

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 915**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 47/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09736823 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2331129**

54 Título: **Composición que comprende un ARN(m) complejoado y un ARNm desnudo para proporcionar o mejorar la respuesta inmunoestimuladora en un mamífero y usos de la misma**

30 Prioridad:

**30.09.2008 WO PCT/EP2008/008304**

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

**06.10.2014**

73 Titular/es:

**CUREVAC GMBH (100.0%)  
Paul-Ehrlich-Str. 15  
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**FOTIN-MLECZEK, MARIOLA y  
VOSS, SÖHNKE**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 502 915 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

Composición que comprende un ARN(m) complejado y un ARNm desnudo para proporcionar o mejorar la respuesta inmunoestimuladora en un mamífero y usos de la misma.

La presente invención se refiere a una composición inmunoestimuladora que comprende a) un componente adyuvante, que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con un péptido policatiónico o una proteína, y b) al menos un ARNm libre que codifica para al menos un antígeno, donde la composición inmunoestimuladora es capaz de desarrollar o mejorar una respuesta inmune innata y una respuesta inmune adaptiva en un mamífero. La composición inmunoestimuladora de la invención puede ser una composición farmacéutica o una vacuna. La invención se refiere además a un método para la preparación de la composición inmunoestimuladora de la invención. La invención también se refiere al uso de la composición inmunoestimuladora de la invención (para la preparación de una composición farmacéutica o de una vacuna) para el tratamiento de varias enfermedades. Finalmente, la invención se refiere a kits que contienen la composición inmunoestimuladora de la invención, sus componentes y/o la composición farmacéutica o vacuna.

La inducción y/o mejora de las respuestas inmunes del sistema inmunológico innato y/o adaptivo juega un papel importante en el tratamiento y prevención de numerosas enfermedades. Para este propósito, el sistema inmunológico es típicamente modulado, por ejemplo, por la administración de un agente inmunoestimulador o un adyuvante. Sin embargo, el sistema inmunológico de los vertebrados, tales como humanos, es muy complejo y finamente regulado. Consiste en muchos tipos de proteínas, células, órganos y tejidos, los cuales interactúan en una red elaborada y dinámica. El sistema inmunológico protege típicamente a estos organismos frente a infecciones con defensas estratificadas de especificidad cada vez más alta. Una capa de defensa comprende barreras físicas o químicas y permite una eliminación *a priori* de al menos algunos patógenos y antígenos. Una capa adicional de defensa incluye el sistema inmunológico innato y adaptivo.

El sistema inmunológico innato, como parte del sistema inmunológico, es el sistema dominante de la defensa del huésped en la mayoría de los organismos y comprende barreras tales como barreras humorales y químicas, que incluyen, por ejemplo, inflamación, el sistema de complemento y barreras celulares. El sistema inmunológico innato se basa típicamente en un pequeño número de receptores, llamados receptores de reconocimiento de patrón. Éstos reconocen patrones moleculares conservados que distinguen organismos extraños, como virus, bacterias, hongos y parásitos de las células de sus huéspedes. Estos patrones moleculares asociados a patógenos incluyen ácidos nucleicos virales, componentes las paredes bacterianas y fúngicas, proteínas flageladas, etc.

La primera familia de receptores de reconocimiento de patrón estudiada en detalle fue la familia del receptor tipo Toll (TLR). Los TLRs son proteínas transmembrana que reconocen ligandos del medio extracelular o del lumen de endosomas. Después de la unión al ligando, transducen la señal por medio de proteínas adaptoras citoplásmicas, lo cual lleva a activar una respuesta de defensa del huésped y a la consiguiente producción de péptidos antimicrobianos, quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, citoquinas antivirales, etc. (véase, por ejemplo, Meylan, E., J. Tschopp, et al. (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response". Nature 442(7098): 39-44). Hasta la fecha, se han identificado al menos 10 miembros de los receptores tipo Toll (TLRs 1-10) en humanos y 13 (TLRs 1-13) en ratones. Esos receptores tipo Toll (TLRs) en humanos incluyen TLR1-TLR2 (ligando conocido: triacil lipopéptido), TLR1-TLR6 (ligando conocido: dicail lipopéptido), TLR2 (ligando conocido: peptidoglucano), TLR3 (ligando conocido: ARNs), TLR4 (ligando conocido: LPS (lipopolisacárido) de bacterias Gram-negativas), TLR5 (ligando conocido: flagelinas bacterianas), TLR7/8 (ligandos conocidos: imidazoquinolinas, análogos de guanosina y ARNs), TLR9 (ligandos conocidos: ADN CpG de bacterias, virus y protozoarios y hemozoína de pigmento de malaria (producto de la digestión de hemoglobina)) y TLR10. Después del reconocimiento de patógenos microbianos, estos TLRs desencadenan típicamente vías de señalización intracelulares que dan como resultado la inducción de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, TFn-ALFA, IL-6, IL-1-beta e IL-12), interferón tipo 1 (IFN-beta y varios IFN-alfa) y quimioquinas (Kawai, T. y S. Akira (2006). "TLR signaling". Cell Death Differ 13(5):816-25).

Como parte de la respuesta inmunológica más compleja de los vertebrados, el sistema inmunológico se adapta con el tiempo para reconocer patógenos o antígenos particulares más eficientemente. Este proceso de adaptación crea memorias inmunológicas y permite una protección todavía más efectiva durante encuentros futuros con estos patógenos. Este proceso de inmunidad adaptiva o adquirida forma la base para las estrategias de vacunación. En contraste con el sistema inmunológico innato descrito arriba, el sistema inmunológico adaptivo es específico de antígenos y requiere el reconocimiento de "auto" o "no auto" antígenos específicos durante un proceso llamado presentación de antígenos. Además, a diferencia de las células del sistema inmunológico innato, las cuales reconocen y responden a patógenos de forma genérica, el sistema inmunológico adaptivo confiere inmunidad de larga duración o protectora al huésped, permitiendo así una respuesta más personalizada a patógenos específicos, células infectadas por patógenos o antígenos. La capacidad para montar estas respuestas personalizadas se conserva en el cuerpo gracias a las llamadas "células de memoria". Si un antígeno o un patógeno entrase/infectase el cuerpo más de una vez, se usan estas células de memoria específicas para eliminarlo rápidamente. El sistema inmunológico adaptivo permite así una respuesta inmunológica más fuerte, así como una memoria inmunológica, siendo posibles diferentes respuestas inmunológicas en favor de enfermedades específicas. Por ejemplo, en el caso de infecciones, cada patógeno es "recordado" por un antígeno firma, en tanto que en el caso de enfermedades cancerosas, los antígenos o autoantígenos tumorales pueden ser reconocidos y neutralizados por el sistema inmunológico adaptivo.

Los principales componentes del sistema inmunológico adaptivo en vertebrados incluyen predominantemente linfocitos a nivel celular y anticuerpos a nivel molecular. Los linfocitos como componentes celulares del sistema inmunológico adaptivo incluyen células B y células T que se derivan de células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Las células B están implicadas en la respuesta humoral, mientras que las células T están implicadas en la respuesta inmunológica mediada por células. Tanto las células B como las células T portan moléculas receptoras que reconocen dianas específicas. Las células T reconocen una diana "no auto", tal como una estructura diana patógena, sólo después de que antígenos (por ejemplo, fragmentos pequeños de un patógeno) han sido procesados y presentados en combinación con un "auto" receptor llamado molécula de complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). En contraste, el receptor específico de antígenos de células B es una molécula de anticuerpo de la superficie de las células B y reconoce los patógenos como tales cuando los anticuerpos sobre sus superficies se unen a un antígeno extraño específico. Este complejo antígeno/anticuerpo es asimilado por la célula B y procesado mediante proteólisis en péptidos. La célula B presenta después estos péptidos antigénicos sobre sus moléculas superficiales MHC clase II. Esta combinación de MHC y antígeno atrae una célula T auxiliar coincidente, la cual libera linfocinas y activa la célula B. Al empezar a dividirse la célula B activada, su progenie secreta millones de copias del anticuerpo que reconoce este antígeno. Estos anticuerpos circulan en el plasma sanguíneo y la linfa, se unen a patógenos o células tumorales que expresan el antígeno y los marcan para su destrucción por la activación de un complemento o para su absorción y destrucción por fagocitos. Como un componente celular del sistema inmunológico adaptivo, las células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) también pueden formar una respuesta CTL. Las células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) pueden reconocer péptidos de patógenos endógenos y autoantígenos unidos por moléculas MHC tipo I. Las células T CD8<sup>+</sup> llevan a cabo su función de eliminación liberando proteínas citotóxicas en la célula.

Ambos mecanismos básicos del sistema inmunológico, es decir, el sistema inmunológico innato así como el sistema inmunológico adaptivo, pueden así constituir objetivos para tratamientos curativos y prevención de numerosas enfermedades. Métodos adecuados, ya conocidos actualmente en la técnica, utilizan ya sea adyuvantes para desarrollar una respuesta inmunológica innata o bien utilizan antígenos, patógenos o inmunógenos para provoca una respuesta inmune adaptiva o, en algunos casos raros, ambas.

Particularmente, se puede provocar una respuesta inmune adaptiva administrando a las células o al organismo huésped un antígeno extraño específico como el descrito arriba, ya sea en forma de péptidos antígenos o de proteínas o el antígeno puede ser codificado por un ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc o un ARN mensajero. Para desarrollar una respuesta inmune adaptiva eficiente, es adecuada una estimulación no específica adicional del sistema inmunológico innato, por ejemplo, cuando se proporciona un estímulo no específico paralelo a la señal específica de antígeno. El estímulo no específico paralelo vuelve al sistema inmunológico a un estado activado, lo cual mejora una respuesta inmune adaptiva. Compuestos capaces de proporcionar esta respuesta inmune no específica son los llamados habitualmente "adyuvantes". Se han propuesto diversos compuestos y composiciones como adyuvantes en la técnica anterior, por ejemplo adyuvante de Freund, óxidos metálicos, por ejemplo, alumbre (hidróxido de aluminio), quelatos inorgánicos o sus sales, diversos aceites tipo parafina, resinas sintéticas, alginatos, mucoides, compuestos polisacáridos, caseinatos, así como compuestos aislados de sangre y coágulos sanguíneos, por ejemplo derivados de fibrina, etc. Estos adyuvantes pueden usarse típicamente en combinación con otros compuestos, por ejemplo con proteínas, péptidos, moléculas de ADN o ARN u otros compuestos terapéuticamente activos, dependiendo del resultado a lograr.

Sin embargo, las moléculas de ARN mensajero (ARNm) libres, las moléculas de ADNc o los ácidos nucleicos en general que pueden codificar para un antígeno específico o para cualquier otra proteína terapéuticamente activa, adecuados para una terapia específica, típicamente no muestran una propiedad inmunoestimuladora significativa o incluso ninguna de ellas. No obstante, estas propiedades inmunoestimuladoras pueden ser conferidas a la molécula de ARNm, al ADNc o al ácido nucleico cuando se complejan con un péptido o proteína, tal como protamina o con una proteína de unión a ácido nucleico. En este contexto, la molécula de ARNm o el ácido nucleico pueden formularse de manera que se forma un complejo entre la molécula de ARNm y el ácido nucleico y el péptido o proteína, pudiendo formarse diferentes complejos entre la molécula de ARNm o el ácido nucleico y el péptido o proteína. Se obtienen complejos particularmente fuertes (adyuvantes) cuando el ácido nucleico, que normalmente está cargado negativamente a pH neutro, está unido mediante un péptido o proteína catiónico o policationico.

La publicación de Scheel y col. (European Journal Immunol. 2005, vol. 35, pp.1557-1566) indica que el ARN condensado con protenas orgánicas está protegido de la degradación mediada por ARN y se puede emplear para la vacunación. También se describe la capacidad de la Protamina-ARN para actuar como una vacuna.

La solicitud de Patente DE 10 2006 007 433 A1 describe el uso de ácidos nucleicos modificados con lípidos como adyuvantes, opcionalmente en combinación con otros adyuvantes. También se describe el uso de estos adyuvantes como componentes de una composición farmacéutica que se puede emplear como una vacuna para el tratamiento de enfermedades infecciosas o cancerosas.

La WO 2008/014979 se refiere a ácidos nucleicos de formula general específica que pueden modificarse mediante lípidos conjugados. Estos ácido nucleicos se describen aquí como agentes inmunoestimuladores que inducen una respuesta inmune innata.

Tales agentes inmunoestimuladores se describen en la WO 2008/014979 como componentes de una composición farmacéutica.

La EP 1 083 232 describe un método para la transferencia de ARNm en las células mediante complejación del ARNm con péptidos o proteínas policatiónicas, por ejemplo protamina.

La EP 1 905 844 describe la administración de ARNm para su uso terapéutico contra enfermedades tumorales. El ARNm puede modificarse y complejarse con agentes policatiónicos para formularse como una composición farmacéutica.

La publicación de Fisher y Wilson (Biochem. J., 1997, vol. 321, pp. 49-58) describe un ARN-luciferasa que está complejada con polilisina para formar un conjugado. La adición de polilisina al ARN resulta en la formación de un complejo.

Shiffman y col. (Nucleic Acids Research, 1978, vol. 5, no. 9, pp. 3409-3426) describe la disociación de protaminas de ADN inducida por sales, que se midió por dispersión de luz relativa. Se demuestra que, bajo la adición de una alta concentración de sal, puede provocarse la disociación de un complejo protamina/ADN.

Zohra y col. (Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, vol. 358, pp. 373-378) describe un suministro efectivo con mayor actividad de traducción que acelera sinérgicamente la transfección basada en ARNm. Se menciona que el suministro del ARNm puede estar basado en lípidos catiónicos, siendo DOTAP el lípido más eficiente.

Hamm y col. (International Immunology, vol. 19, no. 3, pp. 1297-1304) describe un ARN inmunoestimulador como un potente inductor de la respuesta citotóxica específica de antígeno y de la respuesta humoral inmune *in vivo*. Se indica que el ARN puede emplearse como un adyuvante seguro e induce una fuerte respuesta de los anticuerpos de isotipo IgG1.

Sin embargo, cuando se usan moléculas de ARNm o moléculas de ácido nucleico en métodos de vacunación, la traducción del ARNm o de la molécula de ácido nucleico *in vivo* sigue siendo el factor más importante y esencial para inducir una respuesta inmune adaptiva o para expresar la proteína codificada en general, por ejemplo en caso de una proteína o péptido terapéuticamente activo. En consecuencia, las moléculas de ARNm o de ácido nucleico asociadas tendrán que ser liberadas del complejo con el péptido o proteína (catiónico) después de la transfección del complejo en las células para permitir la traducción eficiente del ARNm. Desafortunadamente, esto no ocurre en la mayoría de los casos. Más típicamente, la formación de complejos de la molécula de ARNm o el ácido nucleico con un compuesto catiónico o policatiónico puede incluso impedir la traducción del ácido nucleico o reduce al menos significativamente la velocidad de traducción *in vivo*, debido a la fuerte unión del compuesto policatiónico a la molécula de ARNm, ADNc o de ácido nucleico en general. En consecuencia, es difícil obtener una buena propiedad inmunoestimuladora de la composición con respecto al sistema inmunológico innato tomando estos compuestos y asegurar en paralelo una traducción eficiente de la molécula de ARNm, ADNc o de ácido nucleico en general cuando se usa esta formulación.

Una posibilidad de evitar el problema anterior puede ser la administración de un adyuvante y ARNm en formulaciones separadas. Sin embargo, esto hace la administración mucho más complicada. Se prefiere también que el adyuvante y el ARNm de codificación de antígenos entren en la misma célula para lograr una respuesta inmune óptima. Además, un adyuvante soporta benéficamente la inducción de una respuesta inmune adaptiva si induce una respuesta inmune innata en la misma célula, en la cual el antígeno es expresado por el ARNm de codificación.

Otra posibilidad de evitar el problema anterior puede ser la administración exclusiva de ARN desnudo, ARNc o de ácido nucleico. Este enfoque, aunque adecuado para el propósito de la traducción eficiente del ARNm, ADNc o del ácido nucleico *in vivo*, omite la activación adecuada del sistema inmunológico innato desarrollada por un adyuvante como el descrito arriba.

Así, ninguno de estos enfoques es de hecho convincente y lleva a una respuesta inmune innata en paralelo con una adecuada traducción del ARNm, ADNc o ácido nucleico administrado. En consecuencia, existe aún la necesidad en la técnica de proporcionar una composición o método inmunoestimulador eficiente, que permita desarrollar una respuesta inmune innata y opcionalmente una adaptiva, donde la administración no se deteriora por una traducción ineficiente del ARNm debido a la formación de un complejo con el socio del complejo, lo cual confiere propiedades inmunoestimuladoras al ARNm. En otras palabras, el objeto de la presente invención es proporcionar un método y una composición inmunoestimuladora que permitan desarrollar o incrementar una respuesta inmunoestimuladora innata y opcionalmente una adaptiva en un mamífero, asegurando así una propiedad (inmunoestimuladora) adyuvante eficiente y una traducción eficiente del ARNm a administrar.

Este objeto es resuelto por la materia de la presente invención, de preferencia por las reivindicaciones anexas. Particularmente, la presente invención resuelve el objetivo anterior mediante una composición inmunoestimuladora que comprende a) un componente adyuvante que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con un péptido o proteína policatiónico, y b) al menos un ARNm libre, que codifica para al menos un antígeno, donde la composición inmunoestimuladora es capaz de desarrollar o incrementar una respuesta inmune innata y una respuesta adaptiva en un mamífero y donde la proporción molar entre el componente adyuvante a) y el segundo componente b) está en el intervalo de 0,1:1 a 1:0,01.

En el contexto de la presente invención, el mamífero puede seleccionarse de cualquier mamífero, de preferencia un mamífero seleccionado del grupo que comprende, sin ser limitado a, por ejemplo, cabra, ganado, cerdo, perro, gato, burro, mono, simio, un roedor tal como un ratón, hámster, conejo y en particular humanos.

La principal ventaja de la composición inmunoestimuladora de la invención es que pueden ser desarrolladas eficientemente una respuesta inmune innata y adaptiva en un mamífero, donde la traducción del al menos un ARNm libre que codifica para al menos un antígeno no se ve deteriorada por el componente adyuvante, particularmente la formación de complejos del al menos un ARN(m) con un péptido o proteína policatiónico. Esto se debe particularmente al hecho de que el componente adyuvante se forma empleando un péptido o proteína policatiónico para formar complejos, lo que lleva típicamente a un complejo fuerte entre el ARN y el compuesto policatiónico, que libera en gran medida el ARN con el cual está complejo. En consecuencia, el ARNm libre ya no es alterado más por el compuesto policatiónico, incluso aunque la administración del componente adyuvante y del ARNm libre juntos en una formulación lleve también a una transfección y expresión mejoradas significativamente *in vivo* del ARNm libre. La solución de acuerdo con la presente invención utiliza el sorprendente descubrimiento de los inventores de la presente invención de que ambas propiedades de la composición inmunoestimuladora, es decir una propiedad inmunoestimuladora eficiente y una traducción eficiente del ARN, se puede lograr en una y la misma formulación cuando la formulación *per se* se prepara en dos etapas separadas. Esta solución es aún más convincente, ya que permite mezclar el componente adyuvante con cualquier ARNm libre sin perder ARNm libre por la formación de complejos con el compuesto policatiónico del componente adyuvante. La solución puede incluso almacenarse durante un tiempo considerable sin llevar a una reacción de equilibrio entre el ARN complejo y el ARNm libre. En otras palabras, no hay disociación del componente adyuvante formado que pudiera llevar a una unión del ARNm libre por el compuesto policatiónico del componente adyuvante y a una liberación de ARNm unido del complejo.

Como un primer componente, la composición inmunoestimuladora de la invención comprende un llamado "componente adyuvante", que comprende o consiste en al lo menos un ARN(m) complejo con un péptido o proteína policatiónico.

El llamado "componente adyuvante" se prepara de acuerdo con una primera etapa, complejando el al menos un ARN(m) del componente adyuvante con un péptido o proteína policatiónico en una proporción específica para formar un complejo estable. En este contexto, es importante que ningún compuesto policatiónico o sólo una cantidad insignificamente pequeña permanezca en el componente adyuvante después de la formación de complejos del ARN(m). En consecuencia, la relación entre el ARN(m) y el compuesto policatiónico del componente adyuvante se selecciona típicamente en un intervalo donde el ARN(m) está completamente complejo y ningún compuesto policatiónico libre o sólo una cantidad insignificamente pequeña permanece en la composición. De preferencia, la relación del componente adyuvante, es decir, la relación entre el ARN(m) y el compuesto catiónico o policatiónico se selecciona de entre el intervalo de aproximadamente 6:1 (p/p) a alrededor de 0,25:1 (p/p), en especial alrededor de 5:1 (p/p) a aproximadamente 0,5:1 (p/p), en particular alrededor de 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p) o de aproximadamente 3:1 (p/p) a alrededor de 1:1 (p/p) y muy especialmente una relación de alrededor de 3:1 (p/p) a aproximadamente 2:1 (p/p).

La relación entre el ARN(m) y el compuesto catiónico o policatiónico del componente adyuvante también se puede calcular en base a la relación nitrógeno/fosfato (relación N/P) del complejo de ARN completo. Por ejemplo, 1 µg de ARN típicamente contiene alrededor de 3 nmol de residuos fosfato, siempre y cuando el ARN presente una distribución estadística de bases. Además, 1 µg de péptido contiene típicamente alrededor de x nmoles de residuos nitrógeno, dependiendo del peso molecular y del número de aminoácidos básicos. Cuando se calcula a título ilustrativo para (Arg)<sub>9</sub> (peso molecular 1.424 g/mol, 9 átomos de nitrógeno), 1 µg de (Arg)<sub>9</sub> contiene alrededor de 700 pmol de (Arg)<sub>9</sub> y así 700 x 9 = 6.300 aminoácidos básicos de pmol = 6,3 nmol de átomos de nitrógeno. Para una relación en masa de aproximadamente 1:1 ARN/(Arg)<sub>9</sub>, se puede obtener una relación N/P de aproximadamente 2. Cuando se calcula a modo ilustrativo para la protamina (peso molecular de alrededor de 4.250 g/mol, 21 átomos de nitrógeno, cuando se usa protamina de salmón) con una relación en masa de aproximadamente 2:1 con 2 µg de ARN, se calculan 6 nmol de fosfato para el ARN; 1 µg de protamina contiene alrededor de 235 pmol de moléculas de protamina y entonces 235 x 21 = 4.935 pmol de átomos de nitrógeno básicos = 4,9 nmoles de átomos de nitrógeno. Para una relación en masa de aproximadamente 2:1 de ARN/protamina, puede obtenerse una relación N/P de aproximadamente 0,81. Para una relación en masa de alrededor de 8:1 ARN/protamina, puede obtenerse una relación N/P de aproximadamente 0,2. En el contexto de la presente invención, la relación N/P está en el rango de aproximadamente 0,3-4, preferentemente en un rango de alrededor de 0,5-2 ó 0,7-2 con respecto a la relación ARN:péptido en el complejo, con especial preferencia en el rango de alrededor de 0,7-1,5.

En el contexto de la presente invención, el compuesto policatiónico se selecciona preferentemente de cualquier péptido o proteína policatiónico adecuado para complejarse y así estabilizar un ácido nucleico, en particularmente el al menos un ARNm, por ejemplo por asociación del al menos un ARN(m) con el compuesto policatiónico. Este compuesto policatiónico *per se* no es necesario que muestre una propiedad adyuvante, ya que una propiedad adyuvante, en particular la capacidad de inducir una respuesta inmune innata, se consigue preferentemente después de la formación del complejo del al menos un ARN(m) con el compuesto policatiónico. Cuando se forma un complejo entre el al menos un ARN(m) y el compuesto policatiónico, se forma el componente adyuvante. Los péptidos o proteínas policatiónicas particularmente preferentes se seleccionan de entre protamina, nucleolina, espermina o espermidina, poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, poli-arginina, péptidos de penetración celular (CPPs), CPPs quiméricos, tales como Transportan o péptidos de MPG, péptidos de unión a VIH, Tat, HIV-1 Tat (HIV), péptidos

5 derivados de Tat, oligoargininas, miembros de la familia de penetratinas, por ejemplo Penetratina, péptidos derivados de Antenapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPPs derivados antimicrobianos, por ejemplo buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, KALA, PpTG20, péptidos ricos en prolina, L-oligómeros, péptidos ricos en arginina, péptidos de calcitonina, FGF, 10 lactoferrina, poli-L-lisina, poli-arginina, histonas, péptidos derivados o análogos de VP22, HSV, VP22 (herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTDs, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, péptidos de calcitonina, etc. Adicionalmente, proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos preferentes pueden seleccionarse de las siguientes proteínas o péptidos que tienen la siguiente fórmula total: (Arg)<sub>l</sub>; (Lys)<sub>m</sub>; (His)<sub>n</sub>; (Orn)<sub>o</sub>; (Xaa)<sub>x</sub>, donde l + m + n + o + x = 8-15, y l, m, n u o, 15 independientemente unos de otros, pueden ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, siempre que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= de origen natural) o no nativos, excepto Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 siempre que el contenido total de Xaa no exceda 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Oligoargininas particularmente preferentes en este contexto son, por ejemplo, Arg<sub>7</sub>, Arg<sub>8</sub>, Arg<sub>9</sub>, Arg<sub>7</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>, R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, YSSR<sub>9</sub>SSY, (RKH)<sub>4</sub>, Y(RKH)<sub>2</sub>R, etc. La asociación o formación de complejo del ARN(m) modificado de la composición inmunoestimuladora de la invención con compuestos policatiónicos proporciona preferentemente propiedades adyuvantes al ARN(m) y confiere un efecto estabilizador al ARNm del componente adyuvante por complejación. El procedimiento para estabilizar el ARN(m) modificado se describe en general en la EP-A-1083232. 20 Son particularmente preferentes como compuestos policatiónicos aquellos seleccionados del grupo consistente en protamina, nucleolina, espermina, espermidina, oligoargininas como las definidas arriba, tales como Arg<sub>7</sub>, Arg<sub>8</sub>, Arg<sub>9</sub>, Arg<sub>7</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>, R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, YSSR<sub>9</sub>SSY, (RKH)<sub>4</sub>, Y(RKH)<sub>2</sub>R, etc.

En el contexto de la presente invención, el al menos un ARN(m) del "componente adyuvante" de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser cualquier ARN, preferentemente, sin limitarse a, un oligonucleótido 25 de ARN corto, un ARN codificante, un ARN inmunoestimulador, un ARNsi, un ARN antisentido, o ribo-interruptores, ribozimas o aptámeros. Además, el al menos un ARNm del componente adyuvante puede ser un ARN de una sola hebra o de doble hebra (que puede considerarse también como una molécula de ARN debido a una asociación no covalente de dos (moléculas) de ARN de una sola hebra), o ARN parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra, los cuales son al menos parcialmente auto-complementarios (ambos moléculas de ARN 30 parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra se forman típicamente con una molécula de ARN de una sola hebra más larga y una más corta o con dos moléculas de ARN de una sola hebra que tienen una longitud casi igual, donde una molécula de ARN de una sola hebra es en parte complementaria a la otra molécula de ARN de una sola hebra y ambas forman entonces una molécula de ARN de doble hebra en esta región, es decir un ARN parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra). De preferencia, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante puede ser un ARN de una sola hebra. Con especial preferencia, el al menos un ARNm del componente adyuvante puede ser un ARN de una sola hebra (lineal). El al menos un ARN(m) del componente adyuvante puede ser un ARN ribosómico (ARNr), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN mensajero (ARNm) o un ARN viral (ARNv), en particular un ARNm. La presente invención permite que todos estos ARN sean parte del "componente adyuvante" de la composición de la invención, ya sea solos o en combinación. En el contexto de 40 la presente invención, un ARNm es típicamente un ARN que está compuesto de varios elementos estructurales, por ejemplo una región 5'-UTR opcional, un sitio de unión ribosómico aguasarriba seguido de una región codificante, una región 3'-UTR opcional, la cual puede estar seguida de una cola poli-A (y/o una cola poli-C). Un ARNm puede estar presente como ARN mono-, di- o incluso multicistrónico, es decir un ARN que porte las secuencias de codificación de una, dos o más proteínas o péptidos. Estas secuencias codificantes en el ARNm di o incluso multicistrónico 45 también pueden separarse por al menos una secuencia IRES, por ejemplo como la aquí definida.

Preferentemente, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención comprende una longitud de aproximadamente 5 a alrededor de 20.000 ó 100 a alrededor de 20.000 nucleótidos, en especial alrededor de 250 a aproximadamente 20.000 nucleótidos, en particular de alrededor de 500 a aproximadamente 10.000, con especial preferencia alrededor de 500 a aproximadamente 5.000, con particular 50 preferencia una longitud de aproximadamente 100 a 10.000 nucleótidos o una longitud de alrededor de 100 a 5.000 nucleótidos.

De acuerdo con una primera realización, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser un oligonucleótido de ARN corto. Los oligonucleótidos de ARN cortos en el contexto de la presente invención pueden comprender cualquier ARN como el definido arriba. 55 Preferentemente, el oligonucleótido de ARN corto puede ser un oligonucleótido de ARN de una sola o de doble hebra, en especial un oligonucleótido de ARN de una sola hebra. Con especial preferencia, el oligonucleótido de ARN corto puede ser un oligonucleótido de ARN de una sola hebra lineal. También preferentemente, los oligonucleótidos de ARN cortos usados aquí pueden comprender una longitud como la definida arriba en general para moléculas de ARN, muy preferiblemente una longitud de 5 a 100, de 5 a 50, o de 5 a 30, y aún más preferiblemente una longitud de 20 a 100, de 20 a 80, o de 20 a 60 nucleótidos. 60

De acuerdo con una segunda realización, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser un ARN inmunoestimulador, es decir un ARN derivado de un ARN inmunoestimulador que desencadena o incrementa una respuesta inmune (innata). Preferentemente, el al menos un

ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser un ARN de una sola hebra, de doble hebra o parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra, muy preferiblemente un ARN de una sola hebra y/o un ARN circular o lineal, en especial un ARN lineal. Con especial preferencia, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante puede ser un ARN de una sola hebra (lineal). Con particular preferencia, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante puede ser un ARN mensajero (ARNm) (de una sola hebra (lineal)). El al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención también puede existir como un oligonucleótido de ARN corto tal como el definido arriba. El al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede además seleccionarse de cualquier clase de moléculas de ARN encontradas en la naturaleza o que se preparan sintéticamente y que pueden inducir una respuesta inmune innata. En este contexto, es preferible que el componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención desarrolle típicamente una respuesta inmune innata, mientras que el ARNm libre de la composición estimuladora de la invención pueda desarrollar una respuesta inmune adaptativa, particularmente si el ARNm libre codifica para un antígeno o alérgeno como el aquí descrito o cualquier molécula adicional que sea capaz de desarrollar una respuesta inmune adaptativa. Particularmente, tales clases de moléculas de ARN, que pueden inducir una respuesta inmune innata, pueden seleccionarse de ligandos o de receptores tipo Toll (TLRs). El al menos un ARN inmunoestimulador del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede comprender entonces cualquier secuencia de ARN conocida como inmunoestimuladora, incluyendo, sin ser limitarse a las mismas, secuencias de ARN que representan y/o codifican para ligandos de TLRs, seleccionadas preferentemente de entre los miembros de la familia humana de TLR1-TLR10 o de la familia murina de TLR1-TLR13, muy preferiblemente de TLR7 y LTR8, ligandos para receptores intracelulares de ARN (tales como RIG-1 o MDA-5, etc.) (véase, por ejemplo, Meylan, E., Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol. Cell* 22, 561-569), o cualquier otra secuencia de ARN inmunoestimuladora.

Típicamente, el ARN inmunoestimulador usado como al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede comprender una longitud como la definida arriba en general para moléculas de ARN del ARN del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención. Preferentemente, el ARN puede tener una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 5.000, de 5 a 5.000, o de 5 a 1.000, 5 a 500, 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

Estas secuencias inmunoestimuladoras pueden comprender por ejemplo un ácido nucleico de fórmula (I):



donde:

- G es guanósina, uracilo o un análogo de guanósina o uracilo;
- X es guanósina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de los nucleótidos mencionados;
- l es un entero de 1 a 40, donde cuando  $l = 1$  G es guanósina o un análogo de la misma, cuando  $l > 1$  al menos el 50% de los nucleótidos son guanósina o un análogo de la misma;
- m es un entero y es al menos 3; donde cuando  $m = 3$  X es uracilo o un análogo del mismo, cuando  $m > 3$  existen al menos 3 uracilos sucesivos o análogos de uracilo,
- n es un entero de 1 a 40, donde cuando  $n = 1$  G es guanósina o un análogo de la misma, cuando  $n > 1$  al menos el 50% de los nucleótidos son guanósina o un análogo de la misma.

Estas secuencias inmunoestimuladoras también pueden comprender por ejemplo un ácido nucleico de fórmula (II):



donde:

- C es citosina, uracilo o un análogo de citosina o uracilo;
- X es guanósina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de los nucleótidos mencionados;
- l es un entero de 1 a 40, donde cuando  $l = 1$  C es citosina o un análogo de la misma, cuando  $l > 1$  al menos el 50% de los nucleótidos son citocina o un análogo de la misma;
- m es un entero y es al menos 3; donde cuando  $m = 3$  X es uracilo o un análogo del mismo, cuando  $m > 3$  existen al menos 3 uracilos sucesivos o análogos de uracilo;
- n es un entero de 1 a 40, donde cuando  $n = 1$  C es citosina o un análogo de la misma, cuando  $n > 1$  al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma.

