

VACUNAS DE ARN MENSAJERO CONTRA SARS-COV-2: UN HITO EN LA HISTORIA DE LA CIENCIA

MRNA VACCINES AGAINST SARS-COV-2: A MILESTONE IN THE HISTORY OF SCIENCE

RIOS HERNAN C.

cesaritoout@gmail.com

Recibido en 24 de abril de 2024
Aceptado en 25 de mayo de 2024

Resumen

No hay duda de que las vacunas han sido la principal herramienta que ha utilizado la medicina para la lucha de muchas enfermedades infecciosas desde la época de Luis Pasteur con el desarrollo de su vacuna contra el virus de la rabia hasta la erradicación de la viruela de la faz de la tierra.

Se ha desarrollado 5 plataformas de vacunas desde las clásicas hasta las más modernas: vivas atenuadas, muertas, recombinantes, virales recombinantes y de ácidos nucleicos.

El hecho de que no haya una vacuna ideal, que todas presenten ventajas y desventajas ha llevado a la ciencia moderna que se desarrollen cada día nuevas estrategias para despertar tanto una respuesta humoral como celular, que sean seguras, de bajo costo y accesibles por cualquier sistema de salud del planeta.

En la siguiente revisión se observa el estado de las diferentes plataformas contra la lucha de la pandemia del SARS- Cov2 enfatizando las de RNA mensajero que por primera vez en la historia de la humanidad han sido aprobadas como uso de emergencia contra covid 19.

Palabras clave: ARN, ADN, VIH, cáncer, coronavirus, vacunas

Abstract

There is no doubt that vaccines have been the main tool that medicine has used to fight many infectious diseases from the time of Luis Pasteur with the development of his vaccine against the rabies virus until the eradication of smallpox from the earth.

Five vaccine platforms have been developed from the classical to the most modern: live attenuated, killed, recombinant, recombinant viral and nucleic acids.

The fact that there is no ideal vaccine because of all of them presents advantages and disadvantages has led modern science to develop new strategies every day to awaken both a humoral and cellular immune response, which are safe, low-cost and accessible by any health system of the planet.

In the following review, the status of the different platforms against the fight of the SARS-Cov2 pandemic is observed, emphasizing those of messenger RNA that for the first time in the history of humanity have been approved as emergency use against covid 19.

Key words: RNA, DNA, HIV, Cancer, Coronavirus, Vaccines.

1. INTRODUCCION

Ya han pasado más 12 meses desde los primeros casos reportados en la ciudad de Wuhan China cuando un nuevo coronavirus se convertiría en el

patógeno que la humanidad recordará por haber puesto de rodillas a economías tan fuertes en el planeta.

Los casos del síndrome agudo severo SARS- Cov 2 fueron reportados por primera vez el año 2019, y nombrado

por la OMS posteriormente como enfermedad por coronavirus (1).

El SARS-CoV2 pertenece a la familia coronaviridae, y se lo identificó como un betacoronavirus que en realidad es el responsable de la pandemia que se inició a finales del año 2019. Así mismo el SARS- CoV2 está relacionado filogenéticamente muy cercano al SARS que fue el agente causal del síndrome respiratorio agudo severo el año 2002 al 2004. (2)

Los coronavirus son virus que contienen ARN en su genoma, envueltos de simple cadena, de polaridad positiva y se conocen 4 géneros a saber: 2 alfacoronavirus (NL 63 - 229 E) y 2 betacoronavirus (HKU1- OC43), siendo agentes causales de resfriados comunes en humanos. Ya a mediados del año 2012 surge el MERS Cov, agente causal de síndrome respiratorio agudo de medio oriente y también ha sido relacionado con infecciones de origen zoonótico y alta mortalidad en humanos. (3)

Los 4 géneros son virus zoonóticos y el OC43 ha sido relacionado como el responsable de la “influenza rusa” que causó la pandemia en el año 1889 a 1890.(4)

Ninguna vacuna contra coronavirus había sido aprobada hasta antes de la pandemia por covid-19 debido a que se tenía que obtener una vacuna tetravalente, es decir que tenga una cobertura para los 4 serotipos de coronavirus y como la enfermedad clínica causada por estos serotipos

circulantes se traducía en resfriados leves no se dio la importancia debida. Sin embargo después de los casos del SARS en el año 2002 se llevaron a cabo ensayos clínicos que llegaron a fase I. (5, 6)

Las vacunas contra el MERS se encuentran en fase de desarrollo y están siendo financiados actualmente por la iniciativa de coalición de vacunas por sus siglas en inglés (CEPI).

