)								
	Vax Prep 1				Vax Prep 2				
	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-15A ^a autorizado	1 µg	2,5 µg	10 µg	QIV-18 ^b autorizado	Placebo ^c
Punto de tiempo de muestreo ^d	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)	N ^e n ^f (%) (CI del 95 % ^g)
1 semana	10 0 (0,0) (0,0, 30,8)	10 0 (0,0) (0,0, 30,8)	15 7 (46,7) (21,3, 73,4)	8 0 (0,0) (0,0, 36,9)	6 0 (0,0) (0,0, 45,9)	12 1 (8,3) (0,2, 38,5)	13 5 (38,5) (13,9, 68,4)	48 1 (2,1) (0,1, 11,1)	
2 semanas	10 0 (0,0) (0,0, 30,8)	10 0 (0,0) (0,0, 30,8)	16 9 (56,3) (29,9, 80,2)	7 2 (28,6) (3,7, 71,0)	6 1 (16,7) (0,4, 64,1)	12 5 (41,7) (15,2, 72,3)	13 7 (53,8) (25,1, 80,8)	50 2 (4,0) (0,5, 13,7)	
4 semanas	10 0 (0,0) (0,0, 30,8)	11 0 (0,0) (0,0, 28,5)	16 6 (37,5) (15,2, 64,6)	8 3 (37,5) (8,5, 75,5)	6 2 (33,3) (4,3, 77,7)	12 6 (50,0) (21,1, 78,9)	13 5 (38,5) (13,9, 68,4)	50 3 (6,0) (1,3, 16,5)	

a. Incluye a los participantes del estudio que recibieron QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C2-C5 y C7.

b. Incluye a los participantes del estudio que recibieron QIV autorizado, cuyos datos VRD se probaron al mismo tiempo que se probaron los datos VRD de los grupos C6.

c. Incluye a los participantes en el estudio que recibieron placebo de forma aleatoria.

d. Momento especificado en el protocolo para la toma de muestras de sangre.

e. N = número de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el ensayo especificado tanto antes de la vacunación como en el momento de muestreo especificado.

f. n = Número de participantes con resultados de ensayo válidos y determinados para el ensayo especificado que lograron seroconversión de HAI en el momento de muestreo especificado.

g. CI exacto de dos caras basado en el método de Clopper y Pearson.

Nota: HAI se refiere al nombre del ensayo de FLU_HAI_H1N1_WIS19 probado al inicio, 1 semana, 2 semanas después de la vacunación, y FLU_HAI_H1N1_II_WIS19 probado al inicio, 4 semanas después de la vacunación.

Nota: La seroconversión se define como un título de HAI <1:10 antes de la vacunación y ≥1:40 en el momento de interés, o un título de HAI de ≥1:10 antes de la vacunación con un aumento de 4 veces en el momento de interés.

En la preparación de vacunación 4, la proporción de participantes que lograron la seroconversión 4 semanas después de 1 µg es mayor que la proporción de participantes que lograron la seroconversión después de 2,5 µg y 10 µg (Tabla 12).

5 En la preparación de vacunación 7, la proporción de participantes que logran la seroconversión 4 semanas después de 1 µg es igual a la proporción de participantes que logran la seroconversión después de 2,5 µg (Tabla 12).

Preparación de vacunación 5 y 6

10 En la preparación de vacunación 5, ningún participante logró seroconversión después de 4 semanas. En la preparación de vacunación 6, la proporción de participantes que lograron la seroconversión 4 semanas después de 10 µg es mayor que la proporción de participantes que lograron la seroconversión después de 1 µg y 2,5 µg (Tabla 13).

EJEMPLO 10: MAYOR POTENCIA DEL ARNSA CONTRA LA GRIPE MEDIANTE EL SUMINISTRO CONJUNTO DE ARNMOD-NS1 EN TRANS

15 Utilizamos una plataforma ARNSa basada en el genoma del alfavirus de la encefalitis equina venezolana en donde los genes estructurales bajo un promotor subgenómico (SGP) fueron reemplazados por un antígeno vacunal. Utilizamos hemaglutinina de influenza (HA) derivada de A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) como nuestro antígeno de vacuna de interés. Al ser suministrado en la célula, el ARNSa expresa una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP) que replica el ARN y hace múltiples copias de los genes expresados bajo el SGP.

20 Una posible estrategia para evadir la detección inmune innata potencialmente inducida por el suministro de ARNSa se basa en el uso de proteínas que pueden inhibir eficientemente la cascada de inducción y/o señalización del interferón (IFN), similar al mecanismo utilizado por diferentes virus de ARN para evadir el reconocimiento inmune innato. En el presente trabajo, a menos que se indique expresamente lo contrario en el presente documento, hemos utilizado

25 el antígeno de influenza NS1 de A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1) (AF389122 de Genbank (NCBI), un antagonista de IFN conocido y potente, para mejorar la expresión de ARNSa in vitro en células HeLa, una línea celular sensible a ARNSa. La secuencia NS1 fue optimizada por codones por un proveedor comercial. Nuestros datos muestran que el suministro conjunto de pequeñas cantidades de NS1 en trans como ARNmod puede aumentar significativamente

30 los niveles de expresión de ARNSa-HA y ayuda a preservar la viabilidad celular general. Estos resultados proporcionan evidencia de que las proteínas antagonistas de IFN pueden bloquear eficazmente la respuesta inmune innata inducida naturalmente por ARNSa y podrían usarse

potencialmente para mejorar la inmunogenicidad y la eficacia de las vacunas de ARNsa. Mostramos en la FIG. 14, que la adición de modNS1 en trans aumenta la expresión de ARNsa HA y la viabilidad celular en células Hela. Como se utiliza en este documento, “modNS1” se refiere a un polinucleótido que codifica la proteína NS1, en donde el polinucleótido incluye N1-metilpseudouridina (m1ψ). FIG. 14 representa una mayor expresión del antígeno ARNsa y la viabilidad celular tras el suministro conjunto de modNS1 en trans. Se transfectaron cantidades crecientes de modNS1 o modGFP (como control) en células HeLa combinadas con 25 ng de ARNsa-HA-Wisconsin. Se midieron el (%) de células HA positivas, los niveles de expresión de proteínas (MFI) y el número total de células para evaluar la viabilidad celular a las 24 h. C. Imágenes confocales (10X) de células HeLa transfectadas con 25 ng de ARNsa-HA-Wisconsin solo (izquierda) o con 25 ng de modNS1 (derecha). Las células se fijaron a las 24 horas y se tiñeron con anticuerpo monoclonal humano FI6 HA y anticuerpo secundario de cabra anti-A647 humano. También demostramos que dosis bajas de modNS1 son suficientes para aumentar la expresión de HA del ARNsa que contiene nucleósidos no modificados o modificados. Ver. FIG. 15, FIG. 16, y FIG. 17, que ilustran que las dosis bajas de modNS1 aumentan la expresión de antígeno en ARNsa regular y ARNsa que contiene 50 % m1ψ A. Se transfectó una cantidad total de 25 ng de ARNsa-HA-Wisconsin en células HeLa en combinación con cantidades bajas y crecientes de modNS1 (1 ng a 25 ng) en azul (es decir, “RMM59 + NS1”) o ARNsa (como un control de nivel de dosis coincidente) en rojo (es decir, “RMM59+(X)RMM59”). Las células se fijaron a las 24 horas y se tiñeron con anticuerpo monoclonal humano FI6 HA y anticuerpo secundario de cabra anti-A488 humano. Se midieron el (%) de células HA positivas y el número de células. Se observaron imágenes confocales (10X) de células HeLa transfectadas con 25 ng de ARNsa-HA-Wisconsin solo o con 25 ng de modNS1 (datos no mostrados). La Tabla 17 resume las cantidades transfectadas, el % de células HA(+) y el número absoluto de células obtenidas para cada una de las condiciones probadas.

Tabla 17

	ARNsa+NS1	ARNsa	%HA ARNsa+NS1	#células ARNsa+NS1
0	25+0	25	22,5	16.248
1	25+1	26	48,7	21.778
2	25+2	27	52,2	21.981
5	25+5	30	61,2	22.661
10	25+10	35	66,2	23.748
15	25+15	40	67,9	23.000
20	25+20	45	73,0	22.045
25	25+25	50	72,2	20.784

*RMM59→ se refiere a ARNsa HA Wisconsin

FIG. 16. Se probaron las mismas condiciones que las descritas para la FIG. 15 (y los asociados Tabla 17) que utilizan un ARNsa que codifica para HA Wisconsin pero que contiene 50 % m1ψ se muestran en la FIG. 16 y asociados Tabla 18.

5 Tabla 18

	ARNsa+NS1	ARNsa	%HA ARNsa+NS1	#células ARNsa+NS1
0	25+0	25	39,9	16.415
1	25+1	26	57,5	19.748
2	25+2	27	66,3	21.728
5	25+5	30	65,0	21.944
10	25+10	35	72,4	21.306
15	25+15	40	71,4	20.942
20	25+20	45	71,2	20.009
25	25+25	50	70,3	17.717

*RMM59→ se refiere a ARNsa HA Wisconsin

EJEMPLO 11: PRESENCIA DE modNS1 Y EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE ARNsa EN MONOCITOS HUMANOS

FIG. La figura 17 muestra datos que indican que la replicación de ARNsa en monocitos humanos puede mejorarse. Las células CD14+ humanas (células madre) se transfectaron con diferentes dosis de ARNsa que expresaba GFP (5 ng a 100 ng) en combinación con dosis crecientes de modNS1 (0 a 50 ng) y utilizando ARNmod GFP como control. El total (%) de células positivas se midió mediante FACS a las 24 horas, así como la viabilidad celular. FIG. 18 muestra el total (%) de células positivas medido mediante tinción de agua vivo/muerto.

15 EJEMPLO 12: EL SUMINISTRO DE modNS1 EN TRANS ES UNA VENTAJA SOBRE UN ENFOQUE cis (BICISTRÓNICO)

FIG. 19A respalda que el ARNsa monocistrónico en combinación con modNS1 contribuye a niveles más altos de HA en comparación con un enfoque bicistrónico. Un ARNsa monocistrónico que expresa HA o una configuración bicistrónica que expresa tanto HA como NS1 se transfectó en células HeLa solo o en combinación con 10 ng o 25 ng de modNS1. Se midieron el (%) de células HA positivas y los niveles de expresión de proteínas (MFI). Las células se fijaron a las 24 horas y se tiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo contra HA y un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo A647. FIG. 19B: Diagramas de las diferentes

configuraciones de ARNsa (monocistrónico y bicistrónico) solo o en combinación con modNS1 como se muestra en la FIG. 19A.

EJEMPLO 13: modNS1 AUMENTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE uARN PERO NO ARNMOD

5 Fig. 20A-20B NS1 es capaz de aumentar la expresión del antígeno HA de los ARN que contienen uridina regular. Se agregó una cantidad total constante de 100 ng de ARN por condición a las células HeLa. Se agregaron ARN U (es decir, ARN no modificado) o ARNmod regular en combinación con modNS1 o modGFP (control) en diferentes proporciones y se evaluaron el % de células HA(+) (Fig. 20A) y el número de células (Fig. 20B) a las 24 h. Se observaron imágenes confocales en células HeLa que comparaban 100 ng de RMM71 (ARNu HA Wisconsin) y 50 ng de ARNu combinado con 50 ng de modNS1 (datos no mostrados). Las células se fijaron a las 24 horas y se tiñeron con anticuerpo monoclonal humano FI6 HA y anticuerpo secundario de cabra anti-A647 humano. Figura 20C: Diagramas comparativos de las diferentes configuraciones probadas.

EJEMPLO 14: SUMINISTRO DEL modNS1 EN TRANS

El suministro de modNS1 en trans aumenta significativamente la expresión del antígeno ARNsa y ayuda a preservar la viabilidad celular. Véase la FIG. 21.

Otros hallazgos basados en la presente divulgación incluyen: modNS1 en combinación con ARNsa que contiene 50 % de nucleósidos modificados promueve una expresión de antígeno más eficiente y ayuda a preservar la viabilidad celular. modNS1 aumenta la expresión de antígenos de ARNu pero no de ARNmod, lo que sugiere un papel de NS1 en la prevención de la activación de las respuestas inmunes innatas celulares inducidas por la uridina. Y modNS1 no mejora la expresión del antígeno ARNsa en monocitos humanos.

EJEMPLO 15: INMUNOGENICIDAD DE LAS VACUNAS DE ARNsa OCTAVALENTES HA/NA contra la influenza EN RATONES

Este estudio se realizó para probar la inmunogenicidad de las vacunas de ARNsa-LNP octavales que codifican los antígenos HA y NA de cuatro cepas del virus de la influenza en un modelo de ratón. Los constructos de ARNsa utilizadas en este estudio codificaron las proteínas hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) de las cepas del virus de la influenza A/Wisconsin/588/2019, A/Cambodia/e0926360/2020, B/Phuket/3073/2013 o B/Washington/02/2019. En comparación con el comparador autorizado FluAd, las vacunas de

ARNsa-LNP octavalentes provocaron niveles comparables o superiores de anticuerpos funcionales anti-HA, anti-NA y neutralizantes del virus.

Las formulaciones de vacunas octavalentes compuestas por Constructos de ARNsa monocistrónico o bicistrónico tuvieron una inmunogenicidad comparable en ratones después de dos dosis. Las vacunas de ARNsa multivalentes mezcladas antes (“premezcla”) o después (“postmezcla”) con LNP tuvieron una inmunogenicidad comparable en ratones. Las vacunas de ARNsa-LNP octavalentes dieron como resultado una interferencia modesta para algunas cepas de virus, en particular para la inmunogenicidad de las cepas del virus de la influenza B, en comparación con los ratones vacunados con controles de antígeno único monocistrónico. En general, estos datos respaldan la evaluación continua de vacunas de ARNsa multivalentes que codifican antígenos del virus de la influenza.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad de las vacunas de ARNsa octavalentes que codifican las proteínas hemaglutinina (HA) o neuraminidasa (NA) de los virus de la influenza con controles de vacunas de ARNsa monocistrónico y bicistrónico en ratones. Las vacunas octavalentes estaban compuestas por ocho ARNsa HA o NA monocistrónicos o cuatro Constructos de ARNsa HA-NA bicistrónicos. Las vacunas de ARNsa octavalentes también se compararon con un comparador de vacuna de la influenza inactivada cuadrivalente autorizado (que contiene 8 antígenos HA/NA de 4 cepas) y una vacuna cuadrivalente de ARN modificado (ARNmod)-LNP que codifica 4 proteínas HA. Un objetivo secundario de este estudio fue comparar la inmunogenicidad de los constructos de vacunas octavalentes combinadas antes o después de la formulación con nanopartículas lipídicas (LNP) en el modelo de ratón.

En este estudio se probaron Constructos de ARNsa (TC83-delkozak-80A) que codificaban solo HA o NA (monocistrónico) o ambas proteínas HA y NA (bicistrónico) de H1N1 A/Wisconsin/588/2019, H3N2 A/Cambodia/e0926360/2020, B/Yam B/Phuket/3073/2013 o B/Vic B/Washington/02/2019. Se probaron en ratones formulaciones octavalentes, que comprenden 8 ARNsa monocistrónicos (TC83-delkozak-HA-80A o TC83-delkozak-NA-80A) o 4 bicistrónicos (TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A) formulados en LNP. Las vacunas de ARNsa octavalentes se mezclaron antes de la formulación en LNP (premezcladas) o se mezclaron después de la formulación de cada constructo de ARNsa en LNP (posmezcladas). En este estudio se incluyeron dos comparadores alternativos de vacunas tetravalentes: una vacuna de ARN modificado con nucleósidos (ARNmod)-LNP que codifica 4 proteínas HA y FluAd, un comparador autorizado compuesto por 4 virus de influenza inactivados. También se incluyeron

vacunas de ARNsa-LNP monocistrónico y bicistrónico de cada cepa como controles para evaluar cualquier posible interferencia en las respuestas de anticuerpos observadas en las formulaciones de vacunas octavalentes.

Este estudio fue diseñado con 20 grupos como se muestra en Tabla 19, cada uno con un total de 10 ratones hembra (cepa de ratones: Balb/c). Los ensayos del programa de estudio utilizados en el estudio se documentan a continuación.

Tabla 19 Diseño del estudio

Gp #	Ratones	Descripción de ARN DP	Dosis (µg)	Dosis Vol / Ruta	Vax (Día)	Sangrado (Día)
1	10	Salina	-	50 µL / IM	0, 28	21, 42
2	10	ARNsa RMM234 A/Wisconsin (H1N1) NA monocistrónico	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
3	10	ARNsa RMM235 A/Wisconsin (H1N1) HA monocistrónico	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
4	10	RMM223 A/Cambodia (H3N2) ARNsa HA monocistrónico	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
5	10	RMM226 A/Cambodia (H3N2) ARNsa NA monocistrónico	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
6	10	RMM224 B/Phuket (By) ARNsa de HA monocistrónico	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
7	10	RMM227 B/Phuket (By) ARNsa de NA monocistrónico	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
8	10	ARNsa de HA monocistrónico RMM225 B/Washington (Bv)	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
9	10	ARNsa de NA monocistrónico RMM228 B/Washington (Bv)	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
10	10	8x ARNsa monocistrónicos premezclados y coformulados	1,6	50 µL / IM	0, 28	21, 42
11	10	8x ARNs monocistrónicos postmezclados	1,6	50 µL / IM	0, 28	21, 42
12	10	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Wisconsin (bicistrónico)	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
13	10	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Cambodia (bicistrónico)	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
14	10	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Phuket (bicistrónico)	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
15	10	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Washington (bicistrónico)	0,2	50 µL / IM	0, 28	21, 42
16	10	4x ARNsa bicistrónico premezclado & coformulado	0,8	50 µL / IM	0, 28	21, 42
17	10	4x ARNsa bicistrónico posmezclados	0,8	50 µL / IM	0, 28	21, 42

Gp #	Ratones	Descripción de ARN DP	Dosis (µg)	Dosis Vol / Ruta	Vax (Día)	Sangrado (Día)
18	10	ARNmod cuadrivalente (4x ARNmod-HA RMM71, 81, 90, 91 premezclados)	0,887	50 µL / IM	0, 28	21, 42
19	10	Comparador de vacunas contra la gripe autorizado (FluAd-QIV)	12	100 µL/IM (50 µL/sitio)	0, 28	21, 42
20	10	Comparador de vacunas contra la gripe autorizado (FluAd-QIV)	2,4	20 µL/IM	0, 28	21, 42

Ensayos para el estudio:

HAI (grupos 1,3,4,6,8,10-20);

NAI (grupos 1,2,5,7,9,10-17, 19, 20);

1D neut

5 D21, 42

Se llenó una jeringa de 0,3 mL hasta 0,05 mL y se administró la vacuna por vía intramuscular a cada animal. El procedimiento se repitió el día 28 para la vacunación de refuerzo.

Tabla 20 Artículos de prueba y diluyente para el estudio

Artículo #	Artículos de prueba/Diluyente	Matriz de formulación e información	Gps para utilizar	Viales#/Almacenamiento
1	Salina	0,9 % de NaCl en agua	1 y como diluyente para los grupos 2-18	2 botellas RT
2	LNP RMM234 A/Wisconsin (H1N1) ARNsa NA monocistrónico Lote # 00715982-0040-G2	0,083 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	2 y 11	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 11, 2 extra
3	LNP RMM235 A/Wisconsin (H1N1) ARNsa HA monocistrónico Lote # 00715982-0040-G3-repetición	0,06 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris, 10 % sacarosa, 20 mM ácido glutámico, pH 7,4	3 y 11	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 11, 2 extra

Artículo #	Artículos de prueba/Diluyente	Matriz de formulación e información	Gps para utilizar	Viales#/Almacenamiento
4	RMM223 A/Cambodia (H3N2) ARNsa HA monocistrónico	0,065 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	4 y 11	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 11, 2 extra
5	RMM226 A/Cambodia (H3N2) ARNsa NA monocistrónico	0,084 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	5 y 11	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 11, 2 extra
6	RMM224 B/Phuket (By) ARNsa HA monocistrónico	0,077 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	6 y 11	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 11, 2 extra
7	RMM227 B/Phuket (By) ARNsa NA monocistrónico	0,075 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	7 y 11	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 11, 2 extra
8	ARNsa de HA monocistrónico RMM225 B/Washington (Bv)	0,086 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	8 y 11	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 11, 2 extra
9	ARNsa de NA monocistrónico RMM228 B/Washington (Bv)	0,065 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	9 y 11	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 11, 2 extra
10	8x ARNsa monocistrónicos premezclados y coformulados	0,066 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	10	10 viales de 0,3 mL -80 °C (3) cebado, (3) refuerzo, 4 adicionales
11	TC83-delkozak- HA-SGP-NA-80A Wisconsin (bicistrónico)	0,081 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	12 y 17	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 17, 2 extra
12	TC83-delkozak- HA-SGP-NA-80A Cambodia (bicistrónico)	0,070 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	13 y 17	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 17, 2 extra
13	TC83-delkozak- HA-SGP-NA-80A Phuket (bicistrónico)	0,065 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	14 y 17	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 17, 2 extra

Artículo #	Artículos de prueba/Diluyente	Matriz de formulación e información	Gps para utilizar	Viales#/Almacenamiento
14	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Washington (bicistrónico)	0,066 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	15 y 17	7 x viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, (3) para gps 17, 2 extra
15	4x ARNsa bicistrónico y premezclado coformulado	0,060 mg/mL de ARNsa LNP en 10 mM Tris 10 % Sacarosa 20 mM Ácido glutámico, pH 7,4	16	4 viales de 0,3 mL -80 °C (2) cebado, (2) refuerzo, 2 adicionales
16	ARNmod tetavalente (4x ARNmod-HA RMM71, 81, 90, 91 premezclados)	0,111 mg/mL de LNP de ARNmod en 10 mM Tris 300 mM Sacarosa, pH 7,4	18	4 viales de 0,3 mL -80 °C (1) cebado, (1) refuerzo, 2 adicionales
17	Quad FluAd (NH21-22) – 60 µg/0,5 mL (15 µg por cepa)	A/Victoria/2570/2019 IVR-215, A/Cambodia/e0826360/2020 IVR-224, B/Victoria/705/2018 BVR-11, B/Phuket/3073/2013 BVR-1B	19 y 20	6 jeringas de 0,5 mL 2-8 °C (para cebado y refuerzo)

Tabla 21 Materiales de productos farmacéuticos y resultados analíticos

Grupo #	Descripción del ARN	Concentración	Encapsulación (%)	Tamaño (nm)	PD	Integridad por FA (%)	Cap % (*DS)	T0 IVE Células positivas	% IVE EC50	Endotoxina (EU/mL)
2,11	RMM234 A/Wisconsin (H1N1) ARNsa NA monocistrónico	83 µg/mL	94 %	61	0,15	Principal: 86 %, LMS: 6 %	100 %	NA: 84 % (125 ng)	NA: 20 ng	<0,05 EU/mL
3,11	RMM235 A/Wisconsin (H1N1) ARNsa HA monocistrónico	60 µg/mL	94 %	61	0,16	Principal: 75 %, LMS: 8 %	100 %	HA: 79 % (125 ng)	HA: 20 ng	<0,05 EU/mL
4,11	RMM223 A/Cambodia (H3N2) ARNsa HA monocistrónico	65 µg/mL	93 %	62	0,14	Principal: 84 %, LMS: 6 %	98 %	HA: 86 % (125 ng)	HA: 24 ng	<0,05 EU/mL

Grupo #	Descripción del ARN	Concentración	Encapsulación (%)	Tamaño (nm)	PD	Integridad por FA (%)	Cap % (*DS)	T0 IVE % Células positivas	IVE EC50	Endotoxina (EU/mL)
	0									
5,11	RMM226 A/Cambodia (H3N2) ARNsa NA monocistrónico	84 µg/mL	95 %	62	0,16	Principal: 86 %, LMS: 5 %	99 %	NA: 72 % (125 ng)	NA: 61 ng	0,07 EU/mL
6,11	RMM224 B/Phuket (By) ARNsa HA monocistrónico	77 µg/mL	94 %	62	0,15	Principal: 88 %, LMS: 5 %	98 %	HA: 87 % (125 ng)	HA: 12 ng	0,18 EU/mL
7,11	RMM 227 B/Phuket (By) ARNsa NA monocistrónico	75 µg/mL	97 %	61	0,13	Principal: 87 %, LMS: 5 %	99 %	NA: 71 % (125 ng)	NA: 24 ng	<0,05 EU/mL
8,11	RMM225 B/Washington (Bv) ARNsa HA monocistónico	86 µg/mL	97 %	63	0,16	Principal: 85 %, LMS: 6 %	98 %	HA: 88 % (125 ng)	HA: 17 ng	<0,05 EU/mL
9,11	ARNsa de NA monocistrónico RMM228 B/Washington (Bv)	65 µg/mL	97 %	61	0,15	Principal: 84 %, LMS: 7 %	99 %	NA: 75 % (125 ng)	NA: 18 ng	0,07 EU/mL
10	8x ARNsa monocistrónicos premezclados y coformulados	72 µg/mL	96 %	58	0,12	Principal: 79 %, LMS: 7 %	N/A	A/Wisc HA: 55 % (125 ng) NA: 58 % (125 ng) A/Cam HA: 62 % (63 ng) NA: 29 % (63 ng) B/Phu HA: 54 % (63 ng) NA: 58 % (63 ng)	A/Wisc HA: 64 ng NA: 42 ng A/Cam HA: 18 ng NA: >125 ng B/Phu HA: 30 ng NA: 22 ng B/Wash HA: 8 ng NA: 7 ng	<0,05 EU/mL

Grupo #	Descripción del ARN	Concentración	Encapsulación (%)	Tamaño (nm)	PD	Integridad por FA (%)	Cap % (*DS)	T0 IVE % Células positivas	IVE EC50	Endotoxina (EU/mL)
								B/Wash HA: 69 % (63 ng) NA: 62 % (63 ng)		
12,17	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Wisconsin (bicistrónico)	81 µg/mL	98 %	59	0,14	Principal: 80 %, LMS: 5 %	100 %	HA: 91 % (125 ng) NA: 93 % (125 ng)	HA: 26 ng NA: 25 ng	<0,05 EU/mL
13,17	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Cambodia (bicistrónico)	70 µg/mL	98 %	63	0,16	Principal: 85 %, LMS: 6 %	100 %	HA: 89 % (125 ng) NA: 87 % (125 ng)	HA: 31 ng NA: 40 ng	<0,05 EU/mL
14,17	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Phuket (bicistrónico)	65 µg/mL	98 %	60	0,17	Principal: 85 %, LMS: 7 %	100 %	HA: 92 % (125 ng) NA: 93 % (125 ng)	HA: 18 ng NA: 17 ng	<0,07 EU/mL
15,17	TC83-delkozak-HA-SGP-NA-80A Washington (bicistrónico)	66 µg/mL	98 %	60	0,14	Principal: 86 %, LMS: 6 %	100 %	HA: 92 % (125 ng) NA: 95 % (125 ng)	HA: 22 ng NA: 15 ng	<0,05 EU/mL
16	4x ARNs bicistrónico premezclado y coformulado	60 µg/mL	95 %	66	0,19	Principal: 84 %, LMS: 5 %	N/A	HA/Wisc: 66 % (125 ng) HA/Cam: 55 % (125 ng) HA/Phu: 74 % (125 ng) HA/Wash: 80 % (125 ng) NA/Wisc: 71 % (125 ng)	HA/Wisc: 30 ng HA/Cam: 65 ng HA/Phu: 13 ng HA/Wash: 9 ng NA/Wisc: 27 ng	0,16 EU/mL

Grupo #	Descripción del ARN	Concentración	Encapsulación (%)	Tamaño (nm)	PD	Integridad por FA (%)	Cap % (*DS)	T0 IVE % Células positivas	IVE EC50	Endotoxina (EU/mL)
								NA/Cam: 53 % (125 ng) NA/Phu: 87 % (125 ng) NA/Wash: 82 % (125 ng)	NA/Cam: 69 ng NA/Phu: 6 ng NA/Wash: 8 ng	
18	Material QuadMod Tox	111 µg/mL	94 %	71	0,16	Principal: 92 %, LMS: NMT 3 %	HA/Wisconsin: 89 % HA/Cambodia: 90 % HA/Phuket: 90 % HA/Phu: 90 % HA/Washington: 90 % HA/Wash: 88 %	HA/Wisconsin de células positivas: 90 % (125 ng/pocillo) HA/Cambodia de células positivas: 95 % (31 ng/pocillo) HA/Phuket % de células positivas: 77 % (31 ng/pocillo) HA/Washington % de células positivas: 86 % (31 ng/pocillo)	HA/Wisconsin EC50: 41 ng/pocillo HA/Cambodia EC50: 7 ng/pocillo HA/Phuket EC50: 17 ng/pocillo HA/Wash EC50: 11 ng/pocillo	<0,5 EU/mL

La inyección intramuscular en ratones de una dosis de una vacuna octavalente ARNsa-LNP (es decir, “4x ARNsa bicistrónico”) que codifica los antígenos HA y NA de 4 cepas del virus de la influenza provocó una respuesta anti-HA funcional robusta (**FIG. 22**), anti-NA (**FIG. 23**) y anticuerpos neutralizantes del virus (**FIG. 24**). En general, los niveles de anticuerpos HAI provocados hacia las cepas de IAV fueron más altos que los provocados hacia las cepas de IBV después de una dosis única (**FIG. 22**). Las vacunas de ARNsa-LNP octavales provocaron títulos de HAI y de neutralización comparables o ligeramente superiores a los de la vacuna ARNmod cuadrivalente o FluAd (en la dosis de 12 µg o 2,4 µg). Los niveles de anticuerpos inhibidores de la neuraminidasa (NAI) provocados mediante vacunas de ARNsa-LNP octavales en el día 21 mostraron una tendencia ligeramente inferior a la de los controles con un solo antígeno, pero una tendencia superior a la de los títulos de NAI

provocados mediante FluAd (en la dosis de 12 µg o 2,4 µg) (**FIG. 23**). En general, los títulos de neutralización del virus provocados después de una dosis de la vacuna de ARNsa octavalente fueron comparables o superiores a una dosis única de la vacuna ARNmod cuadrivalente o FluAd (en la dosis de 12 µg o 2,4 µg) (**FIG. 24**).