Los ácidos nucleicos de fórmulas (I) o (II), que se pueden usarse para el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, son típicamente moléculas de ácido nucleico relativamente cortas y típicamente con una longitud de aproximadamente de 5 a 100 (pero también pueden tener más de 100 nucleótidos para realizaciones específicas, por ejemplo hasta 200 nucleótidos), de 5 a 90 o de 5 a 80 nucleótidos, preferiblemente una longitud de alrededor de 5 a 70, en especial una longitud de aproximadamente 8 a

- 60 y en particular una longitud de alrededor de 15 a 60 nucleótidos, con especial preferencia de 20 a 60, con particular preferencia de 30 a 60 nucleótidos. Cuando el ácido nucleico de la invención tiene una longitud máxima de por ejemplo 100 nucleótidos, m típicamente será  $\leq 98$ . El número de nucleótidos G en el ácido nucleico de fórmula (I) se determina por l o n. l y n, independientemente uno de otro, son en cada caso un entero de 1 a 40, donde cuando l o n = 1 G es guanosina o un análogo de la misma y cuando l o n > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4, G<sub>l</sub> o G<sub>n</sub> pueden ser, por ejemplo, GUGU, GGUU, UGUG, UUGG, GUUG, GGGU, GGUG, GUGG, UGGG o GGGG, etc.; cuando l o n = 5, G<sub>l</sub> o G<sub>n</sub> pueden ser, por ejemplo, GGGUU, GGUGU, GUGGU, UGGGU, UGGUG, UGUGG, UUGGG, GUGUG, GGGGU, GGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG o GGGGG, etc. Un nucleótido adyacente a X<sub>m</sub> en el ácido nucleico de fórmula (I) de acuerdo con la invención preferentemente no es uracilo. De forma similar, el número de nucleótidos C en el ácido nucleico de fórmula (II) de acuerdo con la invención se determina por l o n. l y n, independientemente uno de otro, son en cada caso un entero de 1 a 40, donde cuando l o n = 1 C es citosina o un análogo de la misma y cuando l o n < 1 al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4, C<sub>l</sub> o C<sub>n</sub> pueden ser, por ejemplo, CUCU, CCUU, UCUC, UCCU, CCCU, CCUC, CUCC, UCCC o CCCC, etc.; cuando l o n = 5, C<sub>l</sub> o C<sub>n</sub> pueden ser, por ejemplo, CCCUU, CCUCU, CUCCU, UCCCU, UCCUC, UCUCU, UCCCC, CUCUC, CCCCU, CCCUC, CCUCC, CUCCC, UCCCC o CCCCC, etc. Un nucleótido adyacente a X<sub>m</sub> en el ácido nucleico de fórmula (II) de acuerdo con la invención preferentemente no es uracilo. Preferiblemente, para la fórmula (I), cuando l o n > 1, al menos 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 100% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma, como se definió arriba. Los nucleótidos restantes hasta el 100% (cuando guanosina constituye menos del 100% de los nucleótidos) en las secuencias flanqueantes G<sub>l</sub> y/o G<sub>n</sub> son uracilo o un análogo del mismo, como se definió anteriormente aquí. También preferentemente, l y n, independientemente uno de otro, son en cada caso un entero de 2 a 30, en especial un entero de 2 a 20 y en particular un entero de 2 a 15. El límite inferior de l o n puede variar si es necesario y es al menos 1, de preferencia al menos 2, en especial al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Esta definición se aplica correspondiente a la fórmula (II).
- De acuerdo con una realización particularmente preferente, un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las fórmulas (I) o (II), que se puede usar para el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede seleccionarse de una secuencia que consiste o comprende cualquiera de las siguientes secuencias:
- GGUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 1);
  - GGGGGUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 2);
  - GGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 3);
  - GUGUGUGUGUGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO: 4);
  - GGUUGGUUGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGUUGGUUGGUU (SEQ ID NO: 5);
  - GGGGGGGGGUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 6);
  - GGGGGGGGUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 7);
  - GGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 8);
  - GGGGGGGUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 9);
  - GGGGGGUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 10);
  - GGGGGGUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 11);
  - GGGGGUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 12);
  - GGGGGUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 13);
  - GGGGGUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 14);
  - GGGGUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 15);
  - GGGGUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 16);
  - GGUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 17);
  - GUUUUUUUUUUUUUUUUG (SEQ ID NO: 18);
  - GGGGGGGGGUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 19);
  - GGGGGGGGUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 20);
  - GGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 21);
  - GGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 22);
  - GGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 23);
  - GGGGGGGUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 24);
  - GGGGGGGUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 25);
  - GGGGGGUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 26);
  - GGGGGUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 27);
  - GGGGGUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 28);
  - GGGGUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 29);
  - GGGUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 30);
  - GGUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 31);
  - GGGGGGGGGGUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 32);
  - GGGGGGGGGUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 33);
  - GGGGGGGGGUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 34);
  - GGGGGGGGGUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 35);
  - GGGGGGGGUUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 36);
  - GGGGGGGGUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 37);



50% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de referencia de una longitud de 100 nucleótidos, esa secuencia de ácido nucleico puede representar una secuencia de ácido nucleico que tenga una longitud de 50 nucleótidos completamente idéntica con una sección de la secuencia de ácido nucleico de referencia de una longitud de 50 nucleótidos. Sin embargo, también puede representar una secuencia de ácido nucleico que  
 5 tenga una longitud de 100 nucleótidos con un 50% de identidad, es decir en este caso un 50% de ácidos nucleicos idénticos, con la secuencia de ácido nucleico de referencia sobre su longitud completa. Como alternativa, esa secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de ácido nucleico con una longitud de 200 nucleótidos que, en una sección de la secuencia de ácido nucleico con una longitud de 100 nucleótidos, sea completamente idéntica a las secuencias de ácido nucleico de referencia de una longitud de 100 nucleótidos. Otras secuencias de ácido  
 10 nucleico naturalmente satisfacen también estos criterios.

La determinación de la identidad porcentual de dos secuencias puede realizarse mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente pero no limitativo de algoritmo matemático que se puede usar para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y col., (1993), PNAS E.U.A., 90:5873-5877. Este algoritmo está integrado en el programa NBLAST, con el cual pueden seleccionarse secuencias con una identidad deseada con las secuencias de la  
 15 presente invención. Para obtener una alineación con espacios como la descrita arriba, se puede usar el programa "Gapped BLAST", por ejemplo el descrito en Altschul y col., (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden emplearse los parámetros preestablecidos del programa particular (por ejemplo, NBLAST). Las secuencias pueden alinearse además usando la versión 9 de GAP (programa de alineación global) de "Genetic Computing Group", usando la matriz preestablecida (BLOSUM62) (valores -4 a  
 20 +11) con una penalidad de espacios abiertos de -12 (para el primer cero de un espacio) y una penalidad de extensión de espacio de -4 (para cada cero sucesivo adicional en el espacio). Después de la alineación, se calcula la identidad porcentual expresando el número de correspondencias como porcentaje de los ácidos nucleicos en la secuencia reclamada. Los métodos descritos para determinar la identidad porcentual de dos secuencias de ácido nucleico también se pueden aplicar correspondientemente a secuencias de aminoácidos usando los programas  
 25 adecuados.

Además, estas secuencias inmunoestimuladoras también pueden comprender, por ejemplo, una (molécula) de ácido nucleico de fórmula (III):



donde:

- 30 G es guanosina (guanina), uridina (uracilo) o un análogo de guanosina (guanina) o uridina (uracilo), de preferencia guanosina (guanina) o un análogo de la misma;
- X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina), o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos), de preferencia uridina (uracilo) o un análogo de la misma;
- 35 N es una secuencia de ácido nucleico de una longitud de aproximadamente 4 a 50, de preferencia alrededor de 4 a 40, en especial alrededor de 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, seleccionándose cada N independientemente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);
- a es un entero de 1 a 20, de preferencia de 1 a 15, en especial de 1 a 10;
- 40 l es un entero de 1 a 40, donde cuando l = 1, G es guanosina (guanina) o un análogo de la misma, cuando l > 1, al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma;
- m es un entero y es al menos 3; donde cuando m = 3, X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, y cuando m > 3, existen al menos 3 uridinas (uracilos) sucesivos o análogos de uridina (uracilo);
- 45 n es un entero de 1 a 40, donde cuando n = 1, G es guanosina (guanina) o un análogo de la misma, cuando n > 1, al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma;
- u,v pueden ser, independientemente entre sí, un entero de 0 a 50, de preferencia cuando u = 0, v ≥ 1, o cuando v = 0, u ≥ 1;

50 donde la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con fórmula (III) tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, de preferencia de al menos 100 nucleótidos, en especial de al menos 150 nucleótidos, en particular de al menos 200 nucleótidos y con especial preferencia al menos 250 nucleótidos.

La estructura  $(N_u G_l X_m G_n N_v)_a$  de la fórmula (III) de acuerdo con la presente invención comprende el elemento  $G_l X_m G_n$  como una estructura núcleo, preferentemente como la definida arriba, y además los elementos limitadores  $N_u$  y/o  $N_v$ , donde el elemento completo  $N_u G_l X_m G_n N_v$  puede aparecer repetidamente, es decir, al menos una vez, según se  
 55 determina por el entero "a". Como se encontró sorprendentemente por los inventores, una molécula de acuerdo con la fórmula (III), es decir de estructura  $(N_u G_l X_m G_n N_v)_a$  como la definida arriba, lleva a una respuesta inmune innata incrementada en un paciente, lo cual es particularmente indicado por un incremento de la liberación de IFN-alfa en comparación con la administración de la estructura núcleo  $G_l X_m G_n$  como tal. Además, una molécula que comprende

la estructura núcleo  $G_i X_m G_n$  puede ser amplificada en organismos bacterianos con rendimientos significativamente mejores cuando está limitada por un elemento repetitivo  $N_u$  y/o  $N_v$  como el definido en la fórmula (III). Este diseño molecular es particularmente adecuado cuando se prepara una molécula de acuerdo con la estructura  $(N_u G_i X_m G_n N_v)_a$  de fórmula (III) como la definida arriba usando métodos de transcripción *in vitro* en lugar de métodos de síntesis en fase sólida como los conocidos en la técnica, los cuales están limitados típicamente a un tamaño específico de ácidos nucleicos.

La estructura núcleo  $G_i X_m G_n$  de la fórmula (III) se define más concretamente a continuación:

G en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)) es un nucleótido o desoxinucleótido o comprende un nucleósido, siendo el nucleótido (nucleósido) guanosina (guanina) o uridina (uracilo) o un análogo de los mismos, en especial guanosina (guanina) o un análogo de la misma. En este sentido, los análogos de nucleótido (nucleósido) de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) se definen como variantes de origen no nativo de los nucleótidos (nucleósidos) de origen natural guanosina (guanina) y uridina (uracilo). En consecuencia, los análogos de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) son típicamente nucleótidos derivados químicamente (nucleósidos) con grupos o componentes funcionales que no son de origen nativo, los cuales preferentemente se añaden a, se modifican o se suprimen del nucleótido de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) de origen natural o los cuales sustituyen grupos o componentes funcionales de origen natural de un nucleótido de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) de origen natural. En consecuencia, cada grupo funcional o componente del nucleótido de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) puede modificarse o suprimirse del mismo, en particular el componente base, el componente de azúcar (ribosa), cualquier grupo lateral funcional de origen natural y/o el componente fosfato que forme el esqueleto del oligonucleótido. Las partes fosfato pueden sustituirse por ejemplo por fosforamitados, fosforotioatos, nucleótidos péptidos, metilfosfonatos, etc., sin embargo, sigue siendo preferente cualquier esqueleto de fosfodiéster de origen natural en el contexto de la presente invención. Además, el componente de azúcar (ribosa) se selecciona de desoxirribosa, en particular el ácido nucleico es un ARN como el definido arriba donde el componente de azúcar (ribosa) se selecciona de desoxirribosa.

En consecuencia, los análogos de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) incluyen, sin implicar ninguna limitación, cualquier guanosina (guanina) o uridina (uracilo) de origen natural o de origen no natural que haya sido alterado químicamente, por ejemplo por acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyendo, por ejemplo, 1-metilguanosina (guanina), 2-metilguanosina (guanina), 2,2-dimetilguanosina (guanina), 7-metilguanosina (guanina), dihidrouridina (uracilo), 4-tiouridina (uracilo), 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5-(carboxihidroxilmetil)uridina (uracilo), 5-fluorouridina (uracilo), 5-bromouridina (uracilo), 5-carboximetilaminometiluridina (uracilo), 5-metil-2-tiouridina (uracilo), N-uridin éster de (uracil)-5-oxiacetato de metilo, 5-metilaminometiluridina (uracilo), 5-metoxiaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5'-metoxycarbonilmetiluridina (uracilo), 5-metoxiuridina (uracilo), uridinmetil éster de ácido (uracil)-5-oxiacético, uridina ácido (uracil)-5-oxiacético (v). La preparación de estos análogos es conocida del experto en la técnica, por ejemplo de las patentes US 4.373.071, US 4.401.796, US 4.415.732, US 4.458.066, US 4.500.707, US 4.668.777, US 4.973.679, US 5.047.524, US 5.132.418, US 5.153.319, US 5.262.530 y 5.700.642. En el caso de un análogo como el descrito arriba, se da preferencia especial a aquellos análogos que incrementan la inmunogenicidad de la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)) y/o que no interfieren con una modificación adicional que haya sido introducida. Puese encontrarse al menos una guanosina (guanina) o uridina (uracilo) o un análogo del mismo en los elementos de la estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$ , opcionalmente al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 100% de los nucleótidos de los elementos de estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  son guanosina (guanina) de origen natural, uridina (uracilo) de origen natural y/o un análogo de los mismos y/o exhiben propiedades de un análogo de los mismos como las aquí definidas. Preferentemente, el elemento de estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  contiene al menos un análogo de guanosina (guanina) de origen natural y/o uridina (uracilo) de origen natural. Más preferiblemente, todos los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de la estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  son análogos, pudiendo ser, muy preferiblemente, análogos idénticos para el mismo tipo de nucleótidos (nucleósidos) (por ejemplo, todos los nucleótidos de guanosina (guanina) son provistos como 1-metilguanosina (guanina)) o pueden ser distintos (por ejemplo al menos dos análogos de guanosina diferentes sustituyen al nucleótido de guanosina de origen natural).

El número de nucleótidos (nucleósidos) del elemento de estructura núcleo G ( $G_i$  y/o  $G_n$ ) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)) se determina por l y n. l y n, independientemente entre sí, son en cada caso un entero de 1 a 100, 1 a 90, 1 a 80, 1 a 70, 1 a 60, de preferencia 1 a 50, en especial 1 a 40 y en particular 1 a 30, pudiendo el límite inferior de estas escalas ser 1, pero como alternativa también 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o incluso más. Preferiblemente, para cada entero, cuando l y/o n = 1, G es guanosina (guanina) o un análogo de la misma y cuando l o n > 1, al menos el 50%, muy preferiblemente al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos (nucleósidos) del elemento de la estructura núcleo G ( $G_i$  y/o  $G_n$ ) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4,  $G_i$  y/o  $G_n$  pueden ser, por ejemplo, GUGU, GGUU, UGUG, UUGG, GUUG, GGGU, GGUG, GUGG, UGGG o GGGG, etc.; cuando l o n = 5,  $G_i$  y/o  $G_n$  pueden ser, por ejemplo, GGGUU, GGUGU, GUGGU, UGGGU, UGGUG, UUGGG, GUGUG, GGGGU, GGGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG o GGGGG, etc. Un nucleótido (nucleósido) de los elementos de la estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  directamente adyacente a  $X_m$  en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)) preferentemente no es uridina (uracilo) o un análogo de la misma. Muy preferiblemente, los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de ala estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  directamente adyacentes a  $X_m$  en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) son al

- menos una guanosina (guanina) o un análogo de la misma, muy preferiblemente un tramo de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o incluso 20 o más guanosinas (guaninas) o análogos de la misma. Además, un nucleótido de los elementos de la estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  directamente adyacente a N, por ejemplo,  $N_u$  y/o  $N_v$  (o  $N_{w1}$  o  $N_{w2}$  como se define abajo) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)) de preferencia no es uridina (uracilo) o un análogo de la misma. Muy preferiblemente, los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de la estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  directamente adyacentes a N, por ejemplo,  $N_u$  y/o  $N_v$  (o  $N_{w1}$  o  $N_{w2}$  como se define abajo) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)) son al menos una guanosina (guanina) o un análogo de la misma, muy preferiblemente un tramo de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o incluso 20 o más guanosinas (guaninas) o análogos de la misma.
- Asimismo, preferentemente, para la fórmula (III) (y la fórmula (I) y (II)), cuando  $l$  o  $n > 1$ , al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 100% de los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de la estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  son guanosina (guanina) o un análogo de la misma, como se definió arriba. Los nucleótidos (nucleósidos) restantes hasta el 100% en los elementos de la estructura núcleo  $G_i$  y/o  $G_n$  (cuando guanosina (guanina) constituye menos del 100% de estos nucleótidos (nucleósidos)) pueden entonces ser uridina (uracilo) o un análogo de la misma, como se definió aquí anteriormente.
- X, particularmente  $X_m$ , en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y la fórmula (I) y (II)) es también un elemento de la estructura núcleo y es un nucleótido o desoxinucleótido o comprende un nucleósido, seleccionándose el nucleótido (nucleósido) típicamente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de los mismos, preferentemente uridina (uracilo) o un análogo de la misma. En este contexto, los análogos de nucleótido (nucleósido) se definen como variantes no nativas de nucleótidos (nucleósidos) de origen natural. En consecuencia, los análogos son nucleótidos (nucleósidos) derivados químicamente con grupos funcionales que no son de origen nativo, los cuales preferentemente se añaden o se suprimen del nucleótido (nucleósido) de origen natural o sustituyen grupos funcionales de origen natural de un nucleótido (nucleósido). En consecuencia, cada componente del nucleótido de origen natural puede modificarse, en particular el componente base, el componente de azúcar (ribosa o desoxirribosa) y/o el componente fosfato que forma el esqueleto del oligonucleótido. Las partes fosfato pueden sustituirse por ejemplo, por fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos péptidos, metilfosfonatos, etc., siendo especialmente preferente, sin embargo, el esqueleto fosfodiéster de origen natural. Preferiblemente, al menos el 10%, muy preferiblemente al menos el 20%, en especial al menos el 30%, en particular al menos el 50%, con especial preferencia al menos el 70% y con particular preferencia al menos el 90% de todos los nucleótidos "X" pueden mostrar propiedades de un análogo tal como aquí se define, si la secuencia inmunoestimuladora contiene al menos un análogo. Los análogos que sustituyan un tipo de nucleótido específico dentro del elemento de la estructura núcleo " $X_m$ " pueden ser idénticos, por ejemplo, todos los nucleótidos (nucleósidos) de citidina (citosina) existentes en el elemento de la estructura núcleo " $X_m$ " son formados por un análogo de citidina (citosina) específico, por ejemplo, 2-tiocitidina (citosina), o pueden ser distintos para un nucleótido (nucleósido) específico, por ejemplo, al menos dos análogos de citidina (citosina) distintos están contenidos dentro del elemento de la estructura núcleo " $X_m$ ".
- Los análogos de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) incluyen, sin sin implicar ninguna limitación, cualquier guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina) o citidina (citosina) de origen natural o no de origen natural que haya sido alterado químicamente, por ejemplo, por acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyendo 1-metiladenosina (adenina), 2-metiladenosina (adenina), 2-metil-N6-isopentenil-adenosina (adenina), N6-metiladenosina (adenina), N6-isopentenil-adenosina (adenina), 2-tiocitidina (citosina), 3-metilcitidina (citosina), 4-acetil-citidina (citosina), 2,6-diaminopurina, 1-metilguanosina (guanina), 2-metil-guanosina (guanina), 2,2-dimetilguanosina (guanina), 7-metilguanosina (guanina), inosina, 1-metilinosina, dihidouridina (uracilo), 4-tiouridina (uracilo), 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5-(carboxihidroximetil)uridina (uracilo), 5-fluorouridina (uracilo), 5-bromouridina (uracilo), 5-carboximetil-aminometil-uridina (uracilo), 5-metil-2-tiouridina (uracilo), N-uridinmetil éster de ácido (uracil)-5-oxiacético, 5-metilaminometiluridina (uracilo), 5-metoxiaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5'-metoxycarbonilmetil-uridina (uracilo), 5-metoxiuridina (uracilo), uridinmetil éster de ácido (uracil)-5-oxiacético, uridina ácido (uracil)-5-oxiacético (v), queosina, beta-D-manosilqueosina, wibutoxosina e inosina. La preparación de estos análogos es conocida del experto en la técnica, por ejemplo de US 4.373.071, US 4.401.796, US 4.415.732, US 4.458.066, US 4.500.707, US 4.668.777, US 4.973.679, US 5.047.524, US 5.132.418, US 5.153.319, US 5.262.530 y US 5.700.642. En el caso de un análogo como el descrito arriba, se da preferencia particular a aquellos análogos de nucleótidos (nucleósidos) que incrementan la inmunogenicidad de la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)) y no interfieren con una modificación adicional que haya sido introducida.
- El número de elementos de la estructura central X en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)) se determina por m. "m" es un entero y es típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 150, 150 a 200, o incluso más, donde cuando  $m = 3$ , X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, y cuando  $m > 3$ , existen al menos 3 o más uridinas (uracilos) directamente sucesivos o un análogo de los mismos en el elemento X de la fórmula (III) (y de la fórmula (I) y (II)) anterior. Esta secuencia de al menos 3 o más uridinas (uracilos) directamente sucesivas es referida en relación con esta solicitud como una "secuencia de uridina (uracilo) monotónica". Una secuencia de uridina (uracilo) monotónica tiene típicamente una longitud de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 150, 150 a 200 uridinas

(uracilos) u opcionalmente análogos de uridina (uracilo) como los definidos arriba. Esta secuencia de uridina (uracilo) monotónica ocurre por lo menos una vez en el elemento de estructura central X de la molécula del ácido nucleico de fórmula (III) (y de fórmula (I) y (II)). Así, es posible, por ejemplo, que existan 1, 2, 3, 4, 5 o más secuencias de uridina (uracilo) monotónicas que tengan al menos 3 o más uridinas (uracilos) o análogos de las mismas, secuencias de uridina (uracilo) monotónicas que pueden estar interrumpidas en el elemento de estructura central X por al menos una guanosina (guanina), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de las mismas, de preferencia 2, 3, 4, 5 o más. Por ejemplo, cuando  $m = 3$ ,  $X_m$  es UUU. Cuando  $m = 4$ ,  $X_m$  puede ser, por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, UUUU, UUUG, UUUC, UUUU, AUUU, GUUU o CUUU, etc. Cuando  $n = 10$ ,  $X_m$  puede ser, por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, UUUAAUUUUUC, UUUUGUUUUU, UUUGUUUGUU, UUGUUUUUGUU, UUUUUUUUUU, etc. Los nucleótidos de  $X_m$  adyacentes a  $G_i$  o  $G_n$  de la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) comprenden preferentemente uridina (uracilo) o análogos de la misma. Cuando  $m > 3$ , típicamente al menos el 50%, de preferencia al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 100% de los nucleótidos de  $X_m$  son uridina (uracilo) o un análogo de la misma, como se definió arriba. Los nucleótidos restantes de  $X_m$  hasta el 100% (en donde hay menos del 100% de uridina (uracilo) en la secuencia  $X_m$ ) son entonces guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o análogos de los mismos, como se definió arriba.

La secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (III) anterior contiene también el elemento frontera N. El elemento frontera N es típicamente una secuencia de ácido nucleico con una longitud de aproximadamente 4 a 50, de preferencia alrededor de 4 a 40, en especial alrededor de 4 a 30 nucleótidos (nucleósidos), en particular alrededor de 4 a 20 nucleótidos (nucleósidos), pudiendo ser el límite inferior de estos rangos alternativamente también 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. Preferentemente, los nucleótidos (nucleósidos) de cada N se seleccionan independientemente de entre guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) y/o un análogo de los mismos. En otras palabras, el elemento frontera N de la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) de acuerdo con la presente invención puede ser una secuencia que puede estar compuesta por cualquier secuencia (aleatoria), disponible en la técnica, donde cada N se selecciona independientemente de entre guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) y/o un análogo de estos nucleótidos, o provista a partir de un homopolímero de estos nucleótidos (nucleósidos) en cada caso, de manera que esa secuencia tiene una longitud de alrededor de 4 a 50, de preferencia alrededor de 4 a 40, en especial de alrededor de 4 a 30 nucleótidos (nucleósidos) y con particular preferencia de aproximadamente 4 a 30 ó 4 a 20 nucleótidos (nucleósidos) de acuerdo con la definición anterior.

De acuerdo con una realización específica, N puede ser una secuencia de ácido nucleico dentro de las definiciones anteriores, donde la secuencia comprende típicamente no más de dos nucleótidos (nucleósidos) idénticos como los definidos arriba en una posición directamente adyacente, es decir, la secuencia no comprende típicamente ningún tramo de más de dos nucleótidos idénticos (nucleósidos) seleccionados de entre adenosina (adenina), citidina (citosina), uridina (uracilo) y/o guanosina (guanina), y/o un análogo de los mismos (es decir, un tramo "aa", "cc", "uu", "gg" y/o un análogo de los mismos), en especial ninguno de estos tramos, es decir ningún nucleótido (nucleósido) idéntico como se definió arriba en una posición directamente adyacente. Adicional o alternativamente, N puede ser una secuencia de ácido nucleico dentro de las definiciones anteriores, donde la secuencia comprende típicamente un contenido de adenosina (adenina) o un análogo de la misma preferente de alrededor del 0 al 50%, 5 al 45% o 10 al 40%, en especial alrededor del 15 al 35%, en particular alrededor del 20 al 30% y con especial preferencia alrededor del 25%; un contenido de uridina (uracilo) o un análogo de la misma preferente de alrededor del 0 al 50%, 5 al 45% o 10 al 40%, en especial de alrededor del 15 al 35%, en particular alrededor del 20 al 30% y con especial preferencia alrededor del 25%; un contenido de citidina (citosina) o un análogo de la misma preferente de alrededor del 0 al 50%, 5 al 45% o 10 al 40%, en especial alrededor del 15 al 35%, en particular alrededor del 20 al 30% y con especial preferencia alrededor del 25%; un contenido de guanosina (guanina) o un análogo de la misma preferente alrededor del 0 al 50%, 5 al 45% o 10 al 40%, en especial alrededor del 15 al 35%, en particular alrededor del 20 al 30% y con especial preferencia alrededor del 25%. De formas particularmente preferente, N puede ser una secuencia de ácido nucleico dentro de las definiciones anteriores donde la secuencia comprende típicamente un contenido de cada uno de adenosina (adenina), guanosina (guanina), citidina (citosina) y uridina (uracilo) de alrededor del 25%. Ejemplos de estas secuencias de N incluyen, por ejemplo, agcu, aguc, augc, acgu, gcu, gcua, gcau, gacu, guca, cuag, caug, cagu, cgau, uagc, uacg, ucga, ucag, agcugcu, gcaucaug, caguucga, etc.

El número de elementos frontera N en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III), es decir, su repetición, se determina por los enteros u y/o v. Así, en la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) puede existir como un elemento frontera (repetitivo)  $N_u$  y/o  $N_v$ , pudiendo ser u y/o v, independientemente uno de otro, un entero de 0 ó 1 a 100, en especial de 0 ó 1 a 50, en particular de 0 ó 1 a 40 y con especial preferencia de 0 ó 1 a 30, por ejemplo 0 ó 1 a 5, 10, 20, 25 ó 30; o de 5 a 10, 10 a 15, 15 a 20, 20 a 25 ó 25 a 30. En especial, al menos un elemento frontera (repetitivo)  $N_u$  y/o  $N_v$  puede estar presente en la fórmula (III), es decir, u o v no son 0, en particular ambos elementos frontera (repetitivos)  $N_u$  y/o  $N_v$  están presentes, todavía más preferiblemente en las definiciones anteriores.

Adicionalmente, la combinación de elementos de estructura núcleo y elementos frontera con el elemento  $UnG_iX_mG_nN_v$  puede ocurrir como elementos repetitivos de acuerdo con la secuencia inmunoestimuladora de fórmula (III),  $(N_uG_iX_mG_nN_v)_a$ , definida anteriormente, donde el número de repeticiones del elemento combinado según la fórmula (III)  $(N_uG_iX_mG_nN_v)_a$  se determina por un entero a. Preferentemente, a es un entero de alrededor de 1 a 100, 1 a 50, 1 a 20, en especial un entero de alrededor de 1 a 15, en particular un entero de alrededor de 1 a 10. En este contexto, los elementos repetitivos  $N_uG_iX_mG_nN_v$  pueden ser iguales o diferentes entre sí.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, la secuencia inmunoestimuladora de fórmula (III)  $(N_u G_i X_m G_n N_v)_a$ , definida arriba, comprende una estructura núcleo  $G_i X_m G_n$ , preferentemente seleccionada de entre al menos una de las siguientes secuencias de SEQ ID NO: 1-80 como las definidas arriba.

5 Además, las secuencias inmunoestimuladoras aquí definidas pueden comprender también, por ejemplo, una (molécula) de ácido nucleico de fórmula (IIIa)



donde:

C es citidina (citosina), uridina (uracilo) o un análogo de citidina (citosina) o uridina (uracilo), de preferencia citidina (citosina) o un análogo de la misma,

10 X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de los nucleótidos (nucleósidos) mencionados, de preferencia uridina (uracilo) o un análogo de la misma;

N es en cada caso una secuencia de ácido nucleico que tiene, independientemente una de otra, una longitud de alrededor de 4 a 50, de preferencia alrededor de 4 a 40, en especial alrededor de 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, seleccionándose cada N independientemente de entre guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos):

a es un entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 15, muy preferiblemente de 1 a 10;

l es un entero de 1 a 40, donde cuando  $l = 1$ , C es citidina (citosina) o un análogo de la misma; cuando  $l > 1$ , al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son citidina (citosina) o un análogo de la misma;

20 m es un entero y es al menos 3; donde cuando  $m = 3$ , X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma; cuando  $m > 3$ , existen al menos 3 uridinas (uracilos) sucesivas o análogos de uridina (uracilo);

n es un entero de 1 a 40, donde cuando  $n = 1$ , C es citidina (citosina) o un análogo de la misma, cuando  $n > 1$ , al menos EL 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son citidina (citosina) o un análogo de la misma;

u, v pueden ser, independientemente unos de otros, un entero de 0 a 50, de preferencia donde cuando  $u = 0$ ,  $v \geq 1$ , o cuando  $v = 0$ ,  $u \geq 1$ ;

25 donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, de preferencia al menos 100 nucleótidos, en especial de al menos 150 nucleótidos, en particular de al menos 200 nucleótidos y con especial preferencia de al menos 250 nucleótidos.

30 Para la fórmula (IIa), cualquiera de las definiciones dadas arriba para los elementos N (es decir,  $N_u$  y  $N_v$ ) y X ( $X_m$ ), particularmente la estructura núcleo definida arriba, así como para los enteros a, l, m, n, u y v, se aplican similarmente a los elementos de la fórmula (IIIa) correspondientemente, donde en la fórmula (IIIa) la estructura núcleo se define por  $C_i X_m C_n$ . La definición de los elementos frontera  $N_u$  y  $N_v$  es idéntica a las definiciones dadas arriba para  $N_u$  y  $N_v$ .

35 Más particularmente, C en la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) es un nucleótido o desoxinucleótido o comprende un nucleósido, donde el nucleótido (nucleósido) es típicamente citidina (citosina) o uridina (uracilo) o un análogo de las mismas. A este respecto, los análogos del nucleótido citidina (citosina) o uridina (uracilo) se definen como variantes de origen nativo de nucleótidos de citidina (citosina) o uridina (uracilo) de origen natural. En consecuencia, los análogos de citidina (citosina) o uridina (uracilo) son nucleótidos (nucleósidos) derivados químicamente con grupos funcionales de origen no nativo, los cuales preferentemente son añadidos o suprimidos del nucleótido (nucleósido) de citidina (citosina) o uridina (uracilo) de origen natural o sustituyen los grupos

40 funcionales de origen natural de un nucleótido (nucleósido) de citidina (citosina) o uridina (uracilo). En consecuencia, cada componente del nucleótido de citidina (citosina) o uridina (uracilo) de origen natural puede estar modificado, en particular el componente base, el componente azúcar (ribosa) y/o el componente fosfato que forma la estructura base del oligonucleótido. Las partes fosfato pueden sustituirse por ejemplo, por fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos péptidos, metilfosfonatos, etc., siendo preferente la estructura base fosfodiéster de origen natural.

45 Correspondientemente, los análogos de citidina (citosina) o uridina (uracilo) incluyen, sin limitación, cualquier citidina (citosina) o uridina (uracilo) de origen natural o de origen no natural que haya sido alterado químicamente, por ejemplo, por acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyendo, por ejemplo, 2-tiocitidina (citosina), 3-metilcitidina (citosina), 4-acetilcitidina (citosina), dihidrouridina (uracilo), 5-(carboxi-hidroximetil)uridina (uracilo), 5-fluorouridina (uracilo), 5-bromouridina (uracilo), 5-carboximetilaminometil-uridina (uracilo), 5-metil-2-tiouridina (uracilo), N-uridin (uracil) metil éster de ácido 5-oxiacético, 5-metilaminometil-uridina (uracilo), 5-metoxiaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5'-metoxycarbonilmetil-uridina (uracilo), 5-metoxiuridina (uracilo), uridin (uracil) metil éster de ácido -5-oxiacético, uridina (uracilo)-ácido 5-oxiacético (v). La preparación de estos análogos es conocida del experto en la técnica, por

50 ejemplo de US 4.373.071, US 4.401.796, US 4.415.732, US 4.458.066, US 4.500.707, US 4.668.777, US 4.973.679, US 5.047.524, US 5.132.418, US 5.153.319, US 5.262.530 y US 5.700.642. En el caso de un análogo de nucleótido (nucleósido) como el descrito arriba, se da preferencia especialmente a aquellos análogos que incrementan la

55 inmunogenidad de la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) y/o que no interfieren con una modificación adicional que haya sido introducida. Al menos una citidina (citosina) o uridina (uracilo) o un análogo de la misma

5 puede existir en los elementos de estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$ , opcionalmente al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  son citidina (citosina) de origen natural, uridina (uracilo) de origen natural y/o un análogo de los mismos y/o exhiben propiedades de un análogo de las mismas como las aquí definidas. Preferiblemente, el elemento de estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  contiene al menos un análogo de citidina (citosina) de origen natural y/o uridina (uracilo) de origen natural. Más preferiblemente, todos los nucleótidos (nucleósidos) de estos elementos de estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  son análogos, en especial análogos idénticos para el mismo tipo de nucleótidos (nucleósidos) (por ejemplo, todos los nucleótidos de citidina (citosina) son provistos como 2-tiocitidina (citosina)) o pueden ser distintos (por ejemplo, al menos dos análogos de citidina (citosina) diferentes sustituyen al nucleótido citidina (citosina) de origen natural).

10 El número de nucleótidos (nucleósidos) del elemento de estructura núcleo C ( $C_1$  y/o  $C_n$ ) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) se determina por l y n. "l" y "n", independientemente unos de otros, son en cada caso un entero de 1 a 90, de 1 a 80, 1 a 70, 1 a 60, preferiblemente de 1 a 50, en especial de 1 a 40 y en particular de 1 a 30, donde el límite inferior de estos rangos puede ser 1, pero alternativamente también 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o incluso más. De preferencia, para cada entero, cuando l y/o n = 1, C es citidina (citosina) o un análogo de la misma, y cuando l o n > 1, al menos el 50%, muy preferiblemente al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos (nucleósidos) del elemento de estructura núcleo C ( $C_1$  y/o  $C_n$ ) son citidina (citosina) o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin limitación, cuando l o n = 4,  $C_1$  y/o  $C_n$  pueden ser, por ejemplo, CUCU, CCUU, UCUC, UUCC, CUUC, CCCU, CCUC, CUCC, UCCC o CCCC, etc.; cuando l o n = 5,  $C_1$  y/o  $C_n$  pueden ser, por ejemplo, CCCUU, CCUCU, CUCCU, UCCCU, UCCUC, UCUCU, UUCCC, CUCUC, CCCCU, CCCUC, CCUCC, CUCCC, UCCCC o CCCCC, etc.; etc. Un nucleótido (nucleósido) de los elementos de estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  directamente adyacente a  $X_m$  en la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) preferentemente no es una uridina (uracilo) o un análogo de la misma. Muy preferiblemente, los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  directamente adyacentes a  $X_m$  en la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) son al menos citidina (citosina) o un análogo de la misma, en especial un tramo de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o incluso 20 o más citidinas (citosinas) o un análogo de las mismas. Además, un nucleótido (nucleósido) de los elementos de estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  directamente adyacente a N, por ejemplo  $N_u$  y/o  $N_v$  (o  $N_{w1}$  o  $N_{w2}$  como el definido abajo) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) preferentemente no es uridina (uracilo) o un análogo de la misma. En especial, los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de la estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  directamente adyacentes a N, por ejemplo  $N_u$  y/o  $N_v$  (o  $N_{w1}$  o  $N_{w2}$  como se define abajo) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) son al menos una citidina (citosina) o un análogo de la misma, en especial un tramo de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o incluso 20 o más citidinas (citosinas) o un análogo de las mismas. Asimismo de preferencia, para la fórmula (IIIa), cuando l o n > 1, al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos de los elementos de estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  son citidina (citosina) o un análogo de la misma, como se definió arriba. Los nucleótidos (nucleósidos) restantes hasta el 100% en los elementos de la estructura núcleo  $C_1$  y/o  $C_n$  (cuando la citidina (citosina) constituye menos del 100% de estos nucleótidos (nucleósidos)) pueden ser entonces uridina (o uracilo) o un análogo de la misma, como ya se describió anteriormente.

