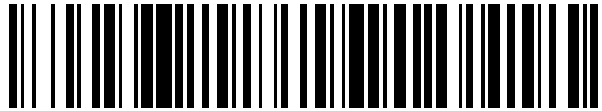


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 221**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2008 E 08804887 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2200646**

54 Título: **Vacunas de ARN**

30 Prioridad:

28.09.2007 EP 07450169

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

16.12.2013

73 Titular/es:

**BIOMAY AG (100.0%)
LAZARETTGASSE 19 TOP 1
1090 WIEN, AT**

72 Inventor/es:

**THALHAMER, JOSEF;
WEISS, RICHARD;
RÖSLER, ELISABETH;
SCHEIBLHOFER, SANDRA y
FRÜHWIRTH, ANGELIKA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 434 221 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas de ARN

La presente invención se refiere a vacunas de ARN

5 Durante las últimas décadas, las enfermedades alérgicas de tipo I han aparecido como un problema de salud pública importante en los países occidentales industrializados, estando ahora afectado el 25% de la población.

Además de la predisposición familiar, se ha demostrado que las condiciones de crecimiento, incluidas las infecciones tempranas en la infancia, y los hábitos alimentarios, así como los factores ambientales como el tabaquismo pasivo o la exposición a los contaminantes del aire, son de gran importancia para el desarrollo de enfermedades atópicas.

10 La inmunoterapia específica, que se realiza mediante inyecciones de dosis crecientes del o los alérgenos durante años, representa actualmente la única intervención terapéutica disponible. No obstante, debido a las elevadas dosis administradas, el riesgo de efectos secundarios anafilácticos es evidente y el uso de extractos alérgicos brutos, apenas caracterizados, implica la posibilidad de sensibilizar al paciente contra componentes previamente no reconocidos. Adicionalmente, no existe una vacunación preventiva contra la alergia de tipo I, aunque la prevención
15 de niños pequeños con mayor riesgo hereditario de desarrollar una enfermedad alérgica puede ser el abordaje más factible. Entrenar a un sistema inmunitario no expuesto es más fácil de conseguir que equilibrar un fenotipo inmunitario que ya ha manifestado alergia.

En Ying et al. (Nature Med (1999) 5:823-827) se divulgan vacunas de ARN autorreplicante cuyo ARN codifica la [beta]-galactosidasa, que a menudo se usa como molécula modelo para estudiar procesos inmunológicos. En Ying
20 et al., se estudió la reacción antitumoral y se observó la inducción de células positivas para CD8. No obstante, las células positivas para CD4, que no se investigaron en Ying et al., participan en contraste con la protección inmunológica de las células positivas para CD8 contra las alergias y previenen un desplazamiento de clase hacia la IgE en los linfocitos B.

En Gabler et al. (J. All. Clin. Immunol. 118 (3) 2006:734-741) se divulgan vacunas de ADN que comprenden
25 moléculas de ácido nucleico que codifican PhI p 5.

Mandl C.W. et al. (Nat. Med. 4 (12) 1998:1438-1440) muestran que las moléculas de ARN obtenibles mediante procedimientos in vitro se pueden usar como vacunas con el fin de producir una respuesta inmunitaria hacia el antígeno codificado por dichas moléculas de ARN.

30 Recientemente, las vacunas a base de ácido nucleico se han convertido en un prometedor abordaje a los mecanismos inmunitarios subyacentes a las enfermedades alérgicas. En numerosos estudios con animales se ha demostrado que las vacunas de ADN pueden prevenir la inducción de respuestas alérgicas de tipo I e incluso invertir un estado inmunitario alérgico de TIPO TH2 ya establecido (Weiss, R. et al. (2006) Int Arch Allergy Immunol 139:332-345).

No obstante, se han planteado problemas generales con respecto a la seguridad de las vacunas a base de ADN, Las moléculas de ADN introducidas podrían integrarse potencialmente en el genoma del huésped o, debido a su
35 distribución en varios tejidos, podrían conducir a una liberación sostenida del alérgeno, de modo que inducirán reacciones anafilácticas incontrolables en los pacientes con moléculas de IgE específicas del alérgeno preexistentes. Además, la vacunación de niños sanos requiere las mejores normas de seguridad para cualquier vacuna anti-alergia.

40 Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar una vacuna frente a un alérgeno que supere los inconvenientes de las vacunas de ADN pero que siga permitiendo un tratamiento eficaz de las alergias o que prevenga con éxito la sensibilización contra un alérgeno.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una vacuna de ARN que comprende al menos una molécula de ARN que codifica al menos un alérgeno o derivado de mismo, siendo dicho alérgeno un alérgeno de *Alnus glutinosa*,
45 *Alternaria alternata*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Apium graveolens*, *Arachis hypogaea*, *Betula verrucosa*, *Carpinus betulus*, *Castanea sativa*, *Cladosporium herbarum*, *Corylus avellana*, *Cryptomeria japonica*, *Cyprinus carpio*, *Daucus carota*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Fagus sylvatica*, *Felis domesticus*, *Hevea brasiliensis*, *Juniperus ashei*, *Malus domestica*, *Quercus alba* y *Phleum pratense*.

Se descubrió que las moléculas de ARN que codifican un alérgeno o derivado del mismo también se pueden usar
50 como vacunas de ARN. Las vacunas de ARN exhiben las características atribuidas a las vacunas de ADN para el tratamiento de enfermedades alérgicas. Proporcionan el alérgeno en su forma más pura, es decir, su información genética, y, de forma similar a las vacunas de ADN, inducen reacciones inmunitarias desviadas a TH1. Además, con las vacunas de ARN también se pueden implementar procedimientos similares a los desarrollados para las vacunas de ADN con el fin de crear productos génicos hipoalérgicos.

Además, las vacunas de ARN ofrecen sorprendentes ventajas sobre las vacunas de ADN. (i) La vacuna contiene la información genética pura del alérgeno pero no secuencias extrañas adicionales, tales como promotores virales, genes de resistencia a antibióticos o secuencias reguladoras virales/bacterianas que suelen estar presentes en la estructura de los plásmidos usados para vacunas de ADN. (ii) el ARN no se puede integrar en el genoma del huésped, de modo que se anula el riesgo de neoplasias malignas. (iii) el ARN se traduce en el citoplasma de la célula, por lo que no es necesaria la maquinaria de la transcripción del núcleo celular, lo que hace que las vacunas de ARN sean independientes del transporte hacia el interior y hacia el exterior del núcleo, así como de etapas nucleares. (iv) Debido a la rápida degradación del ARN, la expresión del transgén extraño tiene una vida corta, por lo que se evita la expresión prolongada e incontrolable del antígeno.

La vacuna de ARN de la presente invención puede comprender más de una molécula de ARN que codifica un alérgeno, preferentemente dos, tres, cinco, diez, etc. No obstante, una molécula de ARN puede también codificar al menos un alérgeno, lo que significa que una molécula de ARN comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos uno, dos, tres, cinco, diez etc. alérgenos diferentes o idénticos. Los alérgenos a codificar por una o más moléculas de ARN se pueden seleccionar de la siguiente lista en cualquier combinación.

Como se usa en el presente documento, el término "vacuna de ARN" hace referencia a una vacuna que comprende una molécula de ARN como se define en el presente documento. No obstante, dicha vacuna puede comprender, por supuesto, otras sustancias y moléculas que son necesarias o que son ventajosas cuando dicha vacuna se administra a un individuo (p. ej., excipientes farmacéuticos).

La expresión "alérgeno de" se usa de forma intercambiable con las expresiones "alérgeno derivado de" y "alérgeno obtenido de". Esto significa que el alérgeno se expresa de forma natural en dichos organismos y el ADN/ARN que codifica dichos alérgenos se aísla con el fin de producir las moléculas de ARN de la presente invención.

Se descubrió que no todas las moléculas de ARN que codifican un alérgeno pueden inducir la formación de anticuerpos específicos del alérgeno cuando se administran a un mamífero o ser humano. Las moléculas de ARN que codifican el alérgeno Art v 1 de *Artemisia vulgaris* y el alérgeno Ole e 1 de *Olea europea* no son capaces de inducir memoria de Th1 y de suprimir la respuesta de IgE específica del alérgeno. No obstante, las moléculas de ARN que codifican el alérgeno de las fuentes mencionadas anteriormente son capaces de hacerlo.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el alérgeno de *Alnus glutinosa* es Aln g 1, el alérgeno de *Alternaria alternata* se selecciona del grupo constituido por Alt a 1, Alt a 3, Alt a 4, Alt a 5, Alt a 6, Alt a 7, Alt a 8, Alt a 10, Alt a 12 y Alt a 13, el alérgeno de *Ambrosia artemisiifolia* se selecciona del grupo constituido por Amb a 1, Amb a 2, Amb a 3, Amb a 5, Amb a 6, Amb a 7, Amb a 8, Amb a 9 y Amb a 10, el alérgeno de *Apium graveolens* se selecciona del grupo constituido por Api g 1, Api g 4 y Api g 5, el alérgeno de *Arachis hypogaea* se selecciona del grupo constituido por Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7 y Ara h 8, el alérgeno de *Betula verrucosa* se selecciona del grupo constituido por Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 6 y Bet v 7, el alérgeno de *Carpinus betulus* es Car b 1, el alérgeno de *Castanea sativa* se selecciona del grupo constituido por Cas s 1, Cas s 5 y Cas s 8, el alérgeno de *Cladosporium herbarum* se selecciona del grupo constituido por Cla h 2, Cla h 5, Cla h 6, Cla h 7, Cla h 8, Cla h 9, Cla h 10 y Cla h 12, el alérgeno de *Corylus avellana* se selecciona del grupo constituido por Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 10 y Cor a 11, el alérgeno de *Cryptomeria japonica* se selecciona del grupo constituido por Cry j 1 y Cry j 2, el alérgeno de *Cyprinus carpio* es Cyp c 1, el alérgeno de *Daucus carota* se selecciona del grupo constituido por Dau c 1 y Dau c 4, el alérgeno de *Dermatophagoides pteronyssinus* se selecciona del grupo constituido por Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 20, Der p 21 y Clone 30, el alérgeno de *Fagus sylvatica* es Fag s 1, el alérgeno de *Felis domesticus* se selecciona del grupo constituido por Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5w, Fel d 6w y Fel d 7w, el alérgeno de *Hevea brasiliensis* se selecciona del grupo constituido por Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 6.03, Hev b 7.01, Hev b 7.02, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10, Hev b 11, Hev b 12 y Hev b 13, el alérgeno de *Juniperus ashei* se selecciona del grupo constituido por Jun a 1, Jun a 2 y Jun a 3, el alérgeno de *Malus domestica* se selecciona del grupo constituido por Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 y Mal d 4, el alérgeno de *Quercus alba* es Que a 1 y el alérgeno de *Phleum pratense* se selecciona del grupo constituido por Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12 y Phl p 13.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el alérgeno se selecciona del grupo constituido por:

Polen de hierba: Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12

Ácaro del polvo doméstico: Der p 1, Der p 2, Der p 7, Der p 21, Clone 30 (solicitud de PCT AT2007/000201, solicitud de patente austriaca AT 503530: MKFNIIIVFI SLAILVHSSY AANDNDDPT TTVHPTTTEQ PDDKFECPSR FGYFADPKDP HKFYICSNWE AVHKDCPGNT RWNEDEETCT, SEC ID N° 1)

Polen de abedul: Bet v 1 y su árbol homólogo (Aln g 1, Cor a 1, Fag s 1) o alérgenos alimentarios) Mal d 1, Api g 1, Pru p 1)

Gato: Fel d 1, Fel d 2

Malas hierbas (ambrosía, artemisa): Amb a 1

Ciprés/enebro/cedro: Cry j 1, Cry j 2, Jun a 1, Jun a 3, Cha o 1, Cha o 2, Cup a 1, Cup a 3, Jun a 1, Jun a 3, Pla a 3

Cacahuete: Ara h 1, Ara h 2, Ara h 4

5 **Avellana:** Cor a 8, Cor a 9

Pescado/gambas: Gad c 1, Cyp c 1, Pen a 1

10 Alérgenos especialmente preferidos que se van a usar en una vacuna de ARN de la presente invención se seleccionan del grupo constituido por Aln g 1, Alt a 1, Amb a 1, Api g 1, Ara h 2, Bet v 1, beta-caseína, Car b 1, Cas s 1, Cla h 8, Cor a 1, Cry j 1, Cyp c 1, Dau c 1, Der p 2, Fag s 1, Fel d 1, Hev b 6, Jun a 1, Mal d 1, ovoalbúmina (OVA), Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 7.