El blanco de las vacunas contra coronavirus a través de los estudio preclínicos contra el SARS y el MERS siempre estuvieron bien definidos y está dado por la larga proteína de superficie “S” como responsable de la unión al receptor celular y la fusión a la membrana.(7, 8,9)

En el caso del SARS- CoV 2, la proteína “S” se adhiere al receptor celular de angiotensina 2 y por un mecanismo de endocitosis es internado a la célula huésped.(10, 11)

Después de este paso viene la fusión al endosoma para la liberación del genoma viral en el citoplasma celular. (12)

Los anticuerpos que se unen a la proteína “S” del virus, en especial al dominio de unión al receptor por sus siglas en inglés (RBD) previenen el acoplamiento a la célula huésped y neutralizan al virus. Sobre la base de estos conocimientos y los estudios preclínicos realizados contra el SARS y el MERS es que se dedujo que la proteína “S” era el gatillador de la

reacción antigénica para el desarrollo de las vacunas contra el SARS- CoV2 por las diferentes compañías farmacéuticas. (13)

Desde que la pandemia se estableció a nivel mundial se ha desarrollado muchas investigaciones acerca de la respuesta inmune del SARS- CoV 2, se ha aprendido y seguimos aprendiendo tanto en la respuesta natural como adaptativa. Así por ejemplo sabemos que tanto los anticuerpos que se dirigen contra el dominio de unión al receptor y otras regiones de la proteína S tienen actividad neutralizante contra el virus. (14, 15, 16, 17, 18)

Sin embargo, la magnitud de la respuesta neutralizante puede variar en las diferentes regiones de la proteína, y esto se asemeja a una característica típica que tienen los virus respiratorios, cuando se estabilizan, declinan y se mantienen a lo largo del tiempo al igual que las células en el plasma. (19, 20)

La respuesta inmune de mucosas es también inducidas en los humanos y se ha demostrado que la proteína S es una potente inductora de linfocitos T CD4+ y un poco menos de linfocitos T CD8+. (21, 22)

Se piensa que la inducción de inmunoglobulina de tipo IgA secretoria induce protección del tracto respiratorio superior y la IgG induce protección del tracto respiratorio inferior, por diferentes estudios realizados en primates no humanos. Es de esta forma que las vacunas que se han diseñado para combatir a SARS CoV

2 al ser administradas por vía intramuscular o subcutánea induce principalmente IgG por lo que protegerían de forma preventiva atenuando la enfermedad y no precisamente induciendo una inmunidad esterilizante que es lo adecuado. (23, 24, 25, 26, 27, 28, 29).

Antes de adentrarnos en las vacunas de RNA mensajero recordaremos qué es en realidad una vacuna, así como las diversas estrategias utilizadas contra diferentes enfermedades infecciosas.

Tradicionalmente el llegar a contar con una vacuna requiere varios años de investigación, incluso décadas, todo ello tomando en cuenta los estudios pre-clínicos donde se establece la toxicidad y el diseño propiamente de la vacuna, este paso puede durar varios años.

Posteriormente viene el ensayo clínico de fase I en el cual dicho sea de paso se aplica para cualquier otro fármaco y no exclusivamente con las vacunas. La fase I se prueba en un poco más de 100 voluntarios y habitualmente tiene una duración de 2 años. La fase I tiene como objetivos obtener datos iniciales de seguridad, dosis e inmunogenicidad de la vacuna.

Si los datos son prometedores y si hay financiamiento, entonces se pasa a la fase II de ensayo clínico. En esta fase se involucran unos cientos más de voluntarios, dura también un par de años, se obtiene datos de eficacia, seguridad y también se sigue estudiando la dosis de la vacuna. Para pasar a la fase III se valora si los

resultados son significativos desde el punto de vista estadísticos, se realiza un análisis interno y se tramita licencias para uso de emergencia ante las autoridades reguladoras de cada país que en el caso de Bolivia es la AGEMED, en Estados Unidos es la FDA por sus siglas en inglés o la EMA en Europa. Este proceso de licencia de emergencia puede durar 1 o 2 años en función de que se vaya presentando más datos a las agencias reguladoras y de que la compañía que desarrolla la vacuna tenga la seguridad de que el fármaco es prometedor y no surjan errores de eficacia y seguridad del medicamento que se desarrolla y de que lógicamente se pueda distribuir en un determinado mercado.