40 X, particularmente  $X_m$ , como elemento de la estructura núcleo adicional en la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con fórmula (IIIa), preferentemente es tal como el definido arriba para la fórmula (III). El número de elementos de la estructura núcleo X en la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) se determina por m. "m" es un entero, típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 150, 150 a 200, o incluso más, donde cuando m = 3, X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, y cuando m > 3, existen al menos 3 o más uridinas (uracilos) directamente adyacentes o un análogo de los mismos en el elemento X de la fórmula (IIIa) anterior. Esta secuencia de al menos 3 o más uridinas (uracilos) sucesivos directamente es referida en relación con esta solicitud como una "secuencia de uridina (uracilo) monotónica". Una secuencia de uridina (uracilo) monotónica tiene típicamente una longitud de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 100, 100 a 150, 150 a 200 uridinas (uracilos) u opcionalmente análogos de uridina (uracilo) como se definió arriba. Esta secuencia de uridina (uracilo) monotónica ocurre al menos una vez en el elemento de estructura núcleo X de la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa). Así, es posible, por ejemplo, que 1, 2, 3, 4, 5 o más secuencias de uridina (uracilo) monotónicas que tengan al menos 3 o más uridinas (uracilos) o análogos de las mismas ocurran, secuencias de uridina (uracilo) monotónicas que pueden estar interrumpidas en el elemento de estructura núcleo X por al menos una guanosina (guanina), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de las mismas, de preferencia 2, 3, 4, 5 o más. Por ejemplo, cuando m = 3,  $X_m$  es UUU. Cuando m = 4,  $X_m$  puede ser, por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, UUUU, UUUU, UUUU, UUUU, AUUU, GUUU o CUUU, etc. Cuando n = 10,  $X_m$  puede ser, por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, UUUAAUUUUU, UUUUGUUUUU, UUUUGUUUGUU, UUGUUUUUGUU, UUUUUUUUUU, etc. Los nucleótidos (nucleósidos) de  $X_m$  adyacentes a  $C_1$  o  $C_n$  en la molécula de ácido nucleico de fórmula (IIIa) comprenden preferentemente uridina (uracilo) o análogos de la misma. Cuando m > 3, típicamente al menos el 50%, de preferencia al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos de  $X_m$  son uridina (uracilo) o un análogo de la misma, como se definió arriba. Los nucleótidos (nucleósidos) restantes de  $X_m$  hasta el 100% (donde hay menos del 100% de uridina (uracilo) en la secuencia  $X_m$ ) pueden ser entonces guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de las mismas, como se definió arriba.

Asimismo, la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IIIa) anterior contiene un elemento frontera N, en particular  $N_u$  y/o  $N_v$ , donde el elemento frontera N, en particular  $N_u$  y/o  $N_v$ , así como los enteros x e y son como se ha definido anteriormente.

5 El elemento  $N_u C_i X_m C_n N_v$  puede ocurrir como un elemento repetitivo de acuerdo con la secuencia inmunoestimuladora de fórmula (IIIa)  $(N_u C_i X_m C_n N_v)_a$  como se definió arriba, determinándose el número de repeticiones de este elemento según la fórmula (IIIa)  $(N_u C_i X_m C_n N_v)_a$  por el entero a. Preferentemente, a es un entero de alrededor de 1 a 100, 1 a 50, 1 a 20, muy preferiblemente un entero de alrededor de 1 a 15, en especial un entero de alrededor de 1 a 10. En este contexto, los elementos repetitivos  $N_u C_i X_m C_n N_v$  pueden ser iguales o diferentes unos de otros.

10 De acuerdo con una realización particularmente preferente, una secuencia inmunoestimuladora de fórmula (IIIa)  $(N_u C_i X_m C_n N_v)_a$ , como se ha definido arriba, comprende una estructura núcleo  $C_i X_m C_n$ , seleccionada preferentemente de al menos una de las siguientes secuencias de SEQ ID Nos: 81-83 como se definió arriba.

15 La secuencia inmunoestimuladora de acuerdo ya sea con la fórmula (III) (o (IIIa)), particularmente cada elemento repetitivo individual  $N_u C_i X_m C_n N_v$  (o  $N_u C_i X_m C_n N_v$ ) de la misma, puede ser de una sola hebra o parcialmente de doble hebra, etc., como se definió para la fórmula (III) en general.

Cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo ya sea con la fórmula (III) (o (IIIa)) es una molécula de ácido nucleico de una sola hebra, la secuencia es típicamente de una sola hebra en su longitud completa.

Asimismo, si la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo ya sea con la fórmula (III) (o (IIIa)) es una molécula de ácido nucleico de doble hebra, la secuencia es típicamente de doble hebra en su longitud completa.

20 Cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo ya sea con la fórmula (III) (o (IIIa)) es una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico de fórmula (III) (o (IIIa)) puede ser de una sola hebra en la región fuera de la estructura núcleo  $G_i X_m G_n$  (o  $C_i X_m C_n$ ), y de doble hebra en la región de la estructura núcleo, seleccionándose la estructura núcleo  $G_i X_m G_n$  (o  $C_i X_m C_n$ ) preferentemente de entre al menos una de las secuencias definidas arriba de SEQ ID NO: 1-83. Con especial preferencia, la estructura núcleo  $G_i X_m G_n$  (o  $C_i X_m C_n$ ) de (ya sea) fórmula (III) (o (IIIa)) puede ser de doble hebra en esa región de la estructura núcleo donde existe un tramo de uridinas (uracilos), en especial en el tramo de uridina (uracilo) completo o al menos en el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% del mismo.

30 Alternativa o adicionalmente, cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo ya sea con la fórmula (III) o (IIIa) es una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, otras partes (que no sean la estructura núcleo  $G_i X_m G_n$ ) de la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (III) o (IIIa) como la definida arriba pueden ser de doble hebra. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico de la fórmula (III) o (IIIa) puede ser de doble hebra en la región fuera de la estructura núcleo  $G_i X_m G_n$  (o  $C_i X_m C_n$ ), por ejemplo en los elementos frontera  $N_u$  y/o  $N_v$ , y de una sola hebra en la región de la estructura núcleo, seleccionándose la estructura núcleo  $G_i X_m G_n$  (o  $C_i X_m C_n$ ) preferentemente de al menos una de las secuencias definidas arriba de SEQ ID NO: 1-83.

35 Por ejemplo, al menos uno de los elementos frontera  $N_u$  y/o  $N_v$  pueden ser de doble hebra, en tanto que los elementos restantes ya sea de la fórmula (III) o (IIIa), por ejemplo la estructura núcleo  $G_i X_m G_n$  y/u otros elementos, pueden ser de una sola hebra.

40 Alternativa o adicionalmente, la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (III) puede seleccionarse de una mezcla de una molécula de ácido nucleico de una sola hebra de acuerdo con la fórmula (III) o (IIIa) y una molécula de ácido nucleico (parcialmente) de doble hebra de acuerdo con la fórmula (III) (o (IIIa)), preferentemente en una relación de aproximadamente 1:10 a 10:1, en especial en una relación de 1:3 a 3:1.

De acuerdo con una realización muy particularmente preferente, la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (III) puede seleccionarse de cualquiera de las siguientes secuencias:

de SEQ ID NO: 84:

UAGCGAAGCU CUUGGACCUA GG UUUUU UUUUU UUUUU GGG UGCGUCCUA GAAGUACACG

o de SEQ ID NO: 85:

UAGCGAAGCU CUUGGACCUA GG UUUUU UUUUU UUUUU GGG UGCGUCCUA GAAGUACACG  
AUCGCUUCGA GAACCUUGAU CC AAAAA AAAAA AAAAA CCC ACGCAAGGAU CUUCAUGUGC

o de SEQ ID NO: 114 (R820: (N<sub>100</sub>)<sub>2</sub>)

GGGAGAAAGCUC AAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACA UUGAGGAAACCGAGUUGCAUAUCUCAGAGUAUUG  
GCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUAC  
GGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUU  
AGAUGUUACACUCUAUUAGAUCUCGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUUGUUCUUGCUCUAAGUA  
CCGAGUGUGCCCAAUACCCGUAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCUCCUCUAGACUGCAGCGUAAGUGC  
GGAAUCUGGGGAUCAAUUACUGACUGCCUGGAUUACCCUCGGACAUAUAACCUUGUAGCACGUGUUG  
CUGUAUAGGUGACCAACGCCACUCGAGUAGACCAGCUCUCUAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGG  
UCAUUCUACUUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAG

o de SEQ ID NO: 115 (R719: (N<sub>100</sub>)<sub>5</sub>)

GGGAGAAAGCUC AAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACA UUGAGGAAACCGAGUUGCAUAUCUCAGAGUAUUG  
GCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUAC  
GGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUU  
AGAUGUUACACUCUAUUAGAUCUCGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUUGUUCUUGCUCUAAGUA  
CCGAGUGUGCCCAAUACCCGUAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCUCCUCUAGACUGCAGCGUAAGUGC  
GGAAUCUGGGGAUCAAUUACUGACUGCCUGGAUUACCCUCGGACAUAUAACCUUGUAGCACGUGUUG  
CUGUAUAGGUGACCAACGCCACUCGAGUAGACCAGCUCUCUAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGG  
UCAUUCUACUUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAGAGCUA  
CGCAGGUUCGCAAUAAAAGCGUUGAUUAGUGGCAUAGAACAGACCUCUAUUCGGUGAAACGCCAGAA  
UGC UAAA UUCAUAACUCUUC CCAAACGCGUACGGCCGAAGACGCGCGCUUAUCUUGUGUACGUUCU  
CGCACAUGGAAGAAUCAGCGGGCAUGGUGGUAGGGCAAUAGGGGAGCUGGGUAGCAGCGAAAAAGGGCC  
CCUGCGCACGUAGCUUCGUGUCGUCUGAAACAACCCGGCAUCCGUUGUAGCGAUCCCGUUAUCAGUG  
UUAUUCUUGUGCGCACUAAGAUUCAUGGUGUAGUCGACAUAACAGCGUCUUGGCAGAUUCUGGUCACG  
UGCCCUAUGCCCGGGCUUGUGCCUCUCAGGUGCACAGCGAUACUUAAGCCUUC AAGGUACUCGACGUG  
GGUACCGAUUCGUGACACUUCUAAGAUUAUCCACUGUGUAGCCCGCACCGCCGACC UAAACUGGU  
CCAAUGUAUACGCAUUCGUGAGCGGAUCGAUAAUAAAAGCUUGAAU

o de SEQ ID NO: 116 (R720: (N<sub>100</sub>)<sub>10</sub>)

GGGAGAAAGCUC AAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACA UUGAGGAAACCGAGUUGCAUAUCUCAGAGUAUUG  
GCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUAC  
GGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUU  
AGAUGUUACACUCUAUUAGAUCUCGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUUGUUCUUGCUCUAAGUA  
CCGAGUGUGCCCAAUACCCGUAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCUCCUCUAGACUGCAGCGUAAGUGC  
GGAAUCUGGGGAUCAAUUACUGACUGCCUGGAUUACCCUCGGACAUAUAACCUUGUAGCACGCGUUG  
CUGUAUAGGUGACCAACGCCACUCGAGUAGACCAGCUCUCUAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGG  
UCAUUCUACUUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAGAGCUA  
CGCAGGUUCGCAAUAAAAGCGUUGAUUAGUGGCAUAGAACAGACCUCUAUUCGGUGAAACGCCAGAA  
UGC UAAA UUCAUAACUCUUC CCAAACGCGUACGGCCGAAGACGCGCGCUUAUCUUGUGUACGUUCU  
CGCACAUGGAAGAAUCAGCGGGCAUGGUGGUAGGGCAAUAGGGGAGCUGGGUAGCAGCGAAAAAGGGCC  
CCUGCGCACGUAGCUUCGUGUCGUCUGAAACAACCCGGCAUCCGUUGUAGCGAUCCCGUUAUCAGUG  
UUAUUCUUGUGCGCACUAAGAUUCAUGGUGUAGUCGACAUAACAGCGUCUUGGCAGAUUCUGGUCACG  
UGCCCUAUGCCCGGGCUUGUGCCUCUCAGGUGCACAGCGAUACUUAAGCCUUC AAGGUACUCGACGUG  
GGUACCGAUUCGUGACACUUCUAAGAUUAUCCACUGUGUAGCCCGCACCGCCGACC UAAACUGGU  
CCAAUGUAUACGCAUUCGUGAGCGGAUCGAUAAUAAAAGCUUGAAU

o de SEQ ID NO: 117 (R821: (N<sub>40</sub>U<sub>20</sub>N<sub>40</sub>)<sub>2</sub>)

GGGAGAAAGCUC AAGCUUAUCCAAGUAGGCUUGGUCACCUGUACAACGUAGCCGGUAUUUUUUUUUUUUUU  
UUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUAAAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAG  
ACUUGUGCGGUACGGUUAUUCUCCCUUU  
AGCGAUGAUGCUGGCCCAGAUC



molécula de ácido nucleico de la fórmula (IV) por cualquiera de sus hebras, por ejemplo, tanto usando la secuencia poli-C, poli-I, poli-A o poli-U. La longitud del elemento modificador poli(IV), en particular poli(IV)<sub>s</sub> y/o poli(IV)<sub>t</sub>, de la secuencia inmunoestimuladora de fórmula (IV) se determina por los enteros s y/o t, donde s y/o t, independientemente unos de otros, pueden ser un entero de aproximadamente 5 a 100, de preferencia alrededor de 5 a 70, en especial alrededor de 5 a 50, en particular alrededor de 5 a 30 y con especial preferencia alrededor de 5 a 20.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV) como la definida arriba puede comprender específicamente por ejemplo una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IVa),



o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IVb),



donde cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico de fórmulas (IVa) o (IVb) también tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, de preferencia al menos 100 nucleótidos, en especial de al menos 150 nucleótidos, en particular de al menos 200 nucleótidos y con especial preferencia de al menos 250 nucleótidos. De manera similar, todas las demás definiciones se aplican al igual que para las fórmulas (IV) o (III). Asimismo, las fórmulas (IV), (IVa) y (IVb) pueden ser definidas en base a una fórmula de acuerdo con la fórmula (IIIb), es decir, introduciendo la estructura central C<sub>i</sub>X<sub>m</sub>C<sub>n</sub>.

Muy preferiblemente, poli(X) en una secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) se puede seleccionar de una poli(IV) como la definida arriba, en especial de poli(I:C) y/o de poli(A:U). Estos elementos modificadores poli(X), en particular poli(I:C) y/o poli(A:U), pueden estar acoplados a la secuencia de fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) por cualquiera de sus hebras, por ejemplo, usando la secuencia poli-C, poli-G, poli-I, poli-A o poli-U.

De manera similar a la definida arriba para la fórmula (III) o (IIIa), la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) puede ser una molécula de ácido nucleico de una sola hebra, de doble hebra o parcialmente de doble hebra, como se ha definido anteriormente.

Cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) es una molécula de ácido nucleico de una sola hebra, la secuencia es típicamente de una sola hebra en su longitud completa.

Asimismo, cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) es una molécula de ácido nucleico de doble hebra, la secuencia es típicamente de doble hebra en su longitud completa.

Cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) es una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico de la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) puede ser una sola hebra en la región fuera de la estructura núcleo G<sub>i</sub>X<sub>m</sub>G<sub>n</sub>, y de doble hebra en la región de dicha estructura núcleo, donde la estructura núcleo G<sub>i</sub>X<sub>m</sub>G<sub>n</sub>, se selecciona preferentemente de al menos una de las secuencias definidas arriba de SEQ ID NO: 1-80 o SEQ ID NO: 81 a 83. Aún más preferiblemente, la estructura núcleo G<sub>i</sub>X<sub>m</sub>G<sub>n</sub> (o C<sub>i</sub>X<sub>m</sub>C<sub>n</sub>) de fórmula (III) (o (IIIa)) puede ser de doble hebra en la región de la estructura núcleo donde existe una hebra de uridinas (uracilos), en especial en el tramo de uridina (uracilo) completo o en al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o el 99% del mismo.

Alternativa o adicionalmente, cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) es una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, otras partes (que la estructura núcleo G<sub>i</sub>X<sub>m</sub>G<sub>n</sub>) de la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) como la definida arriba pueden ser de doble hebra. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico de fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) puede ser de doble hebra en la región fuera de la estructura núcleo G<sub>i</sub>X<sub>m</sub>G<sub>n</sub>, por ejemplo en los elementos frontera N<sub>u</sub> y/o N<sub>v</sub>, y/o en el elemento modificador poli(X), por ejemplo poli(X)<sub>s</sub> y o poli(X)<sub>t</sub> (tal como, por ejemplo, una secuencia poli(I:C) o poli(A:U)), y por ejemplo de una sola hebra en la región de la estructura núcleo, seleccionándose la estructura núcleo G<sub>i</sub>X<sub>m</sub>G<sub>n</sub> de preferencia de al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 1-83 definidas arriba. Por ejemplo, al menos uno de los elementos frontera N<sub>u</sub> y/o N<sub>v</sub> y/o al menos uno de los elementos modificadores poli(IV), por ejemplo poli(IV) y o poli(IV)<sub>t</sub>, puede ser de doble hebra, mientras que los elementos restantes de la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb), por ejemplo, la estructura núcleo G<sub>i</sub>X<sub>m</sub>G<sub>n</sub> y/u otros elementos, pueden ser de una sola hebra.

Alternativa o adicionalmente, una mezcla de una molécula de ácido nucleico de una sola hebra de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) y una molécula de ácido nucleico (parcialmente) de doble hebra de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb), de preferencia en una relación de aproximadamente 1:10 a 10:1, más preferiblemente en una relación de 1:3 a 3:1.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (IV), (IVa) y/o (IVb) puede seleccionarse por ejemplo de cualquiera de las siguientes secuencias:

- CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC GG UUUUUU UUUUUU UUUUUU GGG (SEQ ID NO: 88)
- CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC GG UUUUUU UUUUUU UUUUUU GGG (SEQ ID NO: 89)  
IIIIIIIIIII IIIIIIIIIII
- CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC GG UUUUUU UUUUUU UUUUUU GGG (SEQ ID NO: 90)  
AAAAA AAAAA AAAAA
- CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC GG UUUUUU UUUUUU UUUUUU GGG (SEQ ID NO: 91)  
GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG CC AAAAA AAAAA AAAAA CCC
- CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC UAGCGAAGCU CUUGGACCUA GG UUUUUU UUUUUU UUUUUU GGG  
UGCGUUCUUA GAAGUACACG  
(SEQ ID NO: 92)
- CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC GG UUUUUU UUUUUU UUUUUU GGG UGCGUUCUUA GAAGUACACG  
GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG CC AAAAA AAAAA AAAAA CCC ACGCAAGGAU CUUCAUGUGC  
  
UAGCGAAGCU CUUGGACCUA (SEQ ID NO: 93)  
AUCGCUUCGA GAACCUGGAU
- CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC GG UUUUUU UUUUUU UUUUUU GGG UGCGUUCUUA GAAGUACACG  
CC AAAAA AAAAA AAAAA CCC ACGCAAGGAU CUUCAUGUGC  
  
UAGCGAAGCU CUUGGACCUA (SEQ ID NO: 94)  
AUCGCUUCGA GAACCUGGAU

5 Una secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (III) (o (IIIa)) como la definida arriba también puede modificarse insertando un tallo o tallo-lazo, por ejemplo llevando a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (Va),



o con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (Vb),



10 donde la molécula de ácido nucleico de la fórmula (Va) y/o (Vb) tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, muy preferiblemente de al menos 150 nucleótidos, en especial de al menos 200 nucleótidos y en particular de al menos 250 nucleótidos. Asimismo, las fórmulas (Va) y (Vb) pueden definirse en base a la fórmula (IIIb), es decir introduciendo la estructura central  $C_l X_m C_n$ .

15 En particular, las secuencias inmunoestimuladoras de la fórmula (Va) y/o (Vb) representan variantes de la fórmula (III) como las definidas arriba. En un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las fórmulas (Va) y/o (Vb), los elementos frontera N, es decir  $N_u$  y/o  $N_v$ , que limitan la estructura núcleo  $G_l X_m C_n$ , están aumentados al menos con una estructura tallo (stem) o lazo-tallo, preferentemente consistente en elementos tallo y lazo individuales stem1 y stem2. En las secuencias inmunoestimuladoras de acuerdo con cualquiera de las fórmulas (Va) y/o (Vb) como las definidas arriba, los elementos G, X y N, en particular la estructura central  $G_l X_m G_n$ , y los enteros a, l, m, n, u y v son como se han definido anteriormente. Muy preferiblemente, el entero a = 1. Opcionalmente u y/o v pueden ser 0.

20 Además, los elementos  $N_{w1}$  y  $N_{w2}$  adyacentes a los elementos tallo y lazo stem1 y stem2, representan elementos frontera adicionales, los cuales se definen como se describió arriba para los elementos frontera  $N_u$  y/o  $N_v$ . Particularmente, el elemento frontera N en general es como el descrito arriba para N en la fórmula (III) anterior, y los enteros  $w_1$  y  $w_2$  se seleccionan independientemente unos de otros y se definen como anteriormente en la fórmula (III) para los enteros u y/o v.

25 En este contexto, una estructura de tallo o tallo-lazo es un apareamiento de bases intramolecular que puede ocurrir en un ADN de una sola hebra o, más comúnmente en ARN. La estructura se conoce también como pasador o pasador-lazo. Ocurre cuando dos regiones de la misma molécula, por ejemplo elementos tallo y lazo stem1 o stem2, normalmente elementos de secuencia palindrómicos en las secuencias de ácido nucleico, forman pares de bases unos con otros, llevando a (una doble hélice que concluye en) un lazo no apareado. El lazo no apareado representa

así típicamente una región de ácido nucleico donde no existe o apenas existe una identidad u homología con la secuencia de stem1 y stem2 y, por ello, no es capaz del apareo de bases con ninguno de estos elementos tallo y lazo. La estructura en forma de paleta resultante es un bloque de construcción clave de muchas estructuras secundarias de ARN. La formación de una estructura tallo-lazo es entonces dependiente de la estabilidad de las regiones de hélice y lazo resultantes, donde el primer prerrequisito es típicamente la presencia de una secuencia que pueda doblarse sobre sí misma para formar una doble hélice apareada. La estabilidad de los elementos tallo-lazo apareados se determina por la longitud, el número de no coincidencias o protuberancias que contiene (un pequeño número de no coincidencias es típicamente tolerable, especialmente en una hélice larga) y la composición básica de la región apareada. Por ejemplo, apareamientos entre guanosina (guanina) y citidina (citosina) puede ser preferentes en estas secuencias, toda vez que tienen tres enlaces de hidrógeno y son más estables en comparación con los apareamientos adenosina (adenina)-uridina (uracilo), que sólo tienen dos. En ARN, los apareamientos guanosina (guanina)-uridina (uracilo) que incorporan dos enlaces de hidrógeno pueden ser entonces favorables. La estabilidad del lazo influencia también la formación de estructura de tallo-lazo. Los "lazos" (es decir, sólo el lazo que no contiene elementos tallo-lazo stem1 y stem2) que tienen menos de tres bases de longitud son estéricamente menos preferibles. Sin embargo, los tallos, es decir formaciones que no muestran lazo (definido) sino sólo una región no apareada entre stem1 y stem2, también pueden incluirse. En el contexto de la presente invención, una longitud de lazo óptima tiende a ser de aproximadamente 4-100 bases, en especial 4 a 50 o incluso 4 a 30 o incluso 4 a 20 bases.

Por consiguiente, en el contexto de una secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con cualquiera de las fórmula (Va) y/o (Vb), los elementos tallo y lazo stem1 y stem2 representan típicamente pares de un tallo o una estructura tallo-lazo, donde el tallo o la estructura de tallo-lazo puede formarse con elementos tallo-lazo stem1 y stem2, y un lazo puede formarse por una secuencia que se ubique entre estos elementos tallo-lazo. El tallo o tallo-lazo pueden tener la forma de una hélice en la región apareada en bases. Cada elemento tallo-lazo stem1 y stem2 preferentemente es un ácido nucleico como el definido arriba, en especial un ARN y en particular un ARN de una sola hebra, donde cualquiera de los nucleótidos (nucleósidos) o análogos como los definidos arriba para el elemento de estructura núcleo X pueden usarse como nucleótidos (nucleósidos) para stem1 y/o stem2. Además, el elemento tallo-lazo stem1 representa una secuencia palindrómica del elemento tallo-lazo stem2. Por tanto, preferentemente ambas secuencias son capaces de formar pares de bases unas con otras y de esta manera forman juntas la base para un tallo o tallo-lazo.

Por tanto, los elementos tallo-lazo stem1 o stem2 pueden seleccionarse por pares a partir de cualquier secuencia de ácido nucleico, siempre y cuando los elementos tallo-lazo stem1 o stem2 sean palindrómicos entre sí, es decir que una secuencia sea igual a la otra secuencia (complementaria) leída hacia atrás o que muestra una identidad u homología con esta secuencia de al menos un 90%, en especial de al menos un 95% y en particular de al menos un 99% con la otra secuencia, cuando se lea hacia atrás. Estas secuencias palindrómicas stem1 o stem2 pueden formarse en cada caso con una secuencia de ácido nucleico que tenga una longitud de alrededor de 5 a 50, muy preferiblemente alrededor de 5 a 40 y en especial alrededor de 5 a 30 ácidos nucleicos, seleccionados de adenosina (adenina), guanosina (guanina), citidina (citosina), uridina (uracilo), timidina (timina), o un análogo de los mismos como los aquí definidos.

Secuencias ejemplo para los elementos de tallo-lazo stem1 o stem2 pueden incluir, por ejemplo:

40 a) para stem1:

UAGCGAAGCUCUUGGACCUA (SEQ ID NO: 95)

para stem2:

UAGGUCCAAGAGCUUCGCUA (SEQ ID NO: 96)

b) para stem1:

45 UAGGUCCAAGAGCUUCGCUA (SEQ ID NO: 96)

para stem2:

UAGCGAAGCUCUUGGACCUA (SEQ ID NO: 95)

c) para stem1:

GCCGCGGGCCG (SEQ ID NO: 97)

50 para stem2:

CGGCCGCGGC (SEQ ID NO: 98)

d) para stem1:

CGGCCGCGGC (SEQ ID NO: 98)

para stem2:

55 GCCGCGGGCCG (SEQ ID NO: 97)

- e) para stem1:  
 GACACGGUGC (SEQ ID NO: 99)  
 para stem2:  
 GCACCGUGCA (SEQ ID NO: 100)
- 5 f) para stem1:  
 GCACCGUGCA (SEQ ID NO: 100)  
 para stem2:  
 GACACGGUGC (SEQ ID NO: 99)
- 10 g) para stem1:  
 ACCUAGGU (SEQ ID NO: 101)  
 para stem2:  
 ACCUAGGU (SEQ ID NO: 101)
- h) para stem1:  
 UGGAUCCA (SEQ ID NO: 102)
- 15 para stem2:  
 UGGAUCCA (SEQ ID NO: 102)
- i) para stem1:  
 CCUGC (SEQ ID NO: 103)  
 para stem2:  
 GCAGG (SEQ ID NO: 104)
- 20 j) para stem1:  
 GCAGG (SEQ ID NO: 105)  
 para stem2:  
 CCUGC (SEQ ID NO: 106)
- 25 etc.

De acuerdo con una primera alternativa, la estructura núcleo  $G_iX_mG_n$  puede ubicarse dentro de la estructura tallo-lazo, es decir, la estructura núcleo  $G_iX_mG_n$  puede ubicarse entre elementos tallo-lazo stem1 y stem2, preferentemente formando un lazo. Esta molécula de ácido nucleico es parecida a la fórmula (Va), con la composición  $(N_u \text{ stem1 } G_iX_mG_n \text{ stem2 } N_v)_a$ , como la definida arriba. Cuando  $u$  y/o  $v = 0$ , y  $a = 1$ , la fórmula (Va) puede llevar a una molécula de ácido nucleico específica "stem1  $G_iX_mG_n$  stem2", la cual también está incorporada en la presente invención.

De acuerdo con otra alternativa, la estructura núcleo  $G_iX_mG_n$  se puede ubicar fuera de la estructura tallo-lazo, donde igualmente elementos tallo-lazo stem1 y stem2 pueden estar separados unos de otros por una secuencia, preferentemente por un elemento frontera N, por ejemplo,  $N_{w1}$  y  $N_{w2}$ , los cuales pueden formar entonces una estructura lazo después del apareo de bases de los elementos tallo-lazo stem1 y stem2. Además, los elementos tallo-lazo 1 y/o 1, adyacentes a la estructura núcleo  $G_iX_mG_n$  se pueden separar de la estructura núcleo  $G_iX_mG_n$  mediante un elemento frontera adicional, por ejemplo  $N_{w1}$  o  $N_{w2}$ . De acuerdo con la presente invención, este ácido nucleico es similar a la fórmula (Vb), que tiene la composición  $N_u G_iX_mG_n N_v$  stem1  $N_{w1}$  stem2  $N_{w2}$ , como la definida arriba.

La secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (Va) y/o (Vb) puede ser de una sola hebra, o parcialmente de doble hebra. Cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (Va) y/o (Vb) es una molécula de ácido nucleico de una sola hebra, la secuencia es típicamente de una sola hebra en su longitud completa. Cuando la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (Va) y/o (Vb) es una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, la molécula de ácido nucleico de la fórmula (Va) y/o (Vb) puede ser de preferencia de una sola hebra en la región de los elementos tallo-lazo stem1 y stem2 y en las regiones del lazo formado por la estructura núcleo  $G_iX_mG_n$  o por cualquier otro elemento, por ejemplo  $N_{w1}$  o  $N_{w2}$ . Los elementos fuera de los elementos tallo-lazo stem1 y stem2 y en las regiones del lazo formado por la estructura núcleo  $G_iX_mG_n$  o por cualquier otro elemento, por ejemplo  $N_{w1}$  o  $N_{w2}$ , pueden ser entonces, independientemente unos de otros, de una sola o de doble hebra. Alternativa o adicionalmente una mezcla de una molécula de ácido nucleico de una sola hebra o parcialmente de doble hebra de acuerdo con la fórmula (Va) o (Vb) y una molécula de ácido nucleico

(parcialmente) de doble hebra de acuerdo con la fórmula (Va) o (Vb), preferentemente en una relación de aproximadamente 1:10 a 10:1, muy preferiblemente en una relación de 1:3 a 3:1.

De acuerdo con una realización muy particularmente preferente, la secuencia inmunoestimuladora de acuerdo con la fórmula (Va) y/o (Vb), respectivamente, se puede seleccionar por ejemplo de cualquiera de las siguientes secuencias:

- UAGCGAAGCU CUUGGACCUA **GG UUUUU UUUUU UUUUU GGG** UAGGUCCAAG AGCUUCGCUA  
(SEQ ID NO: 107)

- UAGCGAAGCU CUUGGACCUA **GG UUUUU UUUUU UUUUU GGG** UGCGUCCUA GAAGUACACG  
GCCGCGGGCCG UGCGUCCUA GAAGUACACG CGGCCCGCGC UGCGUCCUA GAAGUACACG  
(SEQ ID NO: 108)

(stem1 y stem2 están subrayados, la estructura núcleo  $G_nX_mG_n$  está escrita en negrita).

La secuencia inmunoestimuladora de fórmula (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) definidas, es típicamente un ácido nucleico, que puede estar en forma de cualquier ADN o ARN, preferentemente, sin estar limitado a éstos, un ADN o ARN circular o lineal, un ADN o ARN de una sola o de doble hebra (el cual también puede ser considerado como un ADN o ARN debido a la asociación no covalente de dos moléculas de ADN o ARN de una sola hebra) o un ADN o ARN parcialmente de doble hebra (el cual se forme típicamente por una molécula de ADN o ARN de una sola hebra más larga y por lo menos una más corta o por al menos dos moléculas de ADN o ARN de una sola hebra, las cuales tienen una longitud casi igual, donde una o más moléculas de ADN o ARN de una sola hebra son en parte complementarias a una o más de otras moléculas de ADN o ARN de una sola hebra y forman entonces un ARN de doble hebra en esta región), por ejemplo un ADN o ARN (parcialmente) de una sola hebra mezclado con regiones de un ADN o ARN (parcialmente) de doble hebra. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico de fórmula (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa) y/o (IVb) antes definidas pueden estar en forma de un ADN o ARN de una sola o de doble hebra, en especial un ADN o ARN parcialmente de doble hebra. También se prefiere que la secuencia inmunoestimuladora de fórmula (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) como la definida está en forma de una mezcla de ADN o ARN de una sola hebra o de doble hebra.

Es particularmente ventajoso que la secuencia inmunoestimuladora de fórmula (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb), definidas arriba, sea una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, ya que esta secuencia inmunoestimuladora (parcialmente de doble hebra) de acuerdo con las fórmulas (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) como las definidas arriba, puede estimular positivamente la respuesta inmune innata en un paciente a ser tratado, al dirigirse a los receptores de PAMP (patrón molecular asociado a patógenos) para ARN de una sola hebra (TLR-7 y TLR-8) así como a los receptores PAMP para ARN de doble hebra (TLR-3, RIG-I y MDA-5). Los receptores TLR-3, TLR-7 y TLR-8 se ubican en el endosoma y son activados por ARN asimilado por el endosoma. En contraste, RIG-1 y MDA-5 son receptores citoplásmicos, los cuales son activados por ARN, el cual se toma directamente del citoplasma o ha sido liberado de los endosomas (liberación endosómica o escape endosómico). En consecuencia, cualquier secuencia inmunoestimuladora parcialmente de doble hebra de fórmula (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) como la definida arriba es capaz de activar diferentes cascadas de señales de inmunoestimulación y lleva entonces a una respuesta inmune innata o incrementa esta respuesta significativamente.

Las moléculas de ácido nucleico de fórmulas (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) como las definidas arriba se pueden preparar usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos, por ejemplo síntesis en fase sólida, así como métodos *in vivo*, como reacciones de transcripción *in vitro*. Preferentemente, se emplea una transcripción *in vitro* para la preparación de las secuencias inmunoestimuladoras. Como se encontró sorprendentemente por los inventores de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico de las fórmulas (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) como las definidas arriba muestran una estimulación todavía mejor del sistema inmunológico innato cuando se preparan por transcripción *in vitro* gracias a su 5'-fosfato en comparación con las moléculas de ácido nucleico de fórmulas (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) preparadas por métodos sintéticos. Esta estimulación del sistema inmunológico innato contribuye, sin limitarse a los mismos, activación del receptor RIG-1. En consecuencia, las moléculas de ácido nucleico de fórmulas (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) como las definidas arriba son particularmente preferentes cuando se preparan mediante una reacción de transcripción *in vitro*.