15 Se descubrió que los alérgenos identificados anteriormente son particularmente adecuados para usar en vacunas de ARN. No obstante, por supuesto también es posible usar la presente invención para otros alérgenos, tales como
 20 Amb a 1, Amb a 2, Amb a 3, Amb a 5, Amb a 6, Amb a 7, Amb a 8, Amb a 9, Amb a 10, Amb t 5, Hel a 1, Hel a 2, Hel a 3, Mer a 1, Che a 1, Che a 2, Che a 3, Sal k 1, Cat r 1, Pla 1 1, Hum j 1, Par j 1, Par j 2, Par j 3, Par o 1, Cyn d 1, Cyn d 7, Cyn d 12, Cyn d 15, Cyn d 22w, Cyn d 23, Cyn d 24, Dac g 1, Dac g 2, Dac g 3, Dac g 5, Fes p 4w, Hol 1 1, Lol p 1, Lol p 2, Lol p 3, Lol p 5, Lol p 11, Pha a 1, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 11, Phl p 12, Phl p 13, Poa p 1, Poa p 5, Sor h 1, Pho d 2, Aln g 1, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 6, Bet v 7, Car b 1, Cas s 1, Cas s 5, Cas s 8, Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 10, Cor a 11, Que a 1, Fra e 1, Lig v 1, Syr v 1, Cry j 1, Cry j 2, Cup a 1, Cup s 1, Cup s 3w, Jun a 1, Jun a 2, Jun a 3, Jun o 4, Jun s 1, Jun v 1, Pla a 1, Pla a 2, Pla a 3, Aca s 13, Blo t 1, Blo t 3, Blo t 4, Blo t 5, Blo t 6, Blo t 10, Blo t 11, Blo t 12, Blo t 13, Blo t 19, Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der f 7, Der f 10, Der f 11, Der f 14, Der f 15, Der f 16, Der f 17, Der f 18w, Der m 1, Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 20, Der p 21, Eur m 2, Eur m 14, Gly d 2, Lep d 1, Lep d 2, Lep d 5, Lep d 7, Lep d 10, Lep d 13, Tyr p 2, Tyr p 13, Bos d 2, Bos d 3, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8, Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4, Equ c 5, Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5w, Fel d 6w, Fel d 7w, Cav p 1, Cav p 2, Mus m 1, Rat n 1, Alt a 1, Alt a 3, Alt a 4, Alt a 5, Alt a 6, Alt a 7, Alt a 8, Alt a 10, Alt a 12, Alt a 13, Cla h 2, Cla h 5, Cla h 6, Cla h 7, Cla h 8, Cla h 9, Cla h 10, Cla h 12, Asp f 13, Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4, Asp f 5, Asp f 6, Asp f 7, Asp f 8, Asp f 9, Asp f 11, Asp f 12, Asp f 13, Asp f 15, Asp f 16, Asp f 17, Asp f 18, Asp f 22w, Asp f 23, Asp f 27, Asp f 28, Asp f 29, Asp n 14, Asp n 18, Asp n 25, Asp o 13, Asp o 21, Pen b 13, Pen b 26, Pen ch 13, Pen ch 18, Pen ch 20, Pen c 3, Pen c 13, Pen c 19, Pen c 22w, Pen c 24, Pen o 18, Fus c 1, Fus c 2, Tri r 2, Tri r 4, Tri t 1, Tri t 4, Cand a 1, Cand a 3, Cand b 2, Psi c 1, Psi c 2, Cop c 1, Cop c 2, Cop c 3, Cop c 5, Cop c 7, Rho m 1, Rho m 2, Mala f 2, Mala f 3, Mala f 4, Mala s 1, Mala s 5, Mala s 6, Mala s 7, Mala s 8, Mala s 9, Mala s 10, Mala s 11, Mala s 12, Mala s 13, Epi p 1, Aed a 1, Aed a 2, Api m 1, Api m 2, Api m 4, Api m 6, Api m 7, Bom p 1, Bom p 4, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Bla g 6, Bla g 7, Bla g 8, Per a 1, Per a 3, Per a 6, Per a 7, Chi k 10, Chi t 1-9, Chi t 1.01, Chi t 1.02, Chi t 2.0101, Chi t 2.0102, Chi t 3, Chi t 4, Chi t 5, Chi t 6.01, Chi t 6.02, Chi t 7, Chi t 8, Chi t 9, Cte f 1, Cte f 2, Cte f 3, Tha p 1, Lep s 1, Dol m 1, Dol m 2, Dol m 5, Dol a 5, Pol a 1, Pol a 2, Pol a 5, Pol d 1, Pol d 4, Pol d 5, Pol e 1, Pol e 5, Pol f 5, Pol g 5, Pol m 5, Vesp c 1, Vesp c 5, Vesp m 1, Vesp m 5, Ves f 5, Ves g 5, Ves m 1, Ves m 2, Ves m 5, Ves p 5, Ves s 5, Ves vi 5, Ves v 1, Ves v 2, Ves v 5, Myr p 1, Myr p 2, Sol g 2, Sol g 4, Sol i 2, Sol i 3, Sol i 4, Sol s 2, Tria p 1, Gad c 1, Sal s 1, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8, Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 4, Gal d 5, Met e 1, Pen a 1, Pen i 1, Pen m 1, Pen m 2, Tod p 1, Hel as 1, Hal m 1, Ran e 1, Ran e 2, Bra j 1, Bra n 1, Bra o 3, Bra r 1, Bra r 2, Hor v 15, Hor v 16, Hor v 17, Hor v 21, Sec c 20, Tri a 18, Tri a 19, Tri a 25, Tri a 26, Zea m 14, Zea m 25, Ory s 1, Api g 1, Api g 4, Api g 5, Dau c 1, Dau c 4, Cor a 1.04, Cor a 2, Cor a 8, Fra a 3, Fra a 4, Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4, Pyr c 1, Pyr c 4, Pyr c 5, Pers a 1, Pru ar 1, Pru ar 3, Pru av 1, Pru av 2, Pru av 3, Pru av 4, Pru d 3, Pru du 4, Pru p 3, Pru p 4, Aspa o 1, Cro s 1, Cro s 2, Lac s 1, Vit v 1, Mus xp 1, Ana c 1, Ana c 2, Cit 1 3, Cit s 1, Cit s 2, Cit s 3, Lit c 1, Sin a 1, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4, Vig r 1, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 8, Len c 1, Len c 2, Pis s 1, Pis s 2, Act c 1, Act c 2, Cap a 1w, Cap a 2, Lyc e 1, Lyc e 2, Lyc e 3, Sola t 1, Sola t 2, Sola t 3, Sola t 4, Ber e 1, Ber e 2, Jug n 1, Jug n 2, Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Ana o 1, Ana o 2, Ana o 3, Ric c 1, Ses i 1, Ses i 2, Ses i 3, Ses i 4, Ses i 5, Ses i 6, Cuc m 1, Cuc m 2, Cuc m 3, Ziz m 1, Ani s 1, Ani s 2, Ani s 3, Ani s 4, Arg r, Asc s 1, Car p 1, Den n 1, Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 6.03, Hev b 7.01, Hev b 7.02, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10, Hev b 11, Hev b 12, Hev b 13, Hom s 1, Hom s 2, Hom s 3, Hom s 4, Hom s 5 y Trip s 1.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el derivado alérgico es hipoalérgico.

55 Con el fin de inducir una respuesta inmunitaria específica en un mamífero, en particular en un ser humano, sin producir una reacción alérgica o provocando una reacción alérgica significativamente reducida, se prefiere que el alérgeno o derivado del mismo exhiba propiedades hipoalérgicas, es decir que la molécula hipoalérgica no muestre ninguna reactividad IgE o muestre actividad de IgE significativamente reducida.

Como se usa en el presente documento, el término "hipoalérgico" hace referencia a la capacidad de un péptido,

5 polipéptido o proteína derivados de un alérgeno con propiedades alérgicas para inducir la inducción de linfocitos T específicos para dicho alérgeno y exhibir menos reacciones alérgicas o ninguna cuando se administran a un individuo. La menor capacidad de “derivados hipoalérgicos” o ausencia de la misma de un alérgeno para inducir una reacción alérgica en un individuo se obtiene eliminando o destruyendo los epítopos de unión a IgE de dichos alérgenos, aunque conservando los epítopos de los linfocitos T presentes sobre dichos alérgenos. Esto se puede conseguir, por ejemplo, dividiendo el alérgeno en fragmentos con menor o ninguna capacidad de unión a IgE y, opcionalmente, condensando algunos o todos de dichos fragmentos en un orden que no corresponda al orden de los fragmentos en el alérgeno natural (véase, por ejemplo, el documento EP 1 440 979). Otro procedimiento para producir moléculas “hipoalérgicas” de alérgenos implica deleciones en los extremos C y/o N del alérgeno silvestre (véase, por ejemplo, el documento EP 1 224 215). Por supuesto, también es posible generar moléculas hipoalérgicas introduciendo mutaciones específicas que afectan a uno o más residuos de aminoácidos del alérgeno natural, de modo que dichas modificaciones tienen como resultado una pérdida de la estructura tridimensional.

15 Las vacunas de ARN se hacen hipoalérgicas dirigiendo la proteína resultante a la vía de ubiquitinización de la célula, en la que la correspondiente proteína se degrada en péptidos hipoalérgicos. Esto se consigue condensando la secuencia que codifica la ubiquitina al extremo 5' del ARN que codifica el alérgeno. La eficacia de ubiquitinización se puede potenciar mutando el residuo de aminoácido 76 de glicina a alanina (G76->A76). La eficacia de ubiquitinización se puede potenciar además mutando el primer aminoácido del alérgeno (metionina) en un aminoácido desestabilizante (Arginina) (MR77->R77). Como alternativa, la ubiquitinización del producto génico resultante se puede conseguir añadiendo una secuencia desestabilizante en el extremo carboxi conocida como secuencia PEST.

20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el derivado del alérgeno hipoalérgico codificado por el ARN en la vacuna exhibe una reactividad de IgE que es al menos un 10 %, preferentemente al menos un 20 %, más preferentemente al menos 30 %, en particular al menos 50 %, inferior a la reactividad de IgE del alérgeno natural.

25 La hipoalergenicidad de las vacunas de ARN puede analizarse de forma rutinaria traduciendo el ARN in vitro en un sistema de lisados de reticulocitos de conejo. El producto génico resultante se analizará mediante transferencias de tipo western con IgE usando grupos de sueros de pacientes adecuados. La reducción de la capacidad de unión a las IgE del hipoalérgeno correspondiente se evaluará en comparación con la capacidad de unión a IgE de la molécula natural, traducida en dicho sistema de lisados de reticulocitos.

30 De acuerdo con una realización particularmente preferida de la presente invención, la molécula de ARN de la invención puede codificar más de uno, preferentemente más de dos, más preferentemente más de tres, incluso más preferentemente más de cuatro, alérgenos o derivados de los mismos. En particular, la molécula de ARN puede codificar Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 and Phl p6, o Aln g 1, Cor a 1, Que a 1, Car b 1 y Bet v 1.

35 La molécula de ARN que codifica el alérgeno o derivado del mismo se condensa con al menos otro péptido, polipéptido o proteína.

40 La secuencia de ARN que codifica el alérgeno se puede condensar con las secuencias de ARN que codifican péptidos, polipéptidos o proteínas. Estos péptidos pueden ser péptidos señal que están dirigidos al alérgeno en el retículo endoplásmico y, de este modo, potencian la secreción de proteínas en la célula, por ejemplo el péptido señal del activador del plasminógeno tisular humano (hTPA). Dicho péptido o proteína puede ser la proteína de membrana asociada al lisosoma (LAMO) o la cola en el extremo C de 20 aminoácidos de la proteína de membrana integral lisosomal II (LIMP-II). Las secuencias de LAMP/LIMP-II se usan para dirigir la proteína antigénica al compartimento vesicular del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) de las células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales transfectadas, de modo que se potencia la activación de los linfocitos T colaboradores, lo que aumenta la eficacia de la vacuna. Dichas proteínas o polipéptidos también pueden ser proteínas que potencia el desplazamiento hacia TH1 de la vacuna, por ejemplo la proteína 70 del shock térmico (HSP70) o toxinas bacterianas como la toxina del cólera (TC) o toxinas relacionadas, tales como la enterotoxina termolábil (TL) de *Escherichia coli*.

45 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la molécula de ARN comprende al menos un elemento adicional seleccionado del grupo constituido por la replicasa, la secuencia líder de la β -globina, cap0, cap1 y la cola de poli A.

50 La vacuna de ARN consiste en la secuencia de ARN que codifica el alérgeno correspondiente. Esta secuencia de ARN puede ser la secuencia natural del alérgeno o se puede adaptar con respecto a su uso de los codones. La adaptación del uso de codones puede aumentar la eficacia de la traducción y la semivida del ARN. Una cola de poli A constituida por al menos 30 residuos de adenosina está unida al extremo 3' del ARN para aumentar la semivida del ARN. El extremo 5' del ARN está rematado con un ribonucleótido modificado con la estructura m7G(5')ppp(5')N (estructura cap 0) o un derivado del mismo, que se puede incorporar durante la síntesis del ARN o se puede modificar enzimáticamente después de la transcripción del ARN usando la enzima de remate del virus vacunal (VCE, constituida por ARNm trifosfatasa, guanilil transferasa y guanina-7-metiltransferasa), que cataliza la construcción de estructuras cap p monometiladas en N7. La estructura cap 0 desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la

estabilidad y la eficacia de la traducción de la vacuna de ARN. El remate en 5' de la vacuna de ARN puede además modificarse mediante una 2'-O-Metiltransferasa que tiene como resultado la generación de una estructura cap 1 (m7Gppp[m2'-O]N), que además aumenta la eficacia de la traducción.

5 Las vacunas de ARN pueden además optimizarse convirtiéndolas en vacunas autorreplicantes. Dichos vectores incluyen elementos de replicación derivados de alfavirus y la sustitución de las proteínas del virus estructural con el gen de interés. Se ha demostrado que las vacunas de ARN a base de replicasa inducen anticuerpos así como respuestas citotóxicas a dosis extremadamente bajas debido a la activación del sistema inmunitario mediada por las señales de peligro derivadas del virus (Ying, H. et al. (1999) Nat Med 5:823-827).

10 La vacuna de ARN también puede ser una vacuna de ARN autorreplicante. Las vacunas de ARN autorreplicante que consisten en una molécula de ARN replicasa derivada del virus del bosque semliki (SFV), el virus sindbis (SIN), el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), el virus de Ross-River (RRV) u otros virus pertenecientes a la familia de los alfavirus. Cadena abajo de la replicasa se encuentra un promotor subgenómico que controla la replicación del ARN del alérgeno, seguido de una cola de poli A artificial constituida por al menos 30 residuos de adenosina.

15 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la vacuna comprende otro CpG-ADN y citocinas, preferentemente interleucina (IL)-12 e IL-15.