5 Todos los grupos recibieron una segunda dosis de vacuna el día 28 y se extrajo sangre 14 días después, el día 42. Siguiendo la 2^{do} dosis, anti-HA funcional (**FIG. 25**), anti-NA (**FIG. 26**) y anticuerpos neutralizantes del virus (**FIG. 27**) se reforzaron en todos los grupos de vacunas. Los títulos de HAI y de neutralización del virus provocados hacia A/Cambodia/e0926360/2020 fueron los menos afectados por la formulación multivalente, en donde las vacunas
10 octavalentes y de antígeno único provocaron títulos similares a este virus (**FIG. 25, FIG. 27**). Después de dos dosis de vacuna, los títulos de NAI provocados con vacunas de ARNsa-LNP octavalentes fueron comparables o superiores a los títulos provocados con una dosis de 12 µg o 2,4 µg de FluAd (**FIG. 26**). Con la excepción de los títulos neutralizantes del virus provocados con A/Cambodia/e0926360/2020, las vacunas de ARNsa-LNP octavalentes
15 provocaron títulos neutralizantes comparables o superiores a los de una vacuna ARNmod-LNP que codifica HA cuadrivalente o FluAd (dosis de 12 µg o 2,4 µg) después de dos dosis de vacuna (**FIG. 27**).

Para evaluar si la vacuna octavalente se preparaba mejor premezclando primero todas los constructos de ARNsa seguido de la formulación con LNP (premezcla) o mezclando las
20 vacunas de ARNsa-LNP después de la formulación (posmezcla), se comparó la inmunogenicidad de cada proceso. Se evaluaron formulaciones de premezcla y posmezcla para vacunas octavalentes compuestas por 8 ARNsa monocistrónicos HA o NA, así como para la vacuna octavalente compuesta por 4 ARNsa bicistrónicos (HA-SGP-NA). Ambos métodos de preparación provocaron niveles similares de anti-HA funcional (**FIG. 22, FIG. 25**),
25 anti-NA (**FIG. 23, FIG. 26**) y anticuerpos neutralizantes del virus (**FIG. 24, FIG. 27**) después de una o más dosis (**FIG. 22, FIG. 23, FIG. 24**) o dos dosis de vacuna (**FIG. 25, FIG. 26, FIG. 27**). Estos datos sugieren que las vacunas de ARNsa multivalentes que se coformulan y las agrupadas después de la formulación tienen una inmunogenicidad comparable.

En este estudio también se evaluó la inmunogenicidad de una vacuna de ARNsa-LNP
30 octavalente compuesta por ocho Constructos ARNsa monocistrónico o cuatro Constructos ARNsa bicistrónicos (HA-SGP-NA). No se observó ninguna diferencia en los títulos de HAI contra las cepas de IBV en este momento para las vacunas octavalentes monocistrónicas o bicistrónicas. Para el día 42 (2 semanas después de la dosis 2), los títulos de HAI para las

cepas IAV e IBV fueron comparables en los ratones a los que se les administraron vacunas octavalentes de constructos de ARNs monocistrónico o bicistrónico (**FIG. 25**). Tres semanas después de la dosis 1, los niveles de anticuerpos neutralizantes provocados por las vacunas octavalentes monocistrónicas o bicistrónicas fueron en general comparables (**FIG. 24**), con la excepción de los títulos provocados hacia A/Cambodia/e0926360/2020, en el que la formulación de la vacuna octavalente monocistrónica provocó títulos aproximadamente 10 veces más altos que la vacuna octavalente bicistrónica. Después de una segunda dosis, los niveles de anticuerpos neutralizantes para los cuatro virus fueron comparables en los ratones que recibieron la vacuna de ARNs octavalente monocistrónica o bicistrónica (**FIG. 27**).

El objetivo de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad de las vacunas de ARNs-LNP octavalentes que codifican los antígenos HA y NA de cuatro cepas del virus de la influenza en un modelo de ratón. Los anticuerpos anti-HA funcionales, medidos mediante el ensayo HAI, los anticuerpos anti-NA funcionales, medidos mediante el ensayo NAI, y los anticuerpos neutralizantes del virus, medidos mediante un MNT de 1 día, fueron todos provocados después de dos dosis de las formulaciones de la vacuna octavalente. Al comparar las vacunas octavalentes compuestas por 8 Constructos de ARNs monocistrónicos o 4 bicistrónicos, la vacuna octavalente monocistrónica fue modestamente superior después de una sola dosis, pero después de dos dosis de vacuna las vacunas octavalentes monocistrónicas y bicistrónicas tuvieron una inmunogenicidad comparable. Se observó una inmunogenicidad similar entre las vacunas de ARNs octavalentes coformuladas (premezcla) y las que se agruparon después de la formulación (posmezcla). En comparación con una vacuna ARNmod-LNP que codifica HA cuadrivalente y FluAd, las vacunas de ARNs octavalentes en general pudieron provocar una inmunogenicidad comparable o superior a la de estos comparadores.

FIG. 22 Se vacunaron ratones por vía intramuscular el día 0 con ARNs(s) que codifican HA o con HA/NA formulados en LNP, una vacuna ARNmod-LNP cuadrivalente que codifica HA o el comparador autorizado, FluAd. Los sueros se recolectaron 3 semanas después de la vacunación (día 21, 3 semanas PD1). Los títulos de anticuerpos anti-HA funcionales contra A/Wisconsin/588/2019 (arriba a la izquierda), A/Cambodia/e0926360/2020 (arriba a la derecha), B/Phuket/3073/2013 (abajo a la izquierda) o B/Washington/02/2019 (abajo a la derecha) se midieron en suero recolectado de ratones (n = 5) mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI). Los títulos medios geométricos (GMT) en cada punto de tiempo se muestran en la parte superior de cada gráfico y se indican mediante líneas horizontales. Los títulos negativos se grafican en el LOD del ensayo, indicado por la línea de

puntos.

FIG. 23 Se vacunaron ratones por vía intramuscular el día 0 con ARNsa que codificaba HA o HA/NA formulados en LNP o el comparador autorizado, FluAd. Los sueros se recolectaron 3 semanas después de la vacunación (día 21, 3 semanas PD1). Los títulos de anticuerpos anti-NA funcionales contra A/Wisconsin/588/2019 (arriba a la izquierda), B/Phuket/3073/2013 (abajo a la izquierda) o B/Washington/02/2019 (abajo a la derecha) se midieron en suero recolectado de ratones (n = 5) mediante un ensayo de lectina ligada a enzimas (ELLA, por sus siglas en inglés). No se determinaron los títulos de NAI frente a A/Cambodia/e0926360/2020 debido a dificultades técnicas con el virus. Los títulos medios geométricos (GMT) en cada punto de tiempo se muestran en la parte superior de cada gráfico y se indican mediante líneas horizontales. Los títulos negativos se grafican en el LOD del ensayo, indicado por la línea de puntos.

FIG. 24 Se vacunaron ratones por vía intramuscular el día 0 con ARNsa(s) que codifican HA o con HA/NA formulados en LNP, una vacuna ARNmod-LNP cuadrivalente que codifica HA o el comparador autorizado, FluAd. Los sueros se recolectaron 3 semanas después de la vacunación (día 21, 3 semanas PD1). Los títulos de anticuerpos neutralizantes del virus contra A/Wisconsin/588/2019 (arriba a la izquierda), A/Cambodia/e0926360/2020 (arriba a la derecha), B/Phuket/3073/2013 (abajo a la izquierda) o B/Washington/02/2019 (abajo a la derecha) se midieron en suero recolectado de ratones (n = 5) mediante una prueba de microneutralización de 1 día (MNT). Los títulos medios geométricos (GMT) en cada punto de tiempo se muestran en la parte superior de cada gráfico y se indican mediante líneas horizontales. Los títulos negativos se grafican en el LOD del ensayo, indicado por la línea de puntos.

FIG. 25 Se vacunaron ratones el día 0 y el día 28 por vía intramuscular con ARNsa(s) que codifican HA o con HA/NA formulados en LNP, una vacuna ARNmod-LNP cuadrivalente que codifica HA o el comparador autorizado, FluAd. Los sueros se recolectaron 2 semanas después de la segunda vacunación (día 42, 2 semanas PD2). Los títulos de anticuerpos anti-HA funcionales contra A/Wisconsin/588/2019 (arriba a la izquierda), A/Cambodia/e0926360/2020 (arriba a la derecha), B/Phuket/3073/2013 (abajo a la izquierda) o B/Washington/02/2019 (abajo a la derecha) se midieron en suero recolectado de ratones (n = 5) mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI). Los títulos medios geométricos (GMT) en cada punto de tiempo se muestran en la parte superior de cada gráfico y se indican mediante líneas horizontales. Los títulos negativos se grafican en el LOD del

ensayo, indicado por la línea de puntos.

FIG. 26 Se vacunaron ratones el día 0 y el día 28 por vía intramuscular con ARNsa que codifica HA o HA/NA formulados en LNP o el comparador autorizado, FluAd. Los sueros se recolectaron 2 semanas después de la segunda vacunación (día 42, 2 semanas PD2). Los títulos de anticuerpos anti-NA funcionales contra A/Wisconsin/588/2019 (arriba a la izquierda), B/Phuket/3073/2013 (abajo a la izquierda) o B/Washington/02/2019 (abajo a la derecha) se midieron en suero recolectado de ratones (n = 5) mediante un ensayo de lectina ligada a enzimas (ELLA). No se determinaron los títulos de NAI frente a A/Cambodia/e0926360/2020 debido a dificultades técnicas con el virus. Se grafican los títulos inhibitorios del 50 % y los títulos medios geométricos (GMT) en cada punto de tiempo se muestran en la parte superior de cada gráfico y se indican mediante líneas horizontales. Los títulos negativos se grafican en el LOD del ensayo, indicado por la línea de puntos.

FIG. 27 Se vacunaron ratones por vía intramuscular el día 0 y el día 28 con ARNsa(s) que codifican HA o con HA/NA formulados en LNP, una vacuna ARNmod-LNP cuadrivalente que codifica HA o el comparador autorizado, FluAd. Los sueros se recolectaron 2 semanas después de la segunda vacunación (día 42, 2 semanas PD2). Los títulos de anticuerpos neutralizantes del virus contra A/Wisconsin/588/2019 (arriba a la izquierda), A/Cambodia/e0926360/2020 (arriba a la derecha), B/Phuket/3073/2013 (abajo a la izquierda) o B/Washington/02/2019 (abajo a la derecha) se midieron en suero recolectado de ratones (n = 5) mediante una prueba de microneutralización de 1 día (MNT). Se grafican los títulos de neutralización del 50 % y los títulos de media geométrica (GMT) en cada punto de tiempo se muestran en la parte superior de cada gráfico y se indican mediante líneas horizontales. Los títulos negativos se grafican en el LOD del ensayo, indicado por la línea de puntos.

EJEMPLO 16: MUESTRAS DE ARN AUTOAMPLIFICABLES EN COMBINACIÓN CON ARNmod NS1

Nuestros experimentos anteriores demostraron que el ARNsa que codifica el ARNmod NS1 + HA Wisconsin aumentó la viabilidad celular, el % de células positivas y el MFI para las células transfectadas con ARNsa, en comparación con las muestras de control que solo contenían ARNsa en ausencia del ARNmod NS1.

Aquí, se prepararon muestras de ARN autoamplificante bicistrónico que codifica HA y NA de acuerdo con Tabla 22 (m5C no está presente a menos que se indique lo contrario; FA % se refiere a los resultados del analizador de fragmentos), que muestra los resultados del

analizador de fragmentos y los resultados del análisis de capping para las respectivas muestras. Con la excepción de “ARNsa-HA-NA 0 %m1ψ (VCE)”, “ARNsa-HA-NA 0 % m1ψ (CleanCap)”, todas las muestras se prepararon con los respectivos nucleótidos modificados en las respectivas cantidades.

5 **Tabla 22**

Muestra #	Descripción	FA (%)	Análisis de capping (%)
0137-1	ARNsa-HA-NA 0 %m1ψ (VCE)	84 %	98 %
0137-2	ARNsa-HA-NA 50 %m1ψ (VCE)	86 %	98 %
0065-2	ARNsa-HA-NA 50 % m1ψ + 100 % m5C (CleanCap)	82 %	98 %
0065-3	ARNsa-HA-NA 75 % m1ψ + 100 % m5C (CleanCap)	83 %	99 %
0065-1	ARNsa-HA-NA 100 % m5C (CleanCap)	84 %	96 %
0137-3	ARNsa-HA-NA 0 % m1ψ (CleanCap)	81 %	97 %
0137-4	ARNsa-HA-NA 50 % m1ψ (CleanCap)	83 %	98 %
0138-1	ARNmod-GFP (100 % m1ψ)	91 %	93 %
0138-2	ARNmod-NS1 (100 % m1ψ)	90 %	92 %

Se analizaron muestras de ARNsa en combinación con ARNmod-GFP o ARNmod-NS1 in vitro. Se hicieron las siguientes observaciones: Aumento significativo de células HA(+) en ARNsa con 0 % VCE (10 veces) o 0 % CleanCap (5 veces) vs. control “solo ARNsa” en donde no estaban presentes ni ARNmod-GFP ni ARNmod-NS1; aumentos en el porcentaje de N1-metilpseudouridina en las muestras de ARNsa resultaron en mayor viabilidad celular; la combinación de una cadena de ARNmod (ya sea GFP o NS1) ayudó a aumentar los niveles de expresión de ARNsa en comparación con las muestras “solo ARNsa”; ARNmod-NS1 ayuda a aumentar los niveles de expresión de antígeno (como se muestra en MFI) en comparación con muestras de modGFP o solo ARNsa; 100 % m5c presentó alta expresión de antígeno.

10 Ver Tabla 23-Tabla 25, en donde “0 %”, “50 %” y “75 %” se refieren al porcentaje de N1-metilpseudouridina en la muestra analizada; la cantidad de ARNsa analizada fue de 12,5 ng; Ab policlonal de conejo (HA/Wisconsin H1N1-EBPD)+A647. Los resultados indican que la adición de modNS1 *en trans* aumenta la expresión de antígeno (HA %) del ARNsa en comparación con las muestras de control que solo contienen ARNsa y contribuye a aumentar

15 los niveles de expresión (MFI) en presencia de todas las muestras de ARNsa analizadas. Cuando se encapsularon en nanopartículas lipídicas, cada una de las muestras de ARNsa expresó el antígeno codificado respectivo.

20

Tabla 23

	0,5 ng de modNS1			5 ng de modNS1			12,5 ng de modNS1		
	Celúla #	MFI	%HA(+)	Celúla #	MFI	%HA(+)	Celúla #	MFI	%HA(+)
0 % m1ψ ; VCE	18358	34	7	15959	28	21	15456	23	31
0 % m1ψ ; CleanCap	20477	34	8	16593	29	17	14615	30	34
50 % m1ψ ; VCE	23760	35	16	20022	22	42	16789	22	48
50 % m1ψ ; CleanCap	23682	35	25	19023	22	45	15475	26	65
50 m1ψ + 100 % m5C ; VCE	24831	43	15	20232	29	44	17160	29	63
75 m1ψ + 100 % m5C; CleanCap	25766	45	4	21394	32	28	17453	30	57
100 % m5c	24426	34	24	19992	23	48	14632	30	73

Tabla 24

	0,5 ng de modGFP			5 ng de modGFP			12,5 ng de modGFP		
	Celúla #	MFI	%HA(+)	Celúla #	MFI	%HA(+)	Celúla #	MFI	%HA(+)
0 % m1ψ ; VCE	17823	33	3	14765	31	4	13757	32	7
0 % m1ψ ; CleanCap	19196	35	3	15324	30	5	13894	31	11
50 % m1ψ ; VCE	22687	33	15	17431	30	26	14835	31	30
50 % m1ψ ; CleanCap	20626	31	24	15669	27	33	13264	30	38
50 m1ψ + 100 % m5C ; VCE	23945	43	10	21095	34	31	16494	29	50
75 m1ψ + 100 % m5C; CleanCap	24748	43	3	22473	37	18	17373	32	52
100 % m5c	23292	36	24	18182	32	47	12992	31	55

Tabla 25

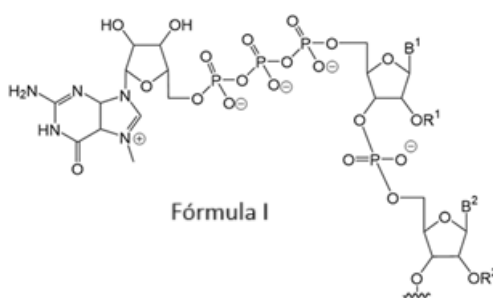
	solo ARNsA		
	Celúla #	MFI	%HA(+)
0 % m1ψ ; VCE	16843	31	2
0 % m1ψ ; CleanCap	17964	34	3
50 % m1ψ ; VCE	21293	32	17
50 % m1ψ ; CleanCap	21584	34	19
50 m1ψ + 100 % m5C ; VCE	24466	42	12
75 m1ψ + 100 % m5C; CleanCap	24872	42	6
100 % m5c	22292	33	29

MODALIDADES EJEMPLARES

- 5 1. Una composición que comprende una molécula de ARN autoamplificante que comprende:

una caperuza 5'; una región no traducida 5'; una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus; un promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés; una región no traducida 3'; y una secuencia poli A 3'; en donde al menos el 5 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

2. La composición de la cláusula 1, en donde la Caperuza 5' está representada por la Fórmula I:



10 en donde R^1 y R^2 son cada uno independientemente H o Me; y

B^1 y B^2 son cada uno independientemente guanina, adenina o uracilo.

3. La composición de la cláusula 1 o 2, en donde B^1 y B^2 son bases que se producen de forma natural.

15 4. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 3, en donde R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

5. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 4, en donde B^1 es guanina.

6. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en donde B^1 es adenina.

7. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en donde B^2 es adenina.

8. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 7, en donde B^2 es uracilo.

20 9. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 8 en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina.

10. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 9, en donde B^1 es adenina y B^2 es

uracilo.

11. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 10, en donde B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno.
12. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 11, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno.
13. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en donde al menos el 10 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
14. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 13, en donde al menos el 25 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
15. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 14, en donde al menos el 50 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
16. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 15, en donde al menos el 75 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
17. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 16, en donde esencialmente la totalidad de una población particular de nucleótidos en la molécula ha sido reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
18. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 17, en donde uno o más nucleótidos de reemplazo modificados o no naturales comprenden dos nucleótidos modificados o no naturales proporcionados en una proporción que varía de 1:99 a 99:1, o cualquier rango derivable dentro del mismo.
19. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 18, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 10 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

20. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 19, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más
5 nucleótidos modificados o no naturales.
21. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 20, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más
10 nucleótidos modificados o no naturales.
22. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 21, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más
15 nucleótidos modificados o no naturales.
23. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 22, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada con uno o más
20 nucleótidos modificados o no naturales.
24. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más
25 nucleótidos modificados o no naturales.
25. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 24, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más
30 nucleótidos modificados o no naturales.
26. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 25, en donde al menos el 25 % de una

población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

- 5 27. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 26, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 10 28. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 27, en donde al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 15 29. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 28, en donde al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 20 30. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 29, en donde al menos el 75 % de una población total de un primer nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 25 31. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 30, en donde los nucleótidos modificados o no naturales se seleccionan del grupo que consiste en pseudouridina, N1-metilpseudouridina, N1-etilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-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.
- 30

32. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 31, en donde los nucleótidos modificados o no naturales se seleccionan del grupo que consiste en 5-metiluridina, N1-metilpseudouridina, 5-metoxiuridina y 5-metilcitosina.
- 5 33. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 32, en donde al menos el 25 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
34. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 33, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
- 10 35. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 34, en donde al menos el 75 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
36. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 35, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina.
- 15 37. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 36, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina.
38. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 37, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con 5-metoxiuridina.
- 20 39. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 38, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metiluridina.
40. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 39, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con 5-metiluridina.
- 25 41. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 40, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de citosina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metilcitosina.
42. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 41, en donde esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina.

43. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 42, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 2-tiouridina.
44. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 43, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con 2-tiouridina.
- 5 45. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 44, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 10 46. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 45, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 15 47. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 46, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metiluridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
48. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 47, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con aproximadamente 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 50 % de N1-metilpseudouridina.
- 20 49. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 48, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con aproximadamente 75 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 25 % de N1-metilpseudouridina.
- 25 50. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 49, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados con aproximadamente un 25 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 75 % de N1-metilpseudouridina.
- 30 51. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 50, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de la población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-

metilcitosina.

52. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 51, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de la población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
53. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 52, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de la población total de nucleótidos de uridina en la molécula ha sido reemplazada con 5-metiluridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la molécula han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
54. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 53, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados por aproximadamente un 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 50 % de N1-metilpseudouridina.
55. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 54, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados por aproximadamente un 75 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 25 % de N1-metilpseudouridina.
56. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 55, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la molécula han sido reemplazados por aproximadamente un 25 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 75 % de N1-metilpseudouridina.
57. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 56, en donde el promotor subgenómico está unido operativamente al marco de lectura abierto.
58. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 57, en donde el promotor subgenómico comprende un elemento regulador que actúa en cis.

59. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 58, en donde el elemento regulador que actúa en cis se encuentra inmediatamente aguas abajo de B².
60. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 59, en donde el elemento regulador que actúa en cis es un elemento rico en AU.
- 5 61. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 60, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP1 del alfavirus.
62. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 61, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP2 del alfavirus.
63. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 62, en donde la proteína no estructural
10 comprende la proteína no estructural nsP3 del alfavirus.
64. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 63, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP4 del alfavirus.
65. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 64, en donde el alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana.
- 15 66. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 65, en donde el alfavirus es el virus del bosque Semliki.
67. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 66, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
68. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 67, que comprende además un lípido
20 catiónico.
69. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 68, en donde la molécula de ARN está encapsulada en, unida a o adsorbida en un lípido catiónico.
70. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 69, que comprende además un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo
25 inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico o una nanoemulsión catiónica.
71. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 70, en donde la molécula de ARN está

encapsulada en, unida a o adsorbida en un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico, una nanoemulsión catiónica o una combinación de los mismos.

72. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 71.

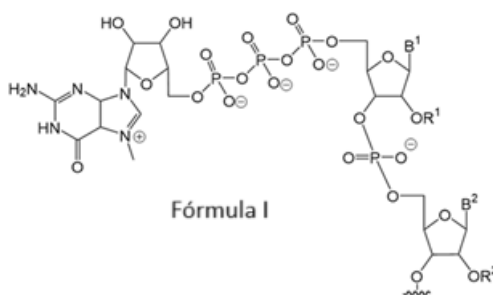
73. Un método para vacunar a un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 71.

74. Un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de la composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 71.