Además, (clases de) moléculas de ARN que se pueden usar para el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden incluir cualquier otro ARN capaz de desarrollar una respuesta inmune. Sin ser limitados a los mismos, este ARN inmunoestimulador puede incluir ARN ribosómico (ARNr), ARN transferente (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y ADN viral (ARNv).

De acuerdo con una tercera realización, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser un ARNsi. Un ARNsi es de interés particular en relación con el fenómeno de la interferencia de ARN. Debe prestarse atención al fenómeno de la interferencia de ARN en el

transcurso de una investigación inmunológica. En los últimos años se ha descubierto un mecanismo de defensa a base de ARN que ocurre tanto en el reino de los hongos como en el reino vegetal y animal y actúa como un “sistema inmunológico del genoma”. El sistema fue originalmente descrito en varias especies independientemente unas de otras, primero en *C. elegans*, antes era posible identificar los mecanismos subyacentes de los procesos como idénticos: resistencia a virus mediada por ARN en plantas, PTGS (silenciamiento de genes después de la transcripción) en plantas e interferencia de ARN en eucariontes se basan en consecuencia en un procedimiento común. La técnica *in vitro* de interferencia de ARN (ARNi) se basa en moléculas de ARN de doble hebra (ARNds) que desencadenan la supresión específica de secuencia de la expresión génica (Zamore (2001) Nat. Struct. Biol. 9: 746-750; Sharp (2001) Genes Dev. 5:485-490; Hannon (2002) Nature 41:244-251). En la transfección de células de mamífero con ARNds largo, la activación de la proteína quinasa R y la ARNasaL causa efectos inespecíficos, por ejemplo una respuesta a interferón (Stark y col. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67:227-264; He y Katze (2002) Viral Immunol. 15: 95-119). Recientemente se han usado también moléculas de ARNds *in vivo* (McCaffrey y col. (2002), Nature 418:38-39; Xia y col. (2002), Nature Biotech. 20:1006-1010; Brummelkamp y col. (2002), Cancer Cell 2:243-247). Así, un ARNsi usado para el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser un ARN inmunoestimulador y comprende típicamente una secuencia de ARN (de una sola) o de doble hebra, preferentemente de doble hebra, con aproximadamente 8 a 30 nucleótidos, de preferencia 17 a 25 nucleótidos, en especial de 20 a 25 y en particular de 21 a 23 nucleótidos. En principio, todas las secciones que tienen una longitud de 17 a 29, de preferencia de 19 a 25, en especial de 21 a 23 pares de bases que ocurren en la región de codificación de una secuencia de ARN como la mencionada arriba pueden servir como secuencia diana para este ARNsi. Igualmente, las moléculas de ARNsi también pueden dirigirse contra secuencias de nucleótidos de una proteína, en particular de proteínas reguladoras, que regulan negativamente la inducción de una respuesta inmune (innata o adaptiva), que no se caen en la región de codificación, en particular en la región no codificante 5' del ARN, por ejemplo, por tanto contra regiones no codificantes de un ARN de función reguladora. La secuencia diana del ARNsi usada como el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede por tanto caer en la región traducida y/o no traducida de la secuencia de nucleótidos de esta proteína como se define arriba y/o en la región de sus elementos de control. La secuencia diana de un ARNsi como se define arriba también puede caer en la región de superposición de secuencia no traducida y traducida; en particular, la secuencia diana puede comprender al menos un nucleótido aguas arriba del triplete de inicio de la región codificante del ARN.

De acuerdo con una cuarta realización, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser un ARN antisentido. En el contexto de la presente invención, un ARN antisentido es preferentemente una molécula de ARN (de una sola hebra) transcrita fuera de la hebra de codificación, en lugar de la de plantilla, de un ADN, por lo que (de preferencia) la secuencia de ARNm de antisentido (completa) es complementaria al ARN sentido (mensajero). Un ARN antisentido como el aquí definido forma típicamente un dúplex entre las moléculas de ARN sentido y antisentido y es así capaz de bloquear la transcripción de la hebra codificadora. Un ARN antisentido usado como el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede dirigirse contra las secuencias de nucleótidos, por ejemplo un ARN(m) (de origen natural) o una secuencia genómica que codifique para una proteína o péptido, que puede seleccionarse de cualquier secuencia de proteínas o péptidos adecuadas para ese propósito. De preferencia, el ARN antisentido aquí empleado como el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención comprende una longitud como la definida arriba en general para las moléculas de ARN, en especial una longitud de 1.000 a 5000, de 500 a 5.000, de 5 a 5.000, o de 5 a 1.000, 5 a 500, 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

De acuerdo con una quinta realización, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser un ARN de codificación. Este ARN de codificación puede ser cualquier ARN como el definido arriba. De preferencia, este ARN de codificación puede ser un ARN de una sola o de doble hebra, muy preferiblemente un ARN de una sola hebra y/o un ARN circular o lineal, en especial un ARN lineal. Todavía más preferiblemente, el ARN de codificación puede ser un ARN de una sola hebra (lineal). De manera especialmente preferente, el ARN de codificación puede ser un ARN mensajero (ARN(m)) de una sola hebra (lineal). El ARN de codificación usado como el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar además para una proteína o un péptido, el cual puede seleccionarse, sin restringirse a los mismos, por ejemplo de entre proteínas o péptidos terapéuticamente activos, antígenos, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos patogénicos (por ejemplo, seleccionados de proteínas patogénicas como las definidas arriba o de antígenos animales, antígenos virales, antígenos protozoarios, antígenos bacterianos, antígenos alérgicos), antígenos autoinmunes o antígenos adicionales, de alérgenos, anticuerpos, proteínas o péptidos inmunoestimuladores, receptores de células T específicos de antígenos o de cualquier otra proteína o péptido adecuada para una aplicación (terapéutica) específica, donde el ARN de codificación usado como el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser transformado en una célula, un tejido o un organismo y la proteína se puede expresar subsecuentemente en esta célula, tejido u organismo.

#### a) Proteínas terapéuticamente activas

En este contexto, las proteínas terapéuticamente activas codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora se pueden seleccionar de cualquier proteína recombinante o

aislada de origen natural conocida por el experto en la técnica. Sin limitarse a las mismas, las proteínas terapéuticamente activas pueden comprender proteínas, capaces de estimular o inhibir la transducción de señales en la célula, por ejemplo citoquinas, anticuerpos, etc. Las proteínas terapéuticamente activas pueden así comprender citoquinas de clase I de la familia de las citoquinas que tengan 4 residuos de cisteína conservados posicionalmente (CCCC) y que comprendan un motivo de secuencia conservado Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS), donde X es un aminoácido no conservado. Las citoquinas de la clase I de la familia de las citoquinas comprenden la subfamilia GM-CSF, por ejemplo IL-3, IL-5, GM-CSF, la subfamilia IL-6, por ejemplo IL-6, IL-11, IL-12 o la subfamilia IL-2, por ejemplo IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, etc., o las citoquinas IL-1alfa, IL-1beta, IL-10, etc. Las proteínas terapéuticamente activas también pueden comprender citoquinas de la clase II de la familia de citoquinas, las cuales comprenden también cuatro residuos de cisteína conservados posicionalmente (CCCC), pero sin motivo de secuencia Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) conservado. Las citoquinas de la clase II de la familia de citoquinas comprenden por ejemplo IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, etc. Las proteínas terapéuticamente activas pueden comprender además citoquinas de la familia de los factores de necrosis tumoral, por ejemplo TNF-alfa, TNF-beta, etc., o citoquinas de la familia de las quimioquinas, las cuales comprenden 7 hélices de transmembrana e interactúan con proteína G, por ejemplo IL-8, MIP-1, RANTES, CCR5, CXCR4, etc., o receptores específicos de citoquinas, tales como TNF-RI, TNF-RII, CD40, OX40 (CD134), Fas.

Las proteínas terapéuticamente activas codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención también pueden seleccionarse de proteínas recombinantes, incluyendo proteínas seleccionadas del grupo consistente en 0ATL3, 0FC3, 0PA3, 0PD2, 4-1BBL, 5T4, 6Ccina, 707-AP, 9D7, A2M, AA, AAAS, AACT, AASS, ABAT, ABCA1, ABCA4, ABCB1, ABCB11, ABCB2, ABCB4, ABCB7, ABCC2, ABCC6, ABCC8, ABCD1, ABCD3, ABCG5, ABCG8, ABL1, ABO, ABR ACAA1, ACACA, ACADL, ACADM, ACADS, ACADVL, ACAT1, ACCPN, ACE, ACHE, ACHM3, ACHM1, ACLS, ACPI, ACTA1, ACTC, ACTN4, ACVRL1, AD2, ADA, ADAMTS13, ADAMTS2, ADFN, ADH1B, ADH1C, ADLHD3A2, ADRB2, ADRB3, ADSL, AEZ, AFA, AFD1, AFP, AGA, AGL, AGMX2, AGPS, AGS1, AGT, AGTR1, AGXT, AH02, AHCY, AHDS, AHHR, AHSG, AIC, AIED, AIH2, AIH3, AIM-2, AIPL1, AIRE, AK1, ALAD, ALAS2, ALB, HPG1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH1A1, ALDOA, ALDOB, ALMS1, ALPL, ALPP, ALS2, ALX4, AMACR, AMBP, AMCD, AMCD1, AMCN, AMELX, AMELY, AMGL, AMH, AMHR2, AMPD3, AMPD1, AMT, ANC, ANCR, ANK1, ANOP1, AOM, AP0A4, APOC2, APOC3, AP3B1, APC, aPKC, APOA2, APOA1, APOB, APOC3, APOC2, APOE, APOH, APP, APRT, APS1, AQP2, AR, ARAF1, ARG1, ARHGEF12, ARMET, ARSA, ARSB, ARSC2, ARSE, ART-4, ARTC1/m, ARTS, ARVD1, ARX, AS, ASAH, ASAT, ASD1, ASL, ASMD, ASMT, ASNS, ASPA, ASS, ASSP2, ASSP5, ASSP6, AT3, ATD, ATHS, ATM, ATP2A1, ATP2A2, ATP2C1, ATP6B1, ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ATPSK2, ATRX, ATXN1, ATXN2, ATXN3, AUTS1, AVMD, AVP, AVPR2, AVSD1, AXIN1, AXIN2, AZF2, B2M, B4GALT7, B7H4, BAGE, BAGE-1, BAX, BBS2, BBS3, BBS4, BCA225, BCAA, BCH, BCHE, BCKDHA, BCKDHB, BCL10, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCPM, BCR, BCR/ABL, BDC, BDE, BDMF, BDMR, BEST1, beta-Catenina/nn, BF, BFHD, BFIC, BFLS, BFSP2, BGLAP, BGN, BHD, BHR1, BING-4, BIRC5, BJS, BLM, BLMH, BLNK, BMPR2, BPGM, BRAF, BRCA1, BRCA1/m, BRCA2, BRCA2/m, BRCD2, BRCD1, BRDT, BSCL, BSCL2, BTAA, BTB, BTK, BUB1, BWS, BZX, COL2A1, COL6A1, C1NH, C1QA, C1QB, C1QG, C1S, C2, C3, C4A, C4B, C5, C6, C7, C7orf2, C8A, C8B, C9, CA125, CA15-3/CA 27-29, CA195, CA19-9, CA72-4, CA2, CA242, CA50, CABYR, CACD, CACNA2D1, CACNA1A, CACNA1F, CACNA1S, CACNB2, CACNB4, CAGE, CA1, CALB3, CALCA, CALCR, CALM, CALR, CAM43, CAMEL, CAP-1, CAPN3, CARD15, CASP-5/m, CASP-8, CASP-8/m, CASR, CAT, CATM, CAV3, CB1, CBBM, CBS, CCA1, CCAL2, CCAL1, CCAT, CCL-1, CCL-11, CCL-12, CCL-13, CCL-14, CCL-15, CCL-16, CCL-17, CCL-18, CCL-19, CCL-2, CCL-20, CCL-21, CCL-22, CCL-23, CCL-24, CCL-25, CCL-27, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-7, CCL-8, CCM1, CCNB1, CCND1, CCO, CCR2, CCR5, CCT, CCV, CCZS, CD1, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD27L, cD3, CD30, CD30, CD3OL, CD33, CD36, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD40, CD4OL, CD44, CD44v, CD44v6, CD52, CD55, CD56, CD59, CD80, CD86, CDAN1, CDAN2, CDAN3, CDC27, CDC27/m, CDC2L1, CDH1, CDK4, CDK4/m, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2A/m, CDKN1A, CDKN1C, CDL1, CDPD1, CDR1, CEA, CEACAM1, CEACAM5, CEACR, CEACR9, CEPA, CETP, CFNS, CFTR, CGF1, CHAC, CHED2, CHED1, CHEK2, CHM, CHML, CHR39C, CHRNA4, CHRNA9, CHRNB1, CHRNE, CHS, CHS1, CHST6, CHX10, CIAS1, CIDX, CKN1, CLA2, CLA3, CLA1, CLCA2, CLCN1, CLCN5, CLCNKB, CLDN16, CLP, CLN2, CLN3, CLN4, CLN5, CLN6, CLN8, C1QA, C1QB, C1QG, C1R, CLS, CMCWTD, CMDJ, CMD1A, CMD1B, CMH2, MH3, CMH6, CMKBR2, CMKBR5, CML28, CML66, CMM, CMT2B, CMT2D, CMT4A, CMT1A, CMTX2, CMTX3, C-MYC, CNA1, CND, CNGA3, CNGA1, CNGB3, CNSN, CNTF, COA-1/m, COCH, COD2, COD1, COH1, COL10A, COL2A2, COL11A2, COL17A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL7A1, COL8A2, COL9A2, COL9A3, COL11A1, COL1A2, COL23A1, COL1A1, COLQ, COMP, COMT, CORD5, CORD1, COX10, COX-2, CP, CPB2, CPO, CPP, CPS1, CPT2, CPT1A, CPX, CRAT, CRB1, CRBM, CREBBP, CRH, CRHBP, CRS, CRV, CRX, CRYAB, CRYBA1, CRYBB2, CRYGA, CRYGC, CRYGD, CSA, CSE, CSF1R, CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, CSF1R, CST3, CSTB, CT, CT7, CT-9/BRD6, CTAA1, CTACK, CTEN, CTH, CTHM, CTLA4, CTM, CTNBN1, CTNS, CTPA, CTSB, CTSC, CTSK, CTSL, CTS1, CUBN, CVD1, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CYB5, CYBA, CYBB, CYBB5, CYFRA 21-1, CYLD, CYLD1, CYMD, CYP11B1, CYP11B2, CYP17, CYP17A1, CYP19, CYP19A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP21A2, CYP27A1, CYP27B1, CYP2B6, CYP2C, CYP2C9, CYP2D, CYP2D6, CYP2D7P1, CYP3A4, CYP7B1, CYPB1, CYP11B1, CYP1A1, CYP1B1, CYRAA, D40, DADI, DAM, DAM-10/MAGE-B1, DAM-6/MAGE-B2, DAX1, DAZ, DBA, DBH, DBI, DBT, DCC, DC-CK1, DCK, DCR, DCX, DDB 1, DDB2, DDIT3, DDU, DECR1, DEK-CAN, DEM, DES, DF, DFN2, DFN4, DFN6, DFN4, DFN5, DFN5, DFN5, DGCR, DHCR7, DHFR, DHOF, DHS, DIA1, DIAPH2, DIAPH1, DIH1, DIO1, DISCI, DKC1, DLAT, DLD, DLL3, DLX3, DMBT1, DMD, DM1, DMPK,

DMWD, DNAI1, DNASE1, DNMT3B, DPEP1, DPYD, DPYS, DRD2, DRD4, DRPLA, DSCR1, DSG1, DSP, DSPP, DSS, DTD2, DTR, DURS1, DWS, DYS, DYSF, DYT2, DYT3, DYT4, DYT2, DYT1, DYX1, EBAF, EBM, EBNA, EBP, EBR3, EBS1, ECA1, ECB2, ECE1, ECGF1, ECT, ED2, ED4, EDA, EDAR, ECA1, EDN3, EDNRB, EEC1, EEF1A1 L14, EEGV1, EFEMP1, EFTUD2/m, EGFR, EGFR/Her1, EGI, EGR2, EIF2AK3, eIF4G, EKV, EI IS, ELA2, ELF2, ELF2M, ELK1, ELN, ELONG, EMD, EML1, EMMPRIN, EMX2, ENA-78, ENAM, END3, ENG, ENO1, ENPP1, ENUR2, ENUR1, EOS, EP300, EPB41, EPB42, EPCAM, EPD, EphA1, EphA2, EphA3, EfrinaA2, EfrinaA3, EPHX1, EPM2A, EPO, EPOR, EPX, ERBB2, ERCC2 ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERVR, ESR1, ETFA, ETFB, ETFDH, ETM1, ETV6-AML1, ETV1, EVC, EVR2, EVR1, EWSR1, EXT2, EXT3, EXT1, EYA1, EYCL2, EYCL3, EYCL1, EZH2, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2, F5, F5F8D, F7, F8, F8C, F9, FABP2, FAFL6, FAH, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCF, FasL, FBN2, FBN1, FBP1, FCG3RA, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCHL, FCMD, FCP1, FDP5L5, FECH, FEO, FEOM1, FES, FGA, FGB, FGD1, FGF2, FGF23, FGF5, FGFR2, FGFR3, FGFR1, FGG, FGS1, FH, FIC1, FIH, F2, FKBP6, FLNA, FLT4, FMO3, FMO4, FMR2, FMR1, FN, FN1/m, FOXC1, FOXE1, FOXL2, FOXO1A, FPDMM, FPF, Era-1, FRAXF, FRDA, FSHB, FSHMD1A, FSHR, FTH1, FTHL17, FTL, FTZF1, FUCA1, FUT2, FUT6, FUT1, FY, G250/CAIX, G6PC, G6PD, G6PT1, G6PT2, GAA, GABRA3, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GALC, GALE, GALK1, GALNS, GALT, GAMT, GAN, GAST, GASTRINA17, GATA3, GATA, GBA, GBE, GC, GCDH, GCGR, GCH1, GCK, GCP-2, GCS1, G-CSF, GCSH, GCSL, GCY, GDEP, GDF5, GDI1, GDNF, GDXY, GFAP, GFND, GGCX, GGT1, GH2, GH1, GHR, GHRHR, GHS, GIF, GINGF, GIP, GJA3, GJA8, GJB2, GJB3, GJB6, GJB1, GK, GLA, GLB, GLB1, GLC3B, GLC1B, GLC1C, GLDC, GLI3, GLP1, GLRA1, GLUD1, GM1 (fuc-GM1), GM2A, GM-CSF, GMPR, GNAI2, GNAS, GNAT1, GNB3, GNE, GNPTA, GNRH, GNRH1, GNRHR, GNS, GnT-V, gp100, GP1BA, GP1BB, GP9, GPC3, GPD2, GPDS1, GPI, GP1BA, GPN1LW, GPNUMB/m, GPSC, GPX1, GRHR, GRK1, GRO, GRO, GRO, GRPR, GSE, GSM1, GSN, GSR, GSS, GTD, GTS, GUCA1A, GUCY2D, GULOP, GUSB, GUSM, GUST, GYPA, GYPC, GYS1, GYS2, HOKPP2, HOMG2, HADHA, HADHB, HAGE, HAGH, HAL, HAST-2, HB1, HBA2, HBA1, HBB, HBBP1, HBD, HBE1, HBG2, HBG1, HBHR, HBP1, HBQ1, HBZ, HBZP, HCA, HCC-1, HCC-4, HCF2, HCG, HCL2, HCL1, HCR, HCVS, HD, HPN, HER2, HER2/NEU, HER3, HERV-K-MEL, HESX1, HEXA, HEXB, HF1, HFE, HF1, HGD, HHC2, HHC3, HHG, HK1 HLA-A, HLA-A\*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HLA-DPB1 HLA-DRA, HLCS, HLXB9, HMBS, HMGA2, HMGCL, HMI, HMN2, HMOX1, HMS1 HMW-MAA, HND, HNE, HNF4A, HOAC, HOMEBOX NKX 3.1, HOM-TE5-14/SCP-1, HOM-TE5-85, HOXA1 HOXD13, HP, HPC1, HPD, HPE2, HPE1, HPFH, HPFH2, HPRT1, HPS1, HPT, HPV-E6, HPV-E7, HR, HRAS, HRD, HRG, HRPT2, HRPT1, HRX, HSD11B2, HSD17B3, HSD17B4, HSD3B2, HSD3B3, HSN1, HSP70-2M, HSPG2, HST-2, HTC2, HTC1, hTERT, HTN3, HTR2C, HVBS6, HVBS1, HVEC, HV1S, HYAL1, HYR, 1-309, IAB, IBGC1, IBM2, ICAM1, ICAM3, iCE, ICHQ, ICR5, ICR1, ICS 1, IDDM2, IDDM1, IDS, IDUA, IF, IFNa/b, IFNGR1, IGAD1, IGER, IGF-1R, IGF2R, IGF1, IGH, IGHC, IGHG2, IGHG1, IGHM, IGHR, IGKC, IHG1, IHH, IKBK, IL1, IL-1 RA, IL10, IL-11, IL12, IL12RB1, IL13, IL-13Ra2, IL-15, IL-16, IL-17, IL18, IL-1a, IL-1 $\alpha$ , IL-1b, IL-1 $\beta$ , IL1RAPL1, IL2, IL24, IL-2R, IL2RA, IL2RG, IL3, IL3RA, IL4, IL4R, IL4R, IL-5, IL6, IL-7, IL7R, IL-8, IL-9, receptor de laminina inmaduro, IMP2L, INDX, INFGR1, INFGR2, INF $\alpha$ , IFN $\beta$ INF $\gamma$ , INS, INSR, INVS, IP-10, IP2, IPF1, IP1, IRF6, IRS1, ISCW, ITGA2, ITGA2B, ITGA6, ITGA7, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITIH1, ITM2B, IV, IVD, JAG1, JAK3, JBS, JBTS1, JMS, JPD, KAL1, KAL2, KALI, KLK2, KLK4, KCNA1, KCNE2, KCNE1, KCNH2, KCNJ1, KCNJ2, KCNJ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4, KCNQ1, KCS, KERA, KFM, KFS, KFSD, KHK, ki-67, KIAA0020, KIAA0205, KIAA0205/m, KIF1B, KIT, KK-LC-1, KLK3, KLKB1, KM-HN-1, KMS, KNG, KNO, K-RAS/nn, KRAS2, KREV1, KRT1, KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT14L1, KRT14L2, KRT14L3, KRT16, KRT16L1, KRT16L2, KRT17, KRT18, KRT2A, KRT3, KRT4, KRT5, KRT6 A, KRT6B, KRT9, KRTHB1, KRTHB6, KRT1, KSA, KSS, KVVE, KYNU, LOH19CR1, L1CAM, LAGE, LAGE-1, LALL, LAMA2, LAMA3, LAMB3, LAMB1, LAMC2, LAMP2, LAP, LCA5, LCAT, LCCS, LCCS 1, LCFS2, LCS1, LCT, LDHA, LDHB, LDHC, LDLR, LDLR/FUT, LEP, LEWISY, LGCR, LGGF-PBP, LGI1, LGMD2H, LGMD1A, LGMD1B, LHB, LHCGR, LHON, LHRH, LHX3, LIF, LIG1, LIMM, LIMP2, LIPA, LIPA, LIPB, LIPC, LIVIN, L1CAM, LMNA1, LMNA, LMX1B, LOLR, LOR, LOX, LPA, LPL, LPP, LQT4, LRP5, LRS 1, LSFC, LT-13, LTBP2, LTC4S, LYL1, XCL1, LYZ, M344, MA50, MAA, MADH4, MAFD2, MAFD1, MAGE, MAGE-AI, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGEB1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-EI, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, MGB1, MGB2, MAN2A1, MAN2B1, MANBA, MANBB, MAOA, MAOB, MAPK8IP1, MAPT, MART-1, MART-2, MART2/m, MAT1A, MBL2, MBP, MBS1, MC1R, MC2R, MC4R, MCC, MCCC2, MCCC1, MCDR1, MCF2, MCKD, MCL1, MC1R, MCOLN1, MCOP, MCOR, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCPH2, MCPH1, MCS, M-CSF, MDB, MDCR, MDM2, MDRV, MDS 1, ME1, MEI/m, ME2, ME20, ME3, MEAX, MEB, MEC CCL-28, MECP2, MEFV, MELANA, MELAS, MEN1 MSLN, MET, MF4, MG50, MG50/PXDN, MGAT2, MGAT5, MGC1 MGCR, MGCT, MGI, MGP, MHC2TA, MHS2, MHS4, MIC2, MIC5, MIDI, MIF, MIP, MIP-5/HCC-2, MITF, MJD, MKI67, MKKS, MKS1, MLH1, MLL, MLLT2, MLLT3, MLLT7, MLLT1, MLS, MLYCD, MMA1a, MMP 11, MMVP1, antígeno MN/CA IX, MNG1, MN1, MOC31, MOCS2, MOCS1, MOG, MORC, MOS, MOV18, MPD1, MPE, MPFD, MPI, MPIF-1, MPL, MPO, MPS3C, MPZ, MRE11A, MROS, MRP1, MRP2, MRP3, MRSD, MRX14, MRX2, MRX20, MRX3, MRX4, MRXA, MRX1, MS, M54A2, MSD, MSH2, MSH3, MSH6, MSS, MSSE, MSX2, MSX1, MTATP6, MTCO3, MTCO1, MTCYB, MTHFR, MTM1, MTMR2, MTND2, MTND4, MTND5, MTND6, MTND1, MTP, MTR, MTRNR2, MTRNR1, MTRR, MTTE, MTTG, MTTI, MTTK, M1TL2, MTTL1, MTTN, MTTP, MTTT1, MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUM-1, MUM-1/m, MUM-2, MUM-2/m, MUM-3, MUM-3/m, MUT, mutante p21 ras, MUTYH, MVK, MX2, MX11, MY05A, MYB, MYBPC3, MYC, MYCL2, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYMY, MY015A, MY01G, MY05A, MY07A, MYOC, Miosina/m, MYP2, MYP1, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, NAGA, NAGLU, NAMS, NAPP, NAT2, NAT, NBIA1, NBS1, NCAM, NCF2, NCF1, NDN, NDP, NDUFS4, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NEB, NEFH, NEM1, Neo-PAP, neo-PAP/m, NEU1, NEUROD1, NF2, NF1, NFYC/m, NGEP, NHS, NKS1, NKX2E, NM, NME1, NMP22, NMTC, NODAL, NOG, NOS3, NOTCH3, NOTCH1, NP, NPC2,

NPC1, NPHL2, NPHP1, NPHS2, NPHS1, NPM/ALK, NPPA, NQ01, NR2E3, NR3C1, NR3C2, NRAS, NRAS/m, NRL, NROB1, NRTN, NSE, NSX, NTRK1, NUMA1, NXF2, NY-001, NY-E501, NY-ESO-B, NY-LU-12, ALDOA, NYS2, NYS4, NY-SAR-35, NYS1, NYX, 0A3, 0A1, OAP, OASD, OAT, OCA1, OCA2, OCD1, OCRL, OCRL1, OCT, ODDD, ODT1, OFC1, OFD1, OGDH, OGT, OGT/m, OPA2, OPA1, OPD1, OPEM, OPG, OPN, OPN1LW, OPN1MW,

5 OPN1SW, OPPG, OPTB1, TTD, ORM1, ORP1, 0S-9, 0S-9/m, OSM LIE, OTC, OTOF, OTSC1, OXCT1, OYTES1, P15, P190 MINOR BCR-ABL, P2RY12, P3, P16, P40, P4HB, P-501, P53, P53/m, P97, PABPN1, PAFAH1B1, PAFAH1P1, PAGE-4, PAGE-5, PAH, PAI-1, PAI-2, PAK3, PAP, PAPP, PARK2, PART-1, PATE, PAX2, PAX3, PAX6, PAX7, PAX8, PAX9, PBCA, PBCRA1, PBT, PBX1, PBXP1, PC, PCBD, PCCA, PCCB, PCK2, PCK1, PCLD, PCOS1, PCSK1, PDB1, PDCN, PDE6A, PDE6B, PDEF, PDGFB, PDGFR, PDGFRL, PDHAI, PDR, PDX1, PECAM1,

10 PEE1, PE01, PEPD, PEX10, PEX12, PEX13, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PEX1, PF4, PFBI, PFC, PFKFB1, PFKM, PGAM2, PGD, PGK1, PGK1P1, PGL2, PGR, PGS, PHA2A, PHB, PHEX, PHGDH, PHKA2, PHKA1, PHKB, PHKG2, PHP, PHYH, PI, P13, PIGA, PIM1-KINASE, PIN1, PIP5K1B, PITX2, PITX3, PKD2, PKD3, PKD1, PKDTS, PKHD1, PKLR, PKP1, PKU1, PLA2G2A, PLA2G7, PLAT, PLEC1, PLG, PLI, PLOD, PLP1, PMEL17, PML, PMURARa, PMM2, PMP22, PMS2, PMS1, PNKD, PNLIP, POF1, POLA, POLH, POMC, PON2, PON1, PORC, POTE, POU1F1,

15 POU3F4, POU4F3, POU1F1, PPAC, PPARG, PPCD, PPGB, PPH1, PPKB, PPMX, PPD, PPD, PPP1R3A, PPP2R2B, PPT1, PRAME, PRB, PRB3, PRCA1, PRCC, PRD, PRDX5/m, PRF1, PRG4, PRKAR1A, PRKCA, PRKDC, PRKWNK4, PRNP, PROC, PRODH, PROM1, PROP1, PROS1, PRST, PRP8, PRPF31, PRPF8, PRPH2, PRPS2, PRPS1, PRS, PRSS7, PRSS1, PRTN3, PRX, PSA, PSAP, PSCA, PSEN2, PSEN1, PSG1, PSGR, PSM, PSMA, PSORS1, PTC, PTCH, PTCH1, PTCH2, PTEN, PTGS1, PTH, PTHR1, PTLAH, P1051, PTPN12, PTPNI I, PTPRK, PTPRK/m, PTS, PUJO, PVR, PVRL1, PWCR, PXE, PXMP3, PXR1, PYGL, PYGM, QDPR, RAB27A, RAD54B,

20 RAD54L, RAG2, RAGE, RAGE-1, RAG1, RAP1, RARA, RASA1, RBAF600/m, RB1, RBP4, RBP4, RBS, RCA1, RCAS1, RCCP2, RCD1, RCV1, RDH5, RDPA, RDS, RECQL2, RECQL3, RECQL4, REG1A, REHOBE, REN, RENBP, RENS1, RET, RFX5, RFXANK, RFXAP, RGR, RHAG, RHAMM/CD168, RHD, RHO, Rip-1, RLBP1, RLN2, RLN1, RLS, RMD1, RMRP, ROM1, ROR2, RP, RP1, RP14, RP17, RP2, RP6, RP9, RPD1, RPE65, RPGR,

25 RPGRIP1, RP1, RP10, RPS19, RPS2, RPS4X, RPS4Y, RPS6KA3, RRAS2, RS1, RSN, RSS, RU1, RU2, RUNX2, RUNXI, RWS, RYR1, S-100, SAA1, SACS, SAG, SAGE, SALL1, SARDH, SART1, SART2, SART3, SAS, SAX1, SCA2, SCA4, SCA5, SCA7, SCA8, SCA1, SCC, SCCD, SCF, SCLC1, SCN1A, SCN1B, SCN4A, SCN5A, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G, SCO2, SCP1, SCZD2, SCZD3, SCZD4, SCZD6, SCZD1, SDF-1a/f3 SDHA, SDHD, SDYS, SEDL, SERPENA7, SERPINA3, SERPINA6, SERPINA1, SERPINC1, SERPIND1, SERPINE1, SERPINF2,

30 SERPING1, SERPINI1, SFTPA1, SFTPB, SFTPC, SFTPD, SGCA, SGCB, SGCD, SGCE, SGM1, SGSH, SGY-1, SH2D1A, SHBG, SHFM2, SHFM3, SHFM1, SHH, SHOX, SI, SIAL, SIALYL LEWISX, SIASD, S11, SIM1, SIRT2/m, SIX3, SJS1, SKP2, SLC10A2, SLC12A1, SLC12A3, SLC17A5, SLC19A2, SLC22A1L, SLC22A5, SLC25A13, SLC25A15, SLC25A20, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC2A1, SLC2A2, SLC2A4, SLC3A1, SLC4A1, SLC4A4, SLC5A1, SLC5A5, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC7A7, SLC7A9, SLC11A1,

35 SLOS, SMA, SMAD1, SMAL, SMARCB1, SMAX2, SMCR, SMCY, SM1, SMN2, SMN1, SMPD1, SNCA, SNRPN, SOD2, SOD3, SOD1, SOS1, SOST, SOX9, SOX10, Spl 7, SPANXC, SPG23, SPG3A, SPG4, SPG5A, SPG5B, SPG6, SPG7, SPINK1, SPINK5, SPPK, SPPM, SPSMA, SPTA1, SPTB, SPTLC1, SRC, SRD5A2, SRPX, SRS, SRY,  $\beta$ hCG, SSTR2, SXX1, 55X2 (HOM-MEL-40/SXX2), SXX4, ST8, STAMP-1, STAR, STARP1, STATH, STEAP, STK2, STK11, STN/ KLH, STO, STOM, STS, SUOX, SURF1, SURVIVINA-2B, SYCP1, SYM1, SYN1, SYNS1, SYP,

40 SYT/SSX, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAAL6, TACSTD1, TACSTD2, TAG72, TAF7L, TAF1, TAGE, TAG-72, TALI, TAM, TAP2, TAP1, TAPVR1, TARC, TARP, TAT, TAZ, TBP, TBX22, TBX3, TBX5, TBXA2R, TBXAS1, TCAP, TCF2, TCF1, TCIRG1, TCL2, TCL4, TCL1A, TCN2, TC0F1, TCR, TCRA, TDD, TDFA, TDRD1, TECK, TECTA, TEK, TEUAML1, TELAB1, TEX15, TE, TFAP2B, TFE3, TFR2, TG, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ RE, TGF- $\gamma$ , TGF $\beta$ R1I, TGIF, TGM-4, TGM1, TH, THAS, THBD, THC, THC2, THM, THPO, THRA, THRB, TIMM8A, TIMP2,

45 TIMP3, TIMP1, TITF1, TKCR, TKT, TLP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLX1, TM4SF1, TM4SF2, TMC1, TMD, TMIP, TNDM, TNF, TNFRSF11A, TNFRSF1A, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TNNT3, TNNT2, TOC, TOP2A, TOP1, TP53, TP63, TPA, TPBG, TPI, TPI/m, TPI1, TPM3, TPM1, TPMT, TPO, TPS, TPTA, TRA, TRAG3, TRAPPC2, TRC8, TREH, TRG, TRH, TRIM32, TRIM37, TRP1, TRP2, TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, TRPS1, TS, TSC2, TSC3, TSC1, TSG101, TSHB, TSHR, TSP-180, TST,

50 TTGA2B, TTN, TTPA, TTR, TU M2-PK, TULP1, TWIST, TYH, TYR, TYROBP, TYROBP, TYRP1, TYS, UBE2A, UBE3A, UBE1, UCHL1, UFS, UGT1A, ULR, UMPK, UMPS, UOX, UPA, UQCRC1, UR05, UROD, UPK1B, UROS, USH2A, USH3A, USH1A, USH1C, USP9Y, UV24, VBCH, VCF, VDI, VDR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-1, VEGFR-2/FLK-1, VHL, VIM, VMD2, VMD1, VMGLOM, VNEZ, VNF, VP, VRNI, VWF, VWS, WAS, WBS2, WFS2, WFS1, WHCR, WHN, WISP3, WMS, WRN, WS2A, WS2B, WSN, WSS, VVT2, W13, WT1, VVTS, WWS, XAGE, XDH, XIC,

55 XIST, XK, XM, XPA, XPC, XRCC9, XS, ZAP70, ZFH1B, ZFX, ZFY, ZIC2, ZIC3, ZNF145, ZNF261, ZNF35, ZNF41, ZNF6, ZNF198 y ZWS1.