En el caso de SARS- CoV 2 se ha procedido a acciones tan rápidas debido a la pandemia que se ha obtenido vacunas en un tiempo record considerándose un hito en la ciencia.

DEFINICION

Una vacuna puede definirse como un preparado biológico que induce inmunidad frente a un patógeno determinado para el cual ha sido diseñado. (30)

TIPOS DE VACUNAS

En función de las características biológicas para inducir inmunogenicidad, seguridad y eficacia de las vacunas, tradicionalmente se han diseñado 5 estrategias o plataformas que las desarrollaremos a continuación.

1.VACUNAS VIVAS MODIFICADAS O ATENUADAS

Este tipo de vacunas se caracterizan porque el agente biológico es el patógeno atenuado y no virulento, pero sin capacidad de dividirse o replicarse. Una gran ventaja de este tipo de vacunas es la gran respuesta humoral y celular que inducen puesto que inducen una buena respuesta antigénica. Son económicas y las vías de administración son sencillas. Ejemplos de este tipo de vacunas son las del sarampión, rubeola y varicela entre otras. Sin embargo, un riesgo es que el patógeno podría revertirse y tornarse virulento. (31, 32).

2.VACUNAS MUERTAS

Son vacunas que están formados por el patógeno inactivado o muerto mediante sustancias químicas o físicas como el calor, de esta manera se inhibe la capacidad de replicarse, dividirse y por tanto causar enfermedad. Son vacunas muy seguras, sin embargo, una desventaja es que este tipo de preparados biológicos producen una débil respuesta inmunológica y casi nula respuesta celular, ejemplo de este tipo de vacunas tenemos la triple viral y contra la tos ferina (31, 32)

3.VACUNAS RECOMBINANTES

Este tipo de vacunas se las produce de manera heteróloga los componentes antigénicos del patógeno para introducirla como vacuna. Se utilizan proteínas antigénicas o más conocidas como virus like particles (que es la capsida del virus sin el ácido nucleico).

Son vacunas mucho más seguras que las anteriores pero una desventaja es que solo activan la respuesta humoral. Ejemplo de estas vacunas son las de hepatitis B y contra el papiloma virus humano. (33)

4.VACUNAS VIRALES RECOMBINANTES O VECTORIALES

Están constituidas por un virus no virulento que va actuar como vector y que porta las secuencias de antígenos neutralizantes del patógeno. Este tipo de plataforma es la utilizada contra el coronavirus por las compañías de Astrazeneca/ Oxford, la vacuna Sputnik y la de Jhonson y Jhonson en la actual pandemia. Como antecedente de este tipo de vacuna podemos mencionar la desarrollada contra el dengue por la farmacéutica francesa Sanofi Pasteur. Sin embargo, un inconveniente es el precio ya que es necesario un proceso de clonación mediante ingeniería genética. (34)

5.VACUNAS DE ACIDOS NUCLEICOS

Tenemos las de ADN y ARN, pasaremos a explicar cada una de estas plataformas con énfasis en las de ARN mensajero que son las que primero se llegaron a utilizar en la pandemia del SARS- CoV 2.

5.1 VACUNAS DE ADN

Este tipo de vacunas son formadas por secuencias de ADN que van a codificar para antígenos neutralizantes y que se insertan directamente en las células habitualmente miocitos. Inducen una respuesta inmunológica muy eficaz comparable a las vacunas vivas y son

muy estables. La respuesta celular también son muy significativas. El inconveniente de este tipo de vacunas es ético ya que se necesitan organismos transgénicos y los efectos secundarios se desconocen además de que el riesgo de que el ADN del patógeno se integre es latente. (35)

Las vacunas de ADN son una excelente opción, pero invalidadas por aspectos éticos. En ese sentido surgieron las vacunas de ARN. Pasemos a revisar en qué consiste este tipo de plataformas y el porqué han dado mucho que hablar por la comunidad científica en la pandemia del SARS- CoV2.