75. El método de cualquiera de las cláusulas 1 a 74, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de anticuerpos.

76. El método según cualquiera de las cláusulas 1 a 75, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de células T.

77. Una composición que comprende una molécula de ARN autoamplificante que comprende: una caperuza 5' representada por la Fórmula I,



en donde R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me; y

B¹ y B² son cada uno independientemente guanina, adenina o uracilo;

una región 5' no traducida;

una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus;

un promotor subgenómico derivado de un alfavirus;

un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés;

5 una región 3' no traducida; y

una secuencia poli A 3'.

78. La composición de la cláusula 77, en donde B^1 y B^2 son bases que se producen de forma natural.

79. La composición de la cláusula 77 o 78, en donde R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

10 80. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 79, en donde B^1 es guanina.

81. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 80, en donde B^1 es adenina.

82. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 81, en donde B^2 es adenina.

83. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 82, en donde B^2 es uracilo.

15 84. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 83, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina.

85. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 84, en donde B^1 es adenina y B^2 es uracilo.

86. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 85, en donde B^1 es adenina, B^2 es uracilo, R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

20 87. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 86, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B^1 es adenina, B^2 es uracilo, R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

88. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 87, en donde el promotor subgenómico está unido operativamente al marco de lectura abierto.

89. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 88, en donde el promotor subgenómico comprende un elemento regulador que actúa en cis.
90. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 89, en donde el elemento regulador que actúa en cis se encuentra inmediatamente aguas abajo de B².
- 5 91. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 90, en donde el elemento regulador que actúa en cis es un elemento rico en AU.
92. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 91, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP1 del alfavirus.
93. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 92, en donde la proteína no estructural
10 comprende la proteína no estructural nsP2 del alfavirus.
94. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 93, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP3 del alfavirus.
95. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 94, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP4 del alfavirus.
- 15 96. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 95, en donde el alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana.
97. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 96, en donde el alfavirus es el virus del bosque Semliki.
98. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 97, que comprende además un
20 vehículo farmacéuticamente aceptable.
99. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 98, que comprende además un lípido catiónico.
100. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 99, en donde la molécula de ARN está encapsulada, unida o adsorbida en un lípido catiónico.
- 25 101. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 100, que comprende además un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua

en aceite, un emulsoma, un péptido policationico o una nanoemulsión catiónica.

102. La composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 101, en donde la molécula de ARN está encapsulada en, unida a o adsorbida en un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico, una nanoemulsión catiónica y combinaciones de los mismos.

103. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 102.

104. Un método para vacunar a un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 103.

105. Un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de la composición de cualquiera de las cláusulas 77 a 104.

106. El método de cualquiera de las cláusulas 77 a 105, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de anticuerpos.

107. El método según cualquiera de las cláusulas 77 a 106, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de células T.

108. Una composición que comprende (i) una primera molécula de ARN que comprende un nucleótido modificado; y (ii) una segunda molécula de ARN que comprende una caperuza 5', una región no traducida 5', una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus, un promotor subgenómico derivado de un alfavirus, un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés, una región no traducida 3' y una secuencia de poli A 3', en donde al menos el 5 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

109. La composición de la cláusula 108, en donde la composición reduce la citotoxicidad, en comparación con una composición idéntica en ausencia de la primera molécula de ARN.

110. La composición de la cláusula 108 o 109, en donde la segunda molécula de ARN en presencia de la primera molécula de ARN provoca menos citotoxicidad en comparación con

la citotoxicidad provocada por la segunda molécula de ARN en ausencia de la primera molécula de ARN.

111. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 110, en donde la segunda molécula de ARN en presencia de la primera molécula de ARN expresa el gen de interés en una cantidad que es mayor que la cantidad de expresión del gen de interés en ausencia de la primera molécula de ARN.

112. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 111, en donde la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN.

113. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 112, en donde la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es al menos aproximadamente 2 veces mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN.

114. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 113, en donde la primera molécula de ARN es capaz de evadir una respuesta inmune innata de una célula en donde se introduce la primera molécula de ARN.

115. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 114, en donde al menos el 10 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

116. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 115, en donde al menos el 25 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

117. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 116, en donde al menos el 50 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

118. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 117, en donde al menos el 75 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

119. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 118, en donde esencialmente la totalidad de una población de nucleótidos particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

120. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 119, en donde al menos el 10 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 5 121. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 120, en donde al menos el 25 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
122. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 121, en donde al menos el 50 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 10 123. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 122, en donde al menos el 75 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
124. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 123, en donde esencialmente la totalidad de una población de nucleótidos particular en la primera molécula de ARN ha sido
15 reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
125. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 124, en donde uno o más nucleótidos de reemplazo modificados o no naturales comprenden dos nucleótidos modificados o no naturales proporcionados en una proporción que varía de 1:99 a 99:1, o cualquier rango derivable dentro del mismo.
- 20 126. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 125, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 10 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 25 127. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 126, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 30 128. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 127, en donde al menos el 10 % de

una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

- 5 129. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 128, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 10 130. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 129, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 15 131. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 130, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 20 132. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 131, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 25 133. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 132, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 30 134. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 133, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido

reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

5 135. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 134, en donde al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

10 136. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 135, en donde al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

15 137. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 136, en donde al menos el 75 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

20 138. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 137, en donde el nucleótido modificado comprende cualquier nucleótido seleccionado entre pseudouridina, N1-metilpseudouridina, N1-etilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-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-
25 aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metil uridina.

139. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 138, en donde los nucleótidos modificados o no naturales se seleccionan del grupo que consiste en 5-metiluridina, N1-metilpseudouridina, 5-metoxiuridina y 5-metilcitosina.

30 140. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 139, en donde al menos el 25 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.

141. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 140, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
- 5 142. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 141, en donde al menos el 75 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
143. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 142, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina.
- 10 144. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 143, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina.
145. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 144, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 5-
15 metoxiuridina.
146. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 145, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metiluridina.
147. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 146, en donde esencialmente todos
20 los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metiluridina.
148. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 147, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de citosina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metilcitosina.
- 25 149. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 148, en donde esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
150. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 149, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido
30 reemplazada con 2-tiouridina.

151. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 150, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 2-tiouridina.
- 5 152. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 151, en donde al menos el 25 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
153. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 152, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
- 10 154. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 153, en donde al menos el 75 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
- 15 155. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 154, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina.
156. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 155, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina.
- 20 157. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 156, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metoxiuridina.
158. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 157, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metiluridina.
- 25 159. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 158, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metiluridina.
- 30 160. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 159, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metilcitosina.

161. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 160, en donde esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 5 162. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 161, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 2-tiouridina.
163. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 162, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 2-tiouridina.
- 10 164. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 163, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 15 165. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 164, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 20 166. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 165, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metiluridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 25 167. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 166, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 50 % de N1-metilpseudouridina.
168. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 167, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente 75 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 25 % de N1-metilpseudouridina.
- 30 169. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 168, en donde esencialmente todos

los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente 25 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 75 % de N1-metilpseudouridina.

5 170. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 169, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina y al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.

10 171. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 170, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina.

15 172. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 171, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina y al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina.

20 173. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 172, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metiluridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.

25 174. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 173, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 50 % de N1-metilpseudouridina.

175. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 174, en donde la primera molécula de ARN no comprende un promotor subgenómico.

30 176. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 175, en donde la primera molécula de ARN no es una molécula de ARN autoamplificante.

177. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 176, en donde la primera molécula de ARN comprende además una porción de caperuza 5'.
178. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 177, en donde la primera molécula de ARN comprende además una región 5' no traducida.
- 5 179. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 178, en donde la primera molécula de ARN comprende además una región 3' no traducida.
180. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 179, en donde la primera molécula de ARN comprende además una secuencia de poli A 3'.
181. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 180, en donde la primera molécula
10 de ARN comprende además un marco de lectura abierto.
182. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 181, en donde la primera molécula de ARN no comprende ninguna de las siguientes: una porción de caperuza 5', una región no traducida y una secuencia de poli A.
183. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 182, en donde la primera molécula
15 de ARN comprende una región no traducida 5' y una región no traducida 3'.
184. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 183, en donde la primera molécula de ARN comprende una porción de caperuza 5', una región no traducida 5' (5' UTR), un nucleótido modificado, un marco de lectura abierto, una región no traducida 3' (3' UTR), una secuencia de poli A 3'.
- 20 185. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 184, en donde la primera molécula de ARN no comprende un marco de lectura abierto que codifica un antígeno.
186. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 185, en donde la primera molécula de ARN comprende una región de ARN no codificante.
187. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 186, en donde la primera molécula
25 de ARN comprende una región de ARN codificante.
188. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 187, en donde la porción de caperuza 5' de cualquiera de las primera y segunda moléculas de ARN es una caperuza 5' natural.

189. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 188, en donde la porción de caperuza 5' de cualquiera de las primera y segunda moléculas de ARN es un análogo de caperuza 5'.
- 5 190. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 189, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP1 del alfavirus.
191. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 190, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP2 del alfavirus.
192. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 191, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP3 del alfavirus.
- 10 193. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 192, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP4 del alfavirus.
194. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 193, en donde la proteína no estructural comprende las proteínas no estructurales nsP1, nsP2 y nsP3 del alfavirus.
- 15 195. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 194, en donde la primera molécula de ARN no comprende la proteína no estructural 4 del alfavirus (nsP4).
196. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 195, en donde la segunda molécula de ARN no comprende la proteína no estructural 4 del alfavirus (nsP4).
197. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 196, en donde la primera molécula de ARN y la segunda molécula de ARN comprenden uno o más nucleótidos modificados.
- 20 198. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 197, en donde el promotor subgenómico está unido operativamente al marco de lectura abierto.
199. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 198, en donde el promotor subgenómico comprende un elemento regulador que actúa en cis.
- 25 200. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 199, en donde el elemento regulador que actúa en cis se encuentra inmediatamente aguas abajo de B².
201. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 200, en donde el elemento regulador que actúa en cis es un elemento rico en AU.

202. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 201 en donde la segunda molécula de ARN comprende además: (1) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' del alfavirus, y (2) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' del alfavirus.
- 5 203. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 202 en donde la segunda molécula de ARN codifica al menos un antígeno.
204. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 203 en donde la segunda molécula de ARN comprende al menos 7000 nucleótidos.
205. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 204 en donde la segunda molécula de ARN comprende al menos 8000 nucleótidos.
- 10 206. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 205 en donde al menos el 80 % de las segundas moléculas de ARN totales son de longitud completa.
207. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 206 en donde el alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana.
- 15 208. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 207 en donde el alfavirus es el virus del bosque Semliki.
209. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 208, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
210. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 209, que comprende además un lípido catiónico.
- 20 211. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 210, que comprende además un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico o una nanoemulsión catiónica.
- 25 212. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 211, en donde la primera y la segunda molécula de ARN están encapsuladas en, unidas a o adsorbidas en un lípido catiónico.
213. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 212, en donde la primera y la

segunda moléculas de ARN están encapsuladas en, unidas a o adsorbidas en un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico, una nanoemulsión catiónica o una combinación de los mismos.

214. La composición de cualquiera de las cláusulas 108 a 213, en donde la primera y la segunda molécula de ARN están purificadas.

215. Un método para expresar un polipéptido en una célula de mamífero, que comprende administrar a la célula de mamífero una composición que comprende (i) una primera molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 108 a 214, y (ii) una segunda molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 108 a 214, en donde el método expresa el polipéptido de interés en una cantidad que es, cuando se mide en condiciones idénticas, mayor que un método que comprende administrar a la célula de mamífero una composición que comprende la segunda molécula de ARN, en ausencia de la primera molécula de ARN.

216. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 108 a 214.

217. Un método para vacunar a un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 108 a 214.

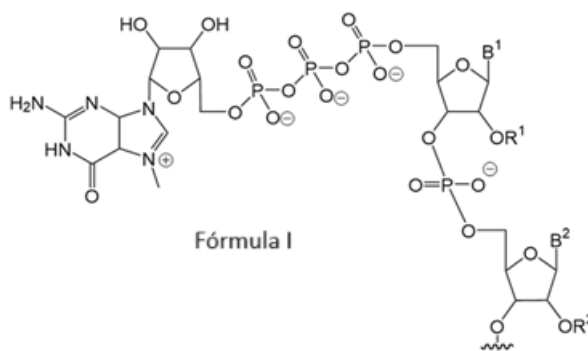
218. Un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 108 a 214.

219. El método según cualquiera de las cláusulas 215 a 218, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de anticuerpos.

220. El método según cualquiera de las cláusulas 215 a 219, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de células T.

221. Una composición que comprende (i) una primera molécula de ARN que comprende un nucleótido modificado; y (ii) una segunda molécula de ARN que comprende una caperuza 5'

representado por la Fórmula I,



en donde R^1 y R^2 son cada uno independientemente H o Me, y B^1 y B^2 son cada uno independientemente guanina, adenina o uracilo, una región no traducida 5', una región
5 codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus, un promotor subgenómico derivado de un alfavirus, un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés, una región no traducida 3' y una secuencia poli A 3'.

222. La composición de la cláusula 221, en donde B^1 y B^2 son bases que se producen de forma natural.

10 223. La composición de la cláusula 221 o 222, en donde R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

224. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 223, en donde B^1 es guanina.

225. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 224, en donde B^1 es adenina.

226. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 225, en donde B^2 es adenina.

227. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 226, en donde B^2 es uracilo.

15 228. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 227, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina.

229. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 228, en donde B^1 es adenina y B^2 es uracilo.

20 230. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 229, en donde B^1 es adenina, B^2 es uracilo, R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

231. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 230, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno.
- 5 232. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 231, en donde la composición reduce la citotoxicidad, en comparación con una composición idéntica en ausencia de la primera molécula de ARN.
- 10 233. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 232, en donde la segunda molécula de ARN en presencia de la primera molécula de ARN provoca menos citotoxicidad en comparación con la citotoxicidad provocada por la segunda molécula de ARN en ausencia de la primera molécula de ARN.
234. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 233, en donde la segunda molécula de ARN en presencia de la primera molécula de ARN expresa el gen de interés en una cantidad que es mayor que la cantidad de expresión del gen de interés en ausencia de la primera molécula de ARN.
- 15 235. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 234, en donde la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN.
- 20 236. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 235, en donde la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es al menos aproximadamente 2 veces mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN.
237. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 236, en donde la primera molécula de ARN es capaz de evadir una respuesta inmune innata de una célula en donde se introduce la primera molécula de ARN.
- 25 238. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 237, en donde el nucleótido modificado comprende cualquier nucleótido seleccionado entre pseudouridina, N1-metilpseudouridina, N1-etilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-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, 5-30 aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metil uridina.

239. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 238, en donde los nucleótidos modificados o no naturales se seleccionan del grupo que consiste en 5-metiluridina, N1-metilpseudouridina, 5-metoxiuridina y 5-metilcitosina.
- 5 240. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 239, en donde al menos el 10 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
241. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 240, en donde al menos el 25 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 10 242. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 241, en donde al menos el 50 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
243. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 242, en donde al menos el 75 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 15 244. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 243, en donde esencialmente la totalidad de una población de nucleótidos particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
245. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 244, en donde la primera molécula de ARN no comprende un promotor subgenómico.
- 20 246. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 245, en donde la primera molécula de ARN no es una molécula de ARN autoamplificante.
247. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 246, en donde la primera molécula de ARN comprende además una porción de caperuza 5'.
- 25 248. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 247, en donde la primera molécula de ARN comprende además una región 5' no traducida.
249. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 248, en donde la primera molécula de ARN comprende además una región 3' no traducida.

250. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 249, en donde la primera molécula de ARN comprende además una secuencia de poli A 3'.
251. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 250, en donde la primera molécula de ARN comprende además un marco de lectura abierto.
- 5 252. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 251, en donde la primera molécula de ARN no comprende ninguna de una porción de caperuza 5', una región no traducida y una secuencia de poli A.
253. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 252, en donde la primera molécula de ARN comprende una región no traducida 5' y una región no traducida 3'.
- 10 254. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 253, en donde la primera molécula de ARN comprende una porción de caperuza 5', una región no traducida 5' (5' UTR), un nucleótido modificado, un marco de lectura abierto, una región no traducida 3' (3' UTR), una secuencia de poli A 3'.
255. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 254, en donde la primera molécula de ARN no comprende un marco de lectura abierto que codifica un antígeno.
- 15 256. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 255, en donde la primera molécula de ARN comprende una región de ARN no codificante.
257. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 256, en donde la primera molécula de ARN comprende una región de ARN codificante.
- 20 258. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 257, en donde la porción de caperuza 5' de la primera molécula de ARN es una caperuza 5' natural.
259. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 258, en donde la porción de caperuza 5' de la primera molécula de ARN es un análogo de caperuza 5'.
260. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 259, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP1 del alfavirus.
- 25 261. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 260, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP2 del alfavirus.
262. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 261, en donde la proteína no

estructural comprende la proteína no estructural nsP3 del alfavirus.

263. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 262, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP4 del alfavirus.

5 264. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 263, en donde la proteína no estructural comprende las proteínas no estructurales nsP1, nsP2 y nsP3 del alfavirus.

265. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 264, en donde la primera molécula de ARN no comprende la proteína no estructural 4 del alfavirus (nsP4).

266. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 265, en donde la segunda molécula de ARN no comprende la proteína no estructural 4 del alfavirus (nsP4).

10 267. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 266 en donde la segunda molécula de ARN no comprende un nucleótido modificado.

268. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 267, en donde la primera molécula de ARN y la segunda molécula de ARN comprenden uno o más nucleótidos modificados.

15 269. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 268, en donde el promotor subgenómico está unido operativamente al marco de lectura abierto.

270. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 269, en donde el promotor subgenómico comprende un elemento regulador que actúa en cis.

271. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 270, en donde el elemento regulador que actúa en cis se encuentra inmediatamente aguas abajo de B².

20 272. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 271, en donde el elemento regulador que actúa en cis es un elemento rico en AU.

273. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 272, en donde la segunda molécula de ARN comprende además: (1) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' del alfavirus, y (2) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' del alfavirus.

25 274. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 273, en donde la segunda molécula de ARN codifica al menos un antígeno.

275. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 274, en donde la segunda molécula

de ARN comprende al menos 7000 nucleótidos.

276. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 275, en donde la segunda molécula de ARN comprende al menos 8000 nucleótidos.

5 277. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 276, en donde al menos el 80 % de las segundas moléculas de ARN totales son de longitud completa.

278. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 277, en donde el alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana.

279. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 278, en donde el alfavirus es el virus del bosque Semliki.

10 280. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 279, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

281. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 280, que comprende además un lípido catiónico.

15 282. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 281, que comprende además un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico o una nanoemulsión catiónica.

20 283. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 282, en donde la primera y la segunda molécula de ARN están encapsuladas, unidas a o adsorbidas en un lípido catiónico.

25 284. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 283, en donde la primera y la segunda moléculas de ARN están encapsuladas en, unidas a o adsorbidas en un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico, una nanoemulsión catiónica o una combinación de los mismos.

285. La composición de cualquiera de las cláusulas 221 a 284, en donde la primera y la segunda molécula de ARN están purificadas.

286. Un método para expresar un polipéptido en una célula de mamífero, que comprende administrar a la célula de mamífero una composición que comprende (i) una primera molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 221 a 285, y (ii) una segunda molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 221 a 285, en donde el método expresa el polipéptido de interés en una cantidad que es, cuando se mide en condiciones idénticas, mayor que un método que comprende administrar a la célula de mamífero una composición que comprende la segunda molécula de ARN, en ausencia de la primera molécula de ARN.

287. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 221 a 285.

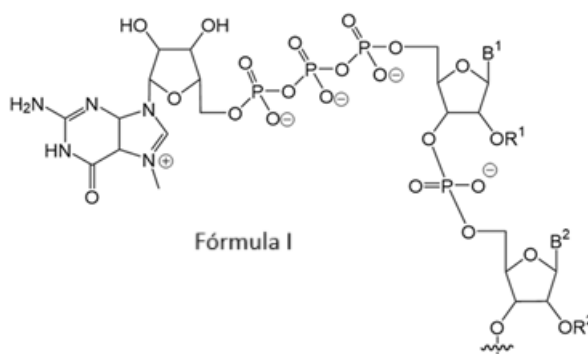
288. Un método para vacunar a un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 221 a 285.

289. Un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 221 a 285.

290. El método según cualquiera de las cláusulas 286 a 289, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de anticuerpos.

291. El método según cualquiera de las cláusulas 286 a 290, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de células T.

292. Una composición que comprende (i) una primera molécula de ARN que comprende un nucleótido modificado; y (ii) una segunda molécula de ARN que comprende una caperuza 5' representado por la Fórmula I,



en donde R^1 y R^2 son cada uno independientemente H o Me, y, B^1 y B^2 son cada uno independientemente guanina, adenina o uracilo, una región no traducida 5', una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus, un promotor subgenómico derivado de un alfavirus, un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés, una región no traducida 3' y una secuencia poli A 3', en donde al menos el 5 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

293. La composición de la cláusula 292, en donde B^1 y B^2 son bases que se producen de forma natural.

294. La composición de la cláusula 292 o 293, en donde R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

295. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 294, en donde B^1 es guanina.

296. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 295, en donde B^1 es adenina.

297. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 296, en donde B^2 es adenina.

298. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 298, en donde B^2 es uracilo.

299. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 298, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina.

300. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 299, en donde B^1 es adenina y B^2 es uracilo.

301. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 300, en donde B^1 es adenina, B^2 es uracilo, R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

302. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 301, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B^1 es adenina, B^2 es uracilo, R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

303. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 302, en donde la composición reduce la citotoxicidad, en comparación con una composición idéntica en ausencia de la primera molécula de ARN.

304. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 303, en donde la segunda molécula de ARN en presencia de la primera molécula de ARN provoca menos citotoxicidad en

comparación con la citotoxicidad provocada por la segunda molécula de ARN en ausencia de la primera molécula de ARN.

5 305. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 304, en donde la segunda molécula de ARN en presencia de la primera molécula de ARN expresa el gen de interés en una cantidad que es mayor que la cantidad de expresión del gen de interés en ausencia de la primera molécula de ARN.

306. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 305, en donde la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN.

10 307. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 306, en donde la composición comprende una cantidad de la primera molécula de ARN que es al menos aproximadamente 2 veces mayor que la cantidad de la segunda molécula de ARN.

15 308. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 307, en donde la primera molécula de ARN es capaz de evadir una respuesta inmune innata de una célula en donde se introduce la primera molécula de ARN.

309. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 308, en donde al menos el 10 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

20 310. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 309, en donde al menos el 25 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

311. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 310, en donde al menos el 50 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

25 312. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 311, en donde al menos el 75 % de una población total de un nucleótido particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

30 313. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 312, en donde esencialmente la totalidad de una población de nucleótidos particular en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

314. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 313, en donde al menos el 10 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 5 315. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 314, en donde al menos el 25 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
316. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 315, en donde al menos el 50 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 10 317. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 316, en donde al menos el 75 % de una población total de un nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 15 318. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 317, en donde esencialmente la totalidad de una población de nucleótidos particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada por uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
319. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 318, en donde uno o más nucleótidos de reemplazo modificados o no naturales comprenden dos nucleótidos modificados o no naturales proporcionados en una proporción que varía de 1:99 a 99:1, o cualquier rango derivable dentro del mismo.
- 20 320. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 319, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 10 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 25 321. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 320, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 30 322. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 321, en donde al menos el 10 % de

una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

- 5 323. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 322, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 10 324. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 323, en donde al menos el 10 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 15 325. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 324, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 25 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 20 326. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 325, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 50 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 25 327. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 326, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.
- 30 328. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 327, en donde al menos el 25 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido

reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

5 329. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 328, en donde al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y al menos el 75 % de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

10 330. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 329, en donde al menos el 50 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

15 331. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 330, en donde al menos el 75 % de una población total de un primer nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales, y esencialmente la totalidad de una población total de un segundo nucleótido particular en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con uno o más nucleótidos modificados o no naturales.

20 332. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 331, en donde el nucleótido modificado o no natural comprende cualquier nucleótido seleccionado entre pseudouridina, N1-metilpseudouridina, N1-etilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-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-
25 aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metil uridina.

333. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 332, en donde los nucleótidos modificados o no naturales se seleccionan del grupo que consiste en 5-metiluridina, N1-metilpseudouridina, 5-metoxiuridina y 5-metilcitosina.

30 334. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 333, en donde al menos el 25 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.

335. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 334, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
- 5 336. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 335, en donde al menos el 75 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
337. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 336, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con N1-metilpseudouridina.
- 10 338. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 337, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina.
339. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 338, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 5-
15 metoxiuridina.
340. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 339, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metiluridina.
341. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 340, en donde esencialmente todos
20 los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metiluridina.
342. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 341, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de citosina en la primera molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metilcitosina.
- 25 343. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 342, en donde esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
344. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 343, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN ha sido
30 reemplazada con 2-tiouridina.

345. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 344, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la primera molécula de ARN han sido reemplazados con 2-tiouridina.
- 5 346. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 345, en donde al menos el 25 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
347. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 346, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
- 10 348. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 347, en donde al menos el 75 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina.
349. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 348, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con N1-
15 metilpseudouridina.
350. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 349, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina.
351. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 350, en donde esencialmente todos
20 los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metoxiuridina.
352. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 351, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metiluridina.
- 25 353. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 352, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metiluridina.
354. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 353, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN ha sido
30 reemplazada con 5-metilcitosina.

355. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 354, en donde esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 5 356. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 355, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 2-tiouridina.
357. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 356, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 2-tiouridina.
- 10 358. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 357, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 15 359. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 358, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 20 360. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 359, en donde al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metiluridina y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.
- 25 361. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 360, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 50 % de N1-metilpseudouridina.
362. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 361, en donde esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente 75 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 25 % de N1-metilpseudouridina.
- 30 363. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 362, en donde esencialmente todos

los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente 25 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente 75 % de N1-metilpseudouridina.

5 364. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 363, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de una población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con N1-metilpseudouridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.

10 365. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 364, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de la población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-metoxiuridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de
15 ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.

366. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 365, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, al menos el 50 % de la población total de nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN ha sido reemplazada con 5-
20 metiluridina, y esencialmente todos los nucleótidos de citosina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con 5-metilcitosina.

367. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 366, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina
25 en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente un 50 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 50 % de N1-metilpseudouridina.

368. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 367, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina
30 en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente un 75 % de 5-metoxiuridina y aproximadamente un 25 % de N1-metilpseudouridina.

369. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 368, en donde el nucleótido inmediatamente aguas abajo (5' a 3') de la caperuza 5' comprende guanina, B¹ es adenina, B² es uracilo, R¹ es metilo y R² es hidrógeno, esencialmente todos los nucleótidos de uridina en la segunda molécula de ARN han sido reemplazados con aproximadamente un 25 % de 5-metoksiuridina y aproximadamente un 75 % de N1-metilpseudouridina.
370. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 369, en donde la primera molécula de ARN no comprende un promotor subgenómico.
371. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 370, en donde la primera molécula de ARN no es una molécula de ARN autoamplificante.
- 10 372. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 371, en donde la primera molécula de ARN comprende además una porción de caperuza 5'.
373. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 372, en donde la primera molécula de ARN comprende además una región 5' no traducida.
- 15 374. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 373, en donde la primera molécula de ARN comprende además una región 3' no traducida.
375. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 374, en donde la primera molécula de ARN comprende además una secuencia de poli A 3'.
376. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 375, en donde la primera molécula de ARN comprende además un marco de lectura abierto.
- 20 377. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 376, en donde la primera molécula de ARN no comprende ninguna de las siguientes: una porción de caperuza 5', una región no traducida y una secuencia de poli A.
378. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 377, en donde la primera molécula de ARN comprende una región no traducida 5' y una región no traducida 3'.
- 25 379. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 378, en donde la primera molécula de ARN comprende una porción de caperuza 5', una región no traducida 5' (5' UTR), un nucleótido modificado, un marco de lectura abierto, una región no traducida 3' (3' UTR), una secuencia de poli A 3'.

380. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 379, en donde la primera molécula de ARN no comprende un marco de lectura abierto que codifica un antígeno.
381. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 380, en donde la primera molécula de ARN comprende una región de ARN no codificante.
- 5 382. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 381, en donde la primera molécula de ARN comprende una región de ARN codificante.
383. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 382, en donde la porción de caperuza 5' de la primera molécula de ARN es una caperuza 5' natural.
384. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 383, en donde la porción de caperuza 5' de la primera molécula de ARN es un análogo de caperuza 5'.
- 10 385. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 384, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP1 del alfavirus.
386. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 385, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP2 del alfavirus.
- 15 387. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 386, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP3 del alfavirus.
388. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 387, en donde la proteína no estructural comprende la proteína no estructural nsP4 del alfavirus.
389. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 388, en donde la proteína no estructural comprende las proteínas no estructurales nsP1, nsP2 y nsP3 del alfavirus.
- 20 390. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 389, en donde la primera molécula de ARN no comprende la proteína no estructural 4 del alfavirus (nsP4).
391. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 390, en donde la segunda molécula de ARN no comprende la proteína no estructural 4 del alfavirus (nsP4).
- 25 392. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 391, en donde la primera molécula de ARN comprende uno o más nucleótidos modificados.
393. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 392, en donde el promotor

subgenómico está unido operativamente al marco de lectura abierto.

394. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 393, en donde el promotor subgenómico comprende un elemento regulador que actúa en cis.

5 395. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 394, en donde el elemento regulador que actúa en cis se encuentra inmediatamente aguas abajo de B².

396. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 395, en donde el elemento regulador que actúa en cis es un elemento rico en AU.

10 397. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 396, en donde la segunda molécula de ARN comprende además: (1) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' del alfavirus, y (2) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' del alfavirus.

398. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 397, en donde la segunda molécula de ARN codifica al menos un antígeno.

399. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 398, en donde la segunda molécula de ARN comprende al menos 7000 nucleótidos.

15 400. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 399, en donde la segunda molécula de ARN comprende al menos 8000 nucleótidos.

401. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 400, en donde al menos el 80 % de las segundas moléculas de ARN totales son de longitud completa.

20 402. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 401, en donde el alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana.

403. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 402, en donde el alfavirus es el virus del bosque Semliki.

404. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 403, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 405. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 404, que comprende además un lípido catiónico.

406. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 405, que comprende además un

liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico o una nanoemulsión catiónica.

5 407. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 406, en donde la primera y la segunda molécula de ARN están encapsuladas, unidas o adsorbidas en un lípido catiónico.

408. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 407, en donde la primera y la segunda moléculas de ARN están encapsuladas en, unidas a o adsorbidas en un liposoma, una nanopartícula lipídica, un poliplexo, un cocleato, un virosoma, un complejo
10 inmunoestimulante, una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar, una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico, una nanoemulsión catiónica o una combinación de los mismos.

409. La composición de cualquiera de las cláusulas 292 a 408, en donde la primera y la
15 segunda molécula de ARN están purificadas.

410. Un método para expresar un polipéptido en una célula de mamífero, que comprende administrar a la célula de mamífero una composición que comprende (i) una primera molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 292 a 409, y (ii) una segunda molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 292 a 409, en donde el método expresa
20 el polipéptido de interés en una cantidad que es, cuando se mide en condiciones idénticas, mayor que un método que comprende administrar a la célula de mamífero una composición que comprende la segunda molécula de ARN, en ausencia de la primera molécula de ARN.

411. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición de acuerdo con cualquiera
25 de las cláusulas 292 a 409.

412. Un método para vacunar a un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 292 a 409.

413. Un método para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa, que comprende administrar
30 al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 292 a 397.

414. El método según cualquiera de las cláusulas 292 a 413, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de anticuerpos.

415. El método según cualquiera de las cláusulas 292 a 414, en donde la composición provoca una respuesta inmune que comprende una respuesta de células T.

5 416. Una composición que comprende un ARN autoamplificante (ARNsa) que comprende: una caperuza 5'; una región no traducida 5' (5' UTR); una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus; un primer promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un primer marco de lectura abierto que codifica un primer gen de interés derivado de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza; un segundo promotor subgenómico derivado
10 de un alfavirus; un segundo marco de lectura abierto que codifica un segundo gen de interés derivado del virus de la influenza; una región no traducida 3' (3' UTR); y una secuencia poli A 3'.

417. La composición según la cláusula 0, en donde el 5' UTR comprende la secuencia: AUAGGCGGC GCAUGAGAGA AGCCCAGACC AAUUACCUAC CCAA (SEQ ID NO: 8).

15 418. La composición según cualquiera de las cláusulas 0-0, en donde el primer promotor subgenómico se deriva del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV).

419. La composición según la cláusula 0, en donde el promotor comprende la secuencia: GGGCCCCUA UAACUCUCUA CGGCUAACCU GAAUGGACUA CGACAUAGUC UAGUCCGCCA AG (SEQ ID NO: 9).

20 420. La composición según cualquiera de las cláusulas 0-0, en donde la UTR 3' comprende AUAC AGCAGCAAUU GGCAAGCUGC UUACAUAGAA CUCGCGGCGA UUGGCAUGCC GCCUAAAAU UUUUAUUUUA UUUUUCUUUU CUUUUCCGAA UCGGAUUUUG UUUUUAAUAU UUC (SEQ ID NO: 10).

25 421. La composición según cualquiera de las cláusulas 0-0, en donde el segundo promotor subgenómico se deriva del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) y comprende la secuencia: GGGCCCCUA UAACUCUCUA CGGCUAACCU GAAUGGACUA CGACAUAGUC UAGUCCGCCA AG (SEQ ID NO: 9).

422. La composición según cualquiera de las cláusulas 0-0, en donde el segundo gen de interés se deriva de la neuraminidasa (NA) del virus de la influenza.

30 423. La composición según cualquiera de las cláusulas 0-0, en donde el ARNsa comprende

una secuencia Kozak, AUAUCGCA CC.

424. Una composición que comprende un ARN autoamplificante (ARNsa) que comprende: una caperuza 5'; una región no traducida 5' (5' UTR); una región codificante para una proteína no estructural derivada de un alfavirus; un promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un marco de lectura abierto que codifica un gen de interés derivado del virus de la influenza; una región no traducida 3' UTR); y una secuencia poli A 3'; en donde al menos el 5 % de una población total de un nucleótido particular en la molécula ha sido reemplazado con uno o más nucleótidos modificados o no naturales (SEQ ID NO: 11).
425. La composición según la cláusula 0, en donde el 5' UTR comprende la secuencia: AUAGGCGGC GCAUGAGAGA AGCCCAGACC AAUUACCUAC CCAA (SEQ ID NO: 8).
426. La composición según cualquiera de las cláusulas 0-0, en donde el primer promotor subgenómico se deriva del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV).
427. La composición según la cláusula 0, en donde el promotor comprende la secuencia: GGGCCCCUA UAACUCUCUA CGGCUAACCU GAAUGGACUA CGACAUAGUC UAGUCCGCCA AG (SEQ ID NO: 9).
428. La composición según cualquiera de las cláusulas 0-0, en donde la UTR 3' comprende AUAC AGCAGCAAUU GGCAAGCUGC UUACAUAGAA CUCGCGGCGA UUGGCAUGCC GCCUAAAAU UUUUAUUUUA UUUUUCUUUU CUUUUCCGAA UCGGAUUUUG UUUUUAAUAU UUC (SEQ ID NO: 10).
429. La composición según cualquiera de las cláusulas 0-0, en donde el ARNsa comprende una secuencia Kozak, AUAUCGCA CC (SEQ ID NO: 11).
430. Una composición que comprende una primera molécula de ARN que codifica un objetivo o gen de interés derivado del virus de la influenza y una segunda molécula de ARN que codifica una proteína no estructural de la influenza (NS1), en donde el segundo polinucleótido es un ARN autoamplificante.
431. La composición de la cláusula 430, en donde la segunda molécula de ARN comprende un nucleótido modificado.
432. La composición de cualquiera de las cláusulas 430 -431, en donde la primera molécula de ARN comprende un ARN autoamplificante.

433. La composición de la cláusula 432, en donde el ARN autoamplificante comprende nucleótidos no modificados.
434. La composición de la cláusula 432, en donde el ARN autoamplificante comprende 0 % de nucleótidos modificados.
- 5 435. La composición de la cláusula 432, en donde el ARN autoamplificante comprende nucleótidos modificados.
436. La composición según la cláusula 435, en donde menos de aproximadamente el 50 %, menos de aproximadamente el 45 %, menos de aproximadamente el 40 %, menos de aproximadamente el 35 %, menos de aproximadamente el 30 % o menos de
10 aproximadamente el 25 % de los ácidos nucleicos en el ARN autoamplificante son nucleótidos modificados.
437. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 436, en donde la primera molécula de ARN y la segunda molécula de ARN están unidas por al menos un nucleótido.
438. La composición según la cláusula 437, que comprende un polinucleótido que comprende
15 una primera molécula de ARN y una segunda molécula de ARN, y que comprende una caperuza 5'; una región no traducida 5' (5' UTR); una región codificante de una proteína no estructural derivada de un alfavirus; un primer promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un primer marco de lectura abierto que codifica un primer gen de interés derivado de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza; un segundo promotor subgenómico derivado de
20 un alfavirus; un segundo marco de lectura abierto que codifica un segundo gen de interés derivado del virus de la influenza; una región no traducida 3' (3' UTR); y una secuencia poli A 3', en donde el segundo gen de interés derivado del virus de la influenza es una proteína no estructural de la influenza (NS1).
439. La composición según la cláusula 438, que comprende además una secuencia IRES.
- 25 440. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 439, en donde el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido no están unidos.
441. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 440, en donde la NS1 de influenza es una NS1 de virus de influenza tipo A, una NS1 de virus de influenza tipo B, una NS1 de virus de influenza tipo C o una variante del mismo.
- 30 442. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 441, en donde la NS1 de

influenza es una H1N1 NS1, H1N2 NS1, H2N2 NS1, H3N2 NS1, H5N1 NS1, H7N9 NS1, H7N7 NS1, H9N2 NS1, H7N2 NS1, H7N3 NS1, H5N2 NS1, H10N7 NS1, o cualquier combinación de las mismas.

5 443. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 442, en donde la NS1 de influenza está codificada por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos
10 establecida en SEQ ID NO: 33.

444. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 443, en donde la expresión del ARNm objetivo aumenta con respecto a la expresión del ARNm objetivo en ausencia de la primera molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS1 de la influenza.

15 445. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 444, en donde la expresión del ARNm diana aumenta en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 100 %, al menos aproximadamente un 125 %, al menos aproximadamente un 150 %, al
20 menos aproximadamente un 175 %, al menos aproximadamente un 200 %, al menos aproximadamente un 225 %, al menos aproximadamente un 250 %, al menos aproximadamente un 275 % o al menos aproximadamente un 300 % con respecto a la expresión del ARNm diana en ausencia de la primera molécula de ácido nucleico que codifica
25 la proteína NS1 de la influenza.

446. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 445, en donde el aumento de la expresión del ARNm diana persiste durante al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos
30 aproximadamente 36 horas, al menos aproximadamente 42 horas o al menos aproximadamente 48 horas.

447. La composición según cualquiera de las cláusulas 430 a 446, en donde las moléculas de

ARN están encapsuladas en una nanopartícula lipídica.

448. Una composición inmunogénica según cualquiera de las cláusulas 430 a 447.

449. Un método para expresar un ARNm objetivo en una célula, que comprende suministrar a la célula una composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 430 a 448.

- 5 450. Un método para expresar un objetivo o gen de interés derivado del virus de la influenza en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 430 a 449.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una primera molécula de ARN que codifica un objetivo o gen de interés derivado del virus de la influenza y una segunda molécula de ARN que codifica una proteína no estructural de la influenza (NS1), caracterizada porque el primer polinucleótido es un ARN autoamplificante.
5
2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la segunda molécula de ARN comprende un nucleótido modificado.
3. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizada porque la segunda molécula de ARN no comprende un promotor subgenómico derivado de un alfavirus.
10
4. La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque el ARN autoamplificante comprende nucleótidos no modificados.
5. La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque el ARN autoamplificante comprende nucleótidos modificados.
- 15 6. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque menos de aproximadamente el 50 % de los ácidos nucleicos en el ARN autoamplificante son nucleótidos modificados.
7. La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la primera molécula de ARN comprende una caperuza 5'; una región no traducida 5' (5' UTR); una región
20 codificante de una proteína no estructural derivada de un alfavirus; un primer promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un primer marco de lectura abierto que codifica un primer gen de interés derivado de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza; un segundo promotor subgenómico derivado de un alfavirus; un segundo marco de lectura abierto que codifica un segundo gen de interés derivado del virus de la influenza; una región no traducida
25 3' (3' UTR); y una secuencia poli A 3', en donde el segundo gen de interés derivado del virus de la influenza es una proteína no estructural de la influenza (NS1).
8. La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque comprende además una secuencia IRES.
9. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizada
30 porque la primera molécula de ARN y la segunda molécula de ARN no están unidas.

- 10.** La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizada porque la NS1 de influenza se selecciona del grupo que consiste en una NS1 de virus de influenza tipo A, una NS1 de virus de influenza tipo B, una NS1 de virus de influenza tipo C y una variante de las mismas.
- 5 **11.** La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizada porque la NS1 de influenza se selecciona del grupo que consiste en una H1N1 NS1, H1N2 NS1, H2N2 NS1, H3N2 NS1, H5N1 NS1, H7N9 NS1, H7N7 NS1, H9N2 NS1, H7N2 NS1, H7N3 NS1, H5N2 NS1, H10N7 NS1 y cualquier combinación de las mismas.
- 10 **12.** La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizada porque la NS1 de influenza está codificada por una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33.
- 15 **13.** La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizada porque la expresión del ARNm objetivo aumenta en relación con la expresión del ARNm objetivo en ausencia de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS1 de la influenza.
- 20 **14.** La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizada porque la expresión del ARNm objetivo aumenta en al menos aproximadamente un 10 % con respecto a la expresión del ARNm objetivo en ausencia de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína NS1 de la influenza.
- 25 **15.** La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizada porque el aumento en la expresión del ARNm objetivo persiste durante al menos aproximadamente 6 horas.
- 30 **16.** La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, caracterizada porque las moléculas de ARN están encapsuladas en una nanopartícula lipídica.
- 17.** Una composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
- 18.** Un método para expresar un ARNm diana en una célula, caracterizado porque comprende suministrar a la célula una composición de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 1-17.

19. Un método para expresar una diana o gen de interés derivado del virus de la influenza en un sujeto que lo necesita, caracterizado porque comprende administrar al sujeto la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen en este documento moléculas de ARN autoamplificantes (ARNsa) que codifican un antígeno del virus de la influenza y métodos de uso de las mismas.