Además, las proteínas terapéuticamente activas pueden seleccionarse de factores apoptóticos o proteínas relacionadas con la apoptosis, incluyendo AIF, Apaf, por ejemplo Apaf-1, Apaf-2, Apaf-3, o APO-2 (L), APO-3 (L), Apopain, Bad, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>s</sub>, bik, CAD, Calpaína, Caspasa por ejemplo, Caspasa-1, Caspasa-2,

60 Caspasa-3, Caspasa-4, Caspasa-5, Caspasa-6, Caspasa-7, Caspasa-8, Caspasa-9, Caspasa-10, Caspasa-11, ced-3, ced-9, c-Jun, c-Myc, crm A, citocromo C, CdR1, DcR1, DD, DED, DISC, DNA-PKc<sub>5</sub>, DR3, DR4, DR5, FADD/MORT-1, FAK, Fas (Fas-ligando CD95/fas (receptor)), FLICE/MACH, FLIP, fodrina, fos, G-Actina, Gas-2, gelsolina, granzima A/B, ICAD, ICE, JNK, JNK, lamina A/B, MAP, MCL-1, Mdm-2, MEKK-1, MORT-1, NEDD, NF- $\kappa$ B, NuMa, p53, PAK-2, PARP, perforina, PITSLRE, PKC delta, pRb, presenilina, pRICE, RAIDD, Ras, RIP,

esfingomielinasa, timidinacinasas de herpes simple, TRADD, TRAF2, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, transglutaminasa, etc.

Una proteína terapéuticamente activa que puede ser codificada por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención también puede ser una proteína adyuvante. En este contexto, se entiende una proteína adyuvante preferentemente como cualquier proteína que es capaz de desarrollar una respuesta inmune innata como la aquí definida. De preferencia, esta respuesta inmune innata comprende la activación de un receptor de reconocimiento de patrones, por ejemplo un receptor seleccionado de la familia del receptor tipo Toll (TLR), incluyendo, por ejemplo, un receptor tipo Toll seleccionado de TLR1 a TLR10 humano o de receptores tipo Toll murinos TLR1 a TLR13. De preferencia, la respuesta inmune innata se desarrolla en un mamífero tal como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, la proteína adyuvante se selecciona de proteínas adyuvantes humanas o de proteínas de adyuvantes patógenas, en particular de proteínas adyuvantes bacterianas. Además, puede emplearse también ARNm que codifica para proteínas humanas implicadas en efectos adyuvantes.

Las proteínas adyuvantes humanas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención comprenden típicamente cualquier proteína humana capaz de desarrollar una respuesta inmune innata (en un mamífero), por ejemplo una reacción de unión de un ligando TLR exógeno a un TLR. Muy preferiblemente, las proteínas adyuvantes humanas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención se seleccionan del grupo consistente en, sin limitarse a, citoquinas que inducen o incrementan una respuesta inmune innata, incluyendo IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF y TNF-alfa; citoquinas que son liberadas de macrófagos, incluyendo IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF-alfa; de componentes del sistema de complemento incluyendo C1q, MBL, C1r, C1s, C2b, Bb, D, MASP-1, MASP-2, C4b, C3b, C5a, C3a, C4a, C5b, C6, C7, C8, C9, CR, CR2, CR3, CR4, C1qR, C1INH, C4bp, MCP, DAF, H, I, P y CD59; de proteínas que son componentes de las redes de señalización de los receptores de reconocimiento de patrones incluyendo TLR e IL-1R1, mientras que los componentes son ligandos de los receptores de reconocimiento de patrones incluyendo IL-1alfa, IL-1beta, beta-defensina, proteínas de choque térmico, tales como HSP10, HSP60, HSP65, HSP75 y HSP90, gp96, fibrinógeno, dominio extra de repetición TyplII A de fibronectina; los receptores, incluyendo IL-TR1, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11; los transductores de señales incluyendo componentes de la señalización de GTPasas pequeñas (RhoA, Ras, Rac1, Cdc42, etc.), componentes de la señalización de PIP (P13K, Src-cinasa, etc.), componentes de la señalización dependiente de MyD88 (MyD88, IRAK1, IRAK2, etc.), componentes de la señalización independiente de MyD88 (TICAM1, TICAM2, etc.); factores de transcripción activados incluyendo, por ejemplo NF- $\kappa$ B, c-Fos, c-Jun, c-Myc; y genes objetivo inducidos incluyendo, por ejemplo IL-1 alfa, IL-1 beta, Beta-Defensina, IL-6, IFN gama, IFN alfa e IFN beta; a partir de moléculas co-estimuladoras, incluyendo CD28 o ligando CD40 o PD1; dominios de proteínas, incluyendo LAMP; proteínas de superficie celular; o proteínas adyuvantes humanas incluyendo CD80, CD81, CD86, tríf, ligando flt-3, timopentina, Gp96 o fibronectina, etc., o cualquier especie homóloga de cualquiera de las proteínas adyuvantes humanas anteriores.

Las proteínas adyuvantes patógenas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención comprenden típicamente cualquier proteína patógena (adyuvante) capaz de desarrollar una respuesta inmune innata (en un mamífero), muy preferiblemente seleccionadas de proteínas patógenas (adyuvantes) derivadas de bacterias, protozoos, virus u hongos, animales, etc., y aún más preferiblemente de proteínas adyuvantes patógenas seleccionadas del grupo consistente en, sin limitarse a, proteínas bacterianas, proteínas protozoarias (por ejemplo, profilina – tales como proteína de *Toxoplasma gondii*), proteínas virales o proteínas fúngicas, proteínas animales, etc.

En este contexto, las proteínas bacterianas (adyuvantes) que pueden ser codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden comprender cualquier proteína bacteriana capaz de desarrollar una respuesta inmune innata (de preferencia en un mamífero) o muestre carácter adyuvante. Muy preferiblemente, las proteínas bacterianas (adyuvantes) se seleccionan del grupo consistente en proteínas de choque térmico bacterianas o chaperones, incluyendo Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100; OmpA (proteína de membrana Exterior) de bacterias gram-negativas; porinas bacterianas, incluyendo OmpF; toxinas bacterianas, incluyendo toxina de pertussis (PT) de *Bordetella pertussis*, toxina de adenilato ciclasa de pertussis CyaA y CyaC de *Bordetella pertussis*, mutante PT-9K/129G de toxina de pertussis, toxina de adenilato ciclasa de pertussis CyaA y CyaC de *Bordetella pertussis*, toxina de tétanos, toxina de cólera (CT), subunidad B de toxina de cólera, mutante CTK63 de toxina de cólera, mutante CTE112K de CT, enterotoxina lábil a calor *Escherichia coli* (LT), subunidad B de enterotoxina lábil a calor (LTB), mutantes de enterotoxina lábil a calor de *Escherichia coli* con toxicidad reducida, incluyendo LTK63, LTR72; modulina soluble en fenol; proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP) de *Helicobacter pylori*, proteína tensoactiva D; proteína de superficie exterior A lipoproteína de *Borrelia burgdorferi*, Ag38 (antígeno de 38 kDa) de *Mycobacterium tuberculosis*; proteínas de fimbrias bacterianas; enterotoxina CT de *Vibrio cholerae*, Pilina de pelos de bacterias gram negativas, y proteína tensoactiva A; etc., o cualquier homólogo de especie de cualquiera de las proteínas (adyuvantes) bacterianas anteriores.

Las proteínas bacterianas (adyuvantes) que pueden ser codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención también pueden seleccionarse de proteínas adyuvantes bacterianas, aún más preferiblemente del grupo consistente en, sin limitarse a, flagelinas bacterianas, incluyendo flagelinas de organismos que incluyen *Agrobacterium*, *Aquifex*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bartonella*,

5 *Bordetella*, *Borrelia*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Caulobacte*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Helicobacter*,  
*Lachnospiraceae*, *Legionella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Roseburia*, *Salmonella*,  
*Serpulina*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio*, *Wolinella*, *Yersinia*, muy preferiblemente flagelinas de las especies,  
10 sin ser limitadas a éstas, *Agrobacterium tumefaciens*, *Aquifex pyrophilus*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*,  
*Bacillus thuringiensis*, *Bartonella bacilliformis*, *Bordetella bronchi septica*, *Borrelia burgdorferi*, *Burkholderia cepacia*,  
*Campylobacter jejuni*, *Caulobacter crescentus*, *Clostridium botulinum strain Bennett clon 1*, *Escherichia coli*,  
*Helicobacter pylori*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*,  
*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Roseburia*  
15 *cecicola*, *Roseburia hominis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella bongori*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*,  
*Serpulina hyodysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Treponema phagedenis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*,  
*Vibrio parahaemolyticus*, *Wolinella succinogenes* y *Yersinia enterocolitica*.

De forma especialmente preferente, las flagelinas bacterianas que pueden ser codificadas por el al menos un  
ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención comprenden una  
15 secuencia seleccionada del grupo que comprende cualquiera de las siguientes secuencias referidas por sus  
números de registro:

organismo	especie	nombre del gen	No. de registro	GI No
<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	FlaD (flaD) FlhB (flhB) FliG (fliG) FliN (fliN) FliM (fliM) MotA (motA) FlgF (flgF) FliI (fliI) FlgB (flgB) FlgC (flgC) FliE (fliE) FlgG (flgG) FlgA (flgA) FlgI (flgI) FlgH (flgH) FliL (fliL) FliP (fliP) FlaA (flaA) FlaB (flaB) FlaC (flaC)	U95165	GI:14278870
<i>Aquifex</i>	<i>Aquifex pyrophilus</i>		U17575	GI:596244
<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	Laf1	U26679	GI:1173509
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	hag	AB033501	GI:14278870
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	flab	X67138	GI:46019718
<i>Bartonella</i>	<i>Bartonella bacilliformis</i>		L20677	GI:304184
<i>Bordetella</i>	<i>Bordetella</i>	flaA	L13034	GI:289453

	<i>bronchiseptica</i>			
<i>Borrelia</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>		X16833	GI:39356
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	fliC	AF011370	GI:2935154
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	flaA flaB	J05635	GI:144197
<i>Caulobacter</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>		J01556	GI:144239
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium botulinum cepa Bennett clon 1</i>	FlaA	DQ845000	GI:114054886
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	hag	M14358	GI:146311
			AJ 884569 (EMBL-SVA)	
<i>Helicobacter</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	flaA	X60746	GI:43631
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>		DQ789131	GI:113911615
<i>Legionella</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	flaA	X83232	GI:602877
<i>Listeria</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	flaA	X65624	GI:44097
<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	FlaD (flaD) FlaA (flaA) FlaB (flaB) FliA (fliA) FliZ (fliZ)	AF221596	GI:6959881
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	flaA	M57501	GI:151225
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	fliC	EF544882	GI:146335619
<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	flaA flaB	M24526	GI:152220
<i>Rhodobacter</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	fliC	AF274346	GI:10716972
<i>Roseburia</i>	<i>Roseburia cecicola</i>		M20983	GI:152535
<i>Roseburia</i>	<i>Roseburis hominis</i>	Fla2	DQ789141	GI:113911632
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>		D13689 (NCBI ID)	GI:217062
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella bongori</i>	fliC	AY603412	GI:51342390
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i>	flag	L21912	GI:397810
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	fliC	M84980	GI:154015
<i>Serpulina</i>	<i>Serpulina</i>	flaB2	X63513	GI:450669

	<i>hyodysenteriae</i>			
<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	hag	M27219	GI:152826
<i>Shigella</i>	<i>Shigella boydii</i>	fliC-SB	D26165	GI:442485
<i>Treponema</i>	<i>Treponema phagedenis</i>	flaB2	M94015	GI:155060
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	flaA	EF125175	GI:119434395
<i>Vibrio s</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		AF069392	GI:7327274
<i>Wolinella</i>	<i>Wolinella succinogenes</i>	flag	M82917	GI:155337
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		L33467	GI:496295

Las proteínas protozoarias que también pueden ser codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención se pueden seleccionar de cualquier proteína protozoaria que muestre carácter adyuvante, en especial del grupo consistente en, sin limitarse al mismo, Tc52 de *Trypanosoma cruzi*, PFTG de *Trypanosoma gondii*, proteínas de choque térmico protozoarias, LelF de *Leishmania spp*, proteína tipo profilina de *toxoplasma gondii*, etc.

Las proteínas virales que pueden ser codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden seleccionarse de cualquier proteína viral que muestre carácter adyuvante, en especial del grupo consistente en, sin limitarse a, glicoproteína de fusión de virus sincitial respiratorio (proteína F), proteína de cápside de virus MMT, proteína de virus de leucemia de ratón, proteína hemaglutinina del virus del sarampión tipo silvestre, etc.

Las proteínas fúngicas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden seleccionarse de cualquier proteína fúngica que muestre carácter adyuvante, en especial del grupo consistente en, sin limitarse a, proteína inmunomoduladora fúngica (FIP; LZ-8), etc.

Finalmente, las proteínas adyuvantes patógenas que pueden ser codificadas por el por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden ser seleccionadas de cualquier proteína patógena adicional que muestre carácter adyuvante, en especial del grupo consistente en, sin limitarse a, hemocianina de lapa en forma de cerradura (KLH), OspA, etc.

#### b) Antígenos

El al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora puede alternativamente codificar para un antígeno. De acuerdo con la presente invención, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que es reconocida por el sistema inmunológico y es capaz de desencadenar una respuesta inmunológica específica de antígenos, por ejemplo mediante la formación de anticuerpos, como parte de una respuesta inmune adaptiva o células T específicas de antígenos. En este contexto, la primera etapa de una respuesta inmunológica adaptiva es la activación de células T específicas de antígenos naives por células presentadoras de antígenos. Esto ocurre en los tejidos linfoides y órganos a través de los cuales las células T naives están pasando constantemente. Los tres tipos de células que pueden servir como células presentadoras de antígenos son células dendríticas, macrófagos y células B. Cada una de estas células tiene una función distinta en provocar respuestas inmunes. Las células dendríticas tisulares asimilan antígenos por fagocitosis y macropinocitosis y son estimuladas por infección para migrar al tejido linfóide local, donde se diferencian en células dendríticas maduras. Los macrófagos ingieren antígenos particulados tales como bacterias y son inducidos por agentes infecciosos a expresar moléculas MHC clase II. La capacidad única de las células B para unirse e internalizarse a antígenos de proteínas solubles por medio de sus receptores puede ser importante para inducir células T. Al presentar el antígeno sobre moléculas MHC se logra la activación de las células T, lo cual induce su proliferación y diferenciación en células T efectoras armadas. La función más importante de las células T efectoras es la eliminación de células infectadas por células T citotóxicas CD8 y la activación de macrófagos por células TH1, los cuales constituyen juntos la inmunidad mediada por células, y la activación de células B por células tanto TH2 como TH1 para producir diferentes clases de anticuerpos, conduciendo así a una respuesta inmune humoral. Las células T reconocen un antígeno por sus receptores de células T, que no reconocen y se unen a antígeno directamente, sino que más bien reconocen fragmentos de péptidos cortos, por ejemplo de antígenos de proteínas de patógenos, los cuales son unidos a moléculas MHC sobre las superficies de otras células.

Las células T se encuentran dentro de dos clases principales que tienen diferentes funciones efectoras. Las dos clases se distinguen por la expresión de las proteínas de superficie celular CD4 y CD8. Estos dos tipos de células T difieren en la clase de molécula MHC que reconocen. Hay dos clases de moléculas MHC – MHC clase I y MHC clase II – que difieren en su estructura y patrón de expresión en los tejidos del cuerpo. Las células T CD4 se unen a la molécula MHC clase II y las células T CD8 a la molécula MHC clase I. MHC clase I y MHC clase II tienen distintas distribuciones entre células que reflejan las diferentes funciones efectoras de las células T que las reconocen. Las moléculas MHC clase I presentan péptidos de patógenos, comúnmente virus contra células T CD8, que se diferencian en células T citotóxicas, especializadas en matar cualquier célula que reconozcan específicamente. Casi todas las células expresan moléculas MHC clase I, aunque el nivel de expresión constitutiva varía de un tipo de célula al otro. Sin embargo, no sólo los péptidos patógenos de virus son presentados por moléculas MHC clase I, también autoantígenos, tales como antígenos tumorales son presentados por ellas. Las moléculas MHC clase I se unen a péptidos de proteínas degradadas en el citosol y transportadas en el retículo endoplásmico. De esta manera, las moléculas MHC clase I sobre la superficie de células infectadas con virus u otros patógenos citosólicos despliegan péptidos de estos patógenos. Las células T CD8 que reconocen complejos MHC clase I:péptido están especializadas en matar cualquier célula que despliegue péptidos extraños y también liberan al cuerpo de células infectadas con virus y otros patógenos citosólicos. La principal función de las células T CD4 (células T CD4 auxiliares) que reconocen moléculas MHC clase II es la de activar otras células efectoras del sistema inmunológico. De esta manera, las moléculas MHC clase II se encuentran normalmente en linfocitos B, células dendríticas y macrófagos, células que participan en respuestas inmunes, pero no en otras células tisulares. Los macrófagos, por ejemplo, son activados para matar los patógenos intravesiculares que portan, y las células B para secretar inmunoglobulinas contra moléculas extrañas. Se impide que las moléculas MHC clase II se unan a péptidos en el retículo endoplásmico y de esta manera las moléculas MHC clase II se unen a péptidos de proteínas que son degradadas en endosomas. Pueden capturar péptidos de patógenos que hayan entrado en el sistema vesicular de macrófagos, o de antígenos internalizados por células dendríticas inmaduras o los receptores de inmunoglobulina de células B. Los patógenos que se acumulan en gran número dentro de las vesículas de macrófagos y células dendríticas tienden a estimular la diferenciación de células TH1, mientras que los antígenos extracelulares tienden a estimular la producción de células TH2. Las células TH1 activan las propiedades microbicidas de macrófagos e inducen a las células B a hacer anticuerpos IgG, que son muy efectivos para opsonizar patógenos extracelulares para su ingestión por células fagocíticas, mientras que las células TH2 inician la respuesta humoral al activar células B naives para secretar IgM, e inducir la producción de anticuerpos de opsonización débil tales como IgG1 o IgG3 (ratón) e IgG2 e IgG4 (humano) así como IgA e IgE (ratón y humano).

En el contexto de la presente invención, los antígenos codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención típicamente comprenden cualquier antígeno que esté bajo la definición anterior, en especial antígenos de proteínas o péptidos, por ejemplo, antígenos tumorales, antígenos de alergia, autoantígenos autoinmunes, antígenos patógenos, etc. De acuerdo con la invención, los antígenos codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden ser antígenos generados fuera de la célula, típicamente antígenos no derivados del propio organismo huésped (por ejemplo un humano) (es decir, no autoantígenos), sino derivados de células huésped fuera del organismo huésped, por ejemplo antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios, antígenos animales (seleccionados preferiblemente de animales u organismos como los aquí descritos), antígenos de alergia, etc. Los antígenos de alergia son típicamente antígenos que causan una alergia en un humano y pueden ser derivados ya sea de un humano o de otras fuentes. Los antígenos codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden además ser antígenos generados dentro de la célula, el tejido o el cuerpo, por ejemplo mediante secreción de proteínas, su degradación, metabolismo, etc. Estos antígenos incluyen antígenos derivados del propio organismo huésped (por ejemplo un humano), por ejemplo antígenos tumorales, antígenos propios o autoantígenos, tales como autoantígenos autoinmunes, etc., pero también (no autoantígenos) como los definidos arriba, los cuales han sido originalmente derivados de células hospederas fuera del organismo huésped, pero los cuales son fragmentados o degradados dentro del cuerpo, tejido o célula, por ejemplo, por degradación (proteasas), metabolismo, etc. Los antígenos patógenos comprenden particularmente por ejemplo antígenos de la gripe, incluyendo hemaglutinina (HA), neuroamidasa (NA), proteína de matriz 1 (M1), proteína de canal iónico M2 (M2), nucleoproteína (NP), etc.; o por ejemplo antígenos de virus sincitial respiratorio (RSV), incluyendo proteína F, proteína G, etc.

Los antígenos codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden comprender además fragmentos de estos antígenos aquí mencionados, particularmente de antígenos de proteínas o péptidos. Los fragmentos de estos antígenos en el contexto de la presente invención pueden comprender fragmentos con una longitud preferente de alrededor de 6 a aproximadamente 20 o más aminoácidos, por ejemplo fragmentos como los procesados y presentados por moléculas MHC clase I con una longitud preferente de alrededor de 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9 ó 10 (o incluso 11 ó 12 aminoácidos), o fragmentos como los procesados y presentados por moléculas MHC clase II con una longitud preferente de alrededor de 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos, donde estos fragmentos se pueden seleccionar de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son reconocidos típicamente por las células T en forma de un complejo consistente en el fragmento de péptido y una molécula MHC, es decir los fragmentos típicamente no son reconocidos en su forma naive.

Los fragmentos de antígenos como los definidos aquí también pueden comprender epítopos de esos antígenos. Los epítopos (también llamados “determinantes de antígeno”) son típicamente fragmentos ubicados sobre la superficie exterior de antígenos de proteínas o péptidos (naives) como los aquí definidos, preferentemente de 5 a 15 aminoácidos, en especial de 5 a 12 aminoácidos, en particular de 6 a 9 aminoácidos, los cuales pueden ser reconocidos por anticuerpos, es decir, en su forma naive.

Una clase de antígenos como los codificados por al lo menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención comprende antígenos tumorales. Los “antígenos tumorales” se ubican preferentemente sobre la superficie de la célula (tumoral). Los antígenos tumorales también se pueden seleccionar de proteínas que son sobre-expresadas en células tumorales en comparación con una célula normal. Más aún, los antígenos tumorales también incluyen antígenos expresados en células que son (fueron) no ellas mismas (u originalmente no ellas mismas) degeneradas sino que están asociadas al supuesto tumor. Los antígenos que están conectados con vasos irrigadores de tumor o la reformación de los mismos, en particular aquellos antígenos a la neovascularización, por ejemplo factores de crecimiento, tales como VEGF, bFGF, etc., también se incluyen aquí. Antígenos relacionados con un tumor incluyen además antígenos de células o tejidos que se incrustan típicamente en el tumor. Además, ciertas sustancias (normalmente proteínas o péptidos) son expresadas en pacientes que sufren (con conocimiento o sin conocimiento) de una enfermedad cancerosa y ocurren en concentraciones incrementadas en los fluidos corporales de estos pacientes. Estas sustancias también se conocen como “antígenos tumorales”, sin embargo no son antígenos en el estricto sentido de una sustancia inductora de una respuesta inmune. La clase de antígenos tumorales puede dividirse en antígenos específicos de tumor (TSAs) y antígenos asociados a tumor (TAAs). Los TSAs sólo pueden ser presentados por células tumorales y nunca por células “saludables” normales. Típicamente son el resultado de una mutación específica de tumor. Los TAAs, que son más comunes, son normalmente presentados por células tanto tumorales como sanas. Estos antígenos son reconocidos y la célula presentadora de antígenos puede ser destruida por células T citotóxicas. Además, los antígenos tumorales también pueden ocurrir sobre la superficie del tumor en forma de por ejemplo un receptor mutado. En este caso, pueden ser reconocidos por anticuerpos.

Ejemplos de antígenos tumorales como los codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención se muestran en las Tablas 1 y 2. Estas tablas ilustran antígenos (proteínas) específicos (es decir, “antígenos tumorales”) con respecto a la enfermedad cancerosa a la que están asociados. De acuerdo con la invención, los términos “enfermedades cancerosas” y “enfermedades tumorales” se usan aquí indistintamente.

**Tabla 1 Antígenos expresados en enfermedades cancerosas**

Antígeno tumoral	Nombre del antígeno tumoral	Cánceres o cáncer relacionado con el mismo
5T4		cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer ovárico
707-AP	707 alanina prolina	melanoma
9D7		carcinoma de células renales
AFP	alfa-fetoproteína	carcinoma hepatocelular, cáncer de vesícula biliar, cáncer testicular, cáncer ovárico, cáncer de vejiga
AlbZIP HPG1		cáncer de próstata
alfa5beta1-integrina		
alfa5beta6-integrina		cáncer de colon
alfa-metilacil-coenzima A racemasa		cáncer de próstata

ES 2 502 915 T3

ART-4	antígeno de adenocarcinoma reconocido por células T 4	cáncer pulmonar, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas
B7H4		cáncer ovárico
BAGE-1	antígeno B	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células escamosas
BCL-2		leucemia
BING-4		melanoma
CA 15-3/CA 27-29		cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata
CA 19-9		cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de vesícula biliar, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón
CA 72-4		cáncer ovárico
CA125		cáncer ovárico, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de útero, carcinoma de cerviz, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón
calreticulina		cáncer de vejiga
CAMEL	antígeno reconocido por CTL en melanoma	melanoma
CASP-8	caspara-8	cáncer de cabeza y cuello
catepsina B		cáncer de mama
catepsina L		cáncer de mama
CD19		malignidades de células B
CD20		
CD22		
CD25		
CD30		
CD33		
CD4		
CD52		
CD55		
CD56		

ES 2 502 915 T3

CD80		
CEA	antígeno carcinoembrionario	carcinoma de intestino, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de cerviz, cáncer de vejiga, melanoma
CLCA2	canal de cloruro activado por calcio-2	cáncer de pulmón
CML28		leucemia
Proteína tipo coactosina		cáncer pancreático
Colágeno XXIII		cáncer de próstata
COX-2		cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer colorrectal
CT-9/BRD6	proteína específica de testículos de bromodominio	
Cten	proteína tipo tensina C-terminal	cáncer de próstata
ciclina B1		
ciclina D1		cáncer ovárico
cyp-B	ciclofilina B	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, leucemia de células T, carcinoma de células escamosas
CYPB1	Citocromo P450 1B1	Leucemia
DAM-10/MAGE-B1	melanoma de antígeno de diferenciación 10	melanoma, tumores de piel, cáncer ovárico, cáncer de pulmón
DAM-6/MAGE-B2	melanoma de antígeno de diferenciación 6	melanoma, tumores de piel, cáncer ovárico, cáncer de pulmón
EGFR/Her1		cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama
EMMPRIN	inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular asociada a células tumorales	cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer de cerebro, linfoma
EpCam	molécula de adhesión a células epiteliales	cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón
EphA2	receptor 2 de efrina tipo A	glioma
EphA3	receptor 2 de efrina tipo A	melanoma, sarcoma, cáncer de pulmón
ErbB3		cáncer de mama

ES 2 502 915 T3

EZH2	(potenciador de homólogo de Zeste 2	cáncer de endometrio, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama
FGF-5	factor de crecimiento de fibroblastos-5	cáncer renal, carcinoma, cáncer de mama, cáncer de próstata
FN	fibronectina	melanoma
Fra-1	antígeno relacionado con Fos 1	cáncer de mama, cáncer esofágico, carcinoma de células renales, cáncer de tiroides
G250/CAIX	glicoproteína 250	leucemia, carcinoma de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer cervical
GAGE-1	antígeno G 1	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-2	antígeno G 2	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-3	antígeno G 3	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-4	antígeno G 4	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-5	antígeno G 5	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-6	antígeno G 6	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-7b	antígeno G 7b	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-8	antígeno G 8	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GDEP	gen expresado diferencialmente en próstata	cáncer de próstata
GnT-V	N-acetilglucosaminil-transferasa V	glioma, melanoma
gp100	glicoproteína 100 kDa	melanoma
GPC3	glipican 3	carcinoma hepatocelular, melanoma
HAGE	antígeno de helicasa	cáncer de vejiga

ES 2 502 915 T3

HAST-2	tumor de anillo signete humano	
hepsina		próstata
Her2/neu/Erb2	receptor epidérmico humano-2/neurológico	cáncer de mama, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer ovárico, cáncer de páncreas, cáncer gástrico
HERV-K-MEL		melanoma
HNE	neutrófilo elastasa humana	leucemia
homebox NKX 3.1		cáncer de próstata
HOM-TES-14/SCP-1		cáncer ovárico
HOM-TES-85		
HPV-E6		cáncer cervical
HPV-E7		cáncer cervical
HST-2		cáncer gástrico
hTERT	transcriptasa inversa de telomerasa humana	cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, sarcoma, linfoma no Hodgkin, leucemia aguda
iCE	carboxil esterasa intestinal	carcinoma de células renales
IGF-1R		cáncer colorrectal
IL-13Ra2	cadena alfa 2 de receptor de interleucina 13	glioblastoma
IL-2R		cáncer colorrectal
IL-5		
receptor de laminina inmaduro		carcinoma de células renales
kalikreína 2		cáncer de próstata
kalikreína 4		cáncer de próstata
Ki67		cáncer de próstata, cáncer de mama, linfoma no Hodgkin, melanoma
KIAA0205		cáncer de vejiga
KK-LC-1	antígeno de cáncer de pulmón Kitakyushu 1	cáncer de pulmón
KM-HN-1		cáncer de engua, carcinomas hepatocelulares, melanoma, cáncer gástrico, esofágico, cáncer de colon, cáncer pancreático
LAGE-1	antígeno L	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma

ES 2 502 915 T3

livina		cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-A1	antígeno de melanoma-A1	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A10	antígeno de melanoma-A10	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A12	antígeno de melanoma-A12	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia, cáncer de próstata, tumores cerebrales
MAGE-A2	antígeno de melanoma-A2	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A3	antígeno de melanoma-A3	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A4	antígeno de melanoma-A4	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A6	antígeno de melanoma-A	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A9	antígeno de melanoma-A9	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-B1	antígeno de melanoma-B1	melanoma
MAGE-B10	antígeno de melanoma-B10	melanoma
MAGE-B16	antígeno de melanoma-B16	melanoma
MAGE-B17	antígeno de melanoma-B17	melanoma
MAGE-B2	antígeno de melanoma-B2	melanoma
MAGE-B3	antígeno de melanoma-B3	melanoma
MAGE-B4	antígeno de melanoma-B4	Melanoma
MAGE-B5	antígeno de melanoma-B5	melanoma
MAGE-B1	6antígeno de melanoma-B6	melanoma
MAGE-C1	antígeno de melanoma-C1	cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-C2	antígeno de melanoma-C2	melanoma
MAGE-C3	antígeno de melanoma-C3	Melanoma
MAGE-D1	antígeno de melanoma-D1	melanoma
MAGE-D2	antígeno de melanoma-D2	melanoma
MAGE-D4	antígeno de melanoma-D4	melanoma

ES 2 502 915 T3

MAGE-E1	antígeno de melanoma-E1	cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-E2	antígeno de melanoma-E2	melanoma
MAGE-F1	antígeno de melanoma-F1	melanoma
MAGE-H1	antígeno de melanoma-H1	melanoma
MAGEL2	MAGE tipo 2	melanoma
mamaglobina A		cáncer de mama
MART-1/Melan-A	antígeno de melanoma reconocido por células T 1/antígeno de melanoma A	melanoma
MART-2	antígeno de melanoma reconocido por células T 2	melanoma
proteína de matriz 22		cáncer de vejiga
MC1R	receptor de melanocortina 1	Melanoma
M-CSF	gen de factor estimulador de colonia de macrófagos	cáncer ovárico
mesotelina		cáncer ovárico
MG50/PXDN		cáncer de mama, glioblastoma, melanoma
MMP 11	fosfoproteína de fase M 11	leucemia
antígeno MN/CA IX		carcinoma de células renales
MRP-3	proteína 3 asociada a resistencia a varios fármacos	cáncer de pulmón
MUC1	mucina 1	cáncer de mama
MUC2	mucina 2	cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer pancreático
NA88-A	clon de ADNc NA de paciente M88	melanoma
N-acetilglucosaminil-transferasa-V		
Neo-PAP	Neo-poli(A) polimerasa	
NGEP		cáncer de próstata
NMP22		cáncer de vejiga
NY-ESO-1	esófago Nueva York 1	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma, linfoma B, hepatoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de mama

ES 2 502 915 T3

NY-ESO-B		
OA1	proteína de albinismo ocular tipo 1	melanoma
OFA-iLRP	antígeno oncofetal-receptor de laminina inmaduro	leucemia
OGT	gen de N-acetilglucosamina transferasa O-enlazado	
OS-9		
osteocalcina		cáncer de próstata
osteopontina		cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer ovárico
p15	proteína 15	
p15		melanoma
p190 bcr-abl menor		
p53		
PAGE-4	proteína 4 tipo GAGE de próstata	cáncer de próstata
PAI-1	inhibidor de activador de plasminógeno tisular 1	cáncer de mama
PAI-2	inhibidor de activador de plasminógeno tisular 2	cáncer de mama
PAP	fosfatasa ácida de próstata	cáncer de próstata
PART-1		cáncer de próstata
PATE		cáncer de próstata
PDEF		cáncer de próstata
Pim-1-Cinasa		
Pin1	propil isomerasa	cáncer de próstata
POTE		cáncer de próstata
PRAME	antígeno de melanoma expresado preferencialmente	melanoma, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, sarcoma
prosteína		cáncer de próstata
proteinasa-3		
PSA	antígeno específico de próstata	cáncer de próstata

ES 2 502 915 T3

PSCA		cáncer de próstata
PSGR		cáncer de próstata
PSM		
PSMA	antígeno de membrana específico de próstata	cáncer de próstata
RAGE-1	antígeno renal	cáncer de vejiga, cáncer renal, sarcoma, cáncer de colon
RHAMM/CD168	receptor para motilidad mediada por ácido hialurónico	leucemia
RU1	ubicua renal 1	cáncer de vejiga, melanoma, cáncer renal
RU2	ubicua renal 2	cáncer de vejiga, melanoma, sarcoma, tumor cerebral, cáncer esofágico, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de mama
S-100		melanoma
SAGE	antígeno de sarcoma	
SART-1	tumor de rechazo de antígeno escamoso 1	cáncer esofágico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer uterino
SART-2	tumor de rechazo de antígeno escamoso 2	cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, melanoma, tumor cerebral
SCC	antígeno de carcinoma de células escamosas	cáncer de pulmón
Sp17	proteína de esperma 17	mieloma múltiple
SSX-1	punto de interrupción 1 de sarcoma sinovial X	carcinoma de células hepatocelulares, cáncer de mama
SSX-2/HOM-MEL-40	punto de interrupción 2 de sarcoma sinovial X	cáncer de mama
SSX-4	punto de interrupción 4 de sarcoma sinovial X	cáncer de vejiga, carcinoma de células hepatocelulares, cáncer de mama
STAMP-1		cáncer de próstata
STEAP	antígeno epitelial de transmembrana seis próstata	cáncer de próstata
survivina		cáncer de vejiga
survivina-2B	survivina de retención de intrón 2	cáncer de vejiga
TA-90		melanoma

ES 2 502 915 T3

TAG-72		carcinoma de próstata
TARP		cáncer de próstata
TGFb	TGFbeta	
TGFbRII	receptor II de TGFbeta	
TGM-4	transglutaminasa específica de próstata	cáncer de próstata
TRAG-3	proteína asociada resistente a taxol 3	cáncer de mama, leucemia y melanoma
TRG	gen relacionado a testina	
TRP-1	proteína 1 relacionada con tirosina	melanoma
TRP-2/6b	TRP-2/exón nuevo 6b	melanoma, glioblastoma
TRP-2/INT2	TRP-2/intrón 2	melanoma, glioblastoma
Trp-p8		cáncer de próstata
Tirosinasa		melanoma
UPA	activador de plasminógeno tipo urocinasa	cáncer de mama
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular	
VEGFR-2/FLK-1	receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular	
WT1	gen de tumor de Wilm	cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer ovárico, leucemia

**Tabla 2 Antígenos mutantes expresados en enfermedades cancerosas**

<b>Antígeno mutante</b>	<b>Nombre de antígeno mutante</b>	<b>cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas</b>
Alfa-actinina-4/m		carcinoma de pulmón
ARTC1/m		melanoma
bcr/abl	proteína de fusión región de racimo de interrupción-Abelson	CML
beta-Catenina/m	beta-Catenina	melanoma
BRCA1/m		cáncer de mama
BRCA2/m		cáncer de mama
CASP-5/m		cáncer colorrectal, cáncer gástrico, carcinoma endometrial
CASP-8/m		cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas
CDC27/m	ciclo de división celular 27	
CDK4/m	cinasa 4 dependiente de ciclina	melanoma
CDKN2A/m		melanoma
CML66		CML
COA-1/m		cáncer colorrectal
DEK-CAN	proteína de fusión	AML
EFTUD2/m		melanoma
ELF2/m	Factor de alargamiento 2	carcinoma pulmonar de células escamosas
ETV6-AML1	proteína de gen 6 de variante Ets/gen 1 de leucemia mieloide aguda	ALL
FN1/m	fibronectina 1	melanoma
GPNMB/m		melanoma
HLA-A*0201-R170I	intercambio de arginina por isoleucina en residuo 170 de la hélice alfa del dominio alfa2 en el gen HLA-A2	carcinoma de células renales
HLA-A11/m		melanoma
HLA-A2/m		carcinoma de células renales

ES 2 502 915 T3

HSP70-2M	proteína de choque térmico 70-2 mutada	carcinoma de células renales, melanoma, neuroblastoma
KIAA0205/m		tumor de vejiga
K-Ras/m		carcinoma pancreático, carcinoma colorrectal
LDLR-FUT	proteína de fusión LDR-Eucosiltransferas	melanoma
MART2/m		melanoma
ME1/m		carcinoma pulmonar no microcítico
MUM-1/m	melanoma ubicuo mutado 1	melanoma
MUM-2/m	melanoma ubicuo mutado 2	melanoma
MUM-3/m	melanoma ubicuo mutado 3	melanoma
Miosina clase I/m		melanoma
neo-PAP/m		Melanoma
NFYC/m		carcinoma pulmonar de células escamosas
N-Ras/m		melanoma
OGT/m		carcinoma colorrectal
OS-9/m		melanoma
p53/m		
PRDX5/m		Melanoma
PRPRK/m	proteína tipo receptor-tirosina fosfatasa kappa	melanoma
RBAF600/m		melanoma
SIRT2/m		melanoma
SYT-SSX-1	proteína de fusión sinaptotagmina I/sarcoma sinovial X	sarcoma
SYT-SSX-2	proteína de fusión sinaptotagmina 2/sarcoma sinovial X	Sarcoma
TEL-AML1	proteína de fusión leucemia de familia Ets de translocación/leucemia mieloide aguda 1	AML

TGFbRII	receptor de TGFbeta II	carcinoma colorrectal
TPI/m	triosefosfato isomerasa	melanoma

En una realización preferente de acuerdo con la presente invención, los antígenos tumorales como los codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora se seleccionan del grupo consistente en 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, 5 1-integrina, 5 6-integrina, -actinina-4/m, metililcoenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, coactosina-proteína similar, collage XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPBI, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gpl OO, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A\*0201 -R1 71, HLA-A1 1/m, HLA- A2/m, HNE, homeobox NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1 R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmaduro, calicreína-2, calicreína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína de matriz 22, MCI R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, antígeno MN/CA IX, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYQm, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, p15, p190 bcr-abl menor, p53, p53/m, PAGE-4, PAM, PAI-2, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-cinasa, Pin-1, Pml/PARα, POTE, PRAME, PRDX5/m, prostetina, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP, survivina, survivina-2B, SYT-SSX-I, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGFβ, TGFβRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, tirosinasa, UPA, VEGF, VEGFR-2/FLK-1, y WT1.