20 La vacuna o formulación de vacuna de acuerdo con la presente invención puede incluir además una adyuvante. El término "adyuvante" de acuerdo con la presente invención se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno. Un adyuvante puede también servir como depósito tisular que lentamente libera el antígeno. Entre dichos adyuvantes se incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa, tales como isolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, levamisol, CpG-ADN, emulsiones en aceite o hidrocarburo y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de *Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

25 Como alternativa, o además de, también se pueden proporcionar proteínas inmunoestimuladoras como adyuvantes para incrementar la respuesta inmunitaria a una vacuna. La eficacia de la vacunación se puede potenciar mediante la coadministración de una molécula inmunoestimuladora (Salgaller and Lodge, J. Surg. Oncol. (1988) 68:122), tal como una citocina, linfocina o quimiocina inmunoestimuladora, inmunopotenciadora o proinflamatoria con la vacuna, en particular con una vacuna en un vector. Por ejemplo, se pueden usar citocinas o genes de citocinas tales como IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-gamma, IL-10, TGF-beta, el factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM) (CSF) y otros factores estimulantes de colonias, el factor inflamatorio de los macrófagos, el ligando Flt3 (Lyman, Curr. Opin. Hematol., 1998, 5:192), ligando de CD40, así como algunas moléculas coestimuladoras clave o sus genes (p. ej., B7.1, B7.2). Estas moléculas inmunoestimuladoras se pueden liberar sistémica o localmente como proteínas o estar codificadas por la molécula de ARN o una molécula de ARN adicional en la vacuna de ARN de la presente invención. Como moléculas inmunoestimuladoras, también se pueden usar péptidos policatiónicos tales como poliarginina.

35 De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, la vacuna está adaptada para administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, transdérmica, tópica o biolística.

40 La vacuna de ARN de la presente invención se puede administrar de varios modos. Uno modo es, por ejemplo, transferir in vivo la vacuna de ARN directamente en un organismo (p. ej., intramuscular, intradérmica intravenosa, intranasal etc.). Como alternativa, es posible introducir el ARN en las células (p. ej., células epidérmicas) fuera del organismo, por ejemplo se transfectan las células epidérmicas con la vacuna de ARN in vitro y después se administran (transplantan) a un organismo. Las células se pueden transfectar con el ARN exógeno o heterólogo cuando dicho ARN se ha introducido en el interior de la célula. El ARN se puede introducir en las células pulsando, es decir incubando las células con las moléculas de ARN de la invención. Como alternativa, el ARN se puede introducir in vivo mediante lipofección, como ARN desnudo, o con otros agentes que facilitan la transfección (péptidos, polímeros etc.). Se pueden usar lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección in vivo. Compuestos y composiciones lipídicas útiles para transferir ácidos nucleicos son, por ejemplo, DODC, DOPE, CHOL, DMEDA, DDAB, DODAC, DOTAP y DOTMA. Otras moléculas también son útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como oligopéptidos catiónicos (p. ej., el documento WO95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión a ADN (p. ej., el documento WO96/25508) o polímeros catiónicos (p. ej., el documento WO95/21931). También se pueden usar polietilenimina y sus derivados, poliláctida-poliglicólido y quitosano. Como alternativa, las moléculas de ARN se pueden introducir en las células huésped deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación en fosfato cálcico o el uso de una pistola génica (transfección biolística, véase, por ejemplo, Tang et al., Nature (1992) 356 152-154).

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos una molécula de ARN como se define en el presente documento para la fabricación de una vacuna para tratar o prevenir la alergia.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de al menos una molécula de ARN como se define en el presente documento para la fabricación de una vacuna para hiposensibilizar un individuo a un alérgeno.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la vacuna está adaptada para administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, transdérmica, tópica o biológica.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos y figuras sin quedar restringida a los mismos.

- 5 La Fig. 1 muestra la transfección in vitro de células BHK-21 con transcritos de ARN (β Gal-ARN) o ARN autorreplicante (β Gal-ARNrep) que codifican β -galactosidasa. Se analizaron los transcritos de ARN con (cap) o sin (sin cap) adición de una estructura de remate m⁷G (5') ppp (5') G. Las células sin transfectar sirvieron como control basal (sin transfectar). Los datos se muestran como las medias \pm SEM de tres experimentos de transfección independientes.
- 10 La Fig. 2 muestra los niveles de IgG1 e IgG2a específicos de Phl p 5 tras la vacunación con ácido nucleico (A) y la posterior sensibilización con alérgeno recombinante en alúmina (B). Los sueros se diluyeron a 1:1000 (A) y 1:100000 (B). Los números encima de las barras representan las proporciones IgG1:IgG2a promedio para el grupo respectivo. Los datos se muestran como medias \pm SEM (n= 4).
- 15 La Fig. 3 muestra la IgE específica de Phl p 5 medida mediante ensayo de liberación de RBL. Los niveles de IgE se midieron tras la vacunación con las respectivas vacunas de ácido nucleico (barras grises) y después de la sensibilización posterior con alérgeno recombinante en alúmina (barras negras). Los valores se muestran como las medias del % de liberación específica de hexosaminidasa \pm SEM (n= 4). ***: P < 0,001.
- 20 La Fig. 4 muestra el número de esplenocitos secretores de IFN-gamma (A), IL-4 (B), e IL-5 (C) tras la reestimulación in vitro con Phl p 5 recombinante determinado mediante ELISPOT. Los datos se muestran como medias \pm SEM (n= 4) de los número de células secretoras por 10⁶ esplenocitos.
- La Fig. 5 muestra el número de leucocitos totales (A) y eosinófilos (B) en BALF de ratones sensibilizados tras la aplicación i.n. del alérgeno. Los valores muestran como medias \pm SEM (n= 4). *: P < 0,05; **: P < 0,01.
- La Fig. 6 muestra los niveles de IL-5 (A) e IFN- γ (B) de ratones sensibilizados tras la aplicación i.n. del alérgeno. Los valores muestran como medias \pm SEM (n= 4). *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.
- 25 La Fig. 7 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Bet v 1.
- La Fig. 8 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Car b 1.
- La Fig. 9 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Cas s 1.
- La Fig. 10 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Phl p 1.
- La Fig. 11 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Phl p 6.
- 30 La Fig. 12 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Cor a 1.
- La Fig. 13 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Aln g 1.
- La Fig. 14 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Fag s 1.
- La Fig. 15 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Phl p 2.
- La Fig. 16 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Phl p 7.
- 35 La Fig. 17 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-híbrido(Phl p 1-2-5-6)..
- La Fig. 18 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Cry j 1.
- La Fig. 19 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Jun a 1.
- La Fig. 20 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Amb a 1.
- 40 La Fig. 21 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Api g 1.
- La Fig. 22 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Dau c 1.
- La Fig. 23 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Mal d 1.
- La Fig. 24 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Ova.
- La Fig. 25 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-beta-caseína.

- La Fig. 26 muestra la inducción de respuestas de memoria de Th1 por ARN pTNT-Cyp c 1.
- La Fig. 27 muestra la inducción de respuestas de memoria de Th1 por ARN pTNT-Fel d 1.
- La Fig. 28 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Der p 2.
- La Fig. 29 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Alt a 1.
- 5 La Fig. 30 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Cla h 8.
- La Fig. 31 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Hev b 6.
- La Fig. 32 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-híbrido (alérgeno).
- La Fig. 33 muestra la inducción de memoria de Th1 y supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Ara h 2.
- La Fig. 34 muestra la inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Que a 1.
- 10 La Fig. 35 muestra ausencia inducción de memoria de Th1 por ARN pTNT-Art v 1.
- La Fig. 36 muestra la inducción de memoria de Th1 o supresión de respuestas de IgE por ARN pTNT-Ole e 1.

Ejemplos:

Ejemplo 1:

- 15 En el presente ejemplo se muestra que las vacunas de ARN así como de ARN a base de replicasa que codifican el alérgeno del polen del fleo de los prados Phl p 5 pueden prevenir con eficacia las respuestas alérgicas.

Materiales y procedimientos

Plásmidos usados para la transcripción de ARN

- 20 El Vector pTNT se adquirió en Promega (Mannheim, Alemania) e incluye algunas características especiales que proporcionan ventajas sobre otros vectores. Hay dos promotores, uno para SP6 y el otro para la T7 polimerasa, para permitir la transcripción in vitro basada en SP6 así como en T7. Se encuentran en tándem adyacentes al sitio de clonación múltiple (MCS). Una secuencia líder en 5' de la β-globina ayuda a aumentar la traducción de varios genes para un inicio más rápido de la traducción. Otra característica para potenciar la expresión génica es su cola de poli (A)30 sintética.

- 25 El vector pSin-Rep5 (Invitrogen, Austria) deriva del alfavirus sindbis, que es un virus ARN de hebra positiva y encapsulado. Los vectores de replicones basados en alfavirus carecen de proteínas estructurales virales, pero mantienen los elementos de replicación (replicasa) necesarios para la autoamplificación de ARN en el citoplasma y la expresión de los genes insertados mediante un promotor del alfavirus.

- 30 El gen Phl p 5 se escindió del vector pCMV-Phlp5 mediante NheI/XbaI (Gabler et al. (2006), J Allergy Clin Immunol 118:734-741) y se ligó en el sitio de restricción XbaI de pTNT y pSin-Rep5 lo que tuvo como resultado pTNT-P5 y pSin-Rep5-P5 respectivamente.

Transcripción del ARN

- 35 Los plásmidos pTNT-P5 y pSin-Rep5-P5 se linealizaron con las correspondientes enzimas de restricción; se purificaron los moldes mediante extracción con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico, seguido de una única extracción con cloroformo-álcohol isoamílico. Tras la adición de 1/10 volumen de acetato sódico 3M a pH 5,2, los plásmidos se precipitaron con 2 volúmenes de EtOH al 100% y se lavaron 3 veces con EtOH al 70%.

- 40 Todas las reacciones de transcripción se realizaron con un sistema de producción de ARN a gran escala de T7 o SP6 RiboMAX™ (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, para una reacción de 100 µl, 20 µl del tampón de transcripción, 30 µl de rNTP0s, 5-10 µg de molde y 10 µl de mezcla enzimática se llenaron hasta 100 µl con H2O sin nucleasa y se incubaron durante 2-3 horas a 37°C. Cuando se usó el kit SP6 RiboMax se usaron 20 µl de rNTP en lugar de 30 µl.

Para imitar la estructura rematada del ARNm, durante la síntesis de ARN se incorporó en 5' un nucleótido 7-metilguanosina ((m7G(5')ppp(5')G) o un análogo rematados (EPICENTRE, EE.UU.). La mezcla de rNTP se preparó como una mezcla 25:25:25:22,5:2,5 mM de rATP, rCTP, rUTP, rGTP y m7G(5')ppp(5')G.

- 45 Tras la transcripción, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13,000 rpm)

a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Resultados

Transfección in vitro con ARN y ARN autorreplicante

5 Las células BHK-21 se transfectaron in vitro con dos transcritos de ARN diferentes que codifican la β-galactosidasa, bien como vacuna de ARN convencional transcrita a partir del vector pTNT-βGal (βGal-RNA) o bien como ARN autorreplicante transcrito a partir del vector pRep5-βGal (βGal-repRNA).

10 Los transcritos de ARN se analizaron con o sin la adición de una estructura de remate m7G(5')ppp(5')G. La Fig. 1 muestra que la transfección con cantidades iguales de ARN autorreplicante induce una expresión 7,5 veces mayor del transgén en comparación con el ARN convencional. Adicionalmente, la estabilización del ARN con una estructura de remate es esencial para la transfección/traducción in vitro del ARN.

Las vacunas a base de ARN que codifican el alérgeno hlp 5 son inmunogénicas e impiden la inducción de IgE

15 Para investigar el potencial de las vacunas a base de ARN para evitar la inducción de la alergia se inmunizó a ratones BALB/c hembra con ARN convencional que codifica Phl p 5 o ARN autorreplicante que codifica Phl p 5. Para estimar la potencia de las vacunas de ARN, se inmunizó también a grupos correspondientes con las mismas dosis de una vacuna de ADN convencional (pCMV-P5) y una vacuna de ADN autorreplicante (pSin-P5) que codifica Phl p 5. Se inmunizó a los ratones tres veces a intervalos semanales y dos semanas después se les sensibilizó mediante dos inyecciones de pSin-P5 Phl p 5 recombinante en complejo con alúmina, un protocolo que se sabe que induce un fenotipo alérgico que se caracteriza por niveles elevados de IgE y un perfil de citocinas de los linfocitos T desplazado hacia TH2.

20 La Figura 2A muestra que las dos vacunas de ARN inducen respuestas inmunitarias humorales similares en comparación con la vacuna de ADN autorreplicante pSin-P5. Por el contrario, la respuesta inmunitaria humoral inducida por la vacuna de ADN convencional pCMV-P5 fue aproximadamente un orden de magnitud mayor en comparación con las demás vacunas. Todos los tipos de vacunas mostraron un perfil serológico claramente desplazado hacia TH1, que se caracteriza por proporciones IgG1/IgG2a y ausencia de inducción de IgE funcional medido mediante el ensayo de liberación de RBL (Fig. 3, barras grises).

25 Después de la sensibilización, el grupo control que no se había preinmunizado mostró una serología estrictamente desplazada hacia TH2 con niveles elevados de IgG1 y una proporción elevada de IgG1/IgG2a, indicativo de una sensibilización alérgica. Por el contrario, todos los grupos vacunados mantenían un inmunofenotipo equilibrado en TH1 (Fig. 2B). La vacunación previa con ambos tipos de vacunas de ARN indujo una supresión similar o mejor de inducción de IgE en comparación con los animales control que sus homólogas de ADN (Fig. 3, barras negras). En general, la vacunación previa con ambos tipos de vacunas de ARN tuvo como resultado una supresión del 93% de la inducción de IgE tras la sensibilización alérgica.