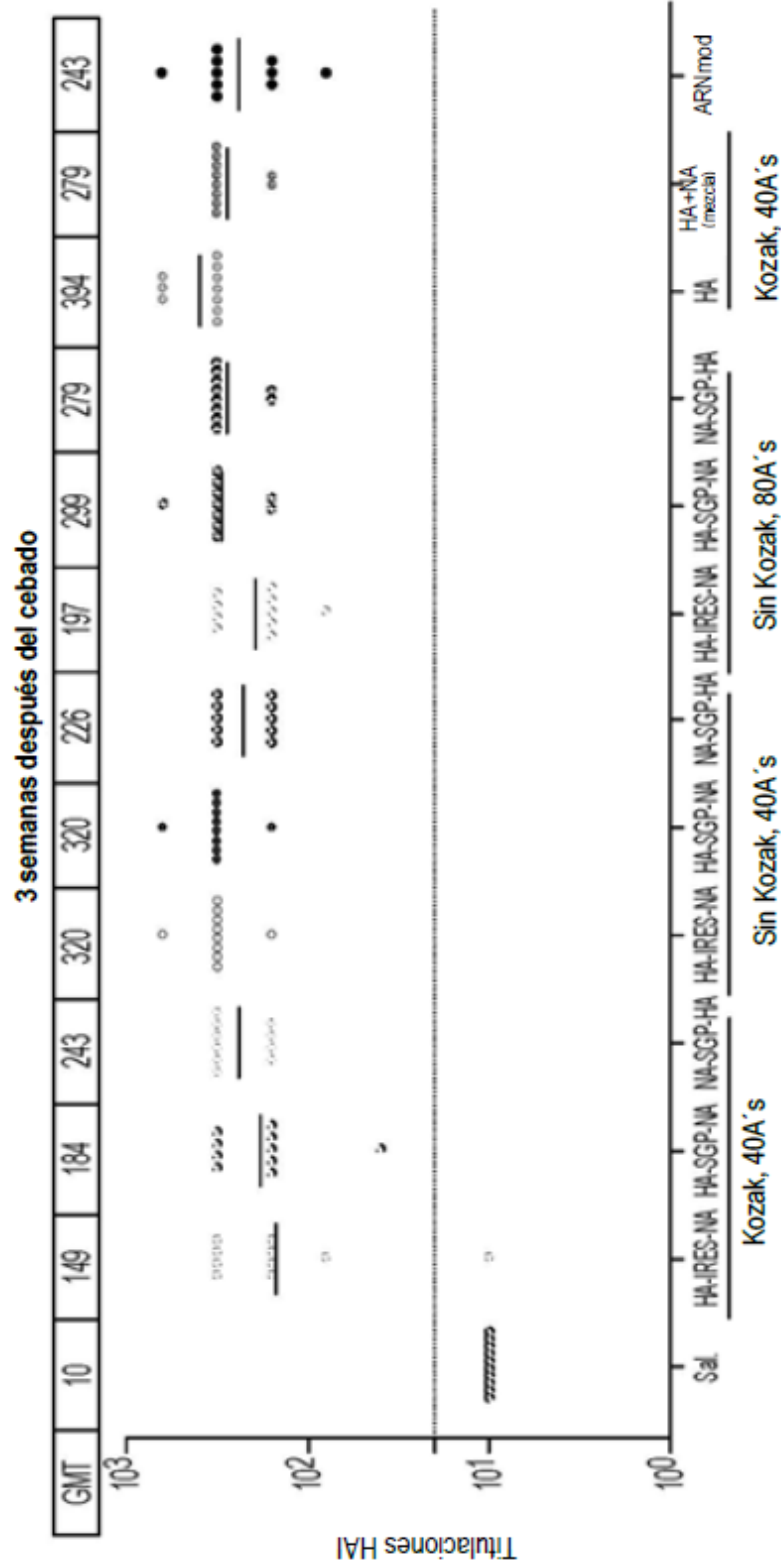


FIGURA 1A

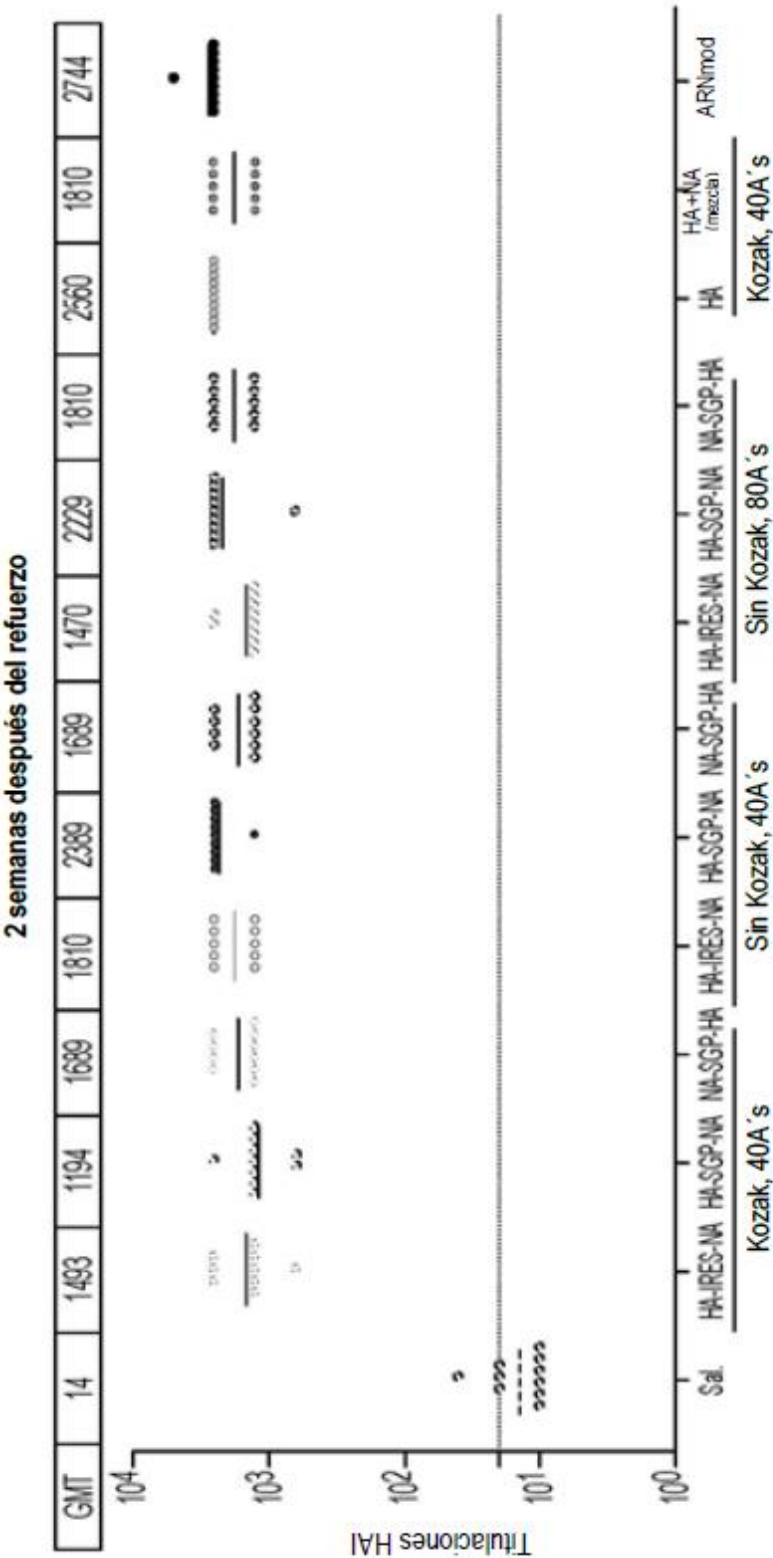


FIGURA 1B

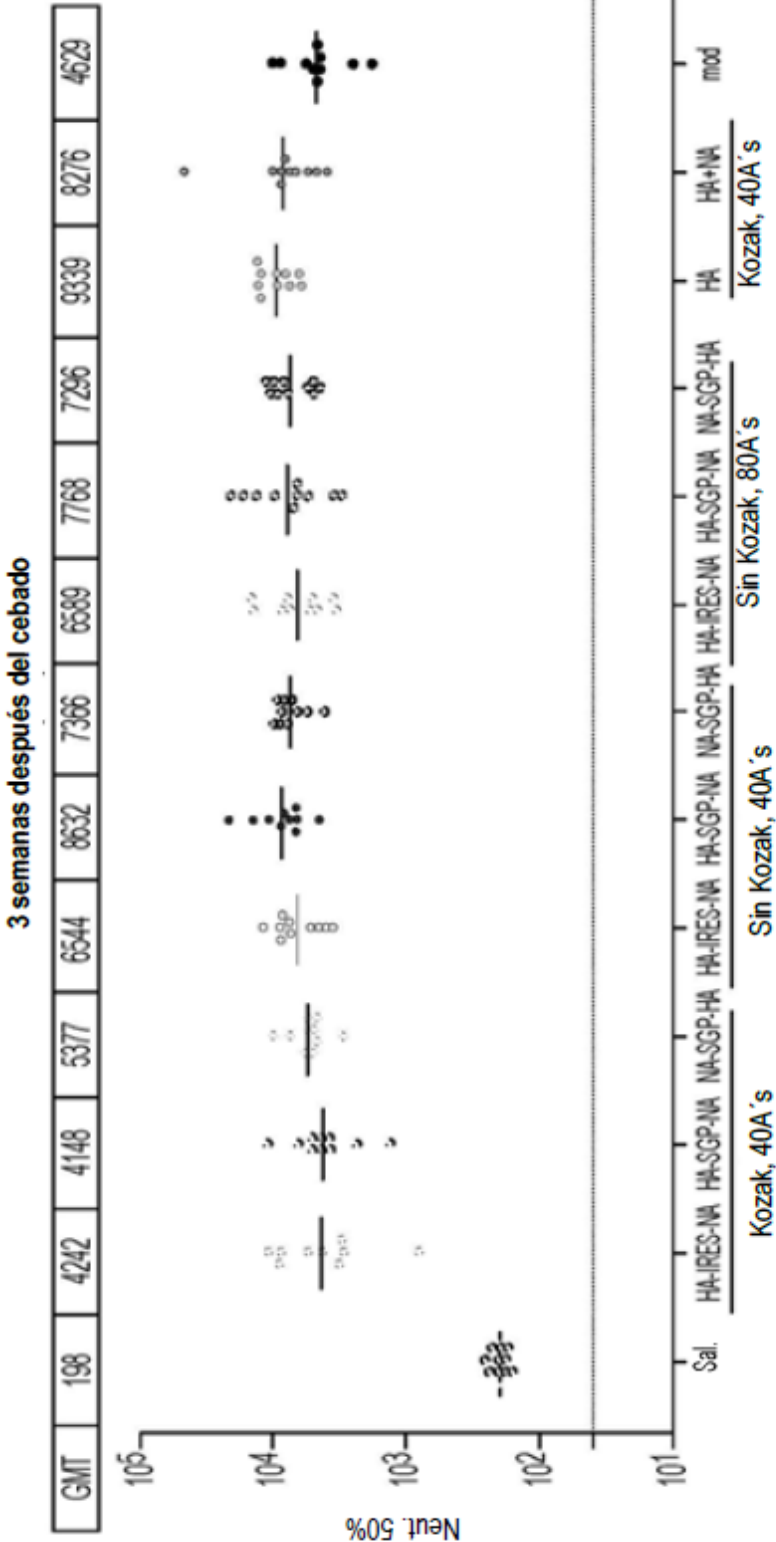


FIGURA 2A

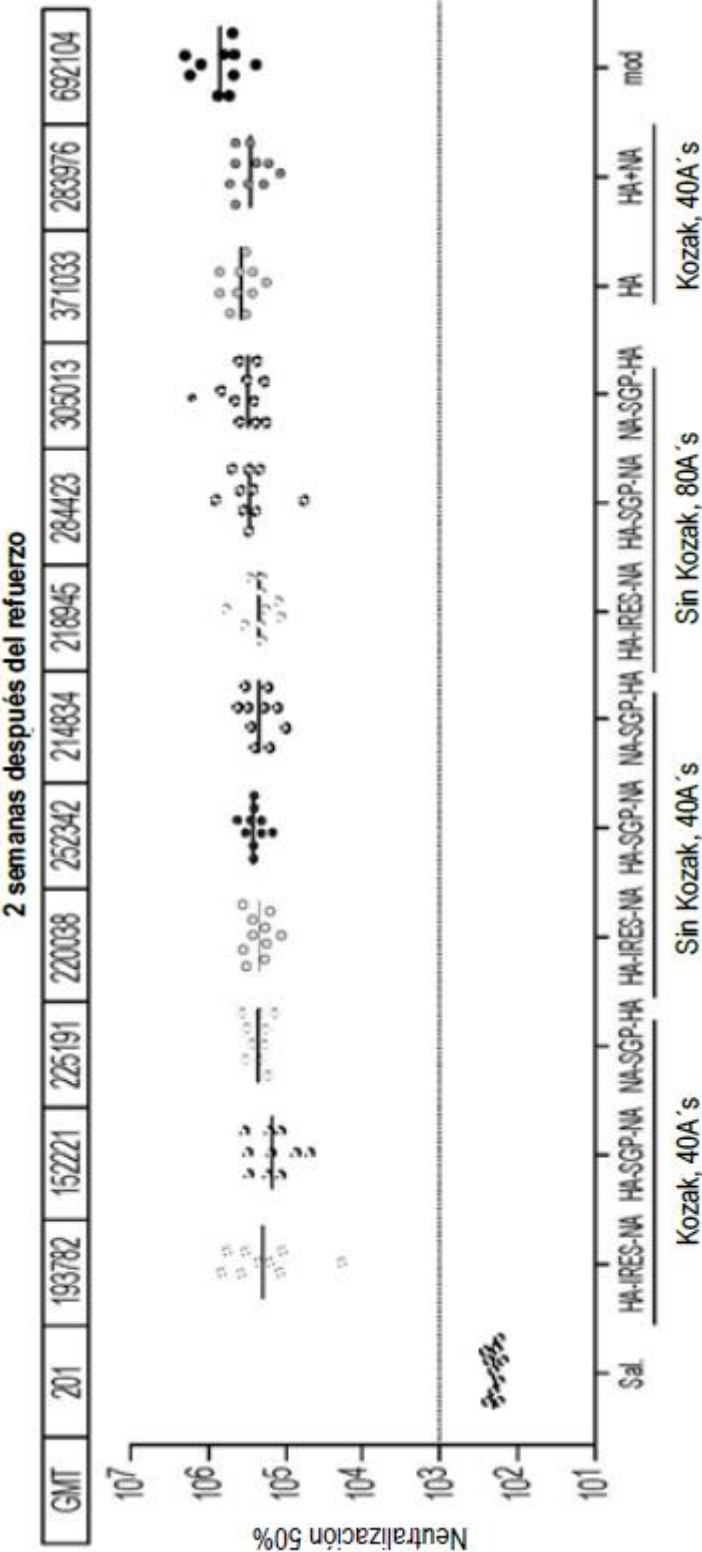


FIGURA 2B

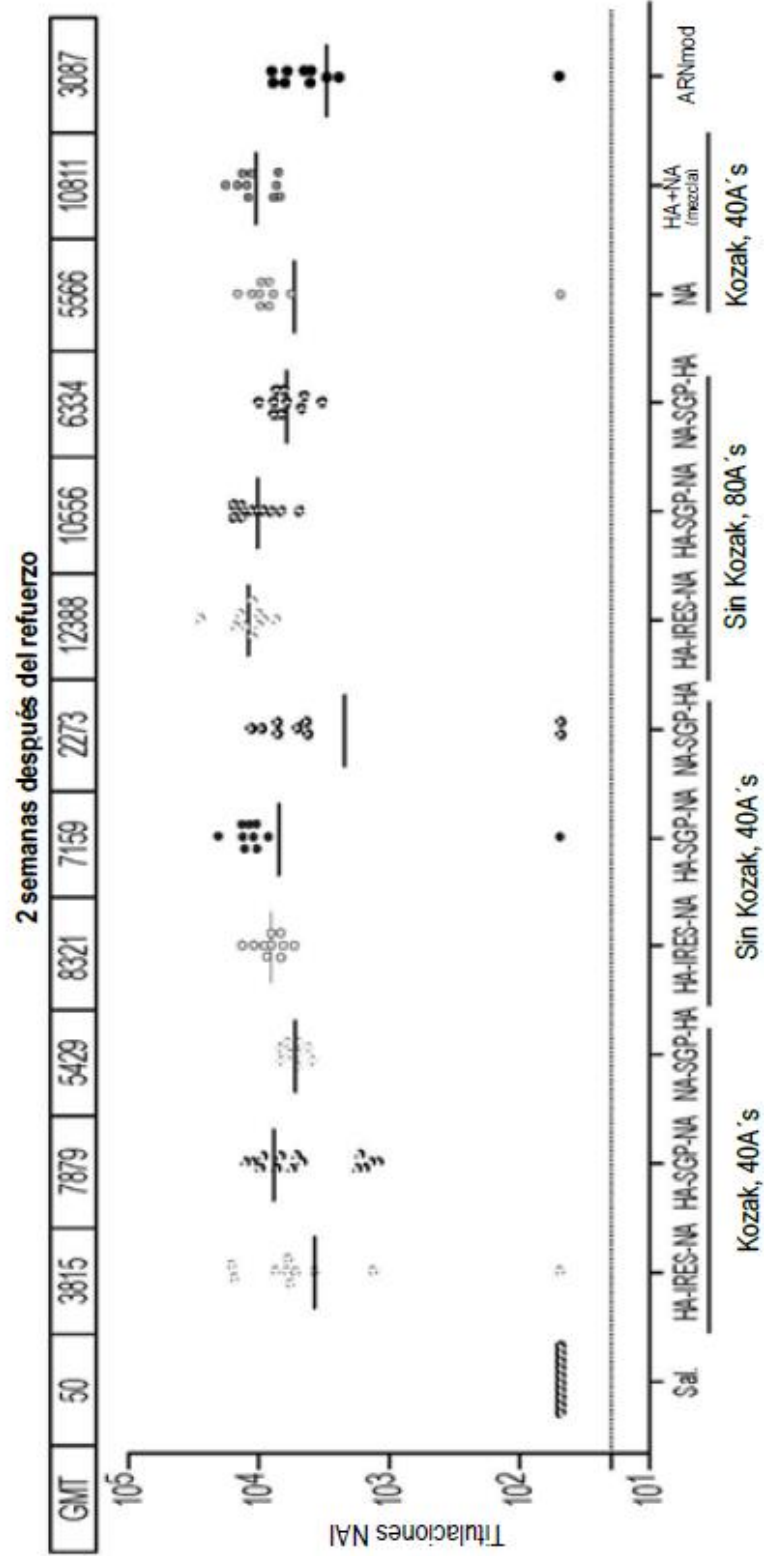


FIGURA 4B

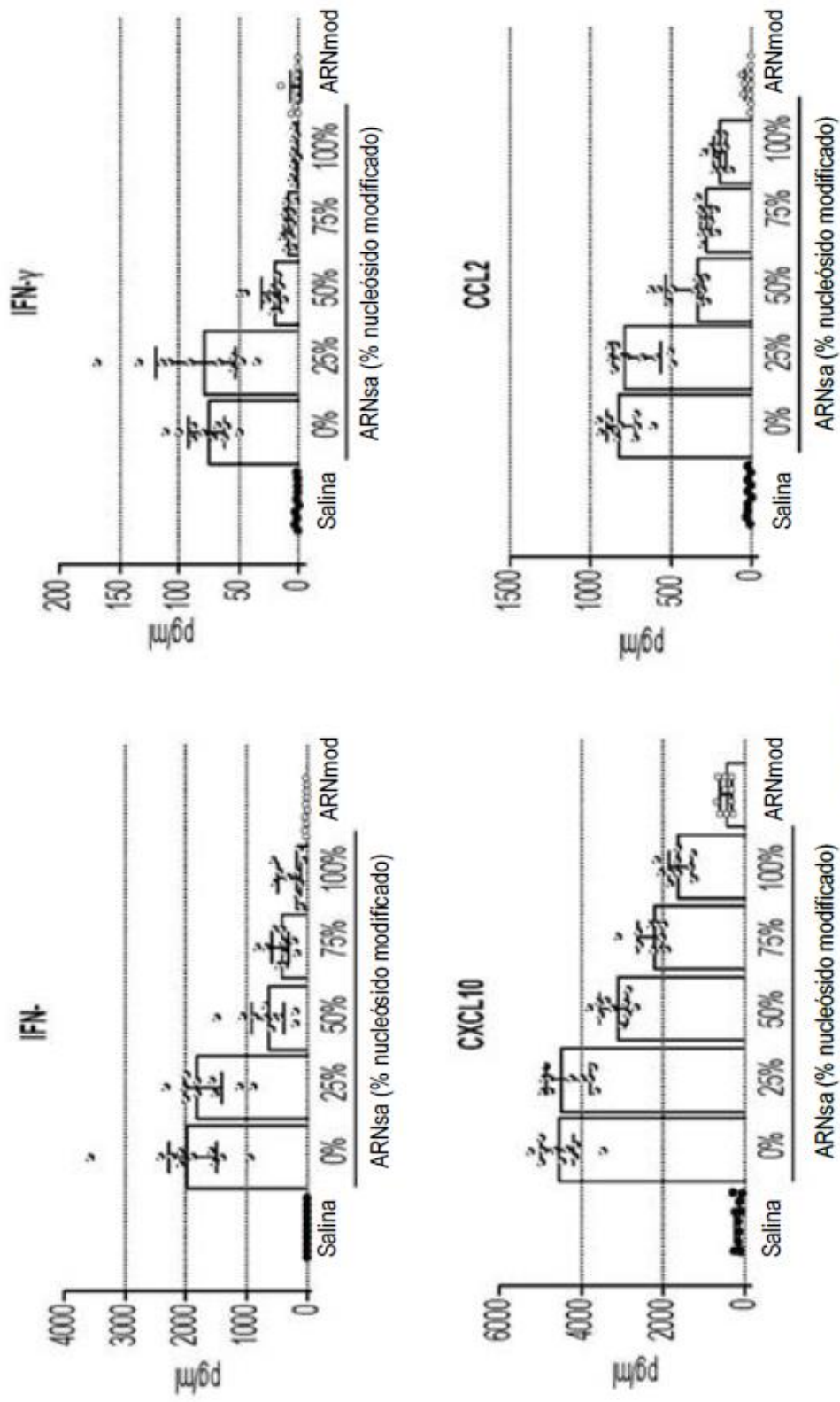


FIGURA 5

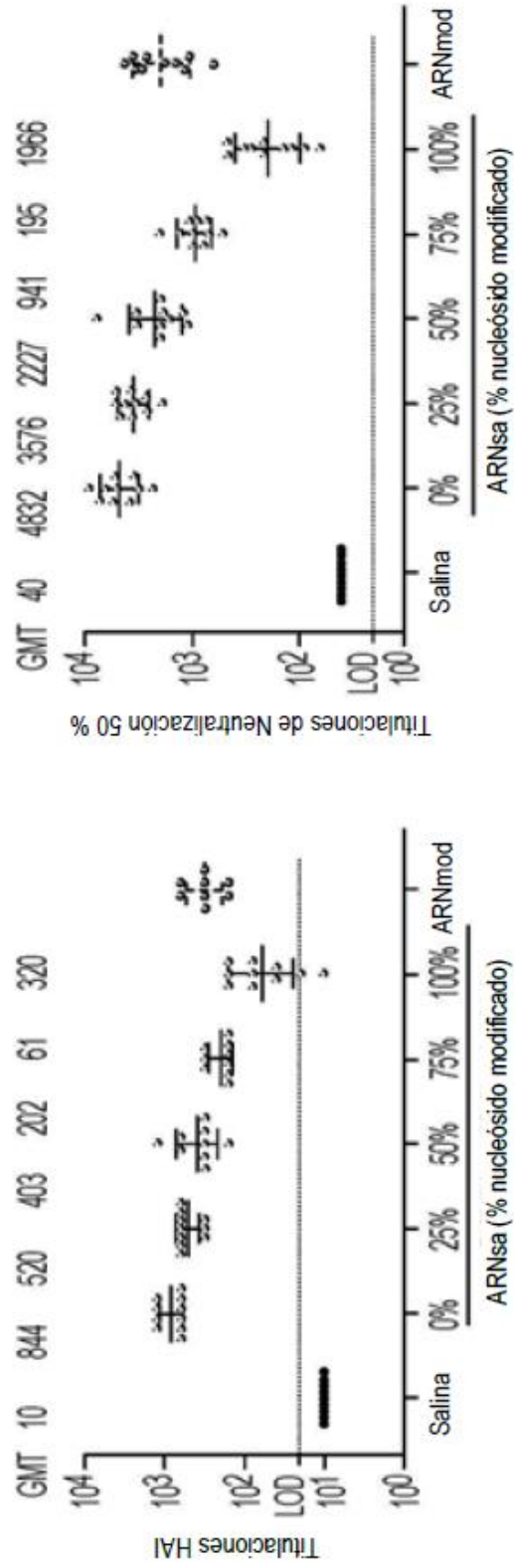


FIGURA 6

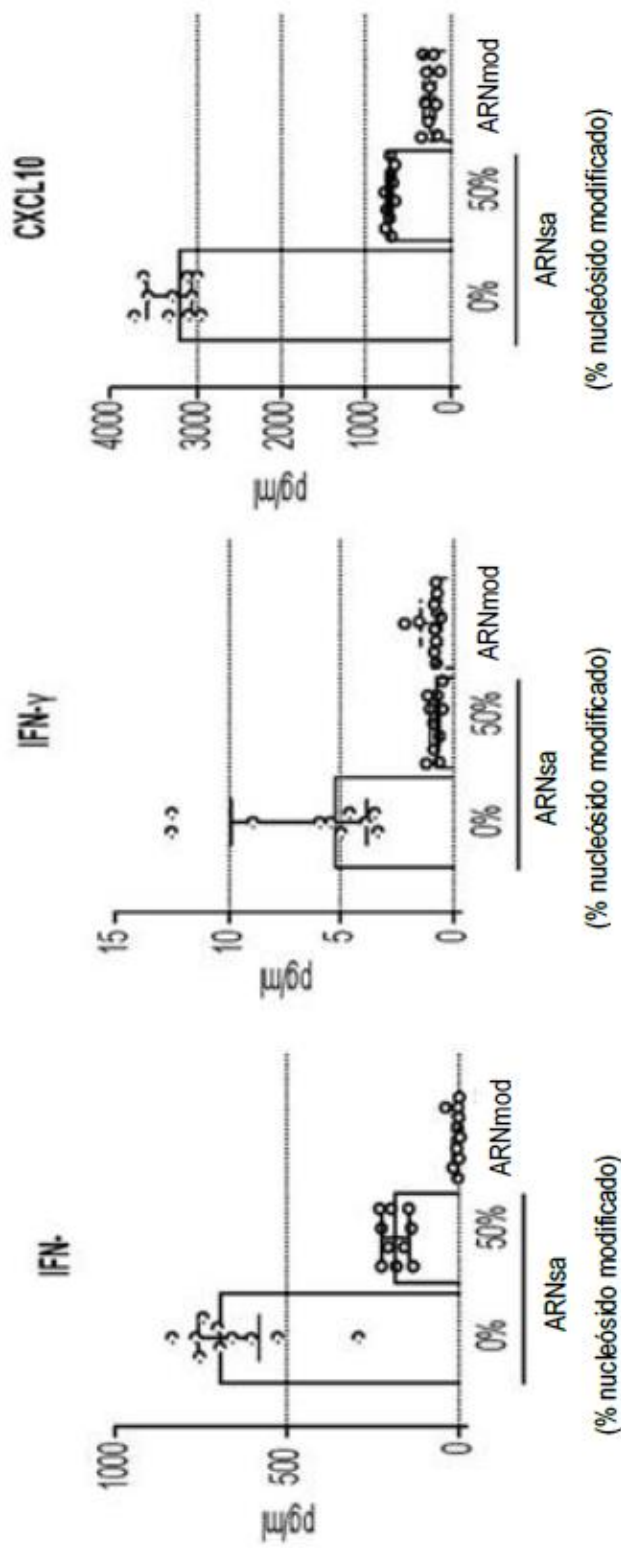


FIGURA 7

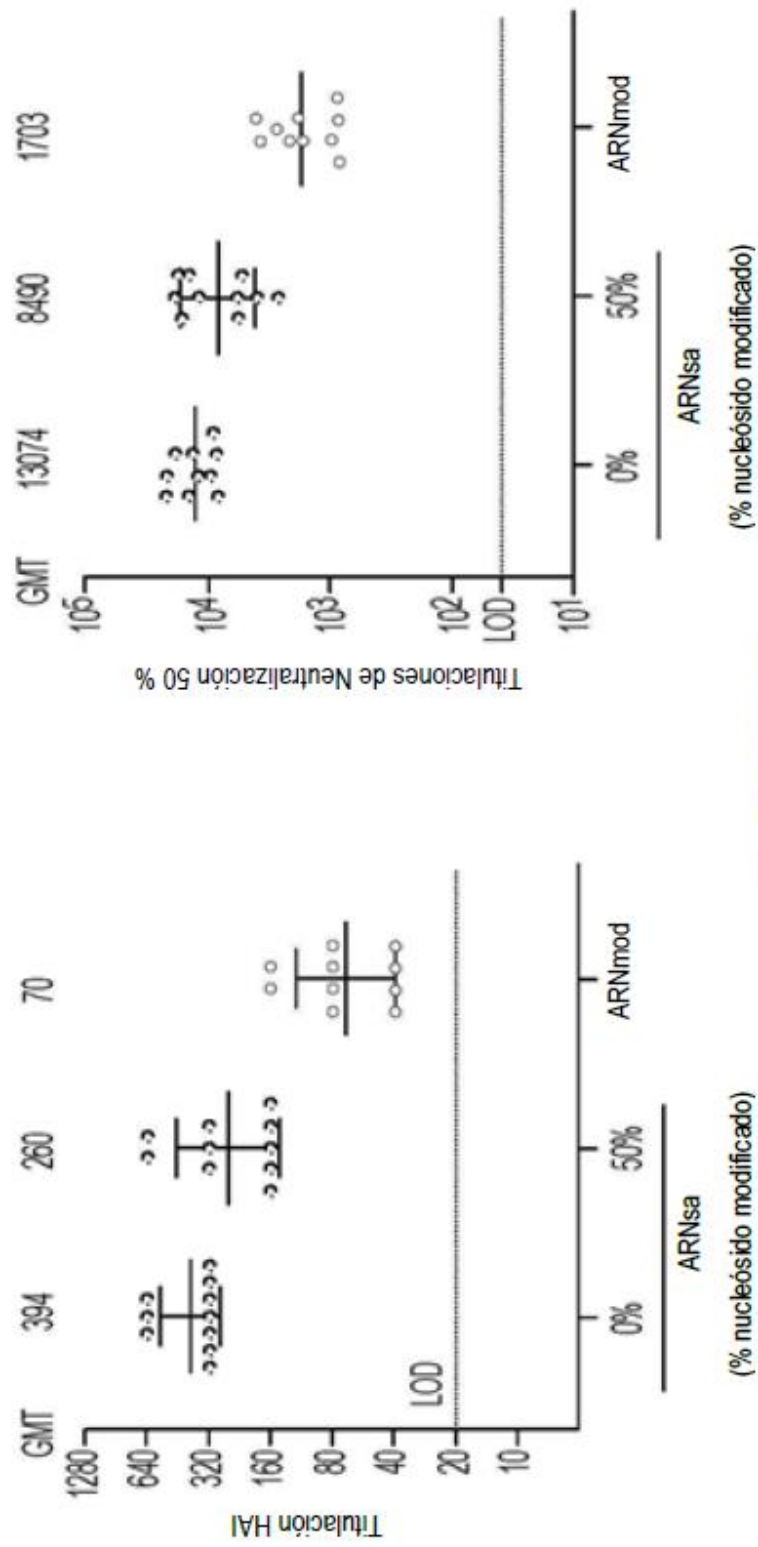


FIGURA 8

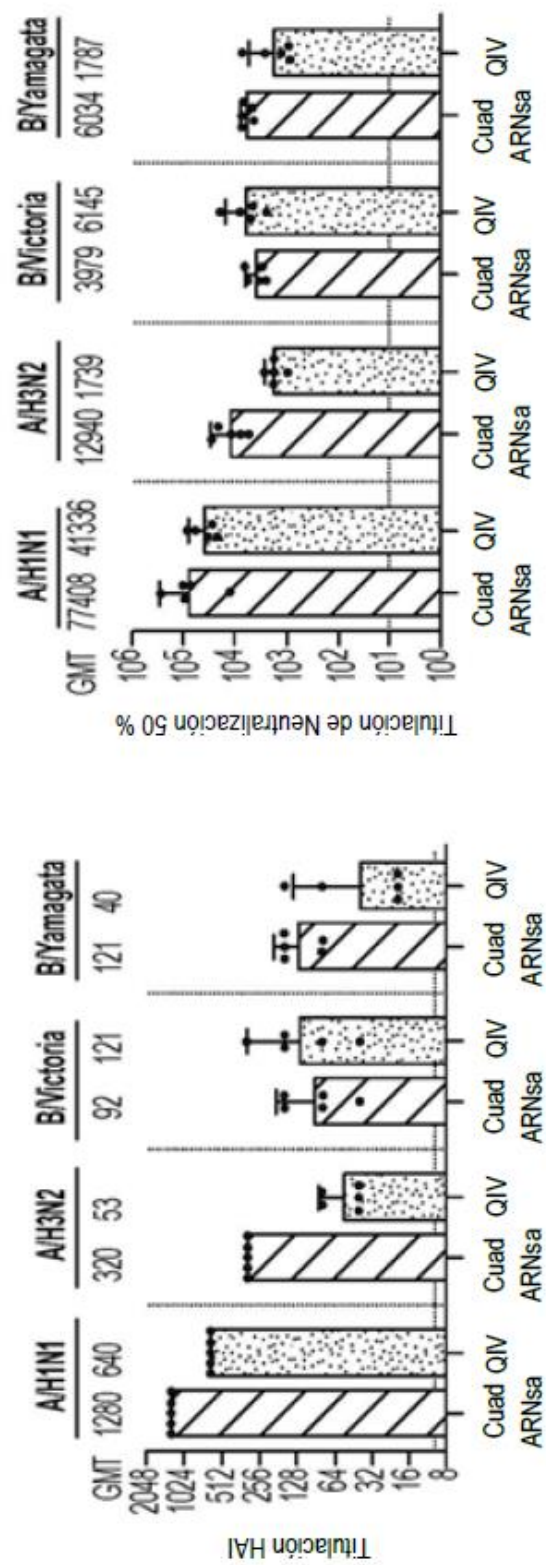


FIGURA 9

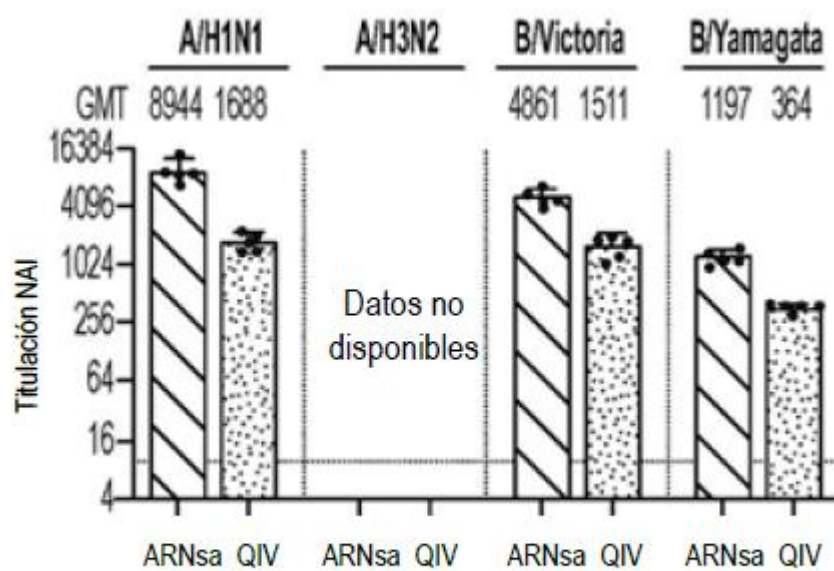
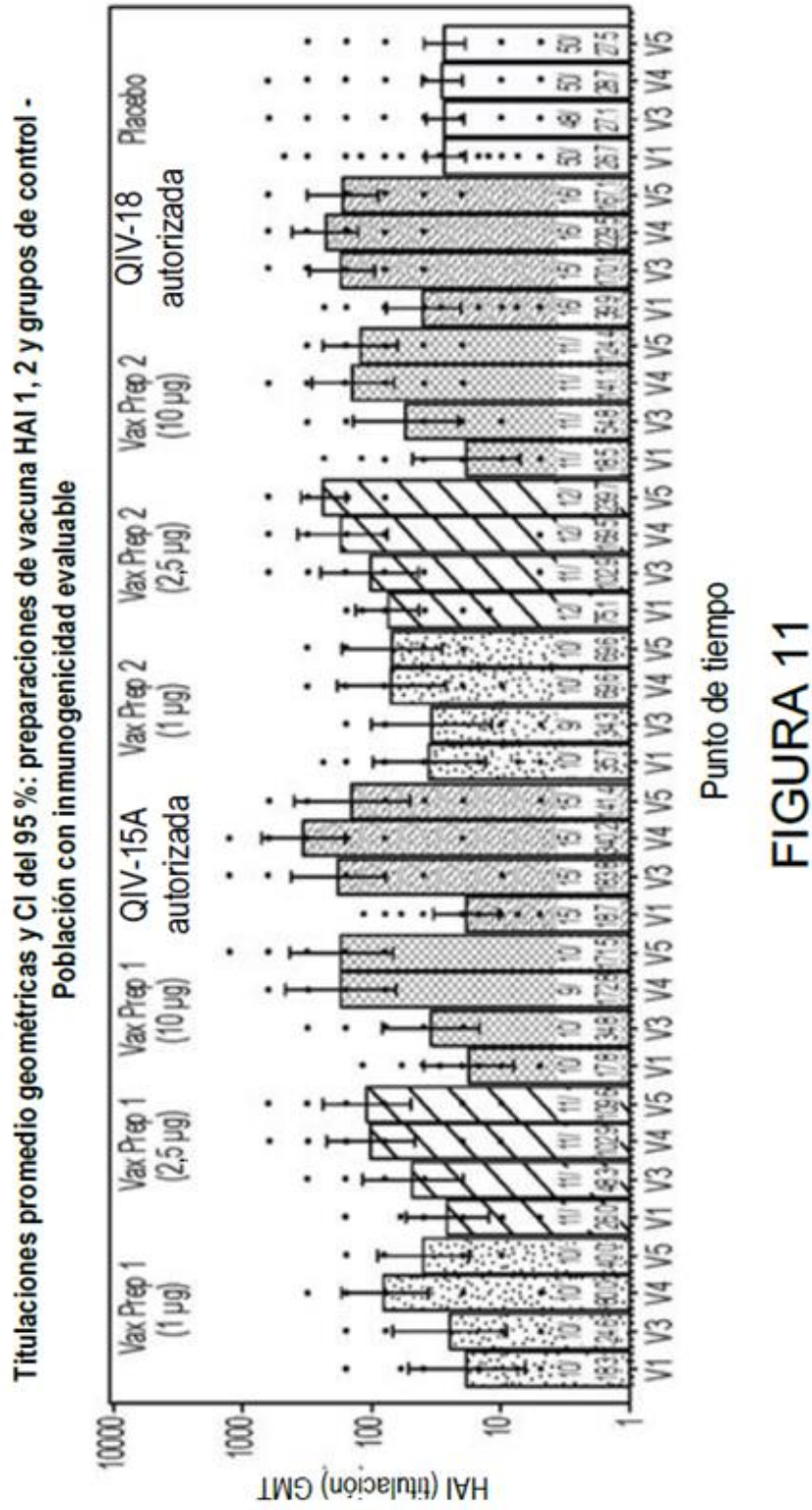