En una realización particularmente preferente, los antígenos tumorales como los codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención se seleccionan del grupo consistente en MAGE-A1 (por ejemplo, MAGE-A1 de acuerdo con el número de registro M77481), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6 (por ejemplo, MAGE-A6 de acuerdo con el número de registro NM\_005363), MAGE-C1, MAGE-C2, melan-A (por ejemplo, melan-A de acuerdo con el número de registro NM\_005511), GP100 (por ejemplo, GP100 de acuerdo con el número de registro M77348), tirosinasa (por ejemplo, tirosinasa de acuerdo con el número de registro NM\_000372), survivina (por ejemplo, survivina de acuerdo con el número de registro AF077350), CEA (por ejemplo, CEA de acuerdo con el número de registro NM\_004363), Her-2/neu (por ejemplo, Her-2/neu de acuerdo con el número de registro M11730), WT1 (por ejemplo, WT1 de acuerdo con el número de registro NM\_000378), PRAME (por ejemplo, PRAME de acuerdo con el número de registro NM\_006115), EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico 1) (por ejemplo, EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico 1) de acuerdo con el número de registro AF288738), MUC1, mucina-1 (por ejemplo, mucina-1 de acuerdo con el número de registro NM\_002456), SEC61G (por ejemplo, SEC61G de acuerdo con el número de registro NM\_014302), hTERT (por ejemplo, hTERT número de registro NM\_198253), 5T4 (por ejemplo, 5T4 de acuerdo con el número de registro NM\_006670), NY-Eso-1 (por ejemplo, NY-Eso1 de acuerdo con el número de registro NM\_001327), TRP-2 (por ejemplo, TRP-2 de acuerdo con el número de registro NM\_001922), STEAP, PCA, PSA, PSMA, etc.

De acuerdo con una realización particularmente preferente adicional, los antígenos tumorales codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden formar un coctel de antígenos, por ejemplo en una composición (inmunoestimuladora) activa o un kit de partes (en donde preferentemente cada antígeno está contenido en una parte del kit), especialmente para desarrollar una respuesta inmune (adaptiva) para el tratamiento de cáncer de próstata (PCa), preferentemente cánceres de próstata neoadyuvantes y/o refractarios a hormonas, y enfermedades o trastornos relacionados con los mismos. Para este propósito, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención es preferentemente al menos un ARN, en especial al menos un ARNm que puede codificar para al menos uno, de preferencia dos, tres o incluso cuatro (de preferencia diferentes) antígenos del siguiente grupo de antígenos:

- PSA (Antígeno Específico de Próstata) = KLK3 (kalikreína 3),
- PSMA (Antígeno de Membrana Específico de Próstata),
- PSCA (Antígeno de Células Madre de Próstata),
- STEAP (Antígeno Epitelial de Seis Transmembranas de la Próstata).

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, los antígenos tumorales como los codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden formar un coctel de antígenos, por ejemplo, en una composición (inmunoestimuladora) activa o un kit de partes (donde de preferencia cada antígeno está contenido en una parte del kit), preferiblemente para desarrollar una respuesta inmune (adaptiva) para el tratamiento de cánceres pulmonares no microcíticos (NSCLC), seleccionados preferentemente de los trece subgrupos principales de carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar macrocítico, o de trastornos relacionados con los mismos. Para ese propósito, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención es de preferencia al menos un ARNm que puede codificar para al menos uno, de preferencia dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce (de preferencia diferentes) antígenos del siguiente grupo de antígenos:

- hTERT,
- WT1,
- MAGE-A2,
- 5T4,
- MAGE-A3,
- MUC1,
- Her-2/neu,
- NY-ESO-1,
- CEA,
- Survivina,
- MAGE-C1, y/o
- MAGE-C2,

siendo posible cualquier combinación de estos antígenos.

De acuerdo con una realización particularmente preferente adicional, los antígenos tumorales como los codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden formar un coctel de antígenos, por ejemplo en una composición (inmunoestimuladora) activa o un kit de partes (donde de preferencia cada antígeno está contenido en una parte del kit), preferiblemente para desarrollar una respuesta inmune (adaptiva) para el tratamiento de cánceres pulmonares no microcíticos (NSCLC), seleccionados preferentemente del grupo de los tres subtipos principales de carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar macrocítico, o de trastornos relacionados con los mismos. Para este propósito, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención es de preferencia al menos un ARN, en especial al menos un ARNm, el cual puede codificar para al menos dos (de preferencia diferentes) antígenos,

a) donde al menos uno, de preferencia al menos dos, tres, cuatro, cinco, o incluso seis, de éstos al menos dos antígenos es (son) seleccionado(s) de:

- 5T4
- NY-ESO-1,
- MAGE-A2,
- MAGE-A3,
- MAGE-C1, y/o
- MAGE-C2, y

b) donde los antígenos adicionales se seleccionan de al menos un antígeno como el aquí definido, de preferencia en cualquiera de las combinaciones, grupos o subgrupos de antígenos aquí mencionados, por ejemplo los antígenos adicionales se seleccionan de:

- hTERT,
- WT1,
- MAGE-A2,
- 5T4,
- MAGE-A3,
- MUC1,
- Her-2/neu,
- NY-ESO-1,
- CEA,
- Survivina,
- MAGE-C1, y/o
- MAGE-C2.

En las realizaciones anteriores, cada una de las proteínas definidas arriba, por ejemplo proteínas, anticuerpos, antígenos terapéuticamente activos, etc., como los aquí definidos pueden ser codificados por un ARN (monocistrónico), de preferencia un ARNm (monocistrónico). En otras palabras, el al menos un ARN(m) del

componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede comprender al menos dos moléculas de ARN (monocistrónicas), de preferencia moléculas de ARNm, donde cada uno de estos al menos dos moléculas de ARN (monocistrónicas), de preferencia moléculas de ARNm, pueden codificar, por ejemplo, sólo para una proteína (de preferencia diferente), por ejemplo, un antígeno, seleccionado preferentemente de una de las combinaciones de antígenos mencionadas arriba.

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el por lo menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede comprender (al menos) un ARN bi- o incluso multicistrónico, de preferencia ARNm, es decir, (al menos) un ARN que porte, por ejemplo, dos o incluso más de las secuencias codificadoras de al menos dos (de preferencia diferentes) proteínas, por ejemplo antígenos, seleccionados preferentemente de una de las combinaciones de antígenos mencionadas arriba. Estas secuencias codificadoras, por ejemplo de las al menos dos (preferentemente diferentes) proteínas, por ejemplo antígenos, de (al menos) un ARN bi- o incluso multicistrónico pueden separarse mediante al menos una secuencia IRES (sitio de entrada ribosómico interno), como se define abajo. Así, el término “que codifica para al menos dos (preferentemente diferentes) proteínas” puede significar, sin limitarse a, que el (al menos) un ARN (bi- o incluso multicistrónico), preferentemente un ARNm, puede codificar, por ejemplo, al menos para dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más (preferentemente diferentes) proteínas, por ejemplo antígenos de los grupos de antígenos mencionados arriba, o sus fragmentos o variantes, proteínas, anticuerpos, proteínas adyuvantes terapéuticamente activas, etc. En especial, sin limitarse a, el (al menos) un ARN (bi- o incluso multicistrónico), preferentemente ARNm, puede codificar por ejemplo, para al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis o más (preferentemente diferentes) proteínas, por ejemplo antígenos de los subgrupos de antígenos mencionados arriba, o sus fragmentos o variantes dentro de las definiciones anteriores. En este contexto, una llamada secuencia IRES (sitio de entrada ribosómico interno) como la aquí definida puede funcionar como un único sitio de unión a ribosomas, pero también puede servir para proporcionar ARN bi- o incluso multicistrónico como el aquí definido que codifica para varias proteínas, las cuales van a ser traducidas por los ribosomas independientemente unas de otras. Ejemplos de secuencias IRES que pueden usarse de acuerdo con la invención son aquellas de picornavirus (por ejemplo FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), virus de leucemia ratón (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

De acuerdo con una realización preferente adicional particular, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede comprender una mezcla de al menos un ARN multicistrónico, preferentemente ARNm, como el aquí definido y por al menos un ARN bi- o incluso multicistrónico, preferentemente ARNm, como el aquí definido. El al menos un ARN monocistrónico y/o el al menos un ARN bi- o incluso multicistrónico codifican preferentemente para proteínas diferentes, por ejemplo antígenos, o sus fragmentos o variantes, seleccionándose los antígenos preferentemente de uno de los grupos o subgrupos de antígenos mencionados arriba, en especial en una de las combinaciones mencionadas arriba. Sin embargo, preferentemente el al menos un ARN multicistrónico y el al menos un ARN bi- o incluso multicistrónico también puede codificar también (en parte) para proteínas idénticas como las aquí definidas, por ejemplo antígenos seleccionados de uno de los grupos o subgrupos de antígenos mencionados arriba, de preferencia en una de las combinaciones mencionadas arriba, siempre y cuando el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención al completo proporcione al menos dos (de preferencia diferentes) proteínas, por ejemplo antígenos como los aquí definidos. Tal realización puede ser adecuada, por ejemplo, para una administración escalonada, por ejemplo dependiente de tiempo, de uno o varios del los al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, por ejemplo como una composición farmacéutica, a un paciente que lo requiera. Los componentes de esta composición farmacéutica de la presente invención, particularmente las diferentes moléculas de ARN asociadas de acuerdo con al menos dos (de preferencia diferentes) proteínas pueden estar contenidos en (diferentes partes de) un kit de partes de composición o pueden administrarse por separado como componentes de diferentes composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, por ejemplo.

Una clase más de antígenos como los codificados por al lo menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención comprende antígenos de alergia. Estos antígenos de alergia pueden seleccionarse de antígenos derivados de diferentes fuentes, por ejemplo animales, plantas, hongos, bacterias, etc. Los alérgenos en este contexto incluyen, por ejemplo, hierbas, pólenes, mohos, fármacos o numerosos activadores ambientales, etc. Los antígenos de alergia pertenecen típicamente a diferentes clases de compuestos, tales como ácidos nucleicos y sus fragmentos, proteínas o péptidos y sus fragmentos, carbohidratos, polisacáridos, azúcares, lípidos, fosfolípidos, etc. De particular interés en el contexto de la presente invención son los antígenos que son codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, es decir, antígenos de proteína o péptidos y sus fragmentos o epítopos, o ácidos nucleicos y sus fragmentos, particularmente ácidos nucleicos y sus fragmentos, que codifican para estos antígenos de proteína o péptidos y sus fragmentos o epítopos.

Antígenos derivados de animales particularmente preferentes y que son codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden incluir antígenos derivados de, sin limitarse a, insectos, tales como ácaros (por ejemplo ácaros del polvo del caballo), mosquitos, abejas (por ejemplo abeja milífera, abejorro), cucarachas, garrapatas, polillas (por ejemplo polilla de la seda), pulgón, chinche,

pulga, avispa, oruga, mosca de la fruta, langosta migratoria, saltamontes, áfido hormiga; de crustáceos, tales como camarones, cangrejo, krill, langosta, langostino, langostero, jaiba, de aves, tales como pato, ganso, gaviota, pavo, avestruz, pollos; de peces, tales como anguila, arenque, carpa, pargo, bacalao, fletán, siluro, beluga, salmón, platija, caballa, sepia, perca; de moluscos, tales como escalopa, pulpo, abulón, caracol, bocina, calamar, almeja, mejillón, de arañas; de mamíferos, tales como vaca, conejo, borregos, león, jaguar, leopardo, rata, cerdo, búfalo, perro, loro, hámster, conejillo de indias, venado, caballo, gato, ratón, ocelote, serval; de artrópodos tales como araña; o de peces plateados; de gusanos, tales como nematodos, de especies de *Trichinella*, o lombrices, de anfibios, tales como ranas o ascidia, etc.

Los antígenos derivados de plantas que son codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, pueden incluir antígenos derivados de, sin limitarse a, frutas, tales como kiwi, piña, jaca, papaya, limón, naranja, mandarina, melón, guayacán, fresa, lichi, manzana, manzana paraíso cereza, mango, maracuyá, ciruela, albaricoque, nectarina, pera, granadilla, frambuesa, uva; vegetales tales como ajo, cebolla, puerro, soya, apio, coliflor, nabo, páprika, chícharo, hinojo, calabacín, pepino, zanahoria, camote, haba, guisante, oliva, tomate, papa, lenteja, lechuga, aguacate, perejil, rábano, chirimoya, remolacha, calabaza, espinaca; especias, tales como mostaza, cilantro, azafrán, pimienta, anís; cultivos tales como avena, trigo sarraceno, cebada, arroz, trigo, maíz, colza, ajonjolí; de frutos secos, tales como anacardo, nuez, nuez blanca, pistache, almendra, avellana, cacahuete, nuez de Brasil, pacana, castaña; de árboles tales como aliso, carpe, cedro, abedul, avellano, hayedo, fresno, aligustre, arce, plátano, ciprés, palma; de flores tales como artemisa, clavel, forsitia, girasol, altramuz, manzanilla, lilo, pasionaria; de hierbas tales como grama oficial, agrostis, bromo veloso, grada americana, cerrillo, ballico inglés; o de otras plantas, tales como amapola, pelitoria, mosto, tabaco, espárrago, artemisa, berro, etc.

Los antígenos derivados de hongos que son codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden incluir antígenos derivados de, sin limitarse a, por ejemplo *Alternia* sp., *Aspergillus* sp., *Beauveria* sp., *Candida* sp., *Cladosporium* sp., *Endothia* sp., *Curcularia* sp., *Embellisia* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Malassezia* sp., *Penicillum* sp., *Pleospora* sp., *Saccharomyces* sp., etc.

Los antígenos derivados de bacterias que son codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden incluir antígenos derivados de, sin limitarse a, por ejemplo *Bacillus tetani*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces griseus*, etc.

c) *Anticuerpos*

De acuerdo con una realización más, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar para un anticuerpo. De acuerdo con la presente invención, este anticuerpo puede seleccionarse de cualquier anticuerpo, por ejemplo cualquier anticuerpo producido de forma recombinante o de origen natural, conocido en la técnica, en particular anticuerpos adecuados para propósitos terapéuticos, de diagnóstico o científicos, o anticuerpos que hayan sido identificados en relación con enfermedades cancerosas específicas. Aquí, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales y policlonales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y de bloqueo o neutralizantes) y especies de anticuerpos con especificidad poliepitópica. De acuerdo con la invención, "anticuerpo" típicamente comprende cualquier anticuerpo conocido en la técnica (por ejemplo, anticuerpos IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), tales como anticuerpos de origen natural, anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped, anticuerpos que fueron aislados e identificados de anticuerpos de origen natural o anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped y producidos de forma recombinante por métodos biomoleculares conocidos en la técnica, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, intracuerpos, es decir anticuerpos expresados en células y ubicados opcionalmente en compartimientos celulares específicos, y fragmentos y variantes de los anticuerpos mencionados. En general, cualquier anticuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada, ambas con dominios variables y constantes. La cadena ligera consiste en un dominio variable N-terminal, V<sub>L</sub>, y un dominio constante C-terminal, C<sub>L</sub>. En contraste, la cadena pesada del anticuerpo IgG, por ejemplo, está formada por un dominio variable N-terminal, V<sub>H</sub>, y tres dominios constantes, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. Los anticuerpos de cadena simple pueden ser codificados por el ARN del ARN(m) modificado de la invención así como, preferentemente, por un ARN de una sola hebra, en especial por un ARNm.

De acuerdo con una primera alternativa, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar para un anticuerpo policlonal. En este contexto, el término "anticuerpo policlonal" significa típicamente mezclas de anticuerpos dirigidas a antígenos o inmunógenos o epítopes específicos de proteína que fueron generados mediante la inmunización de un organismo huésped, tal como un mamífero, por ejemplo incluyendo cabra, ganado, cerdo, perro, gato, burro, mono, simio, un roedor tal como un ratón, hámster y conejo. Los anticuerpos policlonales generalmente no son idénticos y por ello normalmente reconocen diferentes epítopes o regiones del mismo antígeno. Así, en tal caso, típicamente se usará una mezcla (una composición) de diferentes moléculas de ARN como el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, cada ARN codificando para un anticuerpo (monoclonal) específico siendo dirigido a antígenos o inmunógenos o epítopes específicos de una proteína.

De acuerdo con otra alternativa, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar para un anticuerpo monoclonal. Aquí, el término "anticuerpo

monoclonal” se refiere típicamente a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pudieran estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos a un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal es dirigido a un solo determinante en el antígeno. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales como los definidos arriba mediante el método de hibridoma descrito primero por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante, por ejemplo, como los descritos en la patente de US 4.816.567. Los “anticuerpos monoclonales” también pueden ser aislados de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348:552-554 (1990), por ejemplo. De acuerdo con Kohler y Milstein, un inmunógeno (antígeno) de interés es inyectado en un huésped, tal como un ratón, y los linfocitos de células B producidos en respuesta al inmunógeno son cosechados después de un periodo de tiempo. Las células B se combinan con células de mieloma obtenidas de ratón e introducidas en un medio que permite que las células B se fusionen con las células de mieloma, produciendo hibridomas. Estas células fusionadas (hibridomas) se ponen después en pocillos separados de placas de microtitulación y se cultivan para producir anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales son ensayados para determinar cuál de ellos es adecuado para detectar el antígeno de interés. Después de seleccionarse, los anticuerpos monoclonales pueden cultivarse en cultivos celulares o inyectando los hibridomas en ratones. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, las secuencias de péptidos de estos anticuerpos monoclonales tienen que ser secuenciadas y se pueden emplear las secuencias de ARN que codifican para estos anticuerpos como el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, el cual puede prepararse de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica.

Para propósitos terapéuticos en humanos, también pueden ser codificados por el por al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención anticuerpos monoclonales o policlonales no humanos, tales como anticuerpos murinos. Sin embargo, estos anticuerpos típicamente sólo son de uso limitado, ya que generalmente inducen una respuesta inmune mediante la producción de anticuerpos humanos dirigidos a los anticuerpos no humanos en el cuerpo humano. Por tanto, un anticuerpo no humano particular sólo puede ser administrado una vez al humano. Para resolver este problema, también se contemplan anticuerpos quiméricos, no humanos humanizados y humanos codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención. Los anticuerpos “quiméricos” que pueden ser codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención preferentemente son anticuerpos donde los dominios constantes de un anticuerpo descrito arriba son reemplazados por secuencias de anticuerpos de otros organismos, en especial secuencias humanas. Los anticuerpos “humanizados” (no humanos) que también pueden ser codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención son anticuerpos donde los dominios constante y variable (excepto por los dominios hipervariables) descritos arriba de un anticuerpo son reemplazados por secuencias humanas. De acuerdo con otra alternativa, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar para anticuerpos humanos, es decir, anticuerpos que tengan sólo secuencias humanas. Estos anticuerpos humanos pueden aislarse de tejidos humanos o de organismos hospederos no humanos inmunizados que sean transgénicos para el locus génico de IgG humana, pudiendo prepararse secuencias de ARN de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Además, los anticuerpos humanos pueden ser provistos mediante el uso de Phqage Display.

Además, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar para anticuerpos biespecíficos. Anticuerpos “biespecíficos” en el contexto de la invención son preferentemente anticuerpos que actúan como un adaptador entre un efector y una diana respectiva mediante dos dominios  $F_{a/b}$  diferentes, por ejemplo con el propósito de reclutar moléculas efectoras tales como toxinas, fármacos, citosinas, etc., dirigir células efectoras tales como CTL, células NK, macrófagos, granulocitos, etc. (véase para revisión Kontermann R.E., *Acta Pharmacol. Sin.*, 2005, 26(1): 1-9). Los anticuerpos biespecíficos como los aquí descritos están configurados, en general, para ser reconocidos por dos dominios  $F_{a/b}$  diferentes, por ejemplo dos antígenos diferentes, inmunógenos, epítomos, fármacos, células (o receptores de células) u otras moléculas (o estructuras) como las descritas arriba. En este documento, biespecificidad significa que las regiones de unión a antígeno de los anticuerpos son específicas para dos epítomos diferentes. Así, pueden unirse diferentes antígenos, inmunógenos o epítomos, etc., lo cual, opcionalmente, permite una interacción directa de los dos componentes. Por ejemplo, diferentes células, tales como células efectoras y células diana, pueden conectarse vía un anticuerpo biespecífico. La presente invención abarca, pero no está limitada a, anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen, por un lado, a un antígeno soluble como el aquí descrito y, por el otro, a un antígeno o receptor sobre la superficie de una célula tumoral.

De acuerdo con la invención, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar para intracuerpos, donde estos intracuerpos pueden ser anticuerpos como los definidos arriba. Ya que estos anticuerpos son anticuerpos expresados intracelularmente, es decir anticuerpos que son codificados por ácidos nucleicos localizados en áreas específicas de la célula y también expresados ahí, estos anticuerpos pueden ser denominarse intracuerpos.

Preferentemente, los anticuerpos codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden comprender anticuerpos de longitud completa, es decir anticuerpos compuestos de las cadenas pesada completa y ligera completa, o las descritas arriba. Sin embargo, también pueden ser codificados por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpo, variantes o aductos.

El al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar también para fragmentos de anticuerpo seleccionados de fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc, Facb, pFc', Fd y Fv de los anticuerpos (de longitud completa) mencionados arriba. En general, los fragmentos de anticuerpo son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un fragmento Fab ("fragmento, unión a antígeno") está compuesto de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Los dos dominios variables se unen al epítipo sobre antígenos específicos. Las dos cadenas están unidas por un enlace disulfuro. Un fragmento scFv ("fragmento variable de una sola cadena"), por ejemplo, consiste típicamente en los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. Los dominios están enlazados por un enlace artificial, en general un enlace de polipéptidos tal como un péptido compuesto de 15-25 residuos de glicina, prolina y/o serina.

Como un segundo componente, la composición inmunoestimuladora de la invención comprende al menos un ARNm libre, que codifica para al menos un antígeno como el aquí definido, por ejemplo, antígenos tumorales, antígenos patógenos (por ejemplo seleccionados de proteínas patógenas como las definidas arriba o de antígenos de animales, antígenos virales, antígenos protozoarios, antígenos bacterianos, antígenos alérgicos), antígenos autoinmunes u otros antígenos. Este segundo componente se añade (de acuerdo con una segunda etapa de preparación de la composición inmunoestimuladora de la invención) al "componente adyuvante" preparado arriba para formar la composición inmunoestimuladora de la invención. Antes de la adición, el al menos un ARNm libre no está complejado y preferentemente no sufrirá ninguna reacción de asociación detectable o significativa después de la adición del componente adyuvante. Esto se debe a la fuerte unión del compuesto policatiónico con el al menos un ARN(m) descrito arriba del componente adyuvante. En otras palabras, cuando el al menos un ARNm libre, que codifica para el al menos un antígeno, se añade al "componente adyuvante", preferentemente ningún compuesto policatiónico no libre o sustancialmente no libre que pueda formar un complejo con el al menos un ARNm libre está presente. En consecuencia, es posible una traducción eficiente del al menos un ARNm libre de la composición de la invención *in vivo*.

El al menos un ARNm libre que es el segundo componente de la composición inmunoestimuladora de la invención es un ARN mensajero que codifica para al menos un antígeno como el aquí definido, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos patógenos (por ejemplo, seleccionados de proteínas patógenas como las definidas arriba o de antígenos de animales, antígenos virales, antígenos protozoarios, antígenos bacterianos, antígenos alérgicos), antígenos autoinmunes u otros antígenos. En este contexto, un ARNm se define en general como se indicó anteriormente para el componente adyuvante como un ARN que está compuesto de varios elementos estructurales, por ejemplo una región 5'-UTR opcional, un sitio de unión ribosómico aguas arriba seguido por una región de codificación, una región 3'-UTR opcional que puede ser seguida por una cola poli-A (y/o una cola poli-C). El al menos un ARNm libre puede estar presente como un ARN mono-, di- o incluso multicistrónico, es decir un ARN que porta las secuencias de codificación de una, dos o más proteínas. Estas secuencias de codificación en el ARNm di- o incluso multicistrónico pueden estar separadas por al menos una secuencia IRES, por ejemplo como la aquí definida.

El al menos un ARNm libre provisto como un segundo componente de la composición inmunoestimuladora de la invención puede codificar al menos un antígeno.

El al menos un ARNm libre provisto como un segundo componente de la composición inmunoestimuladora de la invención codifica al menos un antígeno como se ha definido anteriormente. En este contexto, un antígeno (tumor) o en general el término "antígeno" se define como se describió anteriormente para el componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y se refiere típicamente a una sustancia que es reconocida por el sistema inmunológico y es capaz de desencadenar una respuesta inmune específica de antígeno, por ejemplo mediante la formación de anticuerpos como parte de una respuesta inmune adaptativa. De acuerdo con una realización preferente, el al menos un ARNm libre, provisto como un segundo componente de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede codificar para cualquier antígeno como el definido arriba para el componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención. De acuerdo con una realización especialmente preferente, estos antígenos se pueden seleccionar de antígenos tumorales como los definidos arriba para el componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, por ejemplo antígenos específicos tumorales (TSAs) y antígenos asociados a tumores (TAAs) como los definidos arriba, etc.

El al menos un ARNm libre, que se proporciona como un segundo componente de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede ser idéntico o diferente del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención, dependiendo de los requerimientos terapéuticos específicos. En especial, el al menos un ARNm libre, que se proporciona como un segundo componente de la composición inmunoestimuladora de la invención, es idéntico al al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención.

La relación entre el primer componente (es decir, el componente adyuvante que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con el compuesto policatiónico) y el segundo componente (es decir, el al menos un ARNm libre) esa tal como se define en la reivindicación 1 y se puede seleccionar en la composición inmunoestimuladora de la invención de acuerdo con los requerimientos específicos de una terapia particular, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, etc. Típicamente la relación entre el componente adyuvante y el al menos un ARNm libre (componente adyuvante: ARNm libre) de la composición inmunoestimuladora de la invención se selecciona de manera que se desarrolle una estimulación significativa del sistema inmune innato debido al componente adyuvante. En paralelo, la relación se selecciona de manera que una cantidad significativa del al menos un ARNm libre pueda ser proporcionada *in vivo* llevando a una traducción y concentración eficientes de la proteína expresada *in vivo*, por ejemplo, el al menos un antígeno. Preferentemente, la relación componente adyuvante:ARNm libre en la composición inmunoestimuladora de la invención se selecciona de un intervalo de aproximadamente 5:1 (p/p) a alrededor 1:10 (p/p), en especial de alrededor de 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:8 (p/p), en particular de alrededor de 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:5 (p/p) o 1:3 (p/p) con especial preferencia la relación componente adyuvante: ARNm libre en la composición inmunoestimuladora de la invención se selecciona de una proporción aproximadamente 1:1 (p/p).

Para la composición inmunoestimuladora de la invención, a relación entre el primer componente (es decir, el componente adyuvante que comprende o consiste en el al menos un ARN(m) complejado con el compuesto policatiónico) y el segundo componente (es decir, el al menos un ARNm libre) se determina en base a la relación molar de ambas moléculas de ARN entre sí, es decir, el ARN(m) del componente adyuvante, estando complejado con el compuesto policatiónico) y el por lo menos un ARNm libre del segundo componente. Típicamente, la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente se puede seleccionar de manera que la relación molar sea suficiente a las definiciones anteriores (p/p). La proporción molar entre el el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente está en el rango de 0,1:1 a 1:0,01. Preferentemente, la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente se puede seleccionar, por ejemplo, de una relación molar de aproximadamente 0,1:1, 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1:0,9, 1:0,8, 1:0,7, 1:0,6, 1:0,5, 1:0,4, 1:0,3, 1:0,2, 1:0,1, 1:0,01, etc. O de cualquier intervalo formados por cualesquiera dos de estos valores, por ejemplo un kintervalo seleccionado entre 0,1:1 a 1:0,01, 0,2:1 a 1:0,01, 0,3:1 a 1:0,01, 0,4:1 a 1:0,01, 0,5:1 a 1:0,01, 0,6:1 a 1:0,01, 0,7:1 a 1:0,01, 0,8:1 a 1:0,01, 0,9:1 a 1:0,01, 1:1 a 1:0,01, 1:0,9 a 1:0,01, 1:0,8 a 1:0,01, 1:0,7 a 1:0,01, 1:0,6 a 1:0,01, 1:0,5 a 1:0,01, 1:0,4 a 1:0,01, 1:0,3 a 1:0,01, 1:0,2 a 1:0,01, 1:0,1 a 1:0,01, 1:0,01 a 1:0,01.

Con total preferencia, la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente se puede seleccionar, por ejemplo, de una relación molar de aproximadamente 1:1. Cualquiera de las definiciones anteriores con respecto a (p/p) también se aplica.

De acuerdo con la presente invención, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención como la definida arriba puede codificar también para fragmentos y/o variantes de las proteínas mencionadas, donde los fragmentos y/o variantes pueden tener una identidad de secuencia con una de las proteínas citadas de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% u 85%, de preferencia al menos un 90%, en especial al menos un 95% y en particular al menos un 99% de la longitud completa de las secuencias de ácido nucleico (de codificación) que codifican para estas proteínas. En el contexto de la presente invención, un fragmento de tal proteína debe entenderse como una proteína truncada de la misma, es decir, una secuencia de aminoácidos que está truncada N-terminalmente, C-terminalmente y/o intrasecuencialmente en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína (nativa) original. Especialmente, los fragmentos que incluyen un epítipo antigénico son preferidos. En este contexto, fragmentos y epítopos son preferentemente como los definidos específicamente arriba para los antígenos.