Las vacunas basadas en ARN inducen memoria en los linfocitos T hacia TH1

35 Dos semanas después de la última sensibilización, se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con la proteína Phl p 5 recombinante para evaluar su perfil TH1/TH2. Por tanto, el número de células secretoras de FN-γ, IL-4, and IL-5 se determinó mediante ELISPOT.

40 Todos los grupos prevacunados con vacunas de ácido nucleico mostraron una inducción significativa de células secretoras de IFN-γ (Fig. 4A) en comparación con el grupo control. De forma simultánea, la cantidad de células secretoras de las citocinas de tipo TH2 IL-4 (Fig. 4B) e IL-5 (Fig. 4C) se había suprimido, lo que indica que de un modo similar a las vacunas de ADN, las vacunas de ARN podían establecer una memoria específica del antígeno desplazada a TH1 que podía reactivarse con una exposición posterior al alérgeno.

Las vacunas basadas en ARN alivian la inflamación pulmonar inducida por el alérgeno

45 Para investigar el efecto de la vacunación con ARN sobre la inducción de enfermedad pulmonar, dos semanas después de la última sensibilización se indujo inflamación pulmonar mediante dos aplicaciones i.n. diarias de 1 μg de Phl p 5 recombinante. Este protocolo indujo una fuerte infiltración de leucocitos en el líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) de los ratones sensibilizados (Fig. 5A, control). Aproximadamente el 80% de los leucocitos infiltrantes eran eosinófilos (Fig. 5B). Por el contrario, los ratones prevacunados mostraron un número significativamente reducido de infiltrados de leucocitos totales e incluso una mayor reducción con respecto a los eosinófilos.

50 La reducción del infiltrado inflamatorio también se vio reflejada por una fuerte supresión de IL-5 en el LLBA (Fig. 6A). La supresión de IL-5 se correlacionó inversamente con una inducción de IFN-γ (Fig. 6B).

Conclusión

Las vacunas de ADN son muy prometedoras para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas. No

obstante, los hipotéticos riesgos asociados con las vacunas de ADN cuestionan el uso de este nuevo tipo de vacuna en la práctica clínica en adultos sanos o incluso en niños-

En este ejemplo se ha podido demostrar por primera vez que la vacunación con ARN desnudo con un alérgeno clínicamente adecuado puede evitar la inducción de alergia en la misma medida que una vacuna de ADN comparable aplicada a la misma dosis,

Para abordar el problema de la producción de cantidades mayores de ARN, el ARN convencional se comparó con el ARN autorreplicante derivado de un replicón del virus Sindbis. La transfección *in vitro* con ambos tipos de ARN demostró que la expresión antigénica depende de, entre otros factores, la adición de un análogo cap (de remate) de m7G(5')ppp(5')G. Se sabe que la mayoría de los ARNm eucarióticos posee esta estructura cap m7G(5')ppp(5')G en su extremo 5', que es importante para los factores de inicio de la traducción y contribuye a la estabilidad del ARNm. Adicionalmente, se pudo demostrar que cantidades similares del ARN autorreplicante se traducen en niveles 7 veces mayores de proteínas (Fig. 1), que se puede atribuir fácilmente a la autoamplificación del ARN subgenómico que codifica el respectivo antígeno. Esto contrasta con las vacunas de ADN autorreplicante, en las que la expresión de proteínas es baja en comparación con las vacunas de ADN convencionales, un efecto que se ha atribuido a la inducción de la apoptosis en células transfectadas. De todas formas, la expresión de vacunas de ADN solo es transitoria y, por tanto, comparable a las células que sufren apoptosis poco después de la transfección con vacunas autorreplicantes. De hecho, las vacunas de ARN autorreplicantes inducen respuestas inmunitarias humorales similares en comparación con las vacunas de ADN autorreplicante (Fig.2A), mientras que la vacuna de ADN convencional, con su expresión continua del antígeno, muestra la respuesta inmunitaria humoral más elevada.

Aunque en el presente ejemplo las vacunas de ácido nucleico autorreplicante se aplicaron a un dosis 5 veces menor en comparación con las vacunas de ARNADN convencionales se observó una inducción similar de las TH1 memoria, indicado por una descarga de IgG2A tras la sensibilización posterior con el alérgeno recombinante en alúmina (Fig. 2B) y un perfil de citocinas TH1 de esplenocitos reestimulados, así como una elevada capacidad de protección (Fig. 3). Aquí, las vacunas de ARN y la vacuna de ADN autorreplicante muestran una capacidad de protección todavía mayor que la vacuna de ADN convencional, aunque esta última induce niveles más altos de antígeno intacto y mayores respuestas inmunitarias humorales. Esto indica que una secreción duradera del alérgeno inducida por la vacuna puede ser contraproducente en comparación con la expresión a corto plazo de la vacuna, como se ve con las vacunas de ARN y autorreplicantes.

La vacunación con ARN también dio lugar a una reducción similar de la infiltración pulmonar tras la provocación *i.n.* con alérgeno en comparación con las vacunas de ADN (Fig. 5A), debida principalmente a una disminución drástica de la cantidad de eosinófilos en el LLBA (Fig. 5B). Esto se correlacionó con una reducción de los niveles de IL-5 (Fig. 6A) y la inducción de niveles moderados de IFN- γ (Fig. 2B) en los pulmones, lo que indica que la generación inducida por la vacuna de células TH1 también afecta al equilibrio de las citocinas TH1/TH2 en los pulmones. Aunque en modelos virales el IFN- γ en los pulmones puede tener efectos perjudiciales sobre el asma y las patologías pulmonares, esto parece ser un efecto indirecto ya que el IFN- γ puede activar el reclutamiento por las células epiteliales de más células TH2 en el tejido. De hecho, en modelos de alergia, podría mostrarse que redirigir la inmunidad TH2 hacia un medio TH1 más equilibrado tiene un efecto beneficioso sobre la inflamación pulmonar y la hiperreactividad de las vías aéreas, principalmente contrarregulando los niveles de IL-5 y IL-13 (Ford, J. G. et al (2001) *J Immunol* 167:1769-1777).

En conjunto, podría demostrarse que las vacunas a base de ARN pueden inducir una protección significativa frente a la sensibilización alérgica y que usando vacunas de ARN autorreplicantes se puede conseguir este efecto a dosis bajas. Dado el excelente perfil de seguridad de las vacunas de ARN, se abre una puerta a la aplicación clínica de las vacunas de ARN no solo en un contexto terapéutico sino también en individuos sanos con un alto riesgo de desarrollo de trastornos alérgicos.

45 **Ejemplo 2:**

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Bet v 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Bet v 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Bet v 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

5 *Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección*

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Bet v 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Bet v 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 7A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 7B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 7C).

Ejemplo 3:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Car b 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron los extremos usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Car b 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Car b 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Car b 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Car b 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 8A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 8B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 8C).

Ejemplo 4:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Cas s 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron los extremos usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Cas s 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Cas s 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Cas s 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Cas s 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 9A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 9B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 9C).

Ejemplo 5:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Phl p 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Phl p 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Phl p 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno mediante ELISA como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Phl p 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Phl p 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 10A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 10B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

Ejemplo 6:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Phl p 6 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron los extremos usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 5 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

- 10 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Phl p 6 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Phl p 6 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

- 15 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Phl p 6 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

20 **Resultados**

- La vacunación previa con ARN pTNT-Phl p 6 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 11A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 11B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 11C).

Ejemplo 7:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

- 30 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Cor a 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 35 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

- 40 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Cor a 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Cor a 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización, mediante ELISA se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno.

45 **Resultados**

La vacunación previa con ARN pTNT-Cor a 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 12) y la secreción de IFN-γ (Fig. 10B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras).

Ejemplo 8:

50 **Materiales y procedimientos**

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica AIn g 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 5 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

10 *Inmunización y sensibilización*

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-AIn g 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de AIn g 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

15 *Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección*

Diez días después de la última sensibilización se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con AIn g 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

- 20 La vacunación previa con ARN pTNT-AIn g 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de la secreción de IFN-γ (Fig. 13) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

Ejemplo 9:

Materiales y procedimientos

25 *Plásmidos y transcripción de ARN*

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Fag s 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 30 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

- 35 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Fag s 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Fag s 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

- 40 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Fag s 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

45 **Resultados**

La vacunación previa con ARN pTNT-Fag s 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 14A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 14B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 14C).

50

Ejemplo 10:**Materiales y procedimientos***Plásmidos y transcripción de ARN*

5 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Phl p 2 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

15 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Phl p 2 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Phl p 2 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

20 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgE específicos del alérgeno mediante RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Phl p 2 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

25 La vacunación previa con ARN pTNT-Phl p 2 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de la secreción de IFN-γ (Fig. 15A) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 15B).

Ejemplo 11:**Materiales y procedimientos***Plásmidos y transcripción de ARN*

30 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Phl p 7 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

35 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

40 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Phl p 7 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Phl p 7 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

45 Una semana después de la última sensibilización, mediante RBL se midieron los niveles séricos de IgE específicos del alérgeno como se ha descrito en el experimento 1.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Phl p 7 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de la inducción de IFN-γ (Fig. 16A) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de

Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 16B).

Ejemplo 12:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

5 Como se ha descrito en el ejemplo 1, en el vector pTNT se clonó un ADNc híbrido que codifica Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 (Linhart B. and Valenta R., Int Arch Allergy Immunol (2004) 134:324-331) Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

15 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-híbrido(Phl p 1-2-5-6) tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

20 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con alérgenos recombinantes durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

25 La vacunación previa con ARN pTNT-híbrido(Phl p 1-2-5-6) (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 17A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 17B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 17C).

Ejemplo 13:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

35 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Cry j 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

40 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

45 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Cry j 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Cry j 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

50 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno mediante ELISA como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Cry j 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ

en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

5 La vacunación previa con ARN pTNT-Cry j 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 18A) y la secreción de IFN- γ (Fig. 18B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

Ejemplo 14:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

10 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Jun a 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

15 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

20 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Cor a 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 μ g de Jun a 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

25 Diez días después de la última sensibilización se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Jun a 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

30 La vacunación previa con ARN pTNT-Jun a 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de la inducción de IFN- γ (Fig. 19) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

Ejemplo 15:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

35 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Amb a 1 en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

40 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

45 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Amb a 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 μ g de Amb a 1 purificado en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Diez días después de la última sensibilización se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Amb a 1 purificado durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes del cultivo celular como

indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

5 La vacunación previa con ARN pTNT-Amb a 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de la secreción de IFN- γ (Fig. 20) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

Ejemplo 16:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

10 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Api g 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

15 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

20 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-API g 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 μ g de Api g 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

25 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Api g 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

30 La vacunación previa con ARN pTNT-API g 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 21A) y la secreción de IFN- γ (Fig. 21B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 21C).

Ejemplo 17:

35 Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Dau c 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

40 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

45 *Inmunización y sensibilización*

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Dau c 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 μ g de Dau c 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno mediante ELISA como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Dau c 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Dau c 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 22A) y la secreción de IFN- γ (Fig. 22B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

Ejemplo 18:**Materiales y procedimientos***Plásmidos y transcripción de ARN*

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Mal d 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Mal d 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 μ g de Mal d 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Mal d 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Mal d 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 23A) y la secreción de IFN- γ (Fig. 23B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 23C).

Ejemplo 19:**Materiales y procedimientos***Plásmidos y transcripción de ARN*

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Ova en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Ova tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Ova recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

5 *Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección*

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Ova recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Ova (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 24A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 24B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 24C).

Ejemplo 20:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica beta-caseína se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-beta-caseína tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de beta-caseína recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgE específicos del alérgeno mediante RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con beta-caseína recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-beta-caseína (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de la secreción de IFN-γ (Fig. 25A) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 25B).

Ejemplo 21:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Cyp c 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos

(13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

5 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Cyp c 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Cyp c 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

10 Una semana después de la última sensibilización, mediante ELISA se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno como se ha descrito en el experimento 1.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Cyp c 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 26).

Ejemplo 22:

15 **Materiales y procedimientos**

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Fel d 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

25 *Inmunización y sensibilización*

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Fel d 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Fel d 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

30 *Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección*

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno mediante ELISA como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Fel d 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

35 **Resultados**

La vacunación previa con ARN pTNT-Fel d 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 27A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 27B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

40 **Ejemplo 23:**

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

45 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Der p 2 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos

(13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

5 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Der p 2 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Der p 2 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

10 Una semana después de la última sensibilización, mediante ELISA y RBL se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno como se ha descrito en el experimento 1.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Der p 2 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 28A). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 28B).

15 **Ejemplo 24:**

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

20 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Alt a 1 en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

25 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

30 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Alt a 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Alt a 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

35 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Alt a 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

40 La vacunación previa con ARN pTNT-Alt a 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 29A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 29B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 29c).

Ejemplo 25:

Materiales y procedimientos

45 *Plásmidos y transcripción de ARN*

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Cla h 8 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT--Cla h 8 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Cla h 8 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgE específicos del alérgeno mediante RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Cla h 8 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Cla h 8 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica la secreción de IFN-γ (Fig. 30A) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas). Esta estimulación previa de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 30B).

Ejemplo 26:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Hev b 6 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Hev b 6 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Hev b 6 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno mediante ELISA como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Hev b 6 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-Hev b 6 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 31A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 31B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

Ejemplo 27:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc híbrido que codifica 5 alérgenos diferentes se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 5 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

- 10 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-híbrido(Aln-Cor-Que-Car-Bet) tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de alérgenos enteros recombinantes en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

- 15 Una semana después de la última sensibilización, mediante ELISA se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno como se ha descrito en el experimento 1.