FIGURA 10



Titulaciones promedio geométricas y CI del 95 %: preparaciones de vacuna HAI 3, 4, 7 y grupos de control -
Población con inmunogenicidad evaluable

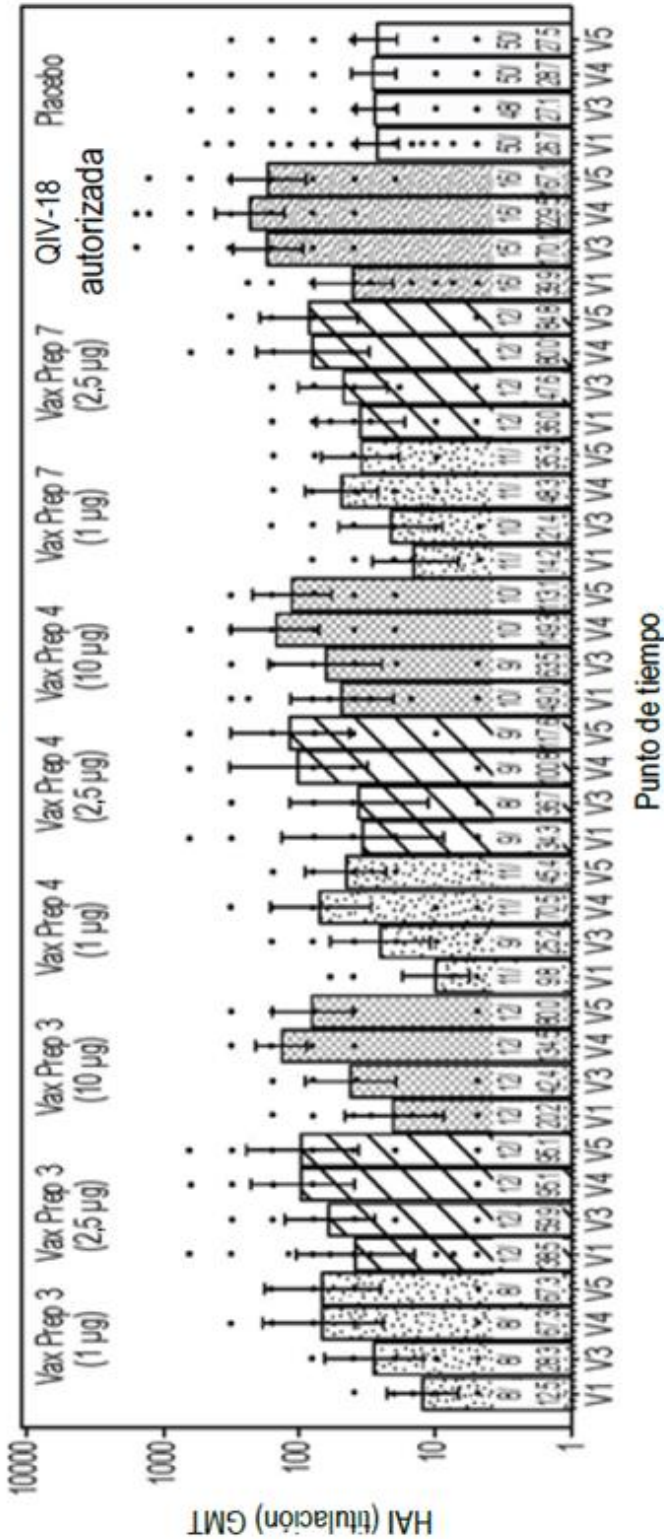


FIGURA 12

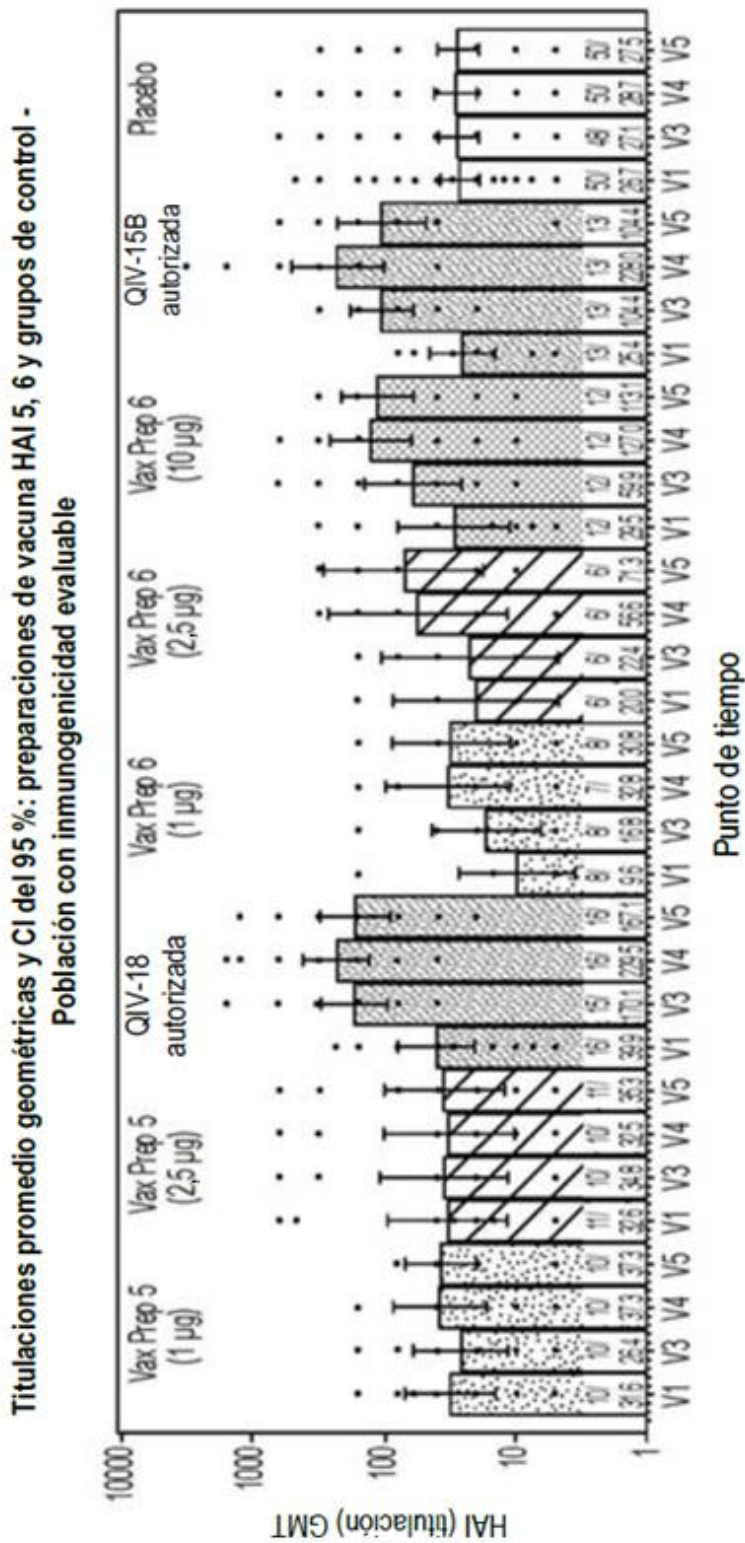


FIGURA 13

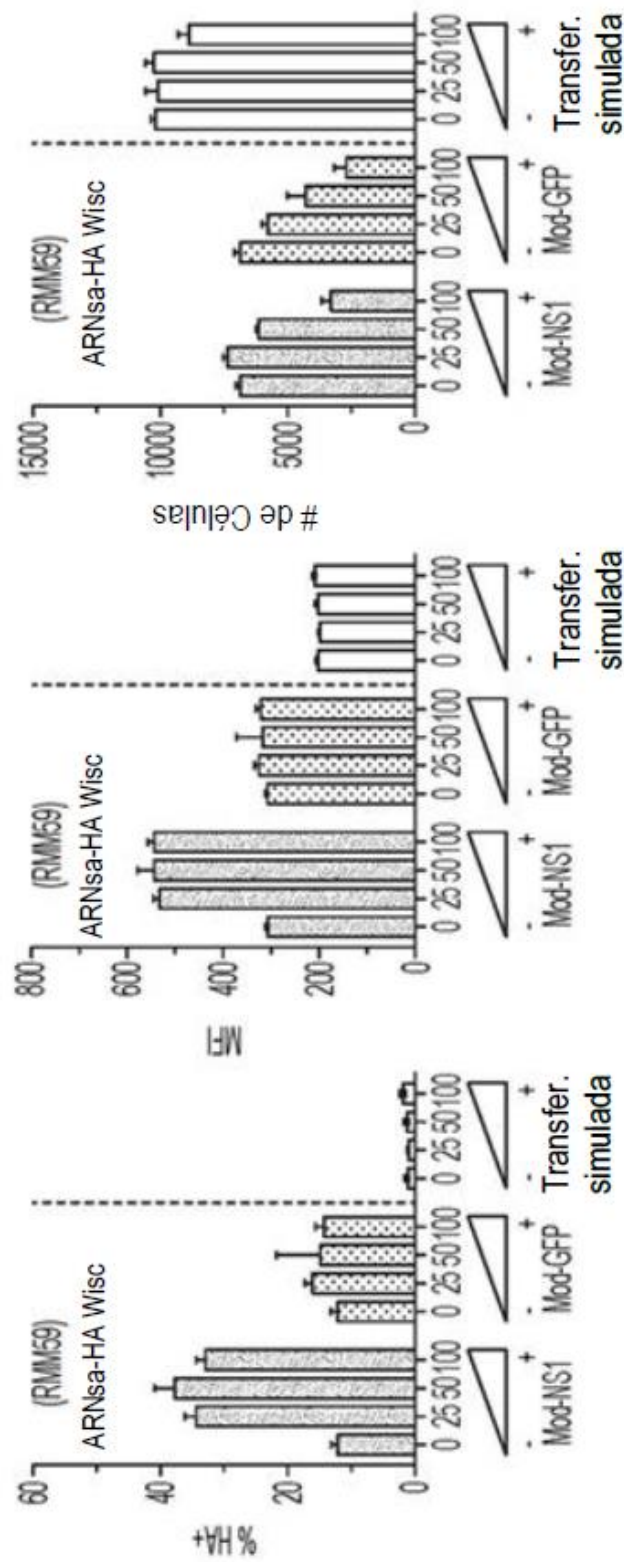


FIGURA 14

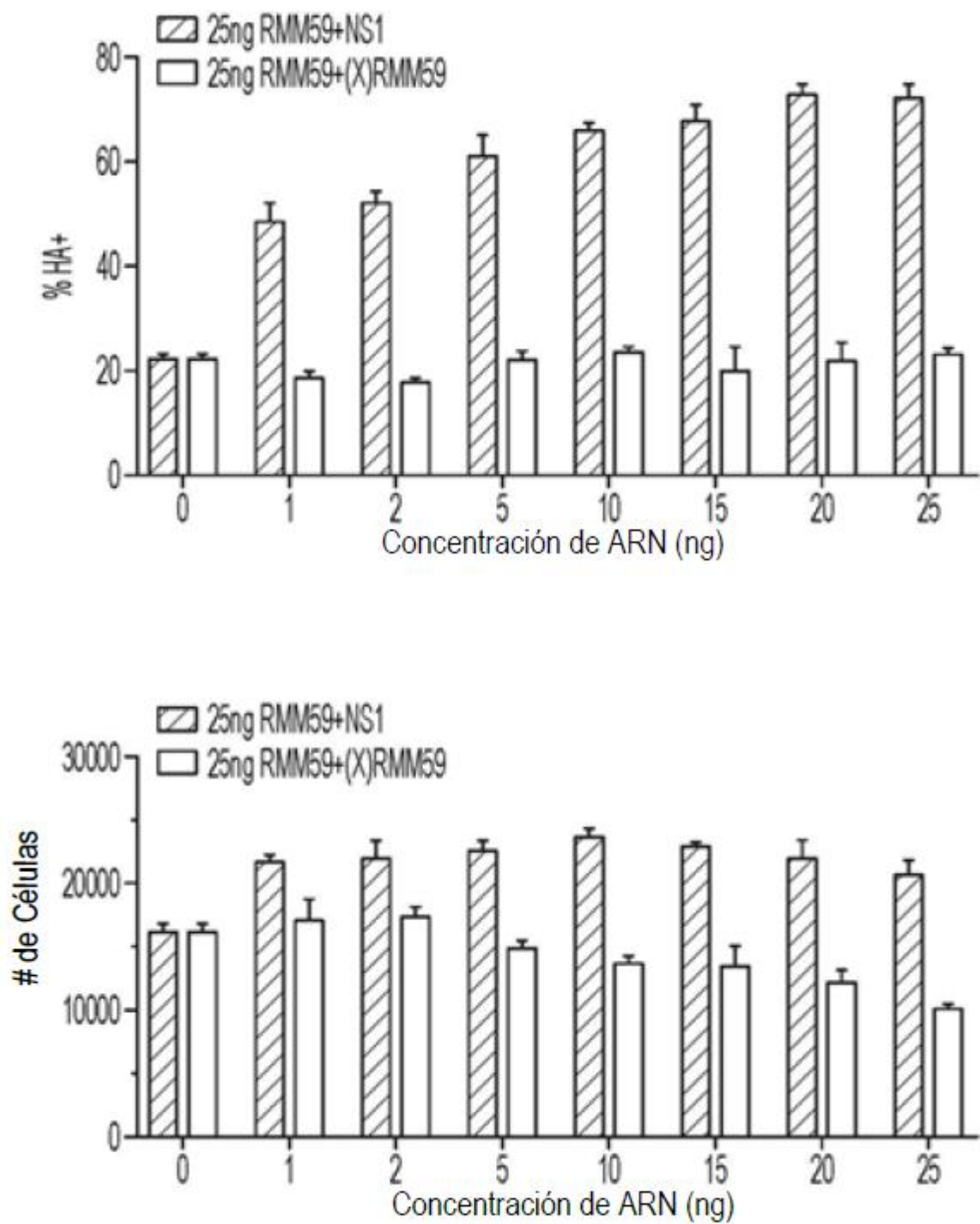


FIGURA 15

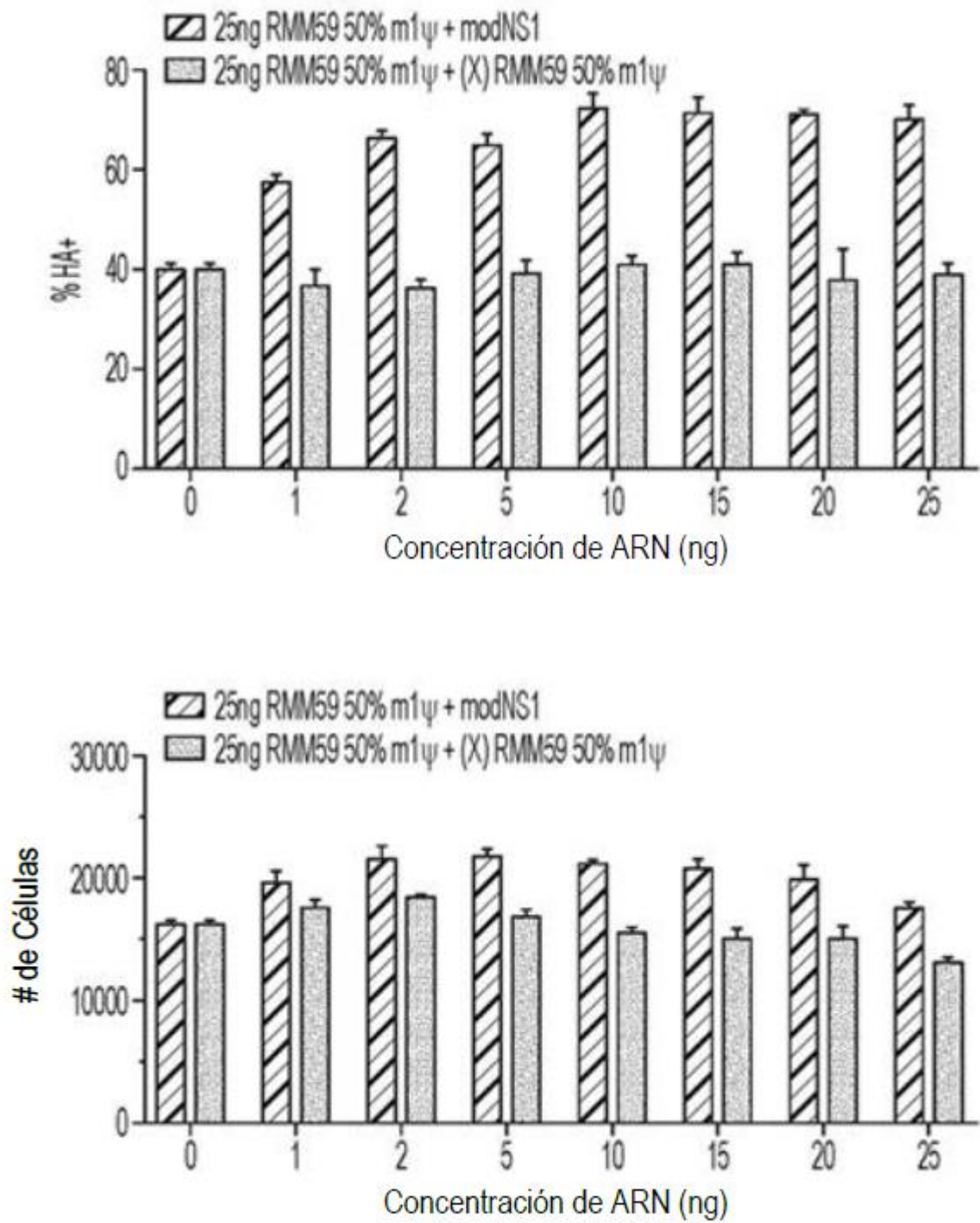


FIGURA 16

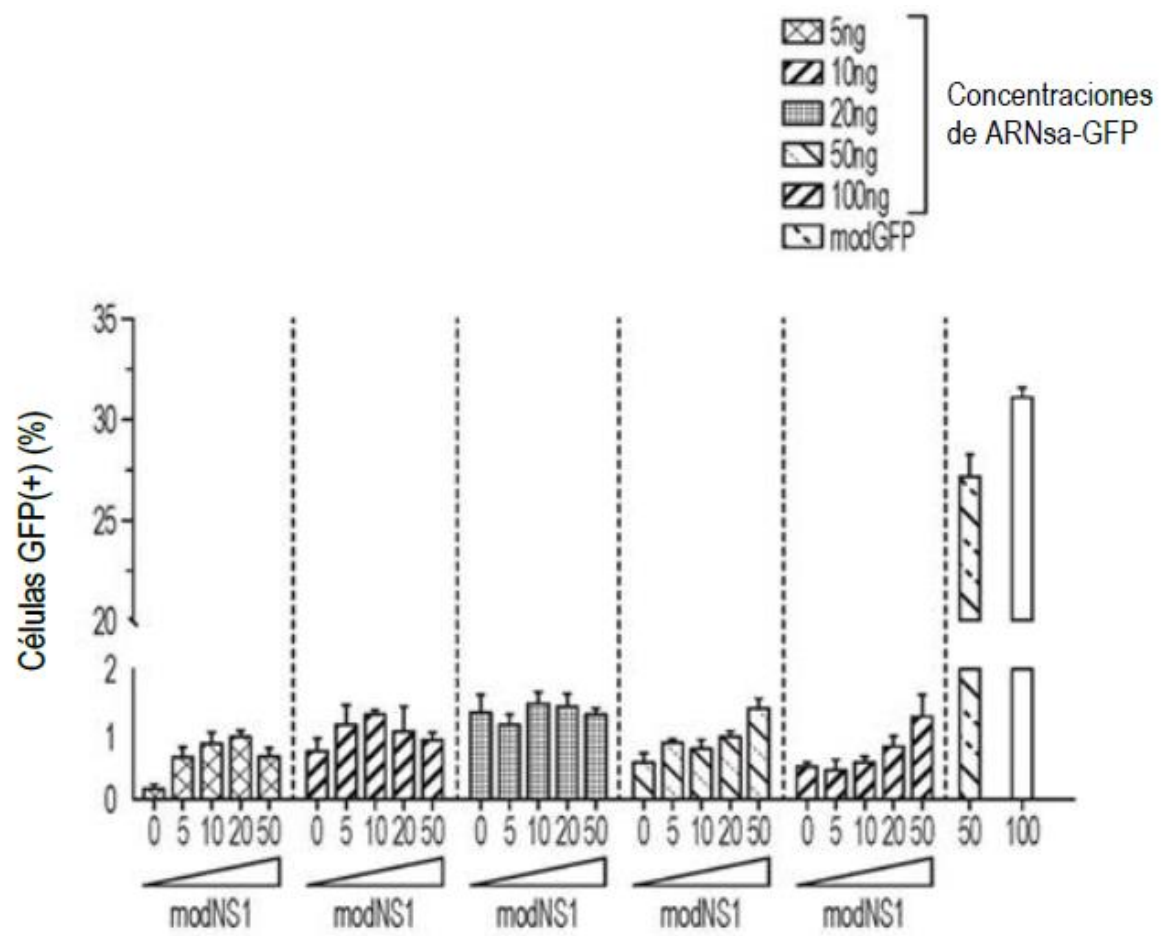


FIGURA 17

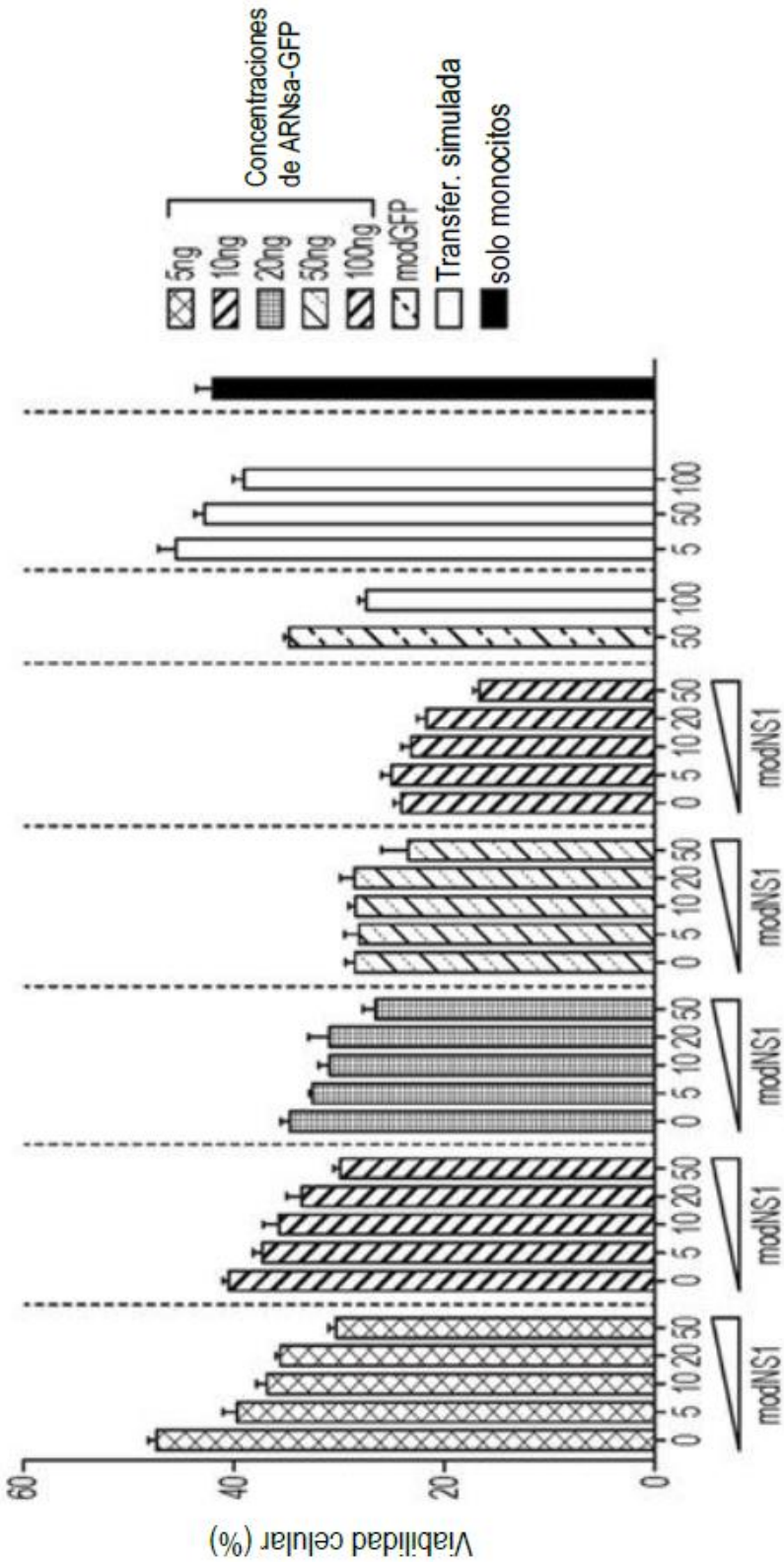


FIGURA 18

FIGURA 19A