Una "variante" en el contexto de la presente invención se refiere a una proteína como la definida arriba (o su secuencia de ARNm o ARN(m) de codificación), donde los ácidos nucleicos del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención o los ácidos nucleicos del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención están intercambiados. De esta manera, se genera una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia original en una o más mutaciones, tal como uno o más aminoácidos sustituidos, insertados y/o suprimidos. De preferencia, los fragmentos y/o variantes tienen la misma función biológica o actividad específica en comparación con las proteínas nativas de longitud completa. Esta "función biológica" incluye, por ejemplo, la capacidad de unión específica (por ejemplo para antígenos particulares), actividad catalítica de estas proteínas, por ejemplo, de proteínas terapéuticamente activas, etc. En este contexto, el término "función biológica" de los anticuerpos como los aquí descritos comprenden también la neutralización de antígenos, activación de complemento u opsonización. Así, los anticuerpos reconocen típicamente ya sea epítopos nativos sobre la superficie celular o antígenos libres. Los anticuerpos como los definidos arriba pueden interactuar con los antígenos presentadores de células e iniciar diferentes mecanismos de defensa. Por otro lado, el anticuerpo puede iniciar mecanismos de señalización en la célula seleccionada que lleven a la autodestrucción de la célula (apoptosis). Por otro lado, pueden marcar la célula de manera que otros componentes o células efectoras del sistema inmunológico del cuerpo puedan reconocer y atacar. Los mecanismos de ataque se conocen como citotoxicidad mediada por complemento dependiente de anticuerpos (CMC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La ADCC implica un reconocimiento del anticuerpo por las células inmunes que acoplan las células marcadas por el anticuerpo y, ya sea a través de su acción directa o a través del

reclutamiento de otros tipos de células, llevan a la muerte de la célula marcada. La CMC es un proceso donde se activa una cascada de diferentes proteínas de complemento, normalmente cuando varios anticuerpos están cercanos unos a otros, dando como resultado la lisis celular o atrayendo otras células inmunes a este lugar para la función de la célula efectora. En la neutralización de un antígeno, el anticuerpo puede unirse a un antígeno y neutralizarlo. Esta reacción de neutralización, a su vez, lleva en general al bloqueo del anticuerpo. Así, el anticuerpo puede unirse sólo a un antígeno, o, en el caso de un anticuerpo biespecífico, a dos antígenos. En particular, los fragmentos de anticuerpo scFv son útiles para reacciones de neutralización, ya que no contienen las funcionalidades del dominio constante de un anticuerpo. En la activación de complemento, el sistema complejo de proteínas de complemento puede ser activado vía la unión de un anticuerpo que es independiente de la parte Fc de un anticuerpo. Los productos finales de la cascada de complemento resultan en la lisis de la célula y la generación de un medio inflamatorio. En la opsonización, los patógenos u otras partículas no celulares se hacen accesibles a los fagocitos vía la unión del dominio constante de un anticuerpo. Alternativamente, las células reconocidas como extrañas pueden ser lisadas mediante citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, las células NK pueden mostrar funciones de lisis por activación de los receptores Fc.

Para determinar el porcentaje al cual dos secuencias son idénticas, particularmente del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, las secuencias pueden ser alineadas con el fin de compararse unas con otras. Por tanto, como un ejemplo, por ejemplo se pueden insertar espacios en la secuencia de la primera secuencia (por ejemplo, ARN(m) o ARNm) y el componente en la posición correspondiente de la segunda secuencia (por ejemplo, ARN(m) o ARNm) pueden compararse. Cuando una posición en la primera secuencia (por ejemplo, ARN(m) o ARNm) es ocupada por el mismo componente que en el caso de una posición en la segunda secuencia (por ejemplo, ARN(m) o ARNm), las dos secuencias son idénticas en esta posición. El porcentaje al cual dos secuencias de ARN(m) (o ARNm) son idénticas es función del número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones. Por supuesto, lo mismo se aplica también a las secuencias de ADN o a las secuencias de aminoácidos codificadas.

El porcentaje al cual dos secuencias, tales como el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, o sus secuencias de aminoácidos codificadas, son idénticas puede determinarse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido pero no limitativo de algoritmo matemático que se puede usar es el algoritmo de Karlin y col. (1993), PNAS E.U.A. 90:5873-5877 o Altschul y col. (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402. Este algoritmo está integrado en el programa BLAST o NBLAST. Las secuencias que son idénticas a las secuencias del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención o al al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención (o a las regiones de codificación de los mismos) de hasta cierto grado pueden ser identificadas por estos programas.

Las secuencias de ARN que corresponden al al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención o al al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención que codifican para secuencias de aminoácidos, las cuales tienen (a) una sustitución conservadora en comparación con la secuencia fisiológica, es decir, nativa o no modificada, están bajo el término particular de "variantes". Las sustituciones donde los aminoácidos codificados que se originan de la misma clase están intercambiados unos por otros se llaman sustituciones conservadoras. En particular, éstas son aminoácidos codificados, cadenas laterales alifáticas codificadas, cadenas laterales cargadas positiva o negativamente, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos codificados, las cadenas laterales de las cuales pueden participar en puentes de hidrógeno, por ejemplo, cadenas laterales con una función hidroxilo. Esto significa que por ejemplo un aminoácido que tenga una cadena lateral polar es reemplazado por otro aminoácido que tenga una cadena lateral igualmente polar, o, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrófoba es sustituido por otro aminoácido que tenga una cadena lateral igualmente hidrófoba (por ejemplo, serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Son posibles inserciones y sustituciones, en particular, en aquellas posiciones de secuencias que no causen modificación de la estructura tridimensional o no afecten a la región de unión o al dominio catalítico. Las modificaciones de la estructura tridimensional por inserciones o supresiones pueden determinarse fácilmente, por ejemplo, usando espectros CD (espectros de dicroísmo circular) (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, in: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger y col. (ed.), Elsevier, Ámsterdam).

Aquellas secuencias de ARN que corresponden al al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención o al al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, las cuales codifican para secuencias de aminoácidos como las definidas arriba, pueden presentarse estar presentes como ARNm mono-, di- o incluso multicistrónico, es decir, un ARN que porta las secuencias de codificación de una, dos o más proteínas como las definidas arriba. Si una secuencia de ARN que corresponde al al menos un ARN(m) del componente adyuvante y/o al al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención dentro de la definición anterior codifica para al menos una proteína como la definida arriba, cada una de estas proteínas puede seleccionarse de la misma o una (de preferencia) proteína diferente como la definida arriba. En cualquier caso, cada proteína codificada por una secuencia de ARN que corresponda al al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la

invención y/o al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención puede seleccionarse independientemente.

- De acuerdo con otra realización particularmente preferente, la composición inmunoestimuladora de la presente invención puede comprender, como al menos un ARNm libre o como al menos un ARN(m) del componente adyuvante, al menos una secuencia de ARN bi- o incluso multicistrónica como la definida arriba. Cada secuencia de codificación de estas secuencias de ARN bi- o incluso multicistrónicas como las definidas arriba puede estar separada por al menos una llamada secuencia IRES (sitio de entrada ribosómico interno). En este contexto, una secuencia IRES puede funcionar como un solo sitio de unión a ribosomas, pero también puede servir para proporcionar una secuencia de ARN bi- o incluso multicistrónica como la definida arriba que codifique para varias proteínas a ser traducidas por los ribosomas independientemente unas de otras. Ejemplos de secuencias IRES que pueden usarse de acuerdo con la invención son aquellas de picornavirus (por ejemplo, FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la fiebre porcina clásicos (CSFV), virus de leucoma de ratón (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).
- De acuerdo con una realización particularmente preferente, la composición inmunoestimuladora de la presente invención puede comprender, como al menos un ARN(m) del componente adyuvante y/o al menos un ARNm libre, una mezcla de diferentes secuencias de ARN, comprendiendo la mezcla, por ejemplo, al menos un ARNm monocistrónico que codifique para una proteína como la definida arriba, y/o al menos un ARNm bi- o incluso multicistrónico, que codifique para la misma o diferentes proteínas como las definidas arriba.
- De acuerdo con otra realización específica, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención pueden ser provistos como un "ARN" estabilizado, de preferencia un ARNm estabilizado, es decir como un ARN que es esencialmente resistente a la degradación *in vivo* por varios causas (por ejemplo, por una exo- o endonucleasa). Es sabido en la técnica que la inestabilidad y (rápida) degradación de ARNm o de ARN *in vivo* en general pueden representar un serio problema en la aplicación de composiciones basadas en ARN. Esta inestabilidad típicamente se debe a enzimas degradadoras de ARN, "RNAsas" (ribonucleasas), donde la contaminación con estas ribonucleasas puede algunas veces degradar completamente el ARN en solución. En consecuencia, la degradación natural del ARN en el citoplasma celular es regulada muy finamente y las contaminaciones por RNasa pueden ser eliminadas generalmente mediante un tratamiento especial antes de usar las composiciones, en particular con pirocarbonato de dietilo (DEPC). A este respecto, en la técnica anterior son conocidos diversos mecanismos de degradación natural que pueden utilizarse también. Por ejemplo, la estructura terminal típicamente es de importancia crítica para un ARNm *in vivo*. Como un ejemplo, en el extremo 5' de las moléculas de ARNm que ocurren naturalmente normalmente existe una "estructura de tapa" (un nucleótido de guanosina modificado), y en el extremo 3' hay típicamente una secuencia de hasta 200 nucleósidos de adenosina (la llamada cola poli-A).
- De acuerdo con una realización particularmente preferente, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, particularmente si es provisto como un ARN(m), puede por tanto estar estabilizado contra la degradación por RNAsas mediante la adición de una llamada estructura de "tapa 5'". A este respecto, se da particular preferencia a una m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A o G(5')ppp(5')G como estructura de "tapa 5'". Sin embargo, tal modificación se introduce sólo si una modificación, particularmente como la aquí definida, aún no ha sido introducida ya en el extremo 5' del al menos un ARN(m) y/o ARNm como el definido, o si la modificación no interfiere con las propiedades inmunogénicas del al menos un ARN(m) y/o ARNm como el definido arriba.
- De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención puede contener, especialmente si el ARN está en forma de un ARNm, una cola poli-A en su extremo 3', típicamente de alrededor de 10 a 200 nucleótidos de adenosina, de preferencia alrededor de 10 a 100 nucleótidos de adenosina, muy preferiblemente alrededor de 20 a 100 nucleótidos de adenosina o todavía más preferiblemente alrededor de 40 a 80 nucleótidos de adenosina.
- De acuerdo con una realización muy particularmente preferente, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención puede contener, especialmente si el ARN está en forma de un ARNm, una cola poli-C en su término 3', típicamente de alrededor de 10 a 200 nucleótidos de citosina, de preferencia aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, muy preferiblemente alrededor de 20 a 70 nucleótidos de citosina o todavía más preferiblemente alrededor de 20 a 60 o incluso 10 a 40 nucleótidos de citosina.
- De acuerdo con otra realización, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención puede estar además modificado con GC o modificado de otra forma. Algunas modificaciones del ARN pueden ser, dependiendo del tipo de ARN, más adecuadas para un ARN en general, o, por ejemplo, en el caso de secuencias de ARN(m) o ARNm modificadas con GC, o más adecuadas para un ARN de codificación, de preferencia un ARN(m) y/o ARNm como el definido arriba. Estas modificaciones adicionales como las aquí definidas llevan preferentemente a un ARN(m) y/o ARNm estabilizado como el definido arriba.

De acuerdo con una realización específica, este ARN estabilizado puede prepararse modificando el contenido de G/C de la región de codificación de las secuencias de ARN mencionadas aquí, por ejemplo, una secuencia de ARN que se corresponde con el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención.

5 En una realización particularmente preferente de la presente invención, el contenido en G/C de la región de codificación del al menos un ARN(m) del componente adyuvante y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención está alterado, preferentemente incrementado, en comparación con el contenido en G/C de la región de codificación del ARN no modificado correspondiente (en lo sucesivo "ARN nativo"). En este contexto, la secuencia de aminoácidos de esta secuencia de ARN incrementada en G/C que corresponde al al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o al lo menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención preferentemente no está alterada en comparación con el ARN nativo correspondiente. Tal alteración de la secuencia G/C puede en lo sucesivo ser referida como estabilización GC.

15 Esta estabilización G/C del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región de ARN que será traducida es importante para una traducción eficiente de ese ARN. Así, la secuencia de varios nucleótidos es importante. En particular, secuencias que tengan un contenido en G (guanosina)/C (citosina) incrementado son más estables que las secuencias que tienen un contenido de A (adenosina)/U (uracilo) incrementado. De acuerdo con la invención, los codones del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención son por tanto variados en comparación con su secuencia de ARN nativa, conservando al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos traducida, de tal forma que incluyan una cantidad incrementada de nucleótidos G/C. Con respecto al hecho de que varios codones codifican para uno y el mismo aminoácido (la llamada degeneración del código genético), pueden determinarse aquellos codones más favorables para la estabilidad (el llamado uso de codones alternativos).

25 Dependiendo del aminoácido a codificar por el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, existen varias posibilidades para la modificación G/C de la secuencia de ARN, en comparación con su secuencia nativa. En el caso de aminoácidos que son codificados por codones que contienen exclusivamente nucleótidos G o C, no es necesaria ninguna modificación G/C del codón. Así, los codones para Pro (CCC o CCG), Arg (CGC o CGG), Ala (GCC o GCG) y Gly (GGC o GGG) no requieren de modificación G/C, ya que no está presente A o U.

30 En contraste, los codones que contienen nucleótidos A y/o U pueden ser modificados con G/C mediante la sustitución de otros codones que codifiquen para los mismos aminoácidos pero que no contengan A y/o U. Ejemplos de éstos son:

los codones para Pro pueden ser modificados con G/C de CCU o CCA a CCC o CCG;

los codones para Arg pueden ser modificados con G/C de CGU o CGA o AGA o AGG a CGC o CGG;

los codones para Ala pueden ser modificados con G/C de GCU o GCA a GCC o GCG;

los codones para Gly pueden ser modificados con G/C de GGU o GGA a GGC o GGG.

40 En otros casos, aunque los nucleótidos A o U no pueden ser eliminados de los codones, sin embargo es posible reducir el contenido en A y U empleando codones que contengan un contenido más bajo de nucleótidos A y/o U. Ejemplos de éstos son:

los codones para Phe pueden ser modificados con G/C de UUU a UUC;

los codones para Leu pueden ser modificados con G/C de UUA, UUG, CUU o CUA a CUC o CUG;

45 los codones para Ser pueden ser modificados con G/C de UCU o UCA o AGU a UCC, UCG o AGC;

los codones para Tyr pueden ser modificados con G/C de UAU a UAC;

los codones para Cys pueden ser modificados con G/C de UGU a UGC;

los codones para His pueden ser modificados con G/C de CAU a CAC;

los codones para Gln pueden ser modificados con G/C de CAA a CAG;

50 los codones para Ile pueden ser modificados con G/C de AUU o AUA a AUC;

los codones para Thr pueden ser modificados con G/C de ACU o ACA a ACC o ACG;

los codones para Asn pueden ser modificados con G/C de AAU a AAC;

los codones para Lys pueden ser modificados con G/C de AAA a AAG;

los codones para Val pueden ser modificados con G/C de GUU o GUA a GUC o GUG;

los codones para Asp pueden ser modificados con G/C de GAU a GAC;

los codones para Glu pueden ser modificados con G/C de GAA a GAG;

el codón de parada UAA puede ser modificado con G/C para UAG o UGA.

5 En el caso de los codones para Met (AUG) y Trp (UGG), por otro lado, no hay posibilidad de modificación de secuencia.

Las sustituciones arriba citadas pueden usarse ya sea individualmente o en todas las combinaciones posibles para incrementar el contenido en G/C del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención en comparación con su ARN nativo particular (es decir, la secuencia no modificada). Así, por ejemplo, todos los codones para Thr que ocurren en la secuencia nativa pueden ser modificados con G/C a ACC (o ACG). Sin embargo, preferentemente, se usan combinaciones de las posibilidades de sustitución anteriores:

10 sustitución de todos los codones que codifican para Thr en la secuencia no modificada (ARN nativo) por ACC (o ACG) y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Ser por UCC (o UCG o AGC);

15 sustitución de todos los codones que codifican para Ile en la secuencia original por AUC y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Lys por AAG y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Tyr por UAC;

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Val en la secuencia original por GUC (o GUG) y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Glu por GAG y

20 sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Ala por GCC (o GCG) y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Arg por CGC (o CGG);

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Val en la secuencia original por GUC (o GUG) y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Glu por GAG y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Ala por GCC (o GCG) y

25 sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Gly por GGC (o GGG) y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Asn por AAC;

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Val en la secuencia original por GUC (o GUG) y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Phe por UUC y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Cys por UGC y

30 sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Leu por CUG (o CUC) y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Gln por CAG y

sustitución de todos los codones que codifican originalmente para Pro por CCC (o CCG); etc.

35 Preferentemente, el contenido en G/C de la región de codificación de una secuencia de ARN correspondiente al al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o al al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención se incrementa en al menos un 7%, en especial en al menos un 15%, en particular en al menos un 20%, en comparación con el contenido en G/C de la región de codificación de ARN nativo que codifica para una proteína. De acuerdo con una realización específica, al menos un 60%, en especial al menos un 70%, en particular al menos un 80% y con total preferencia al menos un 90%, 95% o incluso un 100% de los codones sustituibles de la región que codifica para una proteína o la secuencia completa de la secuencia de ARN nativa son sustituidos, incrementando así el contenido en G/C de la secuencia.

40 En este contexto, es particularmente preferible incrementar el contenido en G/C del ARN nativo del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención al máximo (es decir un 100% de los codones sustituibles del ARN nativo), en particular en la región que codifica para una proteína.

45 De acuerdo con la invención, una modificación preferente adicional del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención se basa en el descubrimiento de que la eficacia de traducción también es determinada por una frecuencia diferente en la ocurrencia de moléculas de ARNt en las células. Así, cuando los llamados "codones raros" están presentes en una secuencia de ARN nativa en mayor grado, la secuencia de ARN

estabilizada con G/C o nativa correspondiente puede ser traducida a un nivel significativamente más deficiente que en el caso en que los codones que codifican para moléculas de ARNt relativamente “frecuentes” están presentes.

5 De acuerdo con la invención, la región en el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o en el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención que codifica para una proteína está preferentemente estabilizada con GC en comparación con la región correspondiente del ARN nativo respectivo, por lo que al menos un codón de la secuencia nativa que codifica para un ARNt que es relativamente raro en la célula es intercambiada por un codón que codifica para un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Mediante esta modificación, las secuencias de ARN nativas son estabilizadas con GC de manera que los codones para los cuales moléculas de ARNt que ocurren frecuentemente están disponibles sean insertados. En otras palabras, de acuerdo con la invención, mediante esta modificación todos los codones de la secuencia nativa que codifica para un ARNt que es relativamente raro en la célula pueden en cada caso ser intercambiados por un codón que codifica para un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y el cual, en cada caso, porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.

15 El experto en la técnica conoce qué moléculas de ARNt ocurren de manera relativamente frecuente en la célula y cuáles, en contraste, ocurren en forma relativamente rara; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666. Son particularmente preferentes los codones para el aminoácido particular el ARNt que ocurre más frecuentemente, por ejemplo, el codón Gly, que usa el ARNt que ocurre más frecuentemente en la célula (humana).

20 De acuerdo con la invención, es particularmente preferente enlazar el contenido en G/C secuencial incrementado, en particular maximizado, en la secuencia de ARN estabilizada con GC del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención con los codones “frecuentes” sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región de codificación del ARN nativo. Esta realización preferente permite la provisión de una secuencia de ARN traducida y estabilizada con GC de manera particularmente eficiente del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención.

30 La determinación de la modificación con GC necesaria y/o posible del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, como se describió arriba (contenido de G/C incrementado; intercambio de moléculas de ARNt), se puede llevar a cabo usando el programa de computadora descrito en WO 02/098443. Usando este programa, la secuencia de nucleótidos de cualquier ARN codificante deseado como el definido arriba puede estabilizarse con GC con la ayuda del código genético o la naturaleza degenerativa del mismo, de manera que el resultado es un contenido en G/C máximo. En combinación con el uso de codones que codifican para moléculas de ARNt que ocurren tan frecuentemente como sea posible en la célula, la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ARN estabilizada con GC del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención preferentemente no está modificada adicionalmente en comparación con su secuencia de ARN nativa. Alternativamente, también es posible modificar sólo el contenido en G/C o sólo el uso de codones en comparación con la secuencia original. El código fuente en Visual Basic 6.0 (ambiente de desarrollo usado: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 con Servicepack 3) también se describe en la WO 02/098443.

45 De acuerdo con otra realización específica, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención puede ser provisto como un ARN estabilizado, que es esencialmente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por una exo- o endo-nucleasa), modificando el esqueleto fosfato de estas secuencias de ARN aquí definidas. Los nucleótidos que pueden usarse de preferencia a este respecto contienen un esqueleto fosfato modificado con fosforotioato, preferentemente al menos uno de los oxígenos del fosfato contenidos en el esqueleto fosfato es reemplazado por un átomo de azufre. Una secuencia de ARN estabilizada como la aquí definida puede incluir además, por ejemplo: análogos de fosfato no iónicos, por ejemplo alquil- y aril-fosfonatos, donde el oxígeno del fosfonato cargado es reemplazado por un grupo alquilo o arilo, o fosfodiésteres y alquifosfotriésteres, donde el residuo de oxígeno cargado está presente en forma alquilada. En más detalle, preferentemente las porciones fosfato pueden ser sustituidas por ejemplo por fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos péptidos, metilfosfonatos, etc.

55 De acuerdo con otra realización, una secuencia de ARN como la aquí definida, preferentemente el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede también modificarse (y preferiblemente estabilizarse) introduciendo nucleótidos modificados que contengan modificaciones de sus porciones ribosa o base en la secuencia de ARN. Generalmente, una secuencia de ARN como la aquí definida, preferentemente el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede contener cualquier nucleótido nativo (= de origen natural), por ejemplo guanosina, uracilo, adenosina, timidina y/o citosina o un análogo del mismo. A este respecto, los análogos de nucleótido se definen como variantes que no son de origen nativo de nucleótidos de origen natural. En consecuencia, los análogos son nucleótidos derivados químicamente con grupos funcionales que no son de origen nativo, los cuales preferentemente se añaden o suprimen del nucleótido de origen natural o

sustituyen grupos funcionales de origen natural de un nucleótido. En consecuencia, cada componente del nucleótido de origen natural puede estar modificado, en particular el componente base, el componente azúcar (ribosa) y/o el componente fosfato que forma el esqueleto de la secuencia de ARN a modificar. Los análogos de guanosina, uracilo, adenosina y citosina incluyen, sin implicar ninguna limitación, cualquier guanosina, uracilo, adenosina, 5 timidina o citidina de origen natural o no de origen natural que haya sido alterado químicamente, por ejemplo, por acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyendo 1-metiladenosina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-  
 10 guanosina, 2,6-diaminopurina, 2'-amino-2'-desoxiadenosina, 2'-amino-2'-desoxicitidina, 2'-amino-2'-desoxiguanosina, 2'-amino-2'-desoxiuridina, 2-amino-6-cloropurinoribosido, 2-aminopurina-ribosido, 2'-araadenosina, 2'-aracitidina, 2'-arauridina, 2'-azido-2'-desoxiadenosina, 2'-azido-2'-desoxicitidina, 2'-azido-2'-desoxiguanosina, 2'-  
 15 azido-2'-desoxiuridina, 2-cloroadenosina, 2'-flour-2'-desoxiadenosina, 2'-flour-2'-desoxicitidina, 2'-flour-2'-desoxiguanosina, 2'-flour-2'-desoxiuridina, 2'-flourotimidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 2-metil-tio-N6-isopenenil-adenosina, 2'-O-metil-2-aminoadenosina, 2'-O-metil-2'-desoxiadenosina, 2'-O-metil-2'-desoxicitidina, 2'-O-metil-2'-desoxiguanosina, 2'-O-metil-2'-desoxiuridina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metilinosina, 2'-O-metilpseudouridina, 2-tiocitidina, 2-tiocitosina, 3-metilcitosina, 4-acetilcitosina, 4-tiouridina, 5-  
 20 (carboxihidroximetil)uracilo, 5,6-dihidrouridina, 5-aminoallicitidina, 5-aminoalil-desoxiuridina, 5-yodouridina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometil-uracilo, 5-cloro-Ara-citosina, 5-flourouridina, 5-yodouridina, 5-metoxycarbonilmetil-uridina, 5-metoxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 6-azacitidina, 6-azauridina, 6-cloro-7-deazaguanosina, 6-cloropurinoribosido, 6-mercapto-guanosina, 6-metil-mercaptapurin-ribosido, 7-deaza-2'-desoxiguanosina, 7-deazaadenosina, 7-metilguanosina, 8-azaadenosina, 8-bromoadenosina, 8-bromoguanosina, 8-mercaptoguanosina, 8-oxoguanosina, bencimidazol-ribosido, beta-D-manosilqueosina, dihidrouracilo, inosina, N1-metiladenosina, N6-([6-aminohehexil]carbamoilmetil)adenosina, N6-isopentenil-adenosina, N6-metil-adenosina, N7-metilxantosina, metil éster de ácido N-uracil-5-oxiacético, puromicina, queosina, ácido uracil-5-oxiacético, metil éster de ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, xantosina y xiloadenosina. La preparación de estos análogos es conocida del experto en la técnica, por ejemplo, de las patentes US 4.373.071, US 4.401.796, US 4.415.732, US 4.458.066, US 4.500.707, US 4.668.777, US 4.973.679, US 5.047.524, US 5.132.418, US 5.153.319, US 5.262.530 y 5.700.642. En el caso de un análogo como el descrito arriba, se da particular preferencia de acuerdo con la invención a aquellos análogos que incrementan la inmunogenicidad de una secuencia de ARN como la aquí definida, preferentemente al al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o al al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o que no  
 30 interfieren con otra modificación del ARN que haya sido introducida.

Una secuencia de ARN de la composición inmunoestimuladora de la invención como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede contener modificaciones en el esqueleto. Una modificación de esqueleto en relación con la presente invención es una modificación donde los  
 35 fosfatos del esqueleto de los nucleótidos contenidos en el ARN se modifican químicamente. Estas modificaciones del esqueleto incluyen típicamente, sin limitación, modificaciones del grupo consistente en metilfosfonatos, fosforamidatos y fosforotioatos (por ejemplo, citidin-5'-O-(1-tiofosfato)).

La secuencia de ARN de la composición inmunoestimuladora de la invención aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede, alternativa o adicionalmente, contener modificaciones de azúcar. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos presentes e incluye típicamente, sin limitación, modificaciones de azúcar seleccionadas del grupo consistente en 2'-desoxi-2'-fluoro-oligorribonucleótido (2'-flour-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-flour-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato), 2'-desoxi-2'-deamina oligorribonucleótido (2'-amino-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato), 2'-O-alquiloligorribonucleótido, 2'-desoxi-2'-C-alquiloligorribonucleótido, (2'-O-metilcitidin-5'-trifosfato, 2'-metiluridin-5'-trifosfato), 2'-C-alquiloligorribonucleótido e isómeros de los mismos (2'-aracitidin-5'-trifosfato, 2'-arauridin-5'-trifosfato) o azidotrifosfato (2'-azido-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato).

La secuencia de ARN de la composición inmunoestimuladora de la invención aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede, alternativa o adicionalmente, contener también al menos una modificación de base, preferentemente adecuada para incrementar la expresión de la proteína codificada por la secuencia de ARN, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante, de forma significativa en comparación con la secuencia de ARN no alterada, es decir natural (= nativa). Significativo en este caso se refiere a un incremento en la expresión de la proteína en comparación con la expresión de la secuencia de ARN nativa de al menos un 20%, de preferencia al menos 30%, 40%, 50% o 60%, en especial de al menos 70%, 80%, 90% o incluso 100% y en particular de al menos 150%, 200% o incluso 300%. En relación con la presente invención, un nucleótido con una modificación en base se selecciona de preferencia del grupo de los nucleótidos modificados en base consistente en 2-amino-6-cloropurinribosido-5'-trifosfato, 2-aminoadenosin-5'-trifosfato, 2-tiocitidin-5'-trifosfato, 2-tiouridin-5'-trifosfato, 4-tiouridin-5'-trifosfato, 5-aminoallicitidin-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridin-5'-trifosfato, 5-bromocitidin-5'-trifosfato, 5-bromouridin-5'-trifosfato, 5-yodocitidin-5'-trifosfato, 5-yodouridin-5'-trifosfato, 5-metilcitidin-5'-trifosfato, 5-metiluridin-5'-trifosfato, 6-azacitidin-5'-trifosfato, 6-azauridin-5'-trifosfato, 6-cloropurinoribosido-5'-trifosfato, 7-deazaadenosin-5'-trifosfato, 7-desazaguanosin-5'-trifosfato, 8-azaadenosin-5'-trifosfato, 8-azidoadenosin-5'-trifosfato, bencimidazol-ribosido-5'-trifosfato, N1-metiladenosin-5'-trifosfato, N1-

metilguanosa-5'-trifosfato, N6-metiladenosin-5'-trifosfato, O6-metilguanosa-5'-trifosfato, pseudouridina-5'-trifosfato o puromicina-5'-trifosfato, xantosina-5'-trifosfato. Se da particular preferencia a nucleótidos para modificaciones en base seleccionadas del grupo de nucleótidos modificados en base consistentes en 5-metilcitosina-5'-trifosfato, 7-desazaguanosa-5'-trifosfato, 5-bromocitosina-5'-trifosfato y pseudouridina-5'-trifosfato.

5 De acuerdo con una realización particularmente específica, una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, comprende entre 0,1% y 100% de nucleótidos (modificados) seleccionados de nucleótidos (modificados) como los definidos arriba con respecto a la secuencia de ARN nativa no modificada, donde de preferencia entre un 0,1% y 100% de cada  
10 nucleótido de ATP, GTP, CTP, UTP (y/o TTP) no modificado de origen natural de una secuencia de ARN aquí definido, de preferencia del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, o de su plantilla de ADN correspondiente, se puede modificar usando un nucleótido modificado correspondiente como el  
15 definido arriba, en especial entre un 0,1% y un 20%, entre 10% y 30%, entre 20% y 40%, entre 30% y 50%, entre 40% y 60%, entre 50% y 70%, entre 60% y 80%, entre 70% y 90% o entre 80% y 100% o al menos 10%, muy preferiblemente al menos 30%, en especial al menos 40%, en particular al menos 60%, con especial preferencia al menos 70%, con particular preferencia al menos 80% y con muy especial preferencia al menos 90% y con total preferencia un 100% de cada nucleótido de ATP, GTP, CTP, UTP (y/o TTP) no modificado de origen natural del ARN no modificado.

20 En una realización preferente adicional de la presente invención, el contenido en A/U en el ambiente del sitio de unión a ribosomas de una secuencia de ARN (opcionalmente ya estabilizada con GC) como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, se incrementa en comparación con el contenido en A/U en el ambiente del sitio de unión a ribosomas de su secuencia de ARN nativa  
25 particular. Esta modificación (un contenido de A/U incrementado alrededor del sitio de unión a ribosomas) aumenta la eficiencia de unión a ribosomas para la secuencia de ARN. Una unión efectiva de los ribosomas al sitio de unión a ribosomas (secuencia de Kozak: GCCGCCACCAUGG (SEQ ID NO: 122), el AUG forma el codón de inicio) tiene a su vez el efecto de una traducción eficiente de la secuencia de ARN aquí definida.

De acuerdo con una realización más de la presente invención, una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, se puede modificar  
30 adicionalmente con respecto a elementos de secuencia potencialmente desestabilizadores. Particularmente, la región de codificación y/o la región no traducida 5' y/o 3' de la secuencia de ARN aquí definida puede modificarse más en comparación con la secuencia de ARN nativa particular de forma que no contenga elementos de secuencia desestabilizadores, donde la secuencia de aminoácidos codificada de la secuencia de ARN aquí definida de preferencia no se modifica en comparación con su ARN nativo particular. Es conocido que, por ejemplo, en las  
35 secuencias de moléculas de ARN eucarióticas ocurren elementos de secuencia desestabilizadores (DSE), a los cuales las proteínas de señal se unen y regulan la degradación enzimática de ARN *in vivo*. Para estabilizar adicionalmente la secuencia de ARN aquí definida, opcionalmente en la región que codifica para una proteína, pueden llevarse a cabo una o más de estas modificaciones adicionales en comparación con la región correspondiente del ARN nativo, de forma que ninguno o sustancialmente ningún elemento de secuencia desestabilizador esté contenido en las mismas. De acuerdo con la invención, DSEs presentes en las regiones no traducidas (3'- y/o 5'-UTR) también pueden ser eliminados de una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la  
40 invención y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, mediante cualquiera de estas modificaciones adicionales.

Estas secuencias de desestabilización son, por ejemplo, secuencias ricas en AU (AURES), las cuales ocurren en las secciones 3'-UTR de numerosas moléculas de ARN inestables (Caput y col., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 1986, 83:1670 a 1674). Una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del  
50 componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, por tanto, preferentemente está modificada (más) en comparación con el ARN nativo, de manera que el ARN modificado no contiene estas secuencias desestabilizadoras. Esto también se aplica a los motivos de secuencia que son reconocidos por posibles endonucleasas, por ejemplo la secuencia GAACAAG, contenida en el segmento 3'-UTR del gen que codifica para el receptor de transferrina (Binder y col., EMBO, 1994, 13:1969 a 1980). Preferentemente, estos motivos de secuencia también son eliminados de acuerdo con la invención en la secuencia de ARN aquí definida, de preferencia en el al menos un ARN(m) del  
55 componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o en el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención.

También preferentemente, de acuerdo con la invención, una secuencia de ARN aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, tiene, en una forma modificada más, al menos una IRES como la definida arriba y/o al menos una secuencia de estabilización 5' y/o 3', por ejemplo para

incrementar la unión de ribosomas o para permitir la expresión de diferentes proteínas como las definidas anteriormente, ubicadas en al menos un ARN (bi- o incluso multicistrónico) como el definido arriba.

De acuerdo con la invención, preferentemente una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede tener además al menos una secuencia estabilizadora 5' y/o 3'. Estas secuencias estabilizadoras en las regiones no traducidas 5' y/o 3' tienen el efecto de incrementar la vida media del ARN aquí definido en el citosol. Estas secuencias estabilizadoras pueden tener un 100% de homología de secuencia con las secuencias de origen natural presentes en virus, bacterias y eucariontes, pero también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Las secuencias no traducidas (UTR) del gen de globina, por ejemplo de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*, pueden mencionarse como ejemplo de secuencias estabilizadoras que se pueden usar en la presente invención para una secuencia de ARN estabilizada más como la aquí definida, de preferencia al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención estabilizado más y/o al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención estabilizado más. Otro ejemplo de secuencia de estabilización tiene la fórmula general (C/U)CCAN<sub>ik</sub>CCC(U/A)Py<sub>x</sub>UC(C/U)CC (SEQ ID NO: 123), la cual está contenida en la 3'-UTR del ARN muy estable que codifica para globina, (I)-colágeno, 15-lipoxigenasa o para tirosina hidroxilasa (véase Holcik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 1997, 94:2410 a 2414). Estas secuencias de estabilización pueden por supuesto usarse individualmente o en combinación unas con otras y también en combinación con otras secuencias estabilizadoras conocidas por el experto en la técnica. Una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, está por tanto, de preferencia, presente como ARN estabilizado en UTR (regiones no traducidas) por globina.

Cualquiera de las modificaciones anteriores pueden aplicarse a una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, y además a cualquier ARN usado en el contexto de la presente invención y pueden, si es adecuado o necesario, combinarse unas con otras en cualquier combinación, siempre y cuando estas combinaciones de modificaciones no interfieran unas con otras en el ARN modificado respectivo. El experto en la técnica puede hacer esta elección en consecuencia.