Resultados

La vacunación previa con ARN pTNT-híbrido (alérgeno) (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 32).

20 **Ejemplo 28:**

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

- 25 Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Ara h 2 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 30 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

- 35 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT--Ara h 2 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Ara h 2 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

- 40 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgE específicos del alérgeno mediante RBL y ELISA como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Ara h 2 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

- 45 La vacunación previa con ARN pTNT-Ara h 2 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica la secreción de IFN-γ (Fig. 33A). Esta sensibilización de Th1 pudo suprimir la inducción de respuestas de IgE específicas del alérgeno (Fig. 33B).

Ejemplo 29:

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Que a 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 5 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

Inmunización y sensibilización

- 10 Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Que a 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Que a 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección

- 15 Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno mediante ELISA como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Que a 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

Resultados

- 20 La vacunación previa con ARN pTNT-Que a 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica el incremento de inducción de IgG2a (Fig. 34A) y la secreción de IFN-γ (Fig. 34B) en contraste con los controles de sensibilización (barras negras) o los ratones preinmunes (barras blancas).

Ejemplo 30:

- 25 **Materiales y procedimientos**

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Art v 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 30 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

- 35 *Inmunización y sensibilización*

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Art v 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Art v 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

- 40 *Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección*

Una semana después de la última sensibilización se midieron los niveles séricos de IgG2a específicos del alérgeno mediante ELISA y RBL como se ha descrito para el experimento 1. Diez días después de la sensibilización final se estimuló de nuevo a los esplenocitos in vitro con Art v 1 recombinante durante 72 horas y se analizaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo celular como indicador de la activación celular TH1 específica del alérgeno.

- 45 **Resultados**

La vacunación previa con ARN pTNT-Art v 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica la ausencia de incremento de inducción de IgG2a (Fig. 35A) o de secreción de IFN-γ (Fig. 35B).

Ejemplo 31:

- 50 **Materiales y procedimientos**

Plásmidos y transcripción de ARN

Como se ha descrito para el ejemplo 1, el ADNc que codifica Ole e 1 se clonó en el vector pTNT. Los transcritos de ARN se prepararon como se ha descrito y se remataron usando un kit de ScriptCap (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 Los transcritos rematados se incubaron con ADNasa sin ARNasa (Promega) durante 15 minutos a 37 °C para extraer el ADN molde. Después, el ARN se precipitó añadiendo 1 volumen de acetato amónico 5M al tubo de reacción e incubando la mezcla durante 10-15 minutos en hielo. Tras un periodo de centrifugación de 15 minutos (13.000 rpm) a 4 °C o a temperatura ambiente, el sedimento se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O sin nucleasa.

10 *Inmunización y sensibilización*

Se inmunizó a los ratones con ARN pTNT-Ole e 1 tres veces a intervalos semanales y se sensibilizaron una semana después mediante dos inyecciones semanales de 1 µg de Ole e 1 recombinante en complejo con alúmina para inducir un fenotipo alérgico. Los animales control solo se sensibilizaron y no recibieron vacunación previa con la vacuna de ARN.

15 *Medición de la inducción de memoria de Th1 y protección*

Una semana después de la última sensibilización, mediante ELISA y RBL se midieron los niveles séricos de IgG2a e IgE específicos del alérgeno como se ha descrito en el ejemplo 1.

Resultados

20 La vacunación previa con ARN pTNT-Ole e 1 (barras con trazos) tuvo como resultado el reclutamiento de células Th1 específicas del alérgeno como indica la falta de incremento de inducción de IgG2a (Fig. 36A). Además, no se pudo medir supresión alguna de la inducción de las respuestas de IgE específica del alérgeno (Fig. 36B).

Listado de secuencias

< 110> Biomay AG

25

<120> Vacunas de ARN

< 130> R 52521

30

< 150> EP 07450169.3

< 151> 28 09 2007

< 160> 1

35

<170> PatentIn versión 3,4

< 210> 1

< 211> 90

< 212> PRT

40

< 213> Dermatophagoides pteronyssinus

< 400> 1

ES 2 434 221 T3

Met Lys Phe Asn Ile Ile Ile Val Phe Ile Ser Leu Ala Ile Leu Val
1 5 10 15

His Ser Ser Tyr Ala Ala Asn Asp Asn Asp Asp Asp Pro Thr Thr Thr
 20 25 30

Val His Pro Thr Thr Thr Glu Gln Pro Asp Asp Lys Phe Glu Cys Pro
 35 40 45

Ser Arg Phe Gly Tyr Phe Ala Asp Pro Lys Asp Pro His Lys Phe Tyr
 50 55 60

Ile Cys Ser Asn Trp Glu Ala Val His Lys Asp Cys Pro Gly Asn Thr
65 70 75 80

Arg Trp Asn Glu Asp Glu Glu Thr Cys Thr
 85 90

REIVINDICACIONES

1. Vacuna de ARN que comprende al menos una molécula de ARN que codifica al menos un alérgeno o derivado de mismo, siendo dicho alérgeno un alérgeno de *Alnus glutinosa*, *Alternaria alternata*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Apium graveolens*, *Arachis hypogaea*, *Betula verrucosa*, *Carpinus betulus*, *Castanea sativa*, *Cladosporium herbarum*, *Corylus avellana*, *Cryptomeria japonica*, *Cyprinus carpio*, *Daucus carota*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Fagus sylvatica*, *Felis domesticus*, *Hevea brasiliensis*, *Juniperus ashei*, *Malus domestica*, *Quercus alba* y *Phleum pratense*.
2. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el alérgeno de *Alnus glutinosa* es Aln g 1, el alérgeno de *Alternaria alternata* se selecciona del grupo constituido por Alt a 1, Alt a 3, Alt a 4, Alt a 5, Alt a 6, Alt a 7, Alt a 8, Alt a 10, Alt a 12 y Alt a 13, el alérgeno de *Ambrosia artemisiifolia* se selecciona del grupo constituido por Amb a 1, Amb a 2, Amb a 3, Amb a 5, Amb a 6, Amb a 7, Amb a 8, Amb a 9 y Amb a 10, el alérgeno de *Apium graveolens* se selecciona del grupo constituido por Api g 1, Api g 4 and Api g 5, el alérgeno de *Arachis hypogaea* se selecciona del grupo constituido por Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7 y Ara h 8, el alérgeno de *Betula verrucosa* se selecciona del grupo constituido por Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 6 y Bet v 7, el alérgeno de *Carpinus betulus* es Car b 1, el alérgeno de *Castanea sativa* se selecciona del grupo constituido por Cas s 1, Cas s 5 y Cas s 8, el alérgeno de *Cladosporium herbarum* se selecciona del grupo constituido por Cla h 2, Cla h 5, Cla h 6, Cla h 7, Cla h 8, Cla h 9, Cla h 10 y Cla h 12, el alérgeno de *Corylus avellana* se selecciona del grupo constituido por Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 10 y Cor a 11, el alérgeno de *Cryptomeria japonica* se selecciona del grupo constituido por Cry j 1 y Cry j 2, el alérgeno de *Cyprinus carpio* es Cyp c 1, el alérgeno de *Daucus carota* se selecciona del grupo constituido por Dau c 1 y Dau c 4, el alérgeno de *Dermatophagoides pteronyssinus* se selecciona del grupo constituido por Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 20, Der p 21 y Clone 30, el alérgeno de *Fagus sylvatica* es Fag s 1, el alérgeno de *Felis domesticus* se selecciona del grupo constituido por Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5w, Fel d 6w y Fel d 7w, el alérgeno de *Hevea brasiliensis* se selecciona del grupo constituido por Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 6.03, Hev b 7.01, Hev b 7.02, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10, Hev b 11, Hev b 12 y Hev b 13, el alérgeno de *Juniperus ashei* se selecciona del grupo constituido por Jun a 1, Jun a 2 y Jun a 3, el alérgeno de *Malus domestica* se selecciona del grupo constituido por Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 y Mal d 4, el alérgeno de *Quercus alba* es Que a 1 y el alérgeno de *Phleum pratense* se selecciona del grupo constituido por Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12 y Phl p 13.
3. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** el alérgeno se selecciona del grupo constituido por Aln g 1, Alt a 1, Amb a 1, Api g 1, Ara h 2, Bet v 1, β -caseína, Car b 1, Cas s 1, Cla h 8, Cor a 1, Cry j 1, Cyp c 1, Dau c 1, Der p 2, Fag s 1, Fel d 1, Hev b 6, Jun a 1, Mal d 1, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 7.
4. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** la molécula de ARN codifica Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 and Phl p 6, o Aln g 1, Cor a 1, Que a 1, Car b 1 y Bet v 1.
5. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** el derivado del alérgeno es hipoalérgico.
6. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada porque** el derivado del alérgeno hipoalérgico exhibe una reactividad de IgE que es al menos un 10 %, preferentemente al menos un 20 %, más preferentemente al menos 30 %, en particular al menos 50 %, inferior a la reactividad de IgE del alérgeno natural.
7. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** la molécula de ARN que codifica el alérgeno o derivado del mismo está condensada con al menos una molécula adicional que codifica un péptido, polipéptido o proteína.
8. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** la molécula de ARN comprende al menos un elemento adicional seleccionado del grupo constituido por la replicasa, la secuencia líder de la β -globina, cap0, cap1 y la cola de poli A.
9. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** la vacuna comprende además un adyuvante, seleccionado preferentemente del grupo constituido por CpG-ADN y citocinas, preferentemente IL-12 e IL-15.
10. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** la vacuna está adaptada para administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, transdérmica, tópica o biolística.
11. Uso de al menos una molécula de ARN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de una vacuna para tratar o prevenir la alergia.

- 5
12. Uso de al menos una molécula de ARN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de una vacuna protectora y terapéutica para hiposensibilizar a un individuo frente a un alérgeno.
 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, **caracterizado porque** la vacuna comprende además un adyuvante, seleccionado preferentemente del grupo constituido por CpG-ADN y citocinas, preferentemente IL-12 e IL-15.
 14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** la vacuna está adaptada para administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, transdérmica, tópica o biolística.