5.2 VACUNAS DE ARN

Finalmente nos referiremos a las vacunas de ARN mensajero muy parecidas a las de ADN, pero con aditamentos especiales.

Primeramente, debemos recordar que el primer evento que se usó este tipo de plataforma datan de 1995 cuando se intentó utilizar contra el cáncer en ratones. Posteriormente en la década del año 2000 se empezó a utilizar especialmente es estadios preclínicos contra diferentes tipos de cáncer y algunas enfermedades infecciosas. (36, 37)

Aunque en la mayoría de los casos se remitían al campo de la investigación fue en la presente pandemia del coronavirus que un par de compañías farmacéuticas se inclinaron por este tipo de plataformas específicamente la norteamericana MODERNA y un

consorcio norteamericano/alemán como es PFIZER-BIONTECH.

5..2.3 ¿Cómo funcionan las vacunas de ARN mensajero?

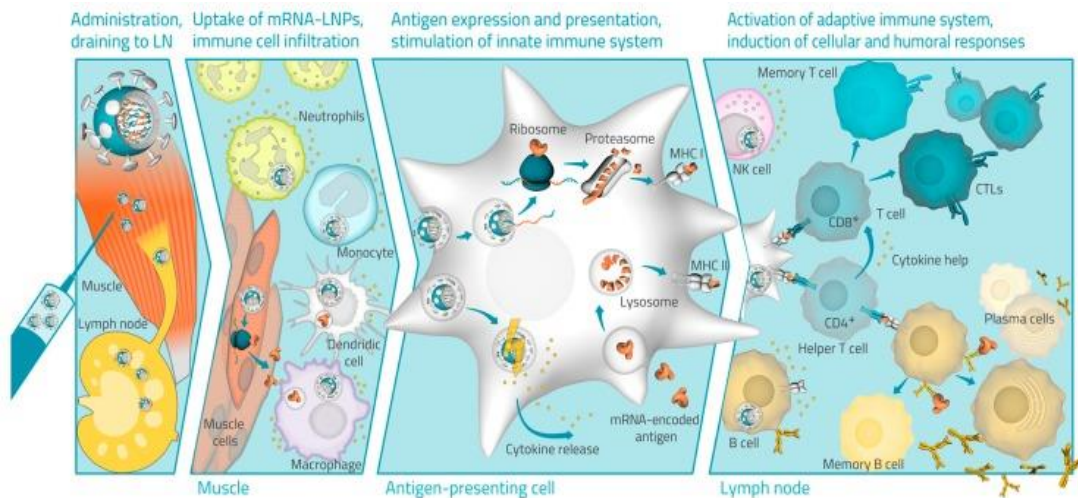
Similar a lo que ocurre con las vacunas de ADN este tipo de plataformas requieren un proceso de investigación en lo que se refiere en hallar las secuencias que codifican para los anticuerpos neutralizantes por el hospedador. Este ADN se produce a gran escala y se transcribe in vitro para producir el RNA que servirá como vacuna el cual debe ser conservado a temperaturas ultrabajas esto debido a que el RNA es una molécula muy lábil.

Una parte de este RNA mensajero será degradado una vez que es administrada por vía intramuscular por las RNAasas, y el resto penetrará al citoplasma celular mediante endocitosis espontanea. El ARN liberado se une a la maquinaria de traducción de los miocitos generándose los péptidos del Figura 1. Vacunas de RNA mensajero

organismo patógeno. Estos péptidos en función de la naturaleza celular podrán permanecer en el interior celular o ser secretados al exterior.

Si sucede el primer evento los péptidos serán presentados en el contexto del MHC-I que activarán una respuesta celular T citotóxica. Por otra parte, los péptidos también podrán ser fagocitados por las células presentadoras de antígenos y otras células relacionados al sistema inmune y expuestos en el contexto del MHC-II (figura 1), los cuales activarán una respuesta celular T específica a través de los linfocitos T-helper. (36,37)

Las vacunas de ARN también pueden actuar a nivel de la inmunidad innata ya que al ser exógeno activaría a macrófagos y células dendríticas, concretamente el ARN sería reconocido por receptores como los TLR3, TLR7 Y TLR8 que normalmente se encuentran en los endosomas. (38)



Fuente: Gentileza de Nicole Ambruster, disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31569785/>

5.2.4 APLICACIONES DE LAS VACUNAS DE ARN

Las vacunas de ARNm se pueden aplicar en diferentes patologías tanto infecciosas como no infecciosas. Tradicionalmente las vacunas de ARN se han aplicado experimentalmente en las últimas 3 décadas en la inmunoterapia del cáncer como el melanoma, cáncer de próstata y pulmón además del VIH/ SIDA

En las enfermedades infecciosas las vacunas de RNAm se han aprobado por primera vez en la presente pandemia del SARS- Cov2 como uso de emergencia en seres humanos.

