

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 44479 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 48/00; C12N 5/10; C12N 15/86; C12N 15/40**
- (43) Date de publication : **30.11.2021**

(21) N° Dépôt : **44479**

(22) Date de Dépôt : **13.03.2017**

(30) Données de Priorité : **21.03.2016 WO PCT/EP2016/056160**

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/EP2017/055813 13.03.2017**

(71) Demandeur(s) :

- **TRON - Translationale Onkologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg- Universität Mainz gemeinnützige GmbH, Freiligrathstrasse 12 55131 Mainz (DE)**
- **BioNTech SE, An der Goldgrube 12 55131 Mainz (DE)**

(72) Inventeur(s) : **SAHIN, Ugur ; BEISSERT, Tim ; PERKOVIC, Mario**

(74) Mandataire : **MOROCCO INTELLECTUAL PROPERTY SERVICES**

(86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: **EP17710268.8**

(54) Titre : **ARN TRANSREPLIQUANT**

(57) Abrégé : La présente invention concerne de manière générale des systèmes et des procédés appropriés pour une production protéinique de niveau élevé. Tandis qu'un ou plusieurs éléments de la présente invention sont dérivés d'un alphavirus, la présente invention ne nécessite pas de propagation de particules virales. En particulier, un système comprenant deux molécules d'ARN séparées est prévu, comprenant chacune une séquence nucléotidique dérivée d'un alphavirus : une molécule d'ARN comprend une construction d'ARN pour exprimer une réplicase d'alphavirus et une molécule d'ARN comprend un réplicon d'ARN qui peut être répliqué par la réplicase en trans. La construction d'ARN pour exprimer une réplicase d'alphavirus comprend une coiffe en position 5'. Il a été découvert de manière surprenante que la coiffe en position 5' est appropriée pour entraîner efficacement l'expression d'un transgène à partir du réplicon en trans. Le système de la présente invention permet l'expression d'une protéine d'intérêt dans une cellule ou un organisme, mais n'est pas associé à une formation non souhaitée de particules virales. Par

conséquent, la présente invention est appropriée pour une production efficace et sûre d'une protéine d'intérêt, par exemple une protéine thérapeutique ou une protéine antigénique, telle qu'un vaccin, dans un organisme cible. L'invention concerne des procédés respectifs de production de protéines in vitro et in vivo ainsi que des utilisations médicales. La présente invention concerne également un ADN codant pour les molécules d'ARN de l'invention et des cellules comprenant les molécules d'ARN de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant :
 - (a) une construction d'ARNm destinée à exprimer une réplicase d'alphavirus qui n'est pas capable d'autoréplication, et
 - (b) un réplicon d'ARN qui peut être répliqué par la réplicase *en trans*, dans laquelle la construction d'ARNm de (a) destinée à exprimer une réplicase d'alphavirus comprend une coiffe 5' destinée à entraîner une traduction de la réplicase ; et dans laquelle le réplicon d'ARN de (b) comprend (1) une séquence de reconnaissance de réplication 5' d'alphavirus, (2) une phase ouverte de lecture codant pour une protéine ou un peptide pharmaceutiquement actif et (3) une séquence de reconnaissance de réplication 3' d'alphavirus et dans laquelle la séquence de reconnaissance de réplication 5' d'alphavirus et la séquence de reconnaissance de réplication 3' d'alphavirus dirigent la réplication du réplicon d'ARN en présence de la réplicase.
2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, dans laquelle la coiffe 5' est une coiffe 5' naturelle ou un analogue de coiffe 5'.
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle la construction d'ARNm destinée à exprimer une réplicase d'alphavirus comprend :
 - (1) une UTR 5',
 - (2) une phase ouverte de lecture codant pour la réplicase, et
 - (3) une UTR 3'.
4. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle la construction d'ARNm destinée à exprimer une réplicase d'alphavirus comprend une séquence poly(A) 3'.
5. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle le réplicon d'ARN comprend un acide nucléique hétérologue.
6. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle la protéine ou le peptide comprend un épitope approprié pour une vaccination, de préférence un épitope qui déclenche une réponse immunitaire contre une bactérie, un champignon, un parasite, un allergène, ou une tumeur.