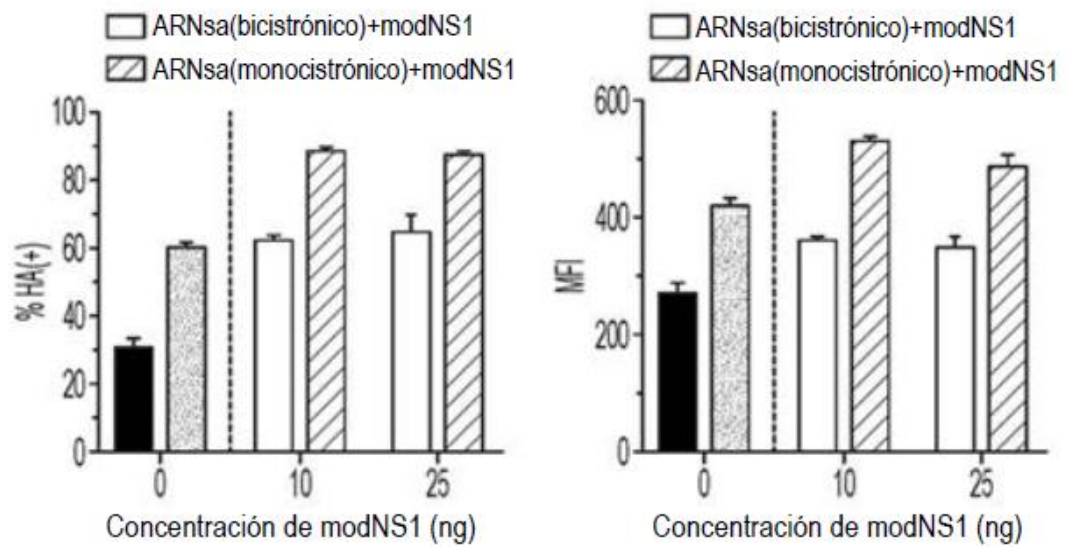


FIGURA 19B

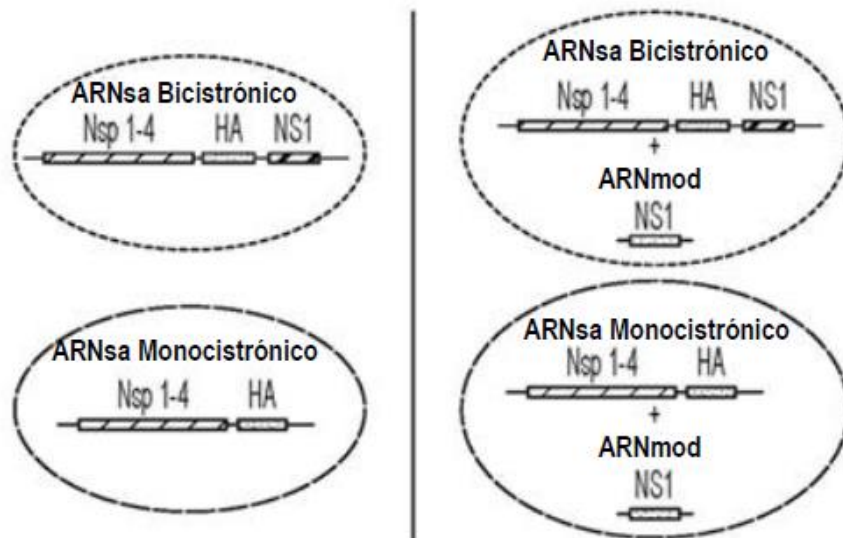


FIGURA 20A

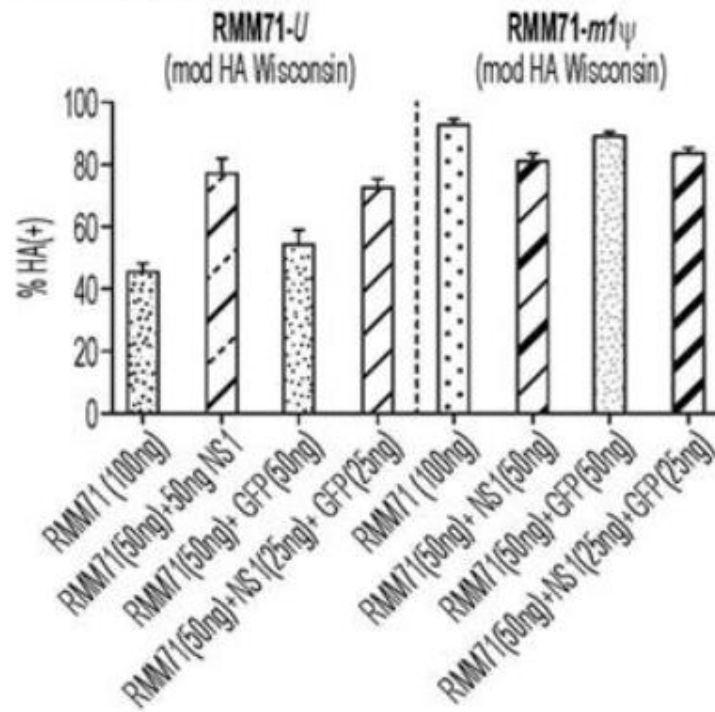


FIGURA 20B

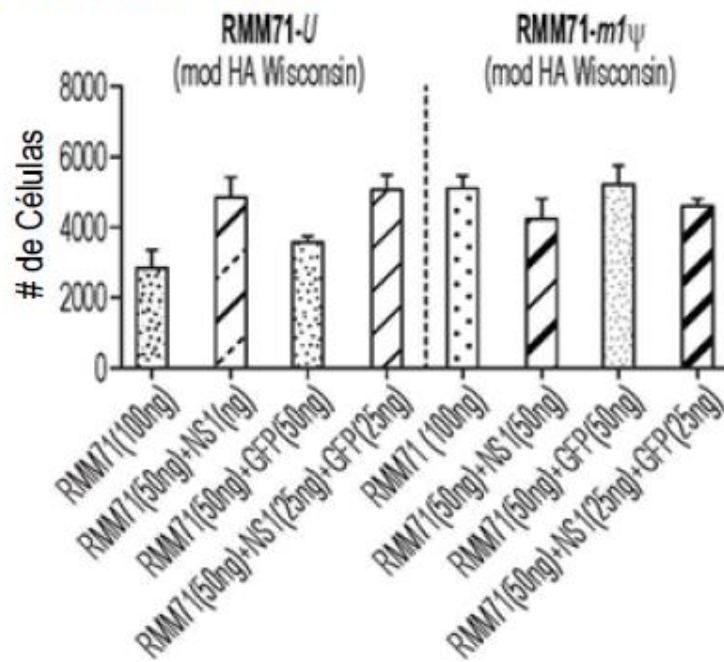
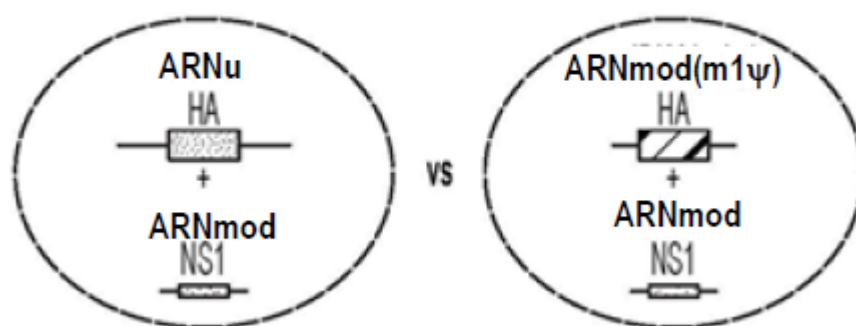


FIGURA 20C



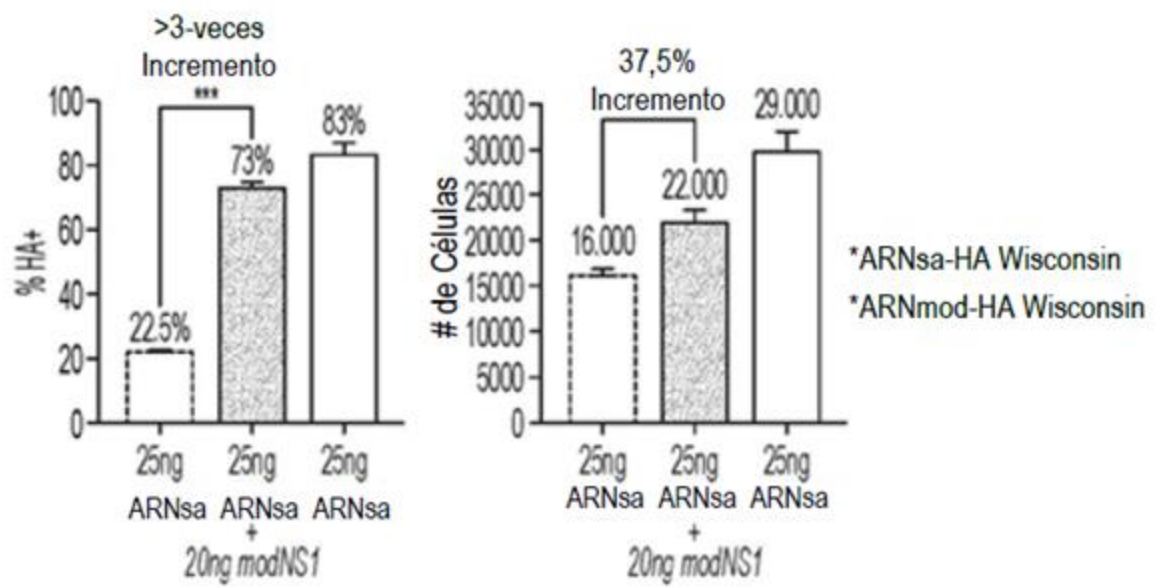


FIGURA 21

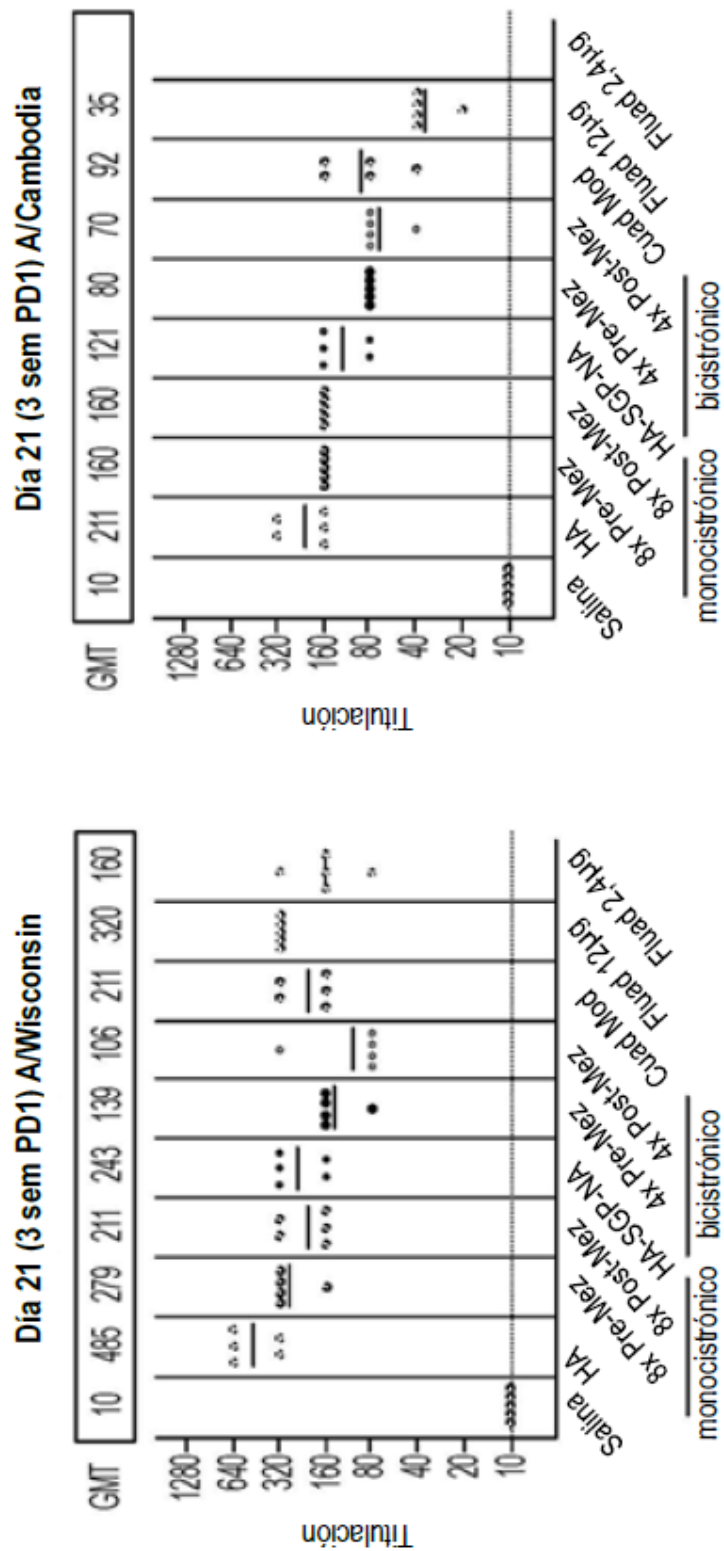


FIGURA 22

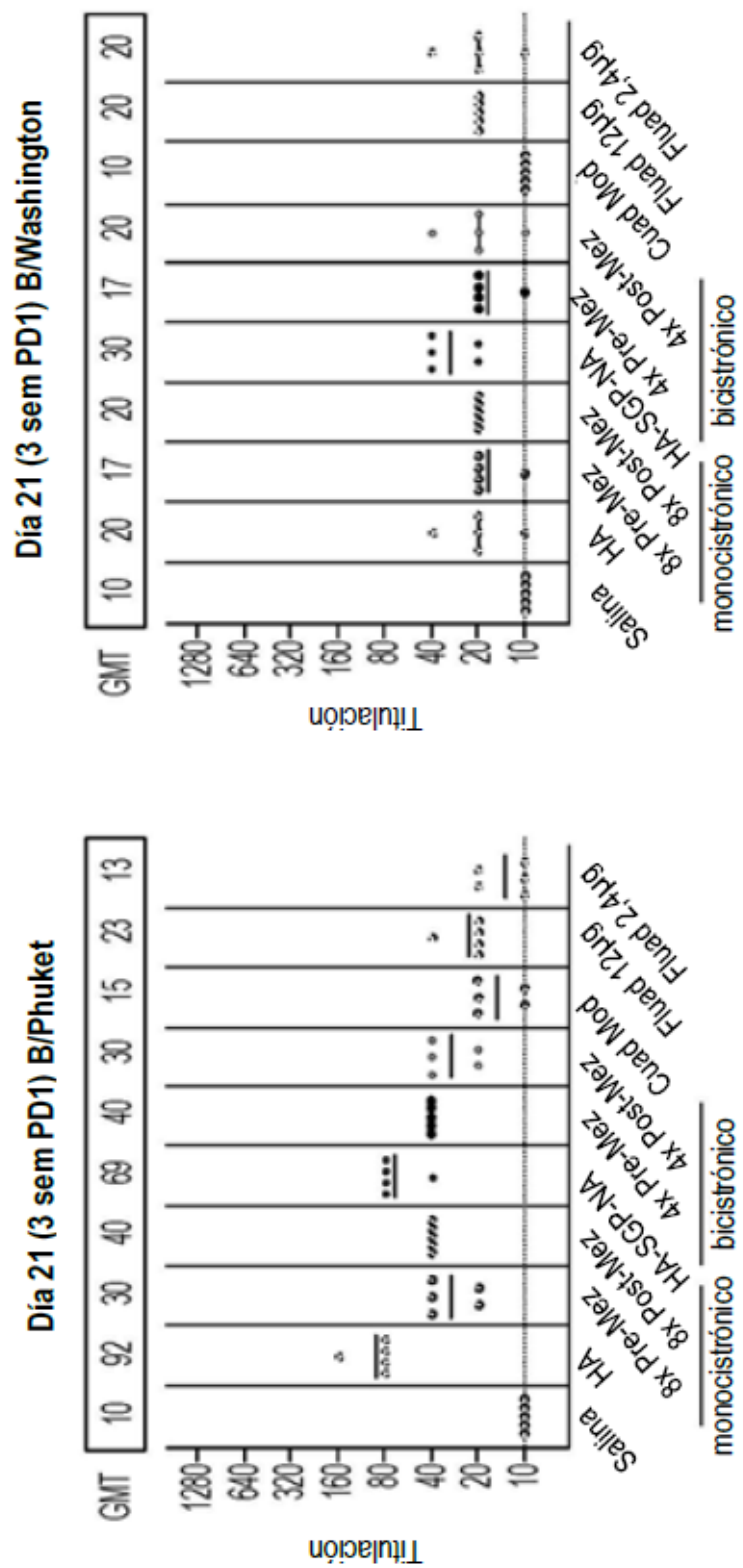


FIGURA 22
(CONTINUACIÓN)

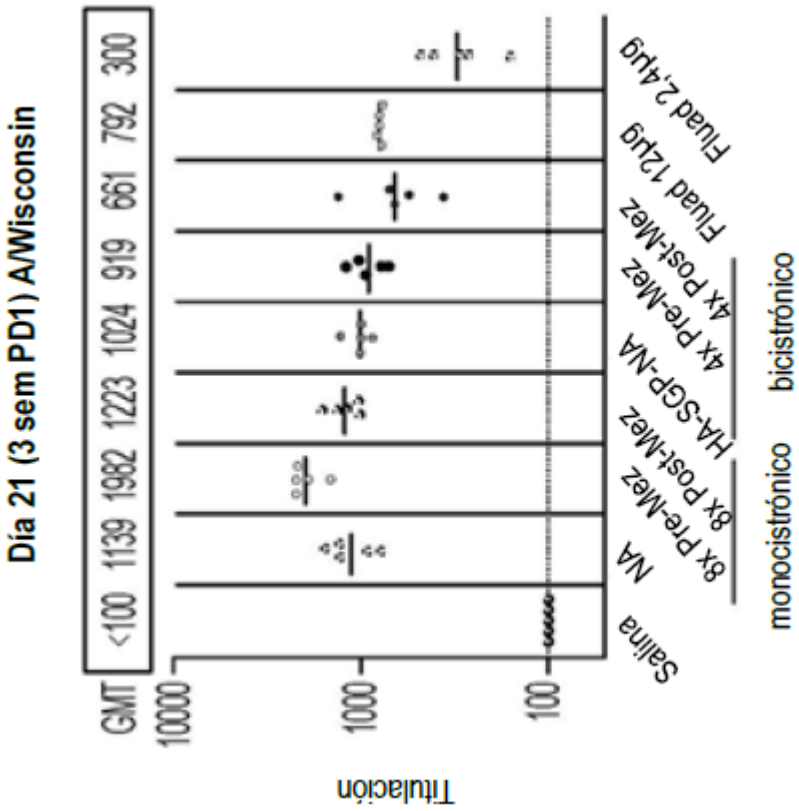


FIGURA 23

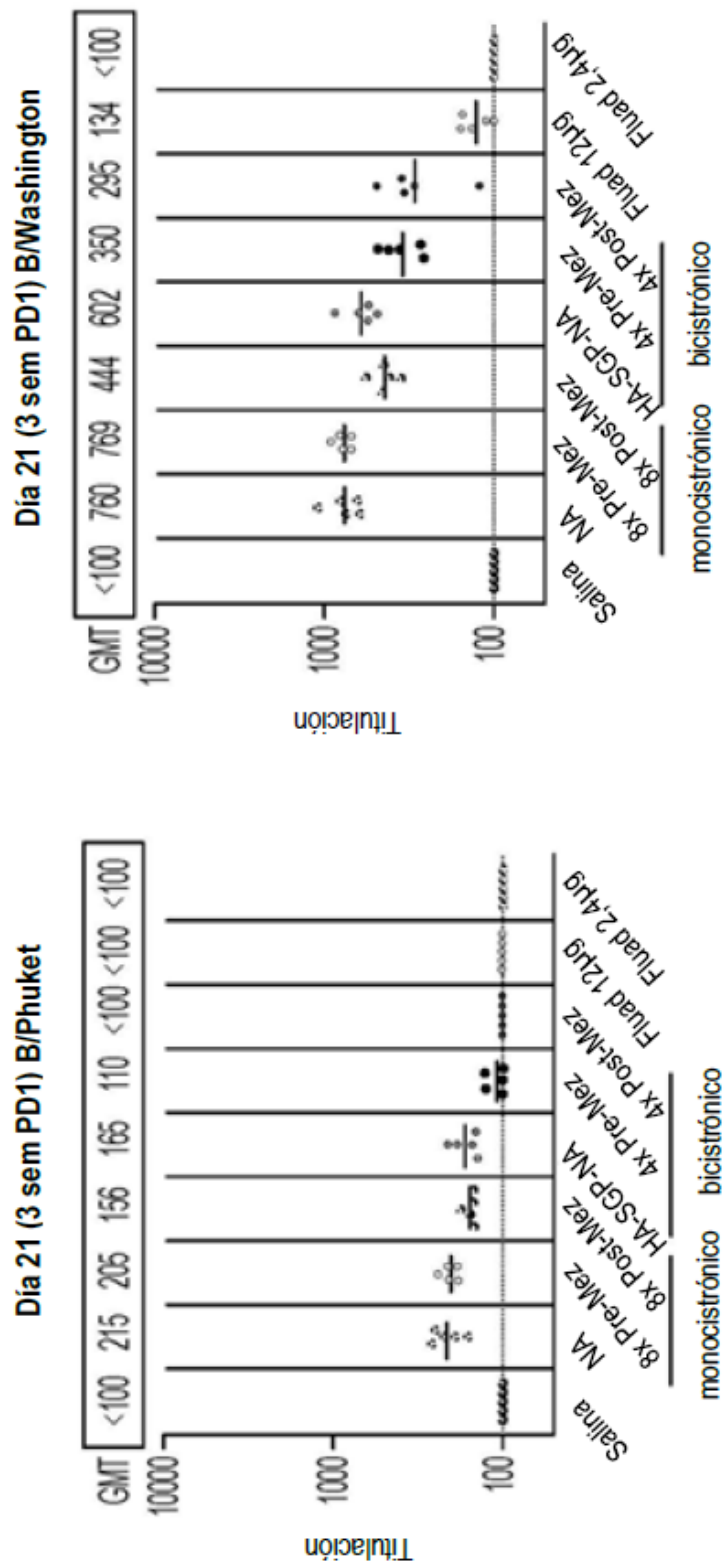


FIGURA 23
(CONTINUACIÓN)