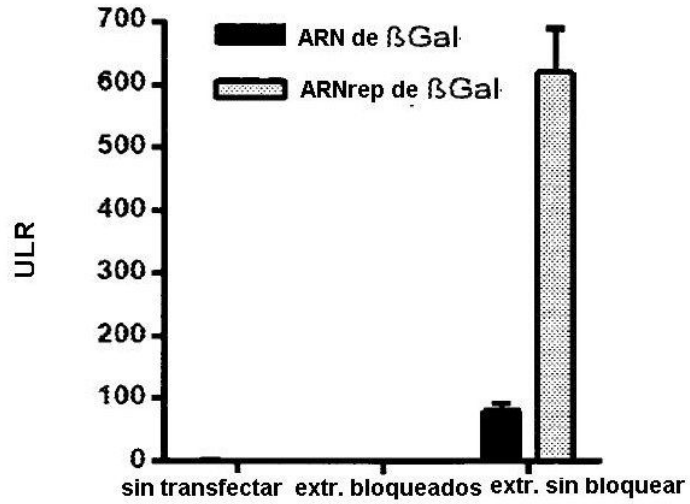


Fig. 1

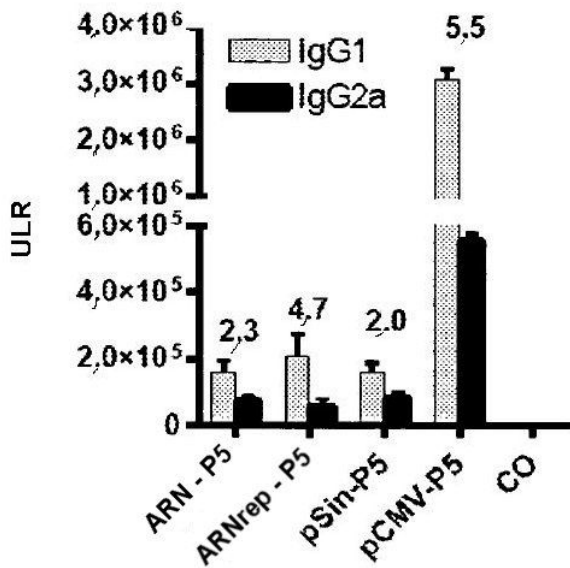


Fig. 2A

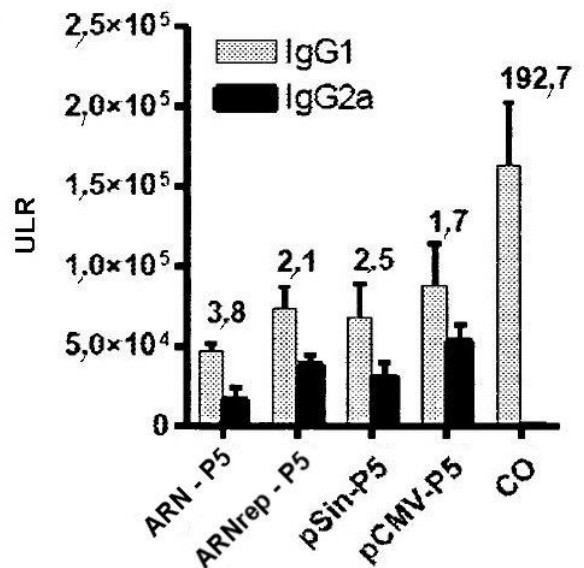


Fig. 2B

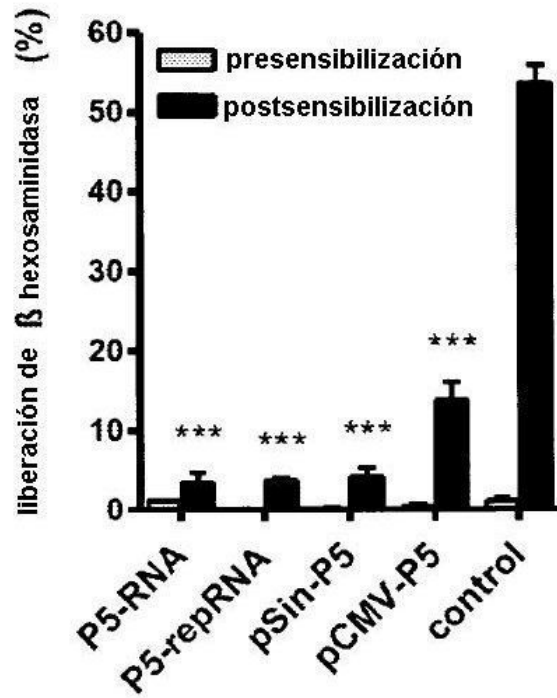


Fig. 3

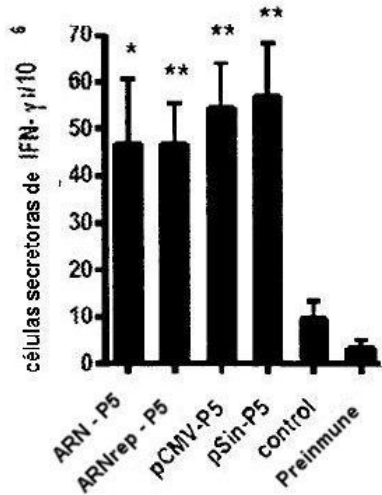


Fig. 4A

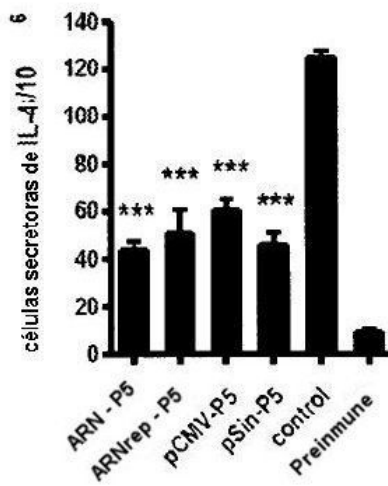


Fig. 4B

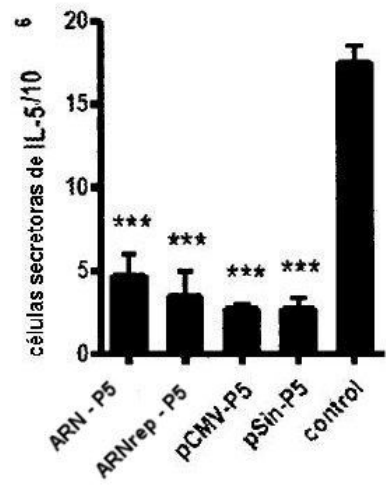


Fig. 4C

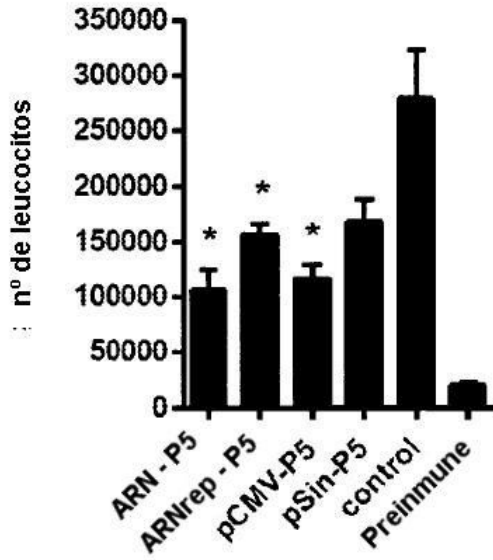


Fig. 5A

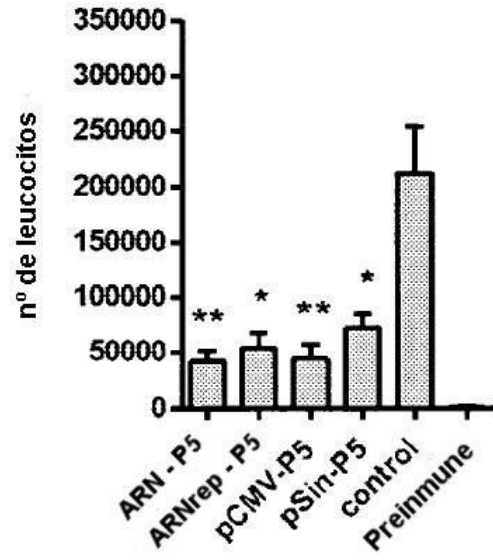


Fig. 5B

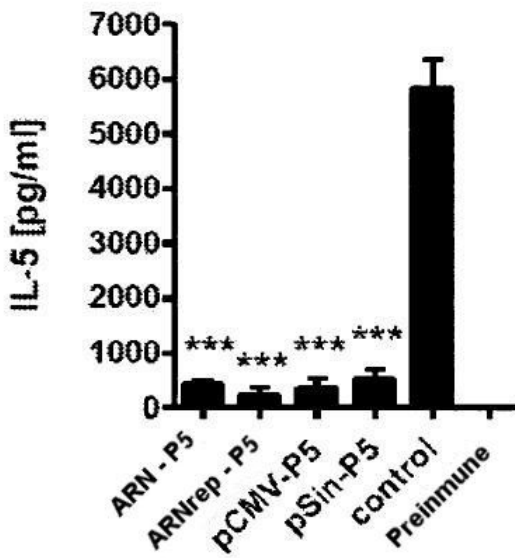


Fig. 6A

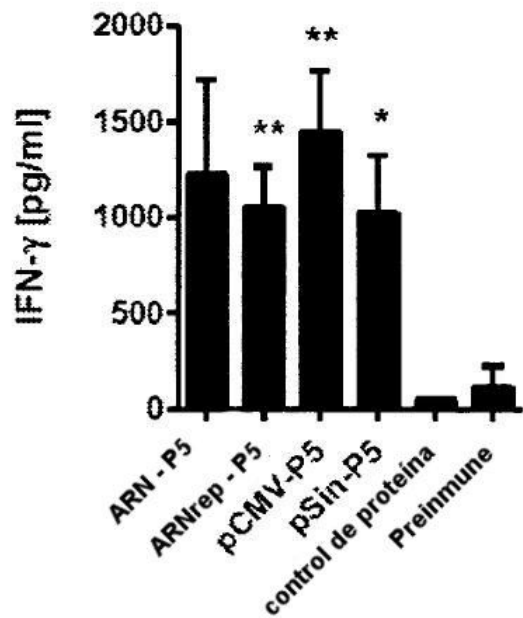


Fig. 6B

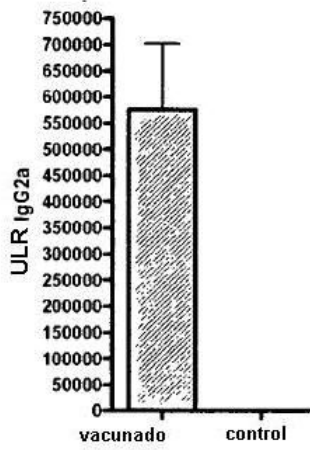


Fig. 7A

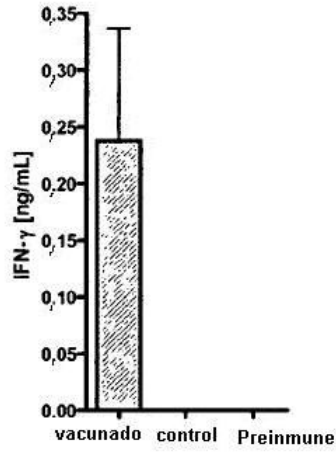


Fig. 7B

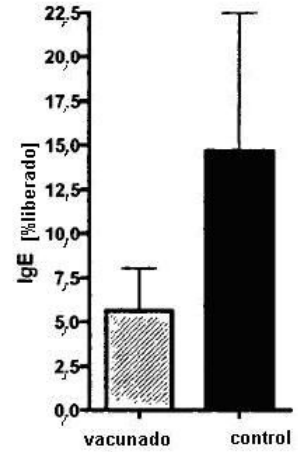


Fig. 7C

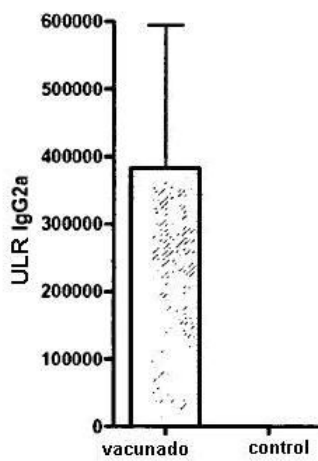


Fig. 8A

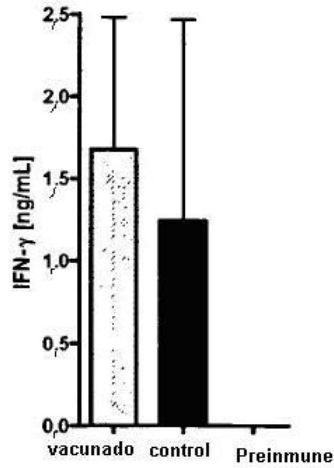


Fig. 8B

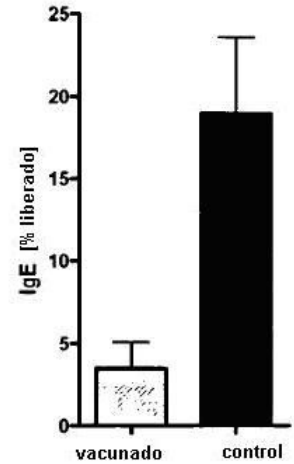


Fig. 8C

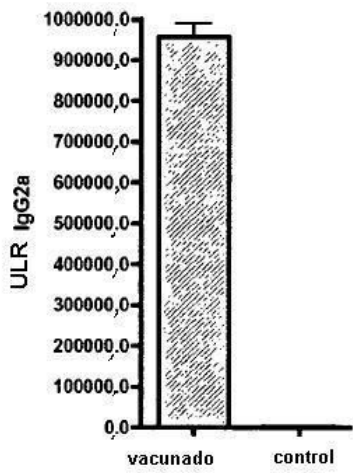


Fig. 9A

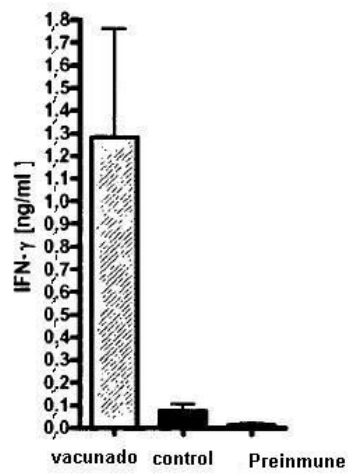


Fig. 9B

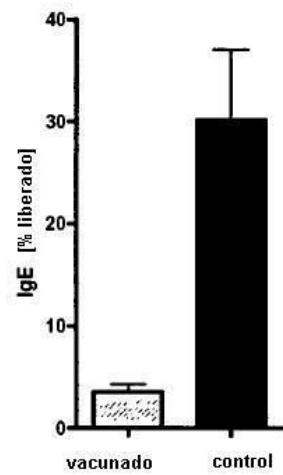


Fig. 9C

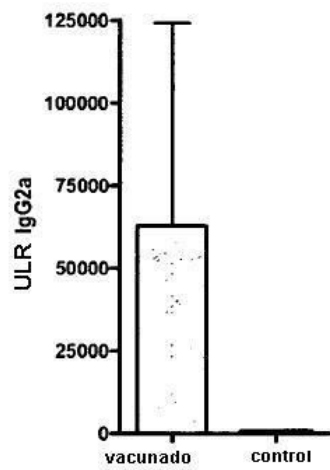


Fig. 10A

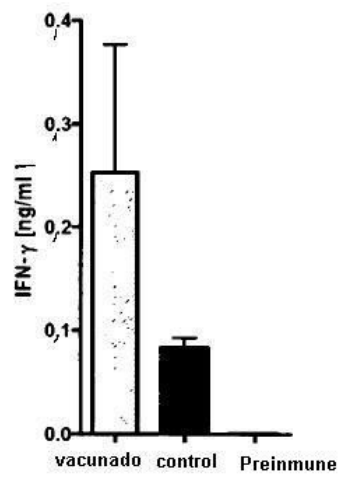


Fig. 10B

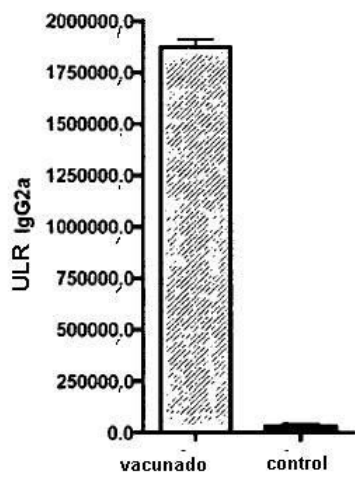


Fig. 11A

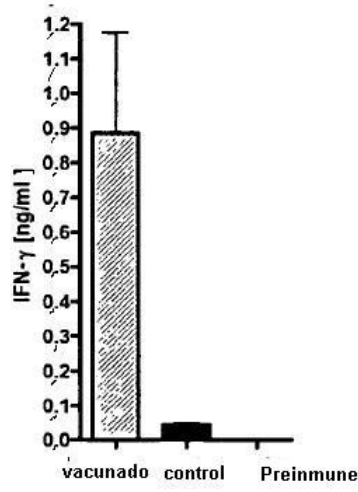


Fig. 11B

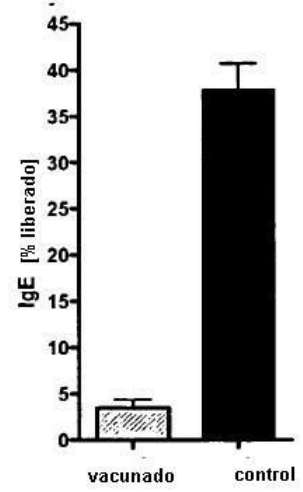


Fig. 11C