7. Composition pharmaceutique selon la revendication 6, dans laquelle l'expression de la phase ouverte de lecture codant pour une protéine d'intérêt est sous le contrôle d'un promoteur subgénomique qui est de préférence natif de l'alphavirus dont la réplicase est dérivée.
8. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle le réplicon d'ARN comprend une séquence poly(A) 3' et/ou une coiffe 5'.
9. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle l'alphavirus est le virus de la forêt de Semliki, le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne, le virus Sindbis, ou le virus Chikungunya.
10. Kit comprenant la construction d'ARNm et le réplicon d'ARN selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel l'ARN est destiné à une inoculation avec une cellule et/ou à une administration à un sujet humain ou un animal.
11. Construction d'ARNm isolée exprimant une réplicase d'alphavirus comprenant une coiffe 5' pour entraîner une traduction de la réplicase, pour une utilisation en thérapie, dans laquelle la thérapie comprend l'administration à un sujet (a) de la construction d'ARNm et (b) d'un réplicon d'ARN qui peut être répliqué par la réplicase *en trans*, et comprend une phase ouverte de lecture codant pour une protéine d'intérêt, dans laquelle la construction d'ARNm exprimant une réplicase d'alphavirus n'est pas capable d'autoréplication, et dans laquelle le réplicon d'ARN comprend (1) une séquence de reconnaissance de réplication 5' d'alphavirus, et (2) une séquence de reconnaissance de réplication 3' d'alphavirus et dans laquelle la séquence de reconnaissance de réplication 5' d'alphavirus et la séquence de reconnaissance de réplication 3' d'alphavirus dirigent la réplication du réplicon d'ARN en présence de la réplicase, dans laquelle la protéine d'intérêt est de préférence un peptide ou une protéine pharmaceutiquement actif ou un antigène utile pour une vaccination.
12. Réplicon d'ARN pour une utilisation en thérapie, dans lequel la thérapie comprend l'administration à un sujet (a) d'une construction d'ARNm exprimant une réplicase d'alphavirus comprenant une coiffe 5' pour entraîner une traduction de la réplicase et (b) du réplicon d'ARN qui peut être répliqué par la réplicase *en trans*, et comprend une phase ouverte de lecture codant pour une protéine d'intérêt,

dans lequel le réplicon d'ARN comprend (1) une séquence de reconnaissance de réplication 5' d'alphavirus, et (2) une séquence de reconnaissance de réplication 3' d'alphavirus et dans lequel la séquence de reconnaissance de réplication 5' d'alphavirus et la séquence de reconnaissance de réplication 3' d'alphavirus dirigent la réplication du réplicon d'ARN en présence de la réplicase,
dans lequel la protéine d'intérêt est de préférence un peptide ou une protéine pharmaceutiquement actif ou un antigène utile pour une vaccination.

13. Procédé *in vitro* pour la production d'une protéine ou d'un peptide pharmaceutiquement actif dans une cellule comprenant les étapes consistant à :

- (a) obtenir une construction d'ARNm destinée à exprimer une réplicase d'alphavirus,
- (b) obtenir un réplicon d'ARN qui peut être répliqué par la réplicase *en trans* et comprend une phase ouverte de lecture codant pour la protéine ou le peptide, et
- (c) l'inoculation conjointe de la construction d'ARNm destinée à exprimer une réplicase d'alphavirus et du réplicon d'ARN dans la cellule,

dans lequel la construction d'ARNm de (a) comprend une coiffe 5' destinée à entraîner une traduction de la réplicase, et dans lequel ledit ARNm n'est pas capable d'autoréplication ; et dans lequel le réplicon d'ARN de (b) comprend (1) une séquence de reconnaissance de réplication 5' d'alphavirus et (2) une séquence de reconnaissance de réplication 3' d'alphavirus et dans lequel la séquence de reconnaissance de réplication 5' d'alphavirus et la séquence de reconnaissance de réplication 3' d'alphavirus dirigent la réplication du réplicon d'ARN en présence de la réplicase.