A continuación, pasamos a describir las vacunas aprobadas como uso de emergencia con la plataforma del RNAm.

Vacuna BNT162b1 y BNT162b2 de Pfizer

La compañía Pfizer con la colaboración de la farmacéutica alemana Biontech publicaron sus resultados de fase I, II y III de ensayos clínicos concluyendo en una eficacia del 90% después de la segunda dosis constituyéndose en la primera compañía en conseguir el permiso de uso de emergencia por parte de la agencia reguladora de Estados Unidos (FDA)

La vacuna de Pfizer es un biológico de RNAm desarrollado en lipopolisacáridos y expresa la versión trimerica del dominio de unión al

receptor RBD de la proteína S del SARS-Cov2. Las dosis de RNAm fueron testeadas a 10µg, 30µg y 100 µg, con intervalos de 3 semanas. Después de las 3 semanas de la primera dosis los títulos de anticuerpos fueron bajos sin embargo después de 7 días de administrada la segunda dosis se midieron títulos de anticuerpos en 1:168 y 1:267 en las dos dosis diferentes. En el grupo de 100µg no hubo la necesidad de realizar “booster” con la vacuna debido a un perfil desfavorable en la seguridad.

Los efectos adversos eran dosis dependientes de la vacuna y se reportaron fiebre, cefalea y escalofríos especialmente en el 50% de los casos del grupo de 100µg.

El candidato de Pfizer/BioNTech (BNT162b2, mRNA) se convirtió en el primer candidato que completó la Fase (III) de estudios clínicos, al contabilizar 170 infecciones entre los voluntarios. 162 en el grupo placebo y apenas 8 en el grupo vacunado. Esto es 90% de eficacia. Se produjeron 10 casos severos de COVID-19, de ellos, apenas 1 en el grupo vacunado. En mayores de 65 años este indicador fue de 94%, igualmente fantástico. La vacuna es segura. No se observaron reacciones severas graves entre los 43 000 voluntarios. La compañía solicitó una autorización de uso de emergencia a la FDA y podrá disponer 1.3 billones para finales de 2021.

Vacuna mRNA-1273 de MODERNA

Como se expuso anteriormente la vacuna de MODERNA también utiliza la plataforma de RNA en lipopolisacaridos y a diferencia de Pfizer expresa toda la cadena de la proteína S del SARS- Cov2 conteniendo 2 mutaciones estabilizadas. Fueron evaluadas 3 dosis de 25µg, 100µg y 250µg con un intervalo de 4 semanas.

Un análisis preliminar de los resultados de Fase III del candidato de Moderna (mRNA-1273) también basado en mRNA de la proteína S del virus, mostró un 94.5% de eficacia tras registrar 95 infecciones en los voluntarios (90 en el grupo placebo, 5 entre los vacunados). Ocurrieron 11 casos graves de COVID-19, ninguno entre los voluntarios que recibieron la vacuna.

CONCLUSIONES

La necesidad de encontrar vacunas efectivas en la lucha contra la pandemia de covid-19 ha hecho de que se utilicen

varias plataformas en el diseño de preparados biológicos que sin embargo han resultado insuficientes por la cantidad de dosis que se requiere a nivel mundial, lo que conlleva a que el SARS – Cov 2 haya llegado para quedarse por un buen tiempo entre nosotros.