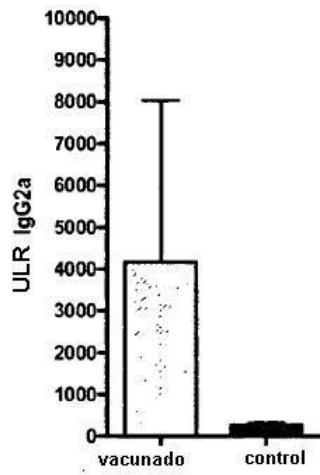


Fig. 12

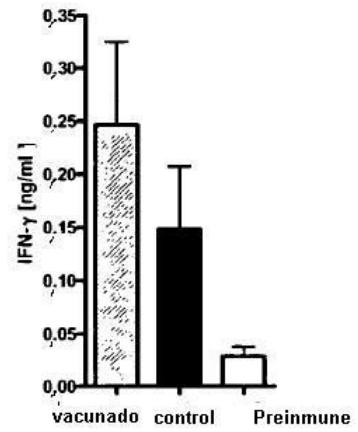


Fig. 13

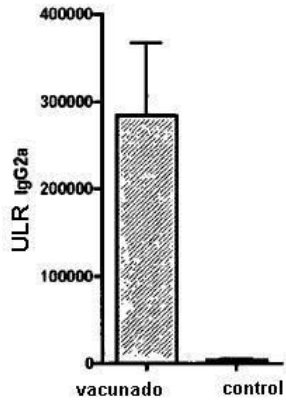


Fig. 14A

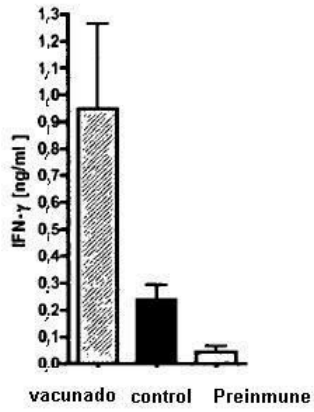


Fig. 14B

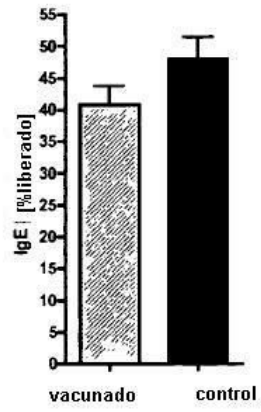


Fig. 14C

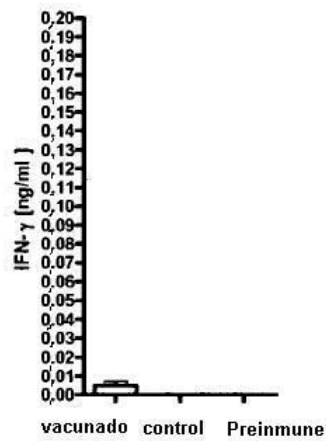


Fig. 15A

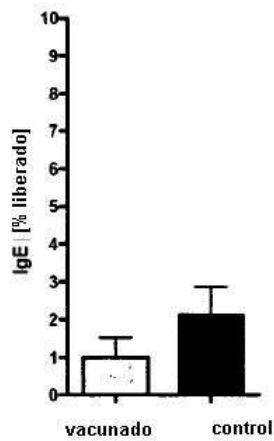


Fig. 15B

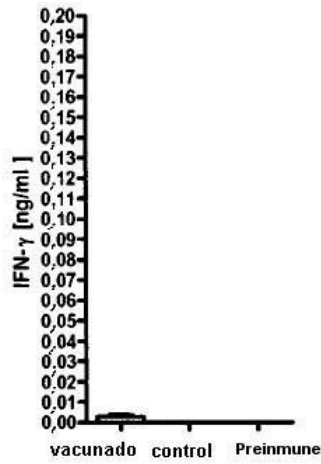


Fig. 16A

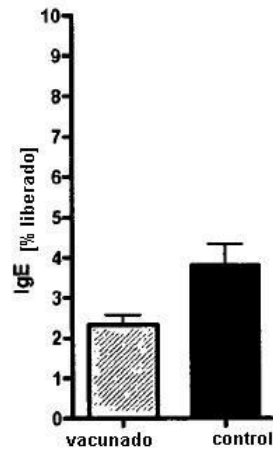


Fig. 16B

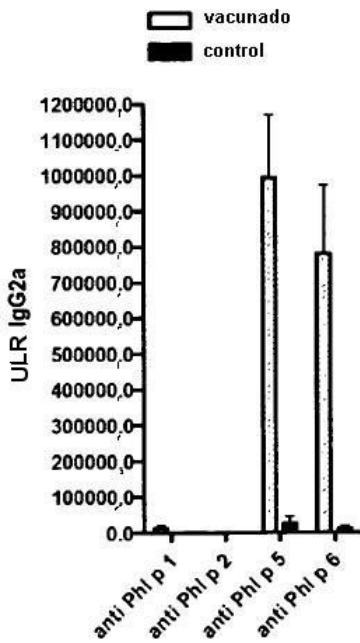


Fig. 17A

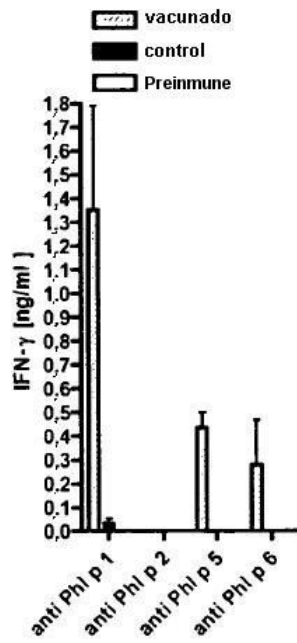


Fig. 17B

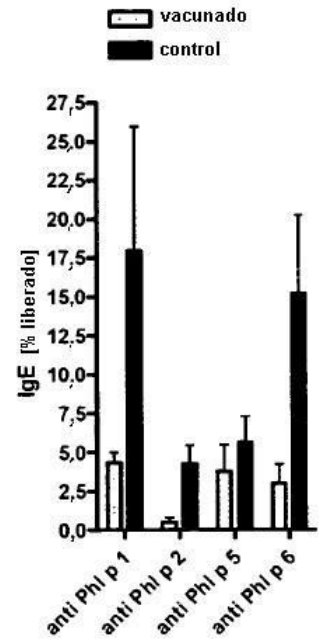


Fig. 17C

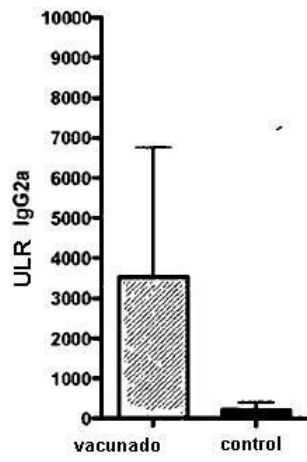


Fig. 18A

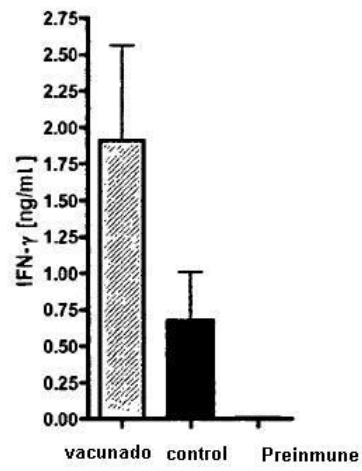


Fig. 18B

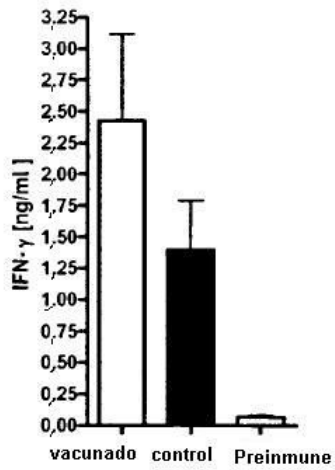


Fig. 19

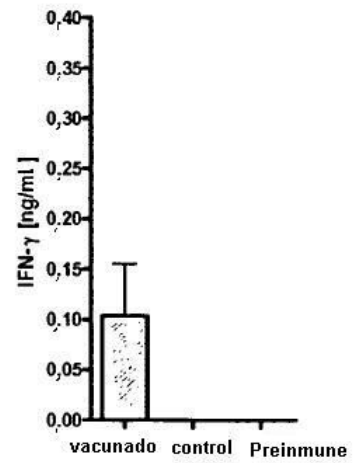


Fig. 20

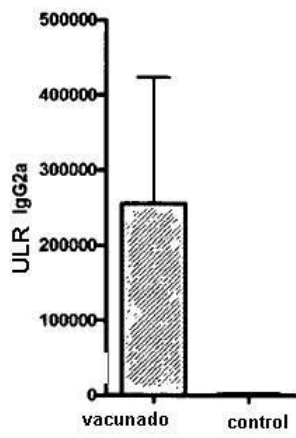


Fig. 21A

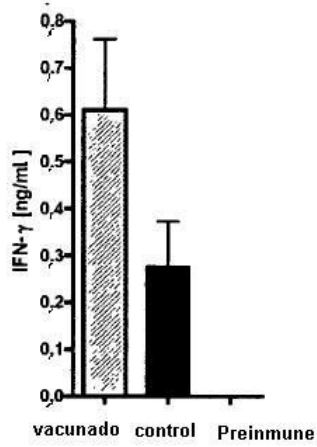


Fig. 21B

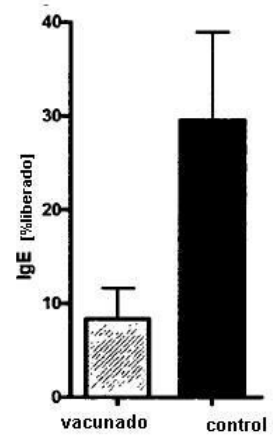


Fig. 21C

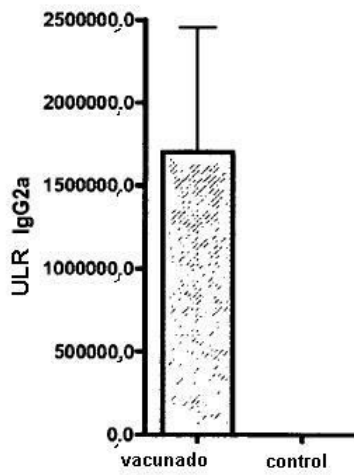


Fig. 22A

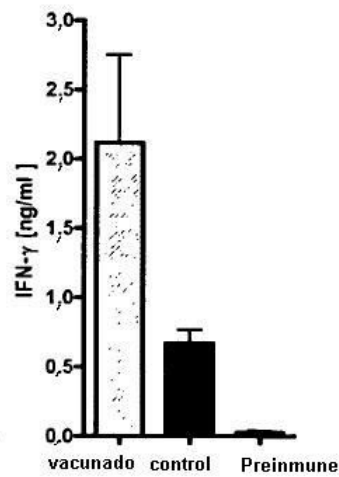


Fig. 22B

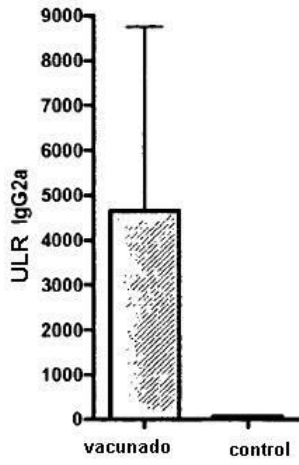


Fig. 23A

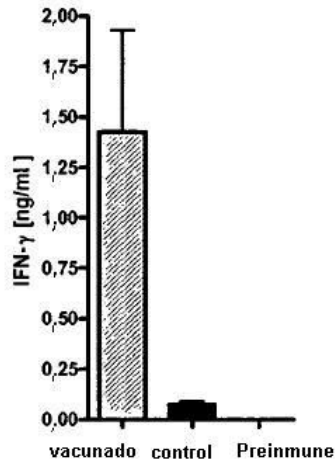


Fig. 23B

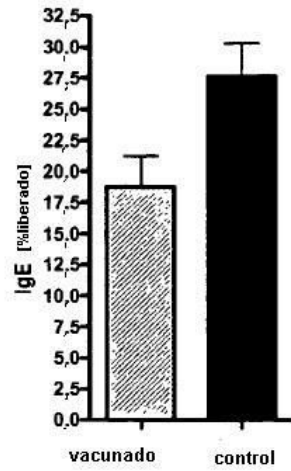


Fig. 23C

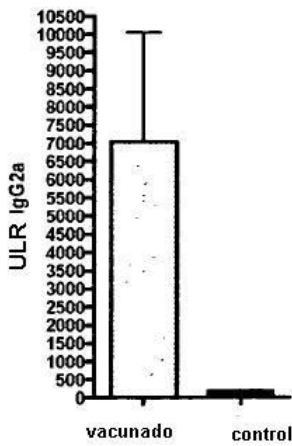


Fig. 24A