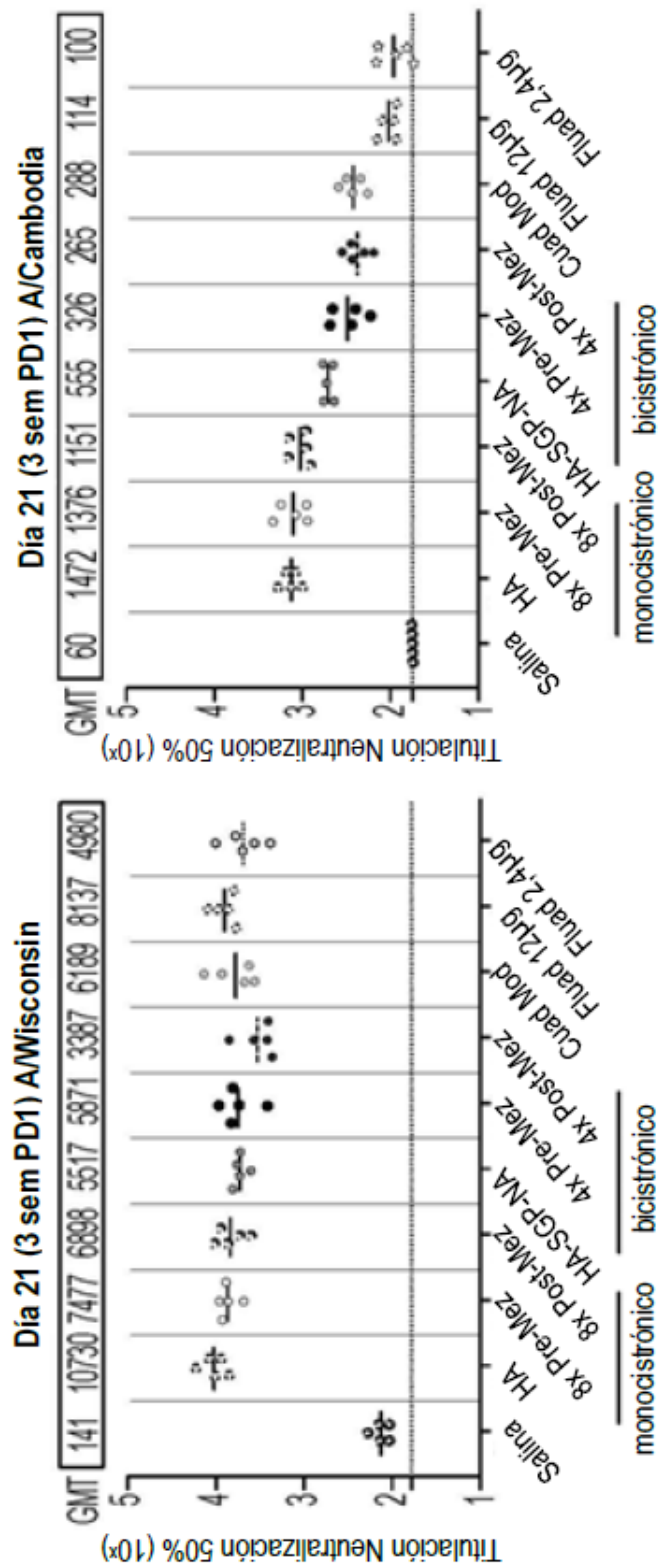


FIGURA 24

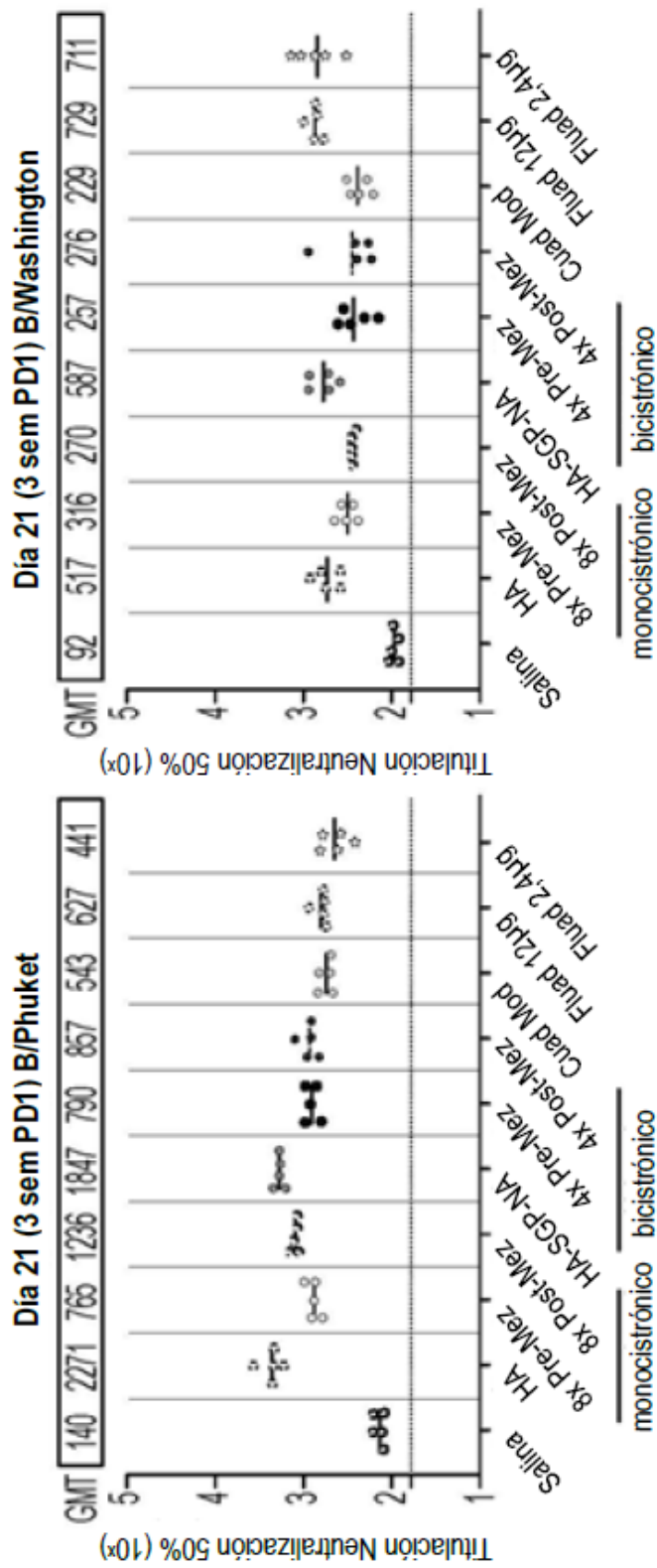


FIGURA 24
(CONTINUACIÓN)

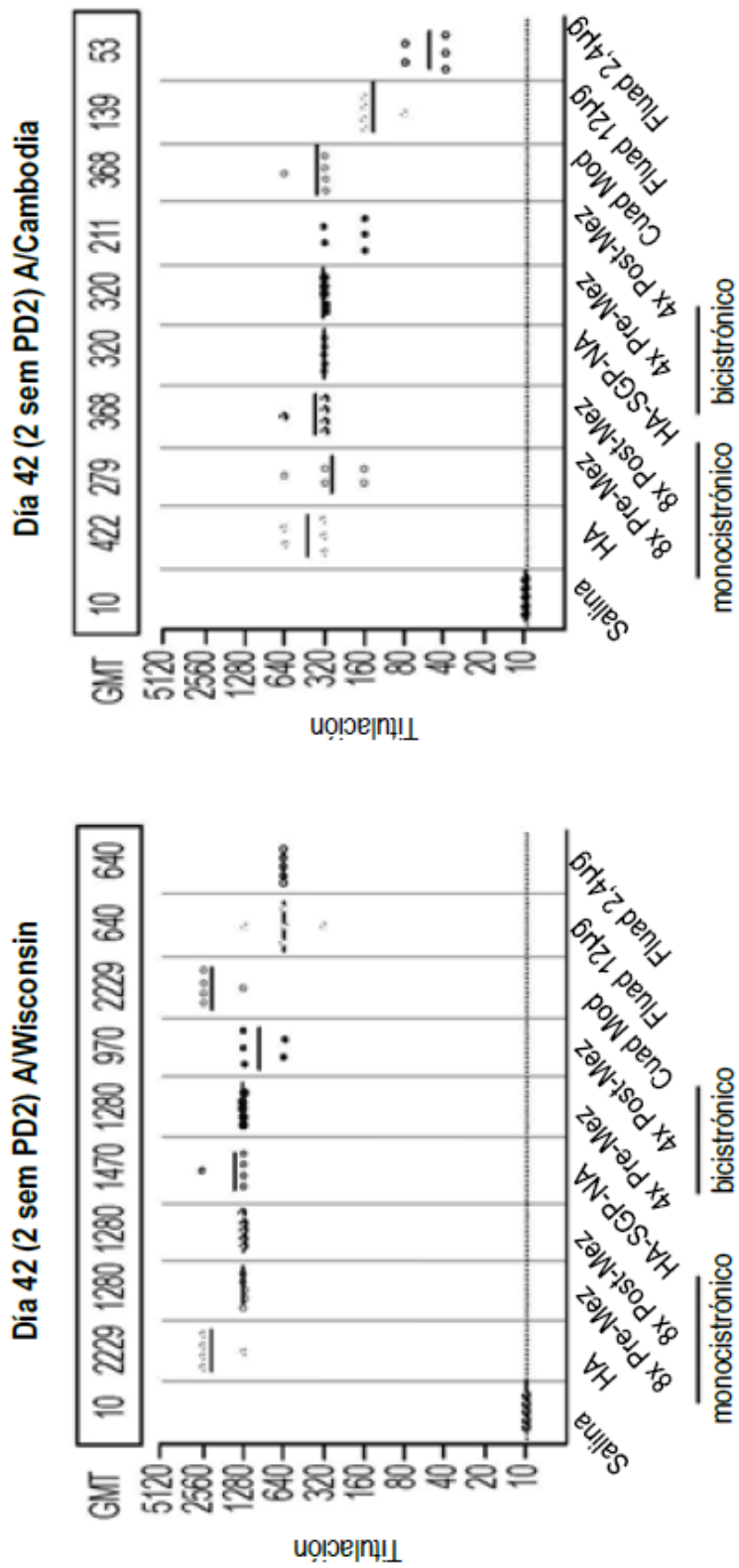


FIGURA 25

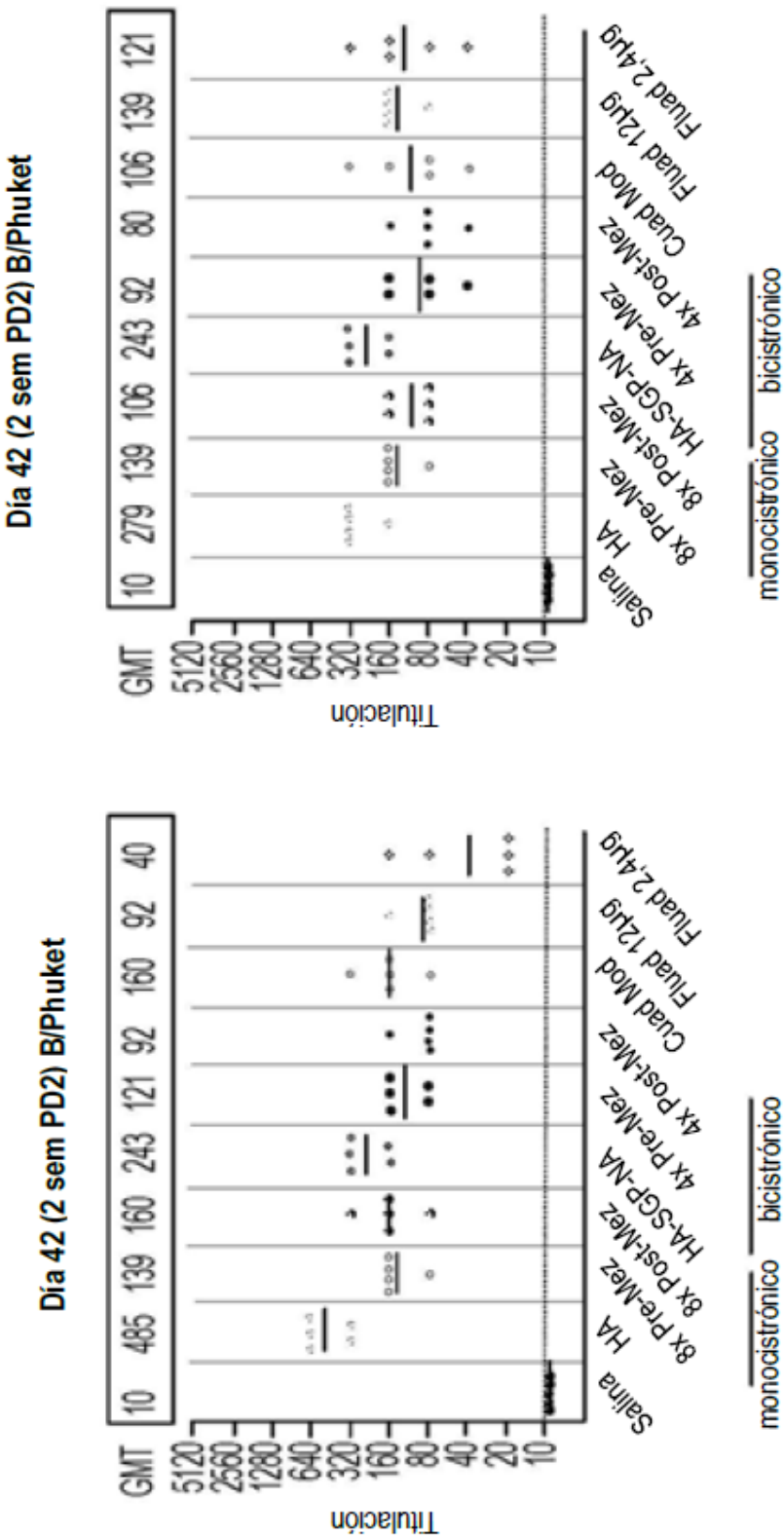


FIGURA 25
(CONTINUACIÓN)

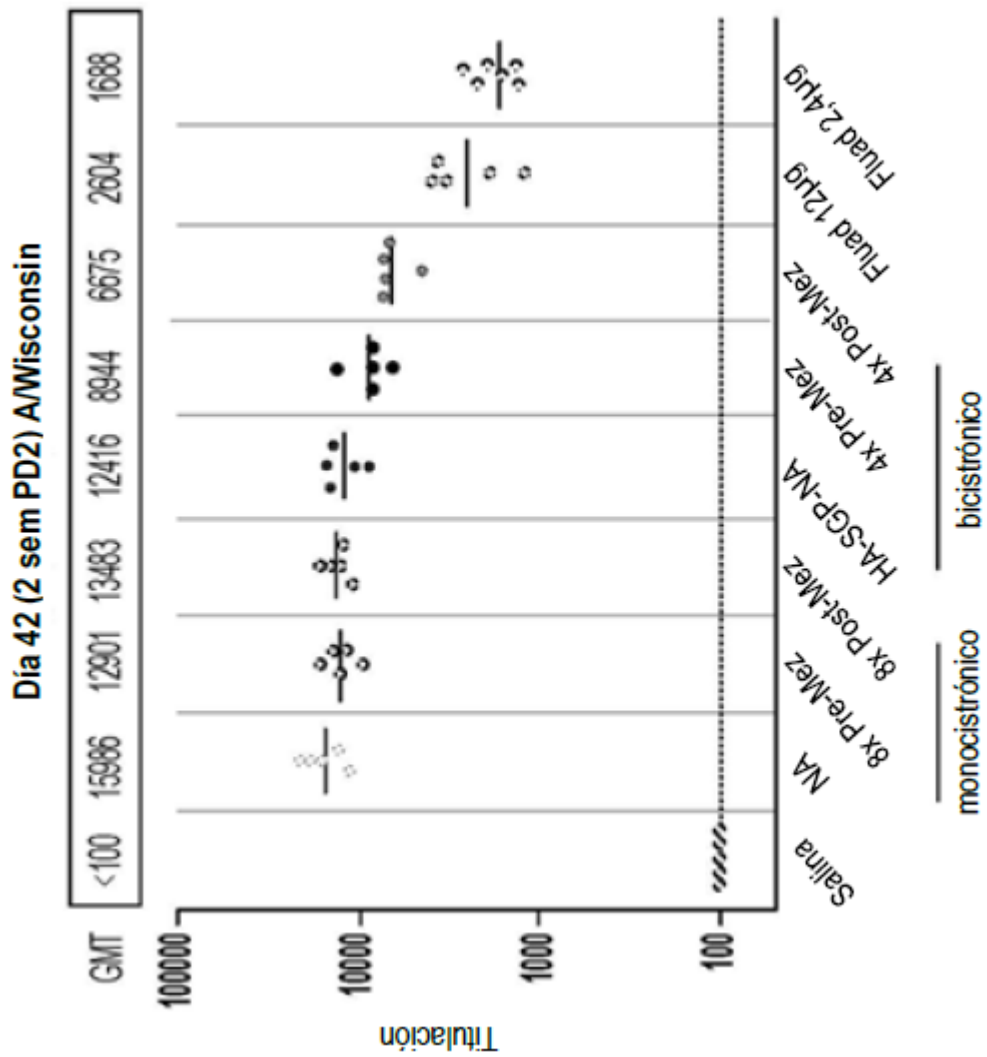


FIGURA 26

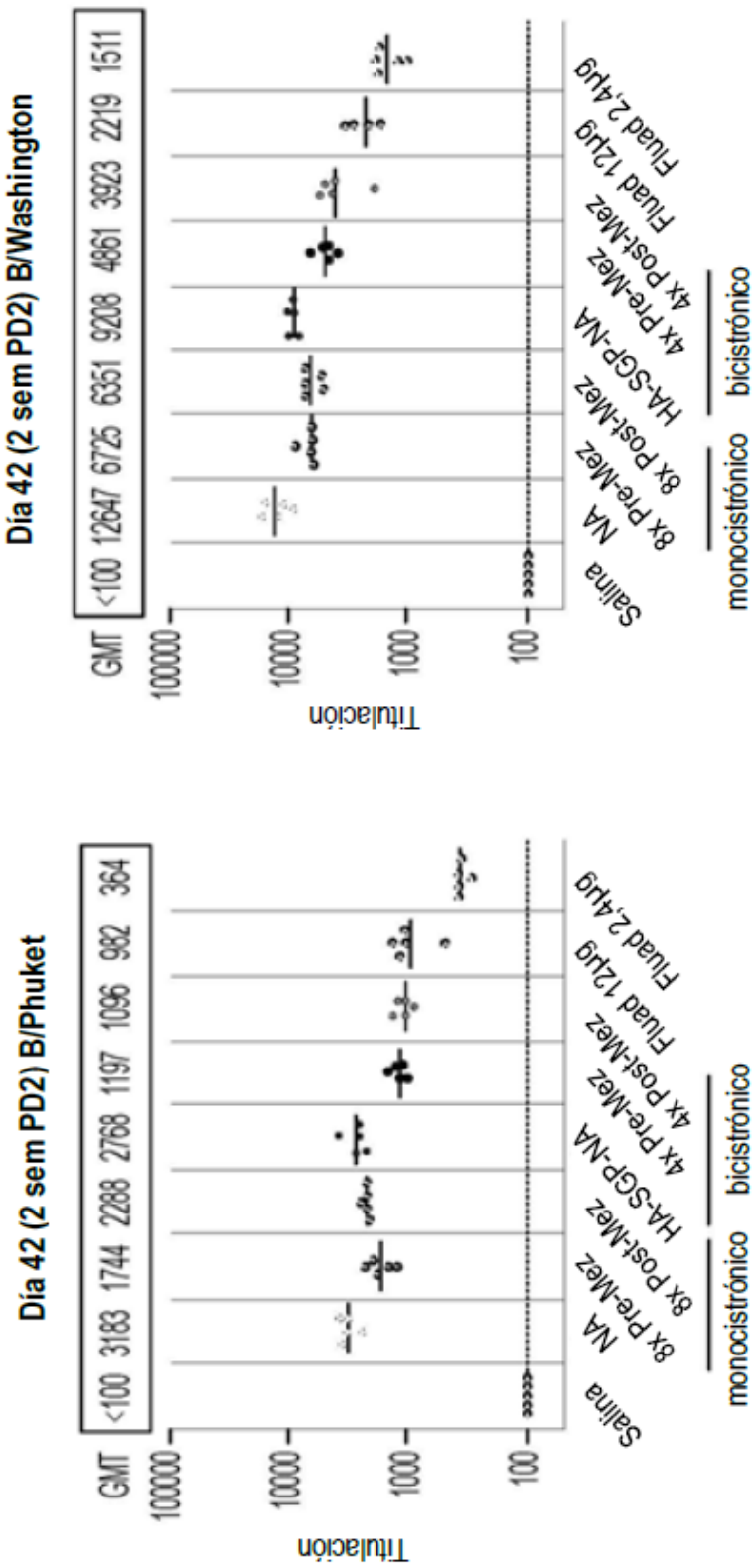


FIGURA 26
(CONTINUACIÓN)

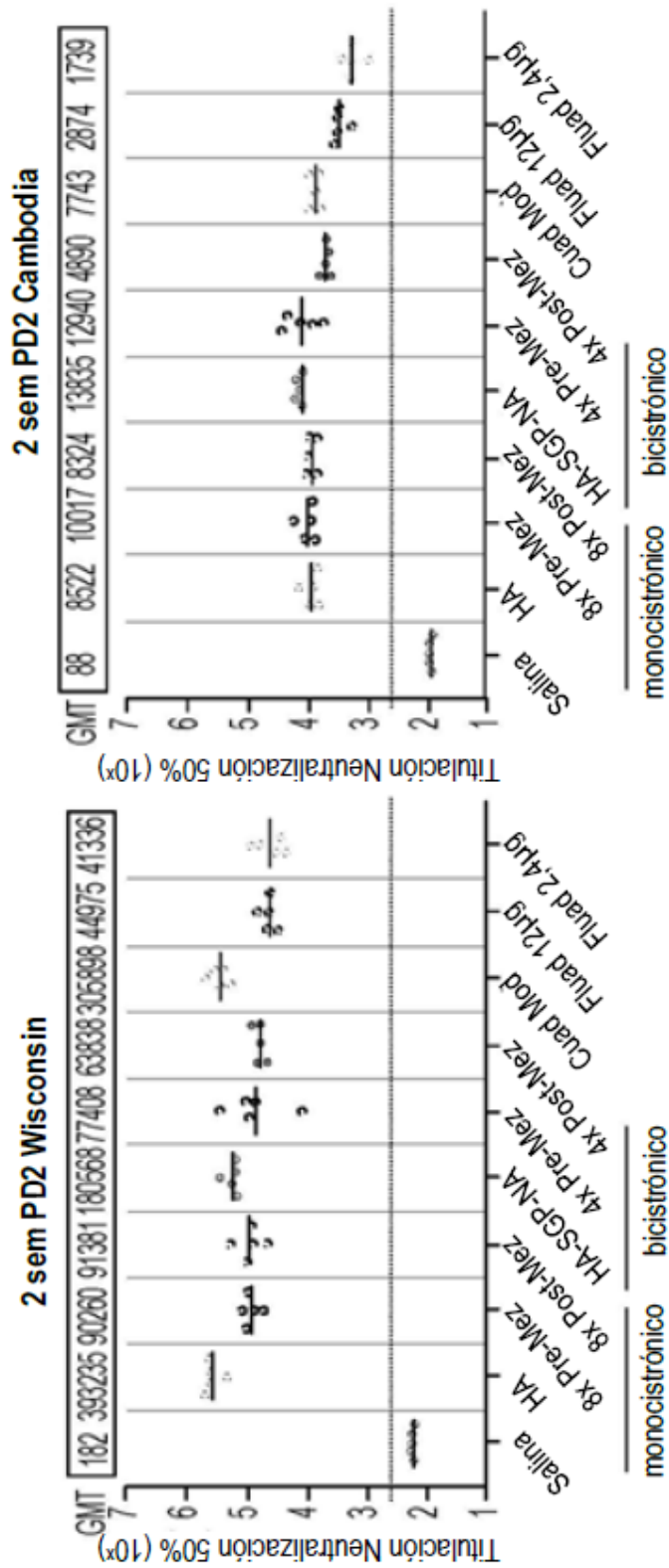


FIGURA 27

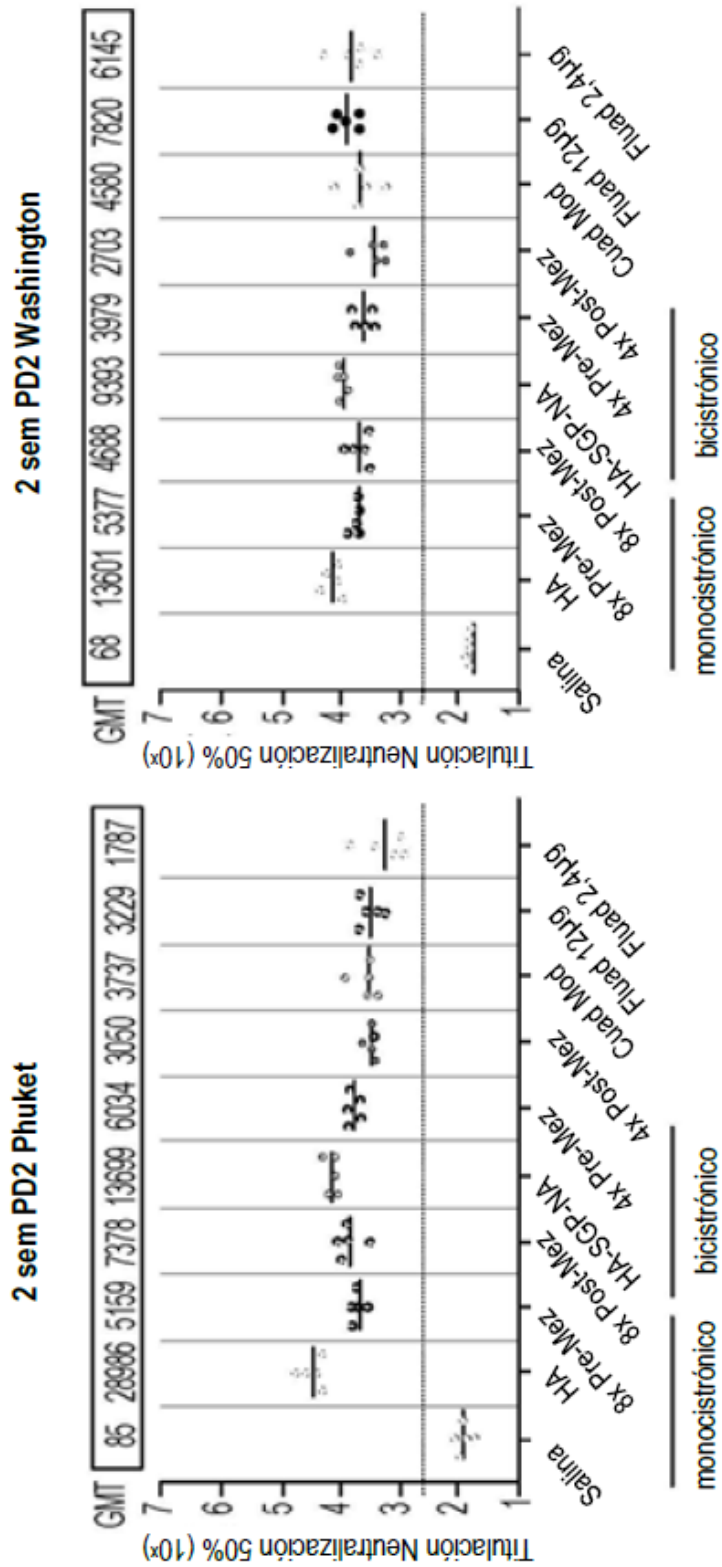


FIGURA 27
(CONTINUACIÓN)