La gran variabilidad que está demostrando el SARS-Cov-2 hace que las plataformas que utilizan RNA mensajero tengan una ventaja sobre los otros enfoques de diseño clásico de vacunas y es la de poder actualizarse con las variantes que puedan ir surgiendo y escapando a la neutralización de anticuerpos con las vacunas diseñadas a la fecha, lo que hace pensar que al igual que lo que acontece con el virus de la influenza A, la población tendrá que vacunarse cada año.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733 (2020).
2. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020).
3. Cui, J., Li, F. & Shi, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 181–192 (2019).
4. Vijgen, L. et al. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.* 79, 1595–1604 (2005).
5. Martin, J. E. et al. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a phase I clinical trial. *Vaccine* 26, 6338–6343 (2008).
6. Lin, J. T. et al. Safety and immunogenicity from a phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine. *Antivir. Ther.* 12, 1107–1113 (2007).
7. Yong, C. Y., Ong, H. K., Yeap, S. K., Ho, K. L. & Tan, W. S. Recent advances in the vaccine development against Middle East respiratory syndrome-coronavirus. *Front. Microbiol.* 10, 1781 (2019).
8. Graham, R. L., Donaldson, E. F. & Baric, R. S. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 836–848 (2013).
9. Tortorici, M. A. & Veesler, D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv. Virus Res.* 105, 93–116 (2019).
10. Wrapp, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260–1263 (2020).
11. Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 562–569 (2020).
12. Wang, H. et al. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res.* 18, 290–301 (2008).
13. Pallesen, J. et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, E7348–E7357 (2017).
14. Okba, N. M. A. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerging Infect. Dis.* 26, 1478–1488 (2020).
15. Liu, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 584, 450–456 (2020).
16. Wajnberg, A. et al. SARS-CoV-2 infection induces robust, neutralizing antibody responses that are stable for at least three months. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.07.14.20151126> (2020).
17. Alsoussi, W. B. et al. A potently neutralizing antibody protects mice against SARS-CoV-2 infection. *J. Immunol.* 205, 915–922 (2020).
18. Amanat, F. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* 26, 1033–1036 (2020).
19. Isho, B. et al. Mucosal versus systemic antibody responses to SARS-CoV-2 antigens in COVID-19 patients. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.08.01.20166553> (2020).

20. Iyer, A. S. et al. Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.07.18.20155374> (2020).
21. Randad, P. R. et al. COVID-19 serology at population scale: SARS-CoV-2-specific antibody responses in saliva. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.05.24.20112300> (2020).
22. Grifoni, A. et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 181, 1489–1501.e15 (2020).
23. Pakkanen, S. H. et al. Expression of homing receptors on IgA1 and IgA2 plasmablasts in blood reflects differential distribution of IgA1 and IgA2 in various body fluids. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 393–401 (2010).
24. Reynolds, H. Y. Immunoglobulin G and its function in the human respiratory tract. *Mayo Clin. Proc.* 63, 161–174 (1988).
25. Spiekermann, G. M. et al. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J. Exp. Med.* 196, 303–310 (2002).
26. Addetia, A. et al. Neutralizing antibodies correlate with protection from SARS-CoV-2 in humans during a fishery vessel outbreak with high attack rate. *J. Clin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/JCM.02107-20> (2020).
27. Yu, J. et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science* 369, 806–811 (2020).
28. Deng, W. et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science* 369, 818–823 (2020).
29. Bao, L. et al. Lack of reinfection in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.03.13.990226> (2020).
30. Web de World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/topics/vaccines/en/>
31. Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., Offit, P.A.: *Vaccines*, pp 1-17. 5ª Edición. Elsevier. (2008)
32. Pattison, M.: *Poultry Diseases*. 6ª Edición. Elsevier Health Sciences. (2008)
33. Morein, B., Helenius, A., Simons, K., Pettersson, R., Kääriäinen, L., Schirrmacher, V. (1978): Effective subunit vaccines against an enveloped animal virus. *Nature*, 276, 715 – 718.
34. Shiver et Al. (2002): Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective antiimmunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415, 331- 335.
35. Ferraro, B., Morrow, M.P., Hutnick, N.A., Shin, T.H., Lucke, C.E., Weiner, D.B. (2011): Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. *Clin Infect Dis*; 53(3): 296–302.
36. ahin, U., Karikó, K., Türeci, O. (2014): mRNA- based therapeutics —developing a new class of drugs. *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 13, 759-780.
37. Kreiter, S., Diken, M., Pascolo, S., Nair, S.K., Thielemans, K.M., Geall, A. (2016): RNA Vaccination Therapy: Advances in an Emerging Field. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 9703914.
38. Kondili, M., Roux, M., Vabret, N., Bailly-Bechet, M. 2016): Innate immune system activation by viral RNA: How to predict it? *Virology*, 488, 169–17