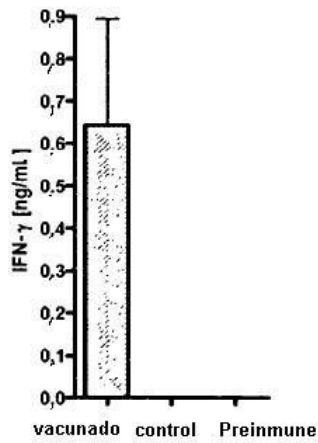


Fig. 24B

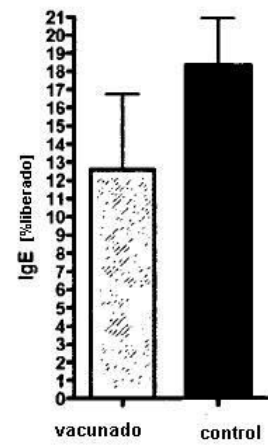


Fig. 24C

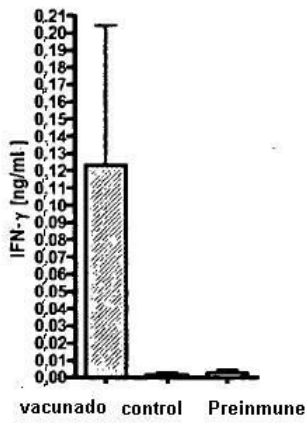


Fig. 25A

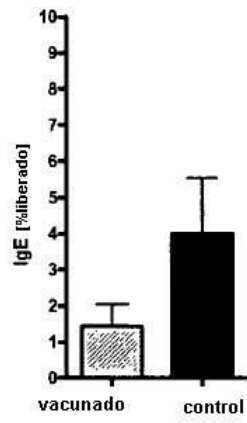


Fig. 25B

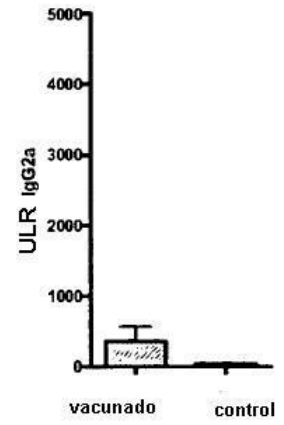


Fig. 26

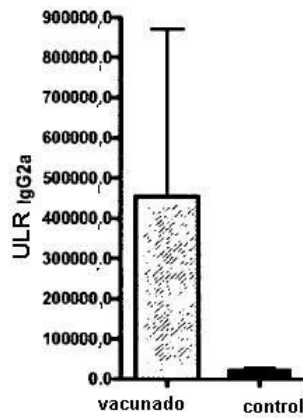


Fig. 27A

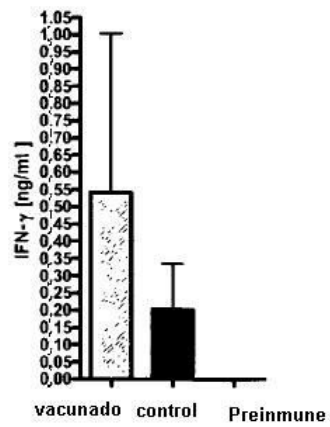


Fig. 27B

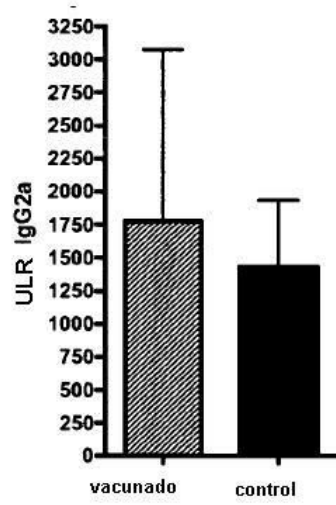


Fig. 28A

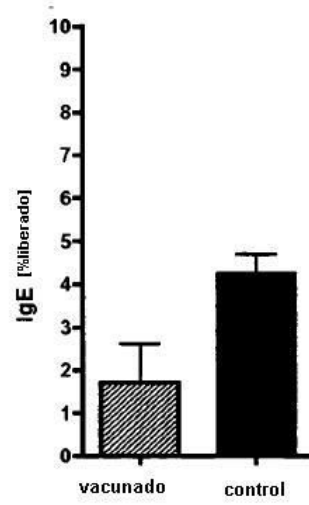


Fig. 28B

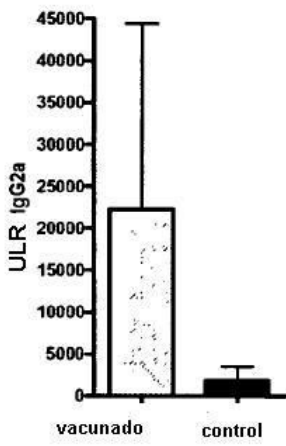


Fig. 29A

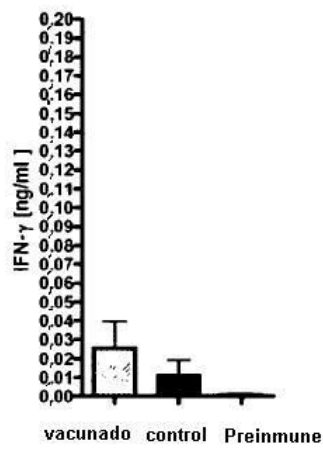


Fig. 29B

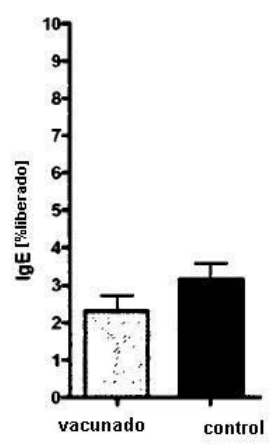


Fig. 29C

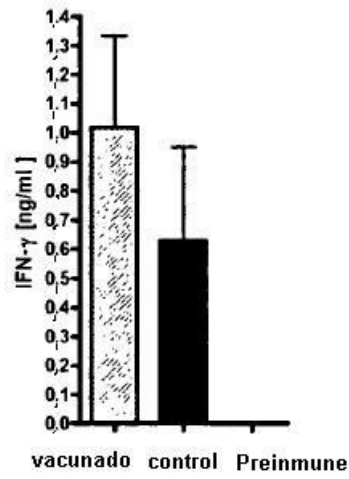


Fig. 30A

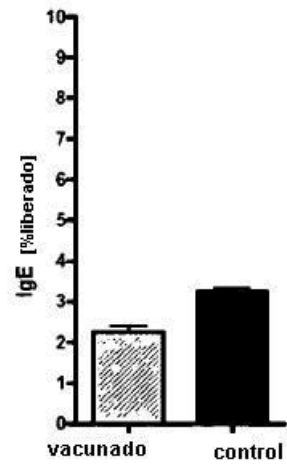


Fig. 30B

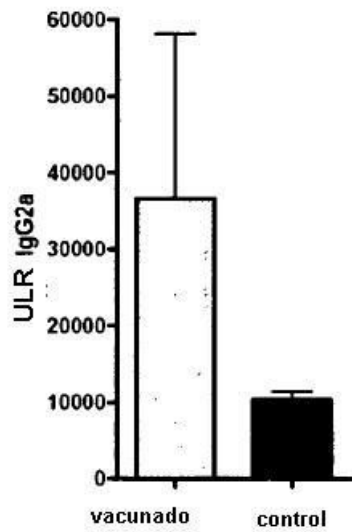


Fig. 31A

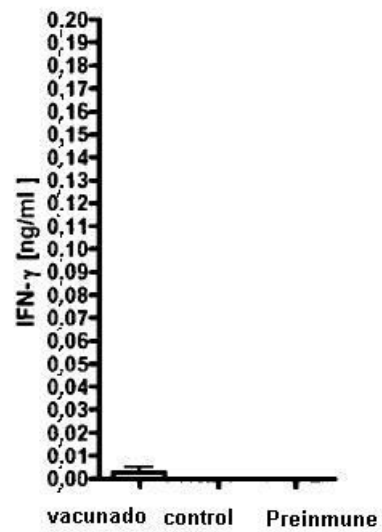


Fig. 31B

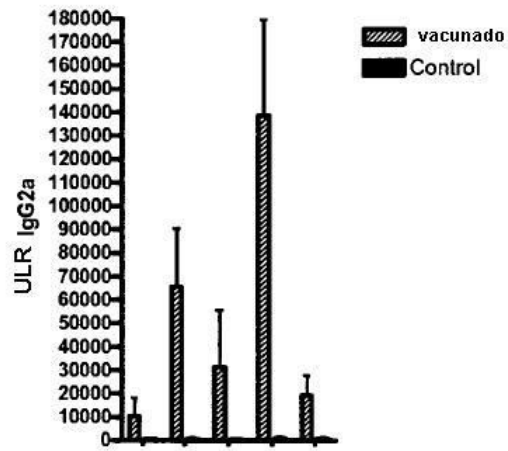


Fig. 32

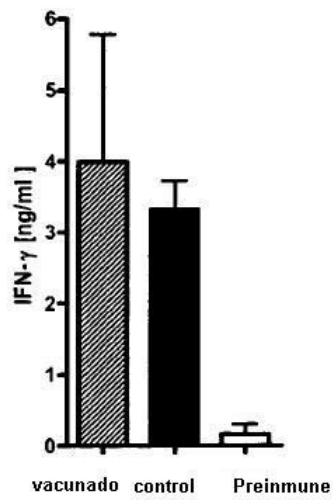


Fig. 33A

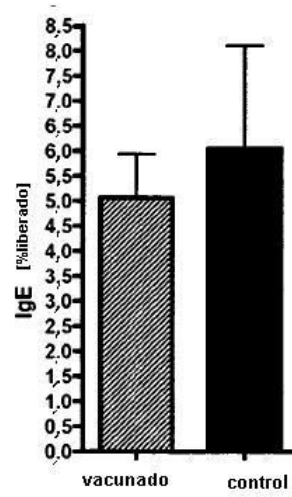


Fig. 33B

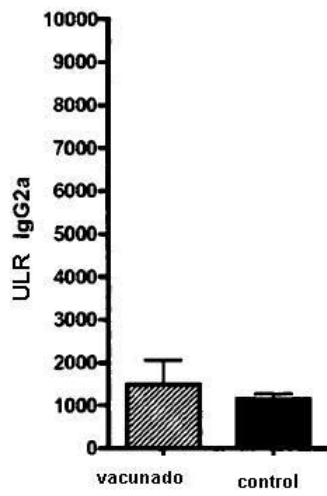


Fig. 34A

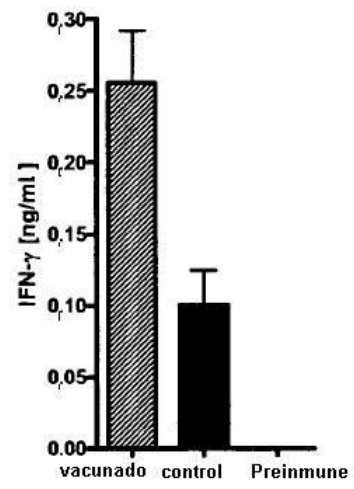


Fig. 34B

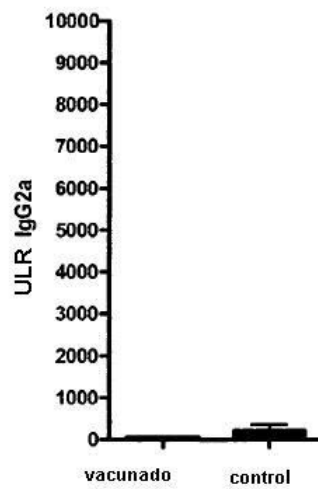


Fig. 35A

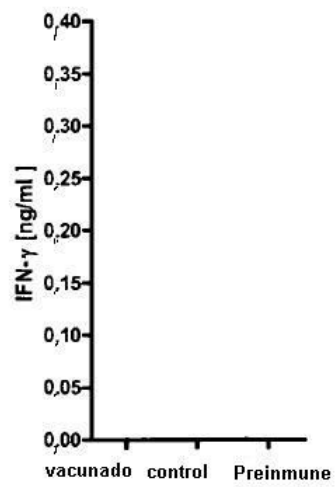


Fig. 35B

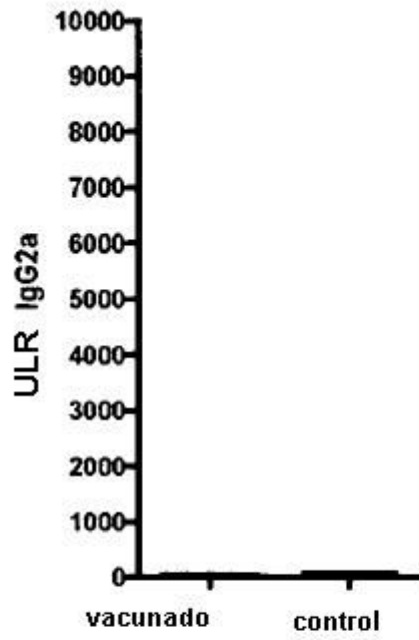


Fig. 36A

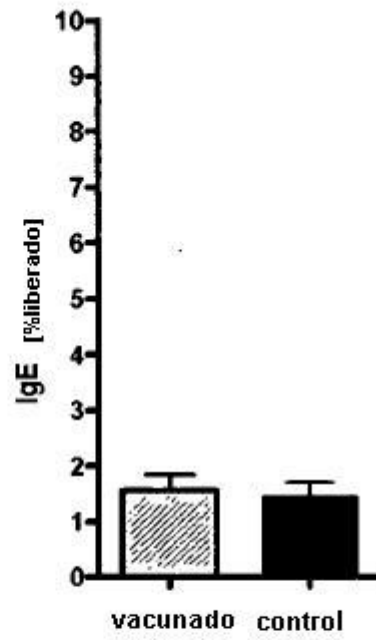


Fig. 36B