De acuerdo con la invención, una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, se puede preparar usando cualquier secuencia de ARN o ADN natural o sintética disponible en la técnica como plantilla, es decir cualquier ácido (desoxi)ribonucleico adecuado. Estas secuencias de ADN o ARN naturales o sintéticas pueden obtenerse de una fuente sintética de origen natural disponible para el experto, por ejemplo se pueden derivar de una librería de proteínas o péptidos o pueden ser transcriptas de una librería de ácido nucleico, tal como una librería de ADNc, o pueden obtenerse de cualquier tejido vivo o muerto, de una muestra obtenida de por ejemplo una fuente humana, animal o bacteriana. Alternativamente, una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede prepararse sintéticamente por métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo mediante síntesis en fase sólida o cualquier otro método adecuado para preparar secuencias de ácido nucleico, particularmente secuencias de ARN. Además, las sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos o bases en estas secuencias preferentemente se llevan a cabo usando una matriz de ADN para la preparación del ARN como el aquí definido o mediante técnicas de la bien conocida mutagénesis dirigida a sitio o con una estrategia de ligación de oligonucleótidos (véase, por ejemplo, Maniatis y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición, Cold Spring Harbor, NY, 2001). Las modificaciones de una secuencia de ARN como la aquí definida, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, se pueden introducir también en el ARN por otros métodos conocidos por el experto en la técnica. Métodos adecuados son, por ejemplo, métodos de síntesis usando dispositivos de síntesis de oligonucleótidos (automáticos o semiautomáticos), métodos bioquímicos, por ejemplo métodos de transcripción *in vitro*, etc. A este respecto se puede usar, de preferencia en el caso de las secuencias (relativamente cortas) cuya longitud generalmente no excede de 50 a 100 nucleótidos, métodos de síntesis que utilicen dispositivos de síntesis de oligonucleótidos (automáticos o semiautomáticos) así como métodos de transcripción *in vitro*. En el caso de secuencias (relativamente largas), por ejemplo secuencias con una longitud de más de 50 a 100 nucleótidos, son más adecuados métodos bioquímicos, por ejemplo métodos de transcripción *in vitro*. Sin embargo, las moléculas de ARN modificadas en base todavía más largas pueden ser sintetizadas sintéticamente acoplando varios fragmentos sintetizados covalentemente.

Como se definió anteriormente, la composición inmunoestimuladora de la invención comprende a) un componente adyuvante y b) al menos un ARNm libre. De acuerdo con otra realización, la composición inmunoestimuladora de la invención puede comprender un adyuvante adicional, es decir un adyuvante que esté contenido en la composición inmunoestimuladora de la invención además del componente adyuvante definido arriba. En este contexto, un adyuvante puede entenderse como cualquier compuesto que sea adecuado para apoyar la administración y

opcionalmente el suministro de la composición inmunoestimuladora de la invención de acuerdo con la invención. Además, este adyuvante puede, ser limitarse a, iniciar o incrementar una respuesta inmune del sistema inmunológico innato, es decir una respuesta inmune no específica. En otras palabras, cuando se administra, la composición inmunoestimuladora de la invención desarrolla típicamente una respuesta inmune innata gracias al componente adyuvante, que comprende o consiste en el al menos un ARN(m) complejado con un compuesto policatiónico definido arriba. Sin embargo, esta respuesta inmune innata puede incrementarse al añadiendo un adyuvante adicional como el definido a continuación. Este adyuvante adicional se puede seleccionar de cualquier adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, es decir que apoye la inducción de una respuesta inmune innata en un mamífero, excepto de entre compuestos policatiónicos como los definidos arriba para evitar así la complejación del al menos un ARNm libre. De preferencia, el adyuvante puede seleccionarse del grupo consistente en, sin limitarse a, quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, plurónicos, solución de alumbre, hidróxido de aluminio, ADJUMER™ (polifosfaceno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alumbre); gel de hidróxido de aluminio de alta adsorción de proteínas; gel de hidróxido de aluminio de baja viscosidad; AF o SPT (emulsión de escualano (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%), solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4); AVRIDINE™ (propandiamina); BAY R1005™ (hidroacetato de (N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoil-amida); CALCITRIOL™ (1-alfa,25-dihidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de calcio); holotoxina del cólera, proteína de fusión de toxina de cólera A1-fragmento de proteína A-D, subunidad B de la toxina del cólera; CRL 1005 (copolímero en boque P1205); liposomas que contengan citocinas; DDA (bromuro de dimetildiocetadecilamonio); DHEA (deshidroepiandrosterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complejo DOC/alumbre (sal sodio de ácido desoxicólico); adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; gama-inulina; adyuvante Gerbu (mezcla de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-glutamina (GMDP), ii) cloruro de dimetildiocetadecilamonio (DDA), iii) complejo de zinc-sal de L-prolina (ZnPro-8); GM-CSF; GMDP (N-acetilglucosaminil-(b1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina); imiquimod (1-(2-metipropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina); ImmTher™ (dipalmitato de N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRVs (inmunoliposomas preparados a partir de vesículas de deshidratación-rehidratación); interferón-gama; interleucina-1beta; interleucina-2; interleucina-7; interleucina-12; ISCOMS™; ISCOPREP 7.0.3.™, liposomas; LOXORIBINE™ (7-alil-8-oxoguanosina); adyuvante oral LT (enterotoxina-prototoxina lábil a *E. coli*); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59™; (emulsión de escualeno-agua); MONTANIDE ISA 51™ (adyuvante de Freund incompleto purificado); MONTANIDE ISA 720™ (adyuvante de aceite metabolizable); MPL™ (lípido de 3-Q-desacil-4'-monofosforilo A); liposomas MTP-PE y MTP-PE ((N-acetil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosfoniloxi))-etilamida, sal monosódica); MURAMETIDE™ (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH<sub>3</sub>); MURAPALMITINE™ y D-MURAPALMITINE™ (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoil); NAGO (oxidasa neuraminidasa-galactosa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISVs (vesículas tensioactivas no iónicas); PLEURAN™ (β-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico; microfesferas/nanoesferas); PLURONIC L121™; PMMA (metacrilato de polimetilo); PODDS™ (microesferas proteínoides); derivados de polietilencarbamato; poli-rA; poli-rU (complejo de ácido poliadenílico-ácido poliuridílico); polisorbato 80 (Tween 80); cocleatos de proteínas (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON™ (QS-21); Quil-A (saponina Quil-A); S-28463 (4-amino-otec-dimetil-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol); SAF-1™ ("formulación adyuvante Syntex"); proteoliposomas Sendai y matrices de lípidos que contengan Sendai; Span-85 (trioleato de sorbitano); Specol (emulsión de Marcol 52, Span 85 y Tween 85); escualeno o Robane® (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracosano y 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano); esteariltirosina (clorhidrato de octadeciltirosina); Theramid® (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida); Theronil-MDP (Termurtide™ o [thr 1]-MDP; N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina); partículas de Ty (Ty-VLPs o partículas tipo virus); liposomas de Walter-Reed (liposomas que contengan lípido A adsorbido sobre hidróxido de aluminio), y lipopéptidos, incluyendo Pam3Cys, en particular sales aluminio, tales como Adju-phos, Alhidrogel, Rehidragel; emulsiones, incluyendo CFA, SAF, IFA, MF59, Provac, titerMax, Montanida, Vaxfectin; copolímeros, incluyendo Optivax (CRL1005), L121, Poloaxmer4010), etc.; liposomas, incluyendo Stealth, cocleatos, incluyendo BIORAL; adyuvantes derivados de plantas, incluyendo QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; adyuvantes adecuados para co-estimulación incluyendo Tomatine, biopolímeros, incluyendo PLG, PMM, inulina; adyuvantes derivados de microbios, incluyendo Romurtide, DETOX, MPL, CWS, manosa, secuencias de ácido nucleico CpG, CpG7909, ligandos de TLR 1-10 humano, ligandos de TLR 1-13 de murino, ISS-1018, IC31, imidazoquinolinas, Ampligen, Ribis29, IMOxina, IRIVs, VLPs, toxina del cólera, toxina lábil al calor, Pam3Cys, Flagelina, ancla GPI, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP; y adyuvantes adecuados como antagonistas incluyendo neuropéptido CGRP. Los adyuvantes adecuados pueden además seleccionarse de ácidos nucleicos modificados por lípidos o de cualquiera de las secuencias inmunoestimuladoras de las fórmulas (I), (II), (III), (IIIa), (IV), (IVa), (IVb), (Va) y/o (Vb) definidas anteriormente.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende la composición inmunoestimuladora de la invención definida anteriormente y opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como un primer ingrediente, la composición farmacéutica de la invención comprende la composición inmunoestimuladora de la invención definida arriba, es decir un a) componente adyuvante que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con un compuesto policatiónico, y b) al menos un ARNm libre que codifica para al menos un antígeno, donde la composición inmunoestimuladora es capaz de desarrollar o incrementar una respuesta innata y una respuesta adaptiva en un mamífero. En consecuencia, la composición farmacéutica de la

invención apoya típicamente una respuesta inmune innata y una respuesta inmune adaptiva del sistema inmunológico de un paciente a tratar.

Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un portador farmacéuticamente aceptable incluye típicamente una base líquida o no líquida para la composición farmacéutica de la invención. Si la composición farmacéutica de la invención se proporciona en forma líquida, el portador será típicamente agua libre de pirógenos, solución salina isotónica o soluciones (acuosas) tamponadas, por ejemplo soluciones tampón con fosfato, citrato, etc. Particularmente para la inyección de la composición farmacéutica de la invención, se puede emplear agua o preferentemente un tampón, en especial un tampón acuoso, que contenga una sal de sodio, de preferencia al menos 50 mM de una sal de sodio, una sal de calcio, de preferencia al menos 0,01 mM de una sal de calcio y opcionalmente una sal de potasio, preferiblemente al menos 3 mM de una sal de potasio. De acuerdo con una realización preferente, las sales de sodio, calcio y opcionalmente potasio pueden estar presentes en forma de sus haluros, por ejemplo cloruros, yoduros o bromuros, en forma de sus hidróxidos, carbonatos, carbonatos ácidos o sulfatos, etc. Sin limitarse a éstos, ejemplos de sales de sodio incluyen, por ejemplo, NaCl, NaI, NaBr, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ejemplos de las sales potasio opcionales incluyen, por ejemplo, KCl, KI, KBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y ejemplos de las sales de calcio incluyen, por ejemplo, CaCl<sub>2</sub>, CaI<sub>2</sub>, CaBr<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>. Además, en el tampón pueden estar incluidos aniones orgánicos de los cationes mencionados. De acuerdo con una realización especialmente preferente, el tampón adecuado para propósitos de inyección como el definido arriba puede contener sales seleccionadas de entre cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) y opcionalmente cloruro de potasio (KCl), donde pueden estar presentes aniones adicionales además de los cloruros. El CaCl<sub>2</sub> también puede ser reemplazado por otra sal, tal como KCl. Típicamente, las sales del tampón de inyección están presentes en una concentración de al menos 50 mM de cloruro de sodio (NaCl), al menos 3 mM de cloruro de potasio (KCl) y al menos 0,01 mM de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>). El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico en relación al medio de referencia específico, es decir el tampón puede tener un contenido en sal más alto, idéntico o más bajo en relación al medio de referencia específico, donde preferentemente se emplean concentraciones de las sales mencionadas arriba que no deterioran las células debido a ósmosis u otros efectos de la concentración. Los medios de referencia son, por ejemplo, líquidos empleados en métodos "in vivo", tales como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o por ejemplo líquidos que se pueden usar como medios de referencia en métodos "in vitro", tales como tampones o líquidos comunes. Estos tampones o líquidos comunes son conocidos del experto. La solución de Ringer o de Ringer-lactato es particularmente preferente como base líquida.

Sin embargo, pueden usarse también para la composición farmacéutica de la invención una o más cargas o diluyentes o compuestos de encapsulación sólidos o líquidos compatibles adecuados para su administración a un paciente a tratar. El término "compatible" tal como se usa aquí significa que estos constituyentes de la composición farmacéutica de la invención son capaces de mezclarse con una secuencia de ARN como la aquí definida presente, de preferencia el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con un compuesto policatiónico, y el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, de manera que no se produce ninguna interacción que pueda reducir sustancialmente la efectividad farmacéutica de la composición farmacéutica de la invención bajo condiciones de uso típicas. Los portadores, cargas y diluyentes farmacéuticamente aceptables deben, por supuesto, tener una pureza suficientemente alta y una toxicidad suficientemente baja como para ser adecuados para su administración a una persona a tratar. Ejemplos de compuestos que se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables, cargas o constituyentes de los mismos, son azúcares, por ejemplo lactosa, glucosa y sucrosa; almidones, por ejemplo almidón de maíz o almidón de papa; celulosa y sus derivados, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; sebo; glidantes sólidos, por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, por ejemplo aceite de nuez, aceite de algodón, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles, por ejemplo polipropilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido algínico.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse vía oral, parenteral, por inhalación, vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término parenteral tal como se usa aquí incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial y sublingual.

Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por inyección parenteral, en especial mediante técnicas de inyección intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial y sublingual o mediante técnicas de infusión. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas de la invención puede ser suspensión acuosa u oleosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica, usando agentes de dispersión o humectación adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable y no tóxico, por ejemplo solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, aceites estériles y fijos se emplean convencionalmente como

5 disolventes o medios de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, al igual que aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite  
10 también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosis farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. Otros agentes tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables también se pueden  
15 usar para los propósitos de formular la composición farmacéutica de la invención.

La composición farmacéutica de la invención definida anteriormente también se puede administrar vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, tabletas, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de las tabletas para uso oral, los vehículos usados comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de  
20 magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo, es decir el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención y/o el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención que forma parte de la composición farmacéutica de la invención definida arriba, se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden  
25 añadir también ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

La composición farmacéutica de la invención también se puede administrar vía tópica, especialmente cuando el objetivo de tratamiento incluya áreas u órganos fácilmente accesibles para la aplicación tópica, por ejemplo incluyendo enfermedades de la piel o de cualquier otro tejido epitelial accesible. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, la  
30 composición farmacéutica de la invención puede formularse en una pomada adecuada que contenga la composición inmunoestimuladora de la invención, particularmente sus componentes definidos arriba, suspendida o disuelta en uno o más portadores. Los portadores para la administración tópica incluyen, pero no están limitados a, aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, la composición farmacéutica de la invención puede formularse en una loción o crema adecuada. En el contexto de la presente invención, los portadores adecuados incluyen, pero no están  
35 limitados a, aceite mineral, monoestearato de sorbitan, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

La composición farmacéutica de la invención comprende típicamente una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica de la invención, en particular del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejoado con un compuesto policatiónico y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención. Tal como se usa aquí, una  
40 "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejoado con un compuesto policatiónico, y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, que es suficiente para inducir en grado suficiente una modificación positiva de una enfermedad o trastorno como el aquí definido. Sin embargo, al mismo tiempo, la "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios serios, es decir como para permitir una relación sensible entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites se encuentra típicamente dentro del alcance del juicio médico. Una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la  
45 composición farmacéutica de la invención, en particular del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejoado con el compuesto policatiónico y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, variará aquí además en relación con la condición particular a tratar y también con la edad y condición física del paciente, su peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármaco, actividad del ARN(m) o ARNm específico aquí definido empleado, la severidad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la  
50 terapia acompañante, del portador farmacéuticamente aceptable particular usado y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del médico. La composición farmacéutica de la invención se puede usar para propósitos médicos humanos y también veterinarios, preferentemente para propósitos médicos humanos, como una composición farmacéutica general o como una vacuna.

De acuerdo con una realización específica, la composición farmacéutica de la invención puede proporcionarse como una vacuna. Esta vacuna de la invención está compuesta típicamente al igual que la composición farmacéutica de la invención y preferentemente refuerza al menos una respuesta inmune innata del sistema inmunológico en un paciente a tratar. Además, la vacuna de la invención puede además provocar una respuesta inmune adaptativa, preferentemente, cuando el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejoado con el compuesto policatiónico, y/o preferentemente al lo menos un ARNm libre de la  
55 composición inmunoestimuladora de la invención codifica para cualquiera de los antígenos mencionados anteriormente, que desarrollan una respuesta inmune adaptativa.

La vacuna de la invención también puede comprender un portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como el definido arriba para la composición farmacéutica de la invención. En el contexto específico de la

vacuna de la invención, la selección de un portador farmacéuticamente aceptable se determina en principio por la forma de administración de la vacuna de la invención. La vacuna de la invención puede administrarse, por ejemplo, sistémica o localmente. Las vías de administración sistémica en general incluyen, por ejemplo, las vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intradérmicas e intraperitoneales, y/o vías de administración intranasales. Las vías para de administración local en general incluyen, por ejemplo, vías de administración tópica, pero también inyecciones intradérmicas, transdérmicas, subcutáneas o intramusculares o inyecciones intralesionales, intracraneales, intrapulmonares, intracardiacas y sublinguales. En especial, las vacunas pueden administrarse vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Así, preferentemente las vacunas de la invención se formulan en forma líquida (o algunas veces sólida). La cantidad adecuada de la vacuna de la invención a administrar puede determinarse por experimentos de rutina con modelos animales. Estos modelos incluyen, sin implicar ninguna limitación, modelos de conejo, oveja, ratón, rata, perro y primate no humano. Las formas de dosis única preferentes para inyección incluyen soluciones estériles de agua, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de estas soluciones debe ajustarse a alrededor de 7,4. Portadores para inyección adecuados incluyen hidrogeles, dispositivos de liberación controlada o retardada, ácido poliláctico o matrices de colágeno. Portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración tópica incluyen aquellos adecuados para su uso en lociones, cremas, geles y similares. Si la vacuna de la invención se administra oralmente, son preferentes las tabletas, cápsulas y similares como dosis única. Los portadores farmacéuticamente aceptables para la preparación de formas de dosis única que pueden usarse para la administración oral son bien conocidos en la técnica anterior. Su selección dependerá de consideraciones secundarias, tales como sabor, coste y capacidad de almacenamiento, los cuales no son críticos para los propósitos de la presente invención y se pueden elaborar sin dificultad por el experto en la técnica.

La vacuna de la invención puede contener además una o más sustancias auxiliares para incrementar más su inmunogenicidad. Preferentemente de esta manera se consigue una acción sinérgica del al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con un compuesto policatiónico y/o del al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, como se define arriba, y de una sustancia auxiliar, opcionalmente contenida en la vacuna de la invención arriba descrita. Dependiendo de los diferentes tipos de sustancias auxiliares, a este respecto pueden entrar en consideración varios mecanismos. Por ejemplo compuestos que permiten la maduración de células dendríticas (DCs), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40, conforman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, es posible usar como sustancia auxiliar cualquier agente que influya el sistema inmunológico de la manera de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, tales como GM-CSF, que permiten que una respuesta inmune producida por el adyuvante inmunoestimulador de acuerdo con la invención se incremente y/o afecte de la forma deseada. Las sustancias auxiliares particularmente preferentes son citoquinas, tales como monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimoquinas, que promueven además la respuesta inmune innata, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, tales como hGH.

Aditivos adicionales que pueden incluirse en la vacuna de la invención son emulsionantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, portadores farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizadores; antioxidantes y conservantes.

La vacuna de la invención también puede contener además cualquier compuesto adicional conocido por ser inmunoestimulador gracias a su afinidad de unión (como ligandos) a los receptores tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o gracias a su afinidad de unión (como ligandos) a los receptores tipo Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.

En este contexto, otra clase de compuestos que pueden añadirse a una vacuna de la invención pueden ser ácidos nucleicos CpG, en particular CpG-ARN o CpG-ADN. Un CpG-ARN o CpG-ADN puede ser un CpG-ADN de hebra individual (ss CpG-ADN), un CpG-ADN de doble hebra (dsADN), un CpG-ARN de una sola hebra (ss CpG-ARN) o un CpG-ARN de doble hebra (ds CpG-ARN). Preferentemente, el ácido nucleico CpG está en forma de CpG-ARN, en especial en forma de CpG-ARN de una sola hebra (ss CpG-ARN). Preferentemente, el ácido nucleico CpG contiene al menos una o más secuencias de dinucleótidos de citosina/guanina (mitógenas) (motivos CpG). De acuerdo con una primera alternativa preferente, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, es decir la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG, no está metilado. Todas las citosinas o guaninas adicionales contenidas opcionalmente en estas secuencias pueden estar metiladas o no metiladas. De acuerdo con otra alternativa preferente, sin embargo, la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG de también puede estar presente en forma metilada.

De acuerdo con un objetivo preferente adicional de la presente invención, la composición inmunoestimuladora de la invención, preferentemente los componentes de la composición inmunoestimuladora de la invención, es decir, el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con un compuesto policatiónico, junto con el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, se pueden usar en la preparación de una composición farmacéutica o una vacuna, de preferencia como las aquí definidas, para la profilaxis, tratamiento y/o mejora de cualquiera de las enfermedades y trastornos aquí definidos.

En consecuencia, la composición inmunoestimuladora de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención, o el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con un compuesto policatiónico, junto con el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, pueden usarse en (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, tratamiento y/o mejora de por ejemplo cáncer o enfermedades tumorales, preferentemente seleccionadas de melanomas, melanomas malignos, carcinoma de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas renales, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, carcinomas mamarios (= cáncer de mama), cáncer uterino, cáncer cervical, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus, por ejemplo carcinomas inducidos por el virus del papiloma humano (por ejemplo, carcinoma cervical = cáncer cervical), adenocarcinomas, tumores inducidos por el virus del herpes (por ejemplo, linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV), tumores inducidos por hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neuroma acústico, carcinomas de pulmón (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas pulmonares microcíticos, cáncer faríngeo, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma rectal, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebrales, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer pancreático, cáncer testicular, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, tumor de hipófisis, micosis fungoide, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer renal, timoma, carcinoma del cuerpo, cáncer de hueso, linfomas no Hodgkin, cáncer uretral, síndrome de CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer vulvar, cáncer intestinal, carcinoma de colon, carcinoma esofágico (= cáncer de esófago), implicación de verrugas, tumores del intestino delgado, craneofaringeomas, carcinoma ovárico, tumores genitales, cáncer ovárico (= carcinoma ovárico), carcinoma pancreático (= cáncer pancreático), carcinoma endometrial, metástasis de hígado, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumor de borde, cáncer de próstata (= tumores de próstata), etc.

Además, la composición inmunoestimuladora de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención, o el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con un compuesto policatiónico, junto con el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, se pueden usar en (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, tratamiento y/o mejora de por ejemplo enfermedades infecciosas, preferentemente enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o protozoológicas). Estas enfermedades infecciosas de preferencia son enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o protozoológicas) seleccionadas típicamente de gripe, malaria, SARS, fiebre amarilla, SIDA, boreliosis de Lyme, leishmaniasis, ántrax, meningitis, enfermedades infecciosas virales tales como SIDA, *Condyloma acuminata*, verrugas huecas, fiebre del dengue, fiebre de tres días, virus Ébola, resfriado, meningoencefalitis estacional temprana (FSME), gripe, herpes, hepatitis, herpes simple tipo I, herpes simple tipo II, herpes zóster, influenza, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, virus de Marburg, sarampión, fiebre aftosa, mononucleosis, paperas, infección por virus de Norwalk, fiebre glandular de Pfeiffer, viruela, polio (cojera en la niñez), pseudo-crup, enfermedad quinta, rabia, verrugas, fiebre del Nilo Occidental, varicela, virus citomegálico (CMV), enfermedades infecciosas bacterianas tales como aborto (inflamación de próstata), ántrax, apendicitis, borreliosis, botulismo, *Camphylobacter*, *Chlamydia trachomatis* (inflamación de la uretra, conjuntivitis), cólera, difteria, donavanosis, epiglotitis, fiebre de tifo, gangrena gaseosa, gonorrea, fiebre de conejo, *Helicobacter pylori*, tos ferina, bubón climático, osteomielitis, enfermedad del Legionario, lepra, listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, ántrax, otitis media, *Mycoplasma hominis*, sépsis neonatal (corioamnionitis), noma, paratifo, plaga, síndrome de Reiter, fiebre moteada de las montañas rocallosas, paratifo por Salmonella, tifo por Salmonella, fiebre escarlata, sífilis, tétanos, fiebre de Tsutsugamushi, tuberculosis, tifo, vaginitis (colpitis), chancro suave y enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoarios u hongos, tales como amibiasis, bilharziasis, mal de Chagas, equinococo, tenia del pescado, envenenamiento por pescado (Ciguatera), tenia del zorro, pie de atleta, tenia canina, candidiasis, manchas por hongos de levadura, sarna, leishmaniosis cutánea, lambliasis (giardiasis), pulgas, malaria, microscopia, oncocercosis (ceguera del río), enfermedades fúngicas, tenia bovina, esquistosomiasis, tenia porcina, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), leishmaniosis visceral, dermatitis por pañal o tenia en miniatura.

Asimismo, la composición inmunoestimuladora de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención, o el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con un compuesto policatiónico, junto con el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, se puede usar para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, tratamiento y/o mejora de enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes se pueden dividir ampliamente en trastornos autoinmunes específicos de órganos y sistémicos o localizados, dependiendo de las características clínico patológicas principales de cada enfermedad. Las enfermedades autoinmunes pueden dividirse en las categorías de síndromes sistémicos, incluyendo lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjögren, escleroderma, artritis reumatoide y polimiositis o síndromes locales que pueden ser endocrinológicos (diabetes tipo I (diabetes mellitus tipo 1), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, etc.), dermatológicas (pénfigo vulgar), hematológicas (anemia hemolítica autoinmune), neurales (esclerosis múltiple) o pueden implicar casi cualquier masa de tejido corporal circunscrita. Las enfermedades autoinmunes a tratar pueden seleccionarse del grupo consistente en enfermedades autoinmunes tipo I o enfermedades autoinmunes tipo II o enfermedades autoinmunes tipo III o enfermedades autoinmunes tipo IV, por ejemplo esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes, diabetes tipo 1 (diabetes mellitus tipo 1), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow,

5 formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades de alergia tipo I, enfermedades de alergia tipo II, enfermedades de alergia tipo III, enfermedades de alergia tipo IV, fibromialgia, caída de cabello, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, miastenia grave, neurodermitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (PSS), síndrome de Reiter, artritis reumática, psoriasis, vasculitis, etc., o diabetes tipo II. Aunque el modo exacto en cuanto a por qué el sistema inmunológico induce una reacción inmune contra auto-antígenos aún no ha sido elucidado hasta la fecha, existen varios descubrimientos con respecto a la etiología. En consecuencia, la autorreacción puede deberse a una derivación de células T. Un sistema inmunológico normal requiere la activación de células B por células T antes de que las primeras puedan producir anticuerpos en grandes cantidades. Este requerimiento de una célula T puede ser derivado en casos raros, tales como infección por organismos que producen súper antígenos, los cuales son capaces de iniciar la activación policlonal de células B, o incluso de células T, al unirse directamente a la subunidad  $\beta$  de los receptores de las células T de una forma no específica. Otra explicación deduce que las enfermedades autoinmunes de una imitación molecular. Un antígeno exógeno puede compartir similitudes estructurales con ciertos antígenos huéspedes; así, cualquier anticuerpo producido contra este antígeno (el cual imite a los auto-antígenos) también puede, en teoría, unirse a los antígenos hospederos y amplificar la respuesta inmune. La forma más desconcertante de imitación molecular se observa en estreptococos beta-hemolíticos del grupo A, que comparten antígenos con el miocardio humano, y es responsable de las manifestaciones cardíacas de la fiebre reumática.

20 Además, la composición inmunoestimuladora de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención, o el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con un compuesto policatiónico, junto con el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, puede usarse para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, tratamiento y/o reducción de alergias o enfermedades alérgicas, es decir, enfermedades relacionadas con la alergia. La alergia es una condición que incluye típicamente una hipersensibilidad inmunológica adquirida y anormal a ciertos antígenos o alérgenos extraños, tales como los antígenos de alergia definidos arriba. Estos antígenos de alergia o alérgenos pueden seleccionarse de antígenos de alergia como los definidos arriba y antígenos derivados de diferentes fuentes, por ejemplo de animales, plantas, hongos, bacterias, etc. Los alérgenos en este contexto incluyen por ejemplo hierbas, pólenes, mohos, fármacos o numerosos activadores ambientales, etc. Las alergias normalmente se traducen en una respuesta inflamatoria local o sistémica a estos antígenos o alérgenos y llevan a una inmunidad en el cuerpo contra estos alérgenos. Sin limitados a una teoría, se supone que están implicados varios mecanismos de enfermedad diferentes en el desarrollo de las alergias. De acuerdo con un esquema de clasificación de P. Gell y R. Coombs, la palabra "alergia" estaba restringida a hipersensibilidades tipo I, las cuales son causadas por el mecanismo IgE clásico. La hipersensibilidad tipo I se caracteriza por una excesiva activación de células cebadas y basófilos por IgE, dando como resultado una respuesta inflamatoria sistémica que puede traducirse en síntomas tan benignos como nariz irritada, o choque anafiláctico amenazador de la vida y muerte. Tipos bien conocidos de alergias incluyen, sin estar limitados a las mismas, asma alérgica (que lleva a hinchazón de la mucosa nasal), conjuntivitis alérgica (que lleva a enrojecimiento y picor de la conjuntiva), rinitis alérgica ("fiebre del heno"), anafilaxis, angioderma, dermatitis atópica (eczema), urticaria, eosinofilia, alergias respiratorias a picaduras de insectos, alergias dérmicas (que llevan a e incluyen varios salpullidos, tales como eczema, urticaria y dermatitis (por contacto), alergias a alimentos, alergias a medicinas, etc. Con respecto a la presente invención, la composición inmunoestimuladora de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención, o el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con un compuesto policatiónico, junto con el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, se pueden usar para el tratamiento de estos trastornos o enfermedades alérgicas, de preferencia desensibilizando la reacción inmune que desencadena una respuesta inmune específica. Esta desensibilización puede llevarse a cabo administrando una cantidad efectiva del alérgeno o antígeno alérgico codificado por un ARN de la composición inmunoestimuladora de la invención, de preferencia el al menos un ARNm libre, para inducir una ligera reacción inmune. La cantidad del alérgeno o antígeno alérgico puede ser después elevada gradualmente en administraciones subsecuentes hasta que el sistema inmunológico del paciente a tratar tolera una cantidad específica de alérgeno o antígeno alérgico.

50 En el contexto de lo anterior, la invención se refiere además también al uso de la composición inmunoestimuladora de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención, o el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con el compuesto policatiónico, junto con el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, en la profilaxis, tratamiento y/o reducción de enfermedades o trastornos como los aquí mencionados. También incluye en particular el uso de la composición inmunoestimuladora de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención, o el al menos un ARN(m) del componente adyuvante de la composición inmunoestimuladora de la invención complejo con el compuesto policatiónico, junto con el al menos un ARNm libre de la composición inmunoestimuladora de la invención, para la inoculación o el uso de estos componentes como inoculante. De acuerdo con una realización particularmente preferente de la presente invención, este método de profilaxis, tratamiento y/o reducción de las enfermedades o trastornos mencionados, o un método de inoculación para prevenir las enfermedades mencionadas, comprenden típicamente administrar la composición farmacéutica descrita a un paciente que lo requiere (por ejemplo, que sufra de cualquiera de las anteriores enfermedades o que muestre síntomas de las mismas), en particular a un ser humano, de preferencia en una "cantidad segura y efectiva" y en una de las formulaciones anteriores como las descritas arriba para las composiciones farmacéuticas de la

invención. El modo de administración también puede ser como el descrito arriba para las composiciones o vacunas farmacéuticas de la invención.

Mediante un método de transcripción *in vitro* puede prepararse el al menos un ARN(m), que será complejado con un compuesto policatiónico, o el al menos un ARNm libre, respectivamente, que codifica para al menos un antígeno, ambos como los definidos arriba, comprendiendo las siguientes etapas:

- 5 a) preparación/provisión de un ácido (desoxi)ribonucleico como una plantilla para el al menos un ARN(m) de la invención, que se asocia al compuesto policatiónico, o el al menos un ARNm libre, respectivamente, que codifica para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, ambos como se describió arriba;
- 10 b) adición del ácido desoxirribonucleico a un medio de transcripción *in vitro* que comprende ARN polimerasa, un tampón adecuado, una mezcla de nucleótidos, comprendiendo la mezcla de nucleótidos opcionalmente uno o más nucleótidos con nucleósidos químicamente modificados seleccionados de los nucleósidos químicamente modificados como los definidos arriba como reemplazo (parcial o completo) para uno o más de los nucleósidos de origen natural A, G, U y/o C, si no todos los nucleósidos de origen natural A, G, U y/o C si no es que todos los nucleósidos de origen natural A, G, U y/o C están reemplazados, y opcionalmente un inhibidor de Rnasa;
- 15 c) incubación del ácido ((desoxi)ribonucleico en el medio de transcripción *in vitro* y transcripción *in vitro* del ácido ((desoxi)ribonucleico); y
- 20 d) opcionalmente purificación y eliminación de los nucleótidos no incorporados del medio de transcripción *in vitro*.

Un ácido (desoxi)ribonucleico como el descrito en la etapa a) del método de transcripción *in vitro* de la invención puede ser cualquier ácido nucleico como el descrito arriba, que se puede usar como una plantilla para la preparación del al menos un ARN(m) que será complejado con el compuesto policatiónico, y/o el al menos un ARNm libre, respectivamente, que codifican para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo. Para este propósito típicamente se usan secuencias de ADN, por ejemplo ADN genómico o fragmentos del mismo, o plásmidos, o secuencias de ARN (que corresponden al mismo), por ejemplo secuencias de ARNm, de preferencia en forma linealizada. La reacción de transcripción *in vitro* normalmente se puede llevar a cabo usando un vector que tenga un sitio de unión a ARN polimerasa. Para este fin, se puede usar cualquier vector conocido en la técnica, por ejemplo vectores disponibles comercialmente (véase arriba). Por ejemplo, son preferentes los vectores que tienen un sitio de unión a SP6 o T7 o T3 aguas arriba y/o aguas abajo del sitio de clonación. En consecuencia, las secuencias de ácido (desoxi)ribonucleico usadas pueden ser transcritas más tarde, según se desee, dependiendo de la ARN polimerasa seleccionada. Típicamente, una secuencia de ácido (desoxi)ribonucleico usada para transcripción y codificación *in vitro* de una proteína como la definida arriba, por ejemplo una proteína terapéuticamente activa, un antígeno o un anticuerpo, es clonada en un vector, por ejemplo mediante un sitio de clonación múltiple del vector usado. Antes de la transcripción, el plásmido típicamente es segmentado con enzimas de restricción en el sitio en el cual el futuro extremo 3' del al menos un ARN(m) del componente adyuvante definido arriba o el al menos un ARNm libre definido arriba se va a ubicar, usando una enzima de restricción adecuada, y se purifica el fragmento. Esto evita que el futuro del al menos un ARN(m) del componente adyuvante definido arriba o el al menos un ARNm libre definido arriba contenga secuencias de vectores y pueda obetenerse cualquier longitud definida.

Alternativamente, también es posible preparar el ácido (desoxi)ribonucleico como una plantilla de transcripción mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, uno de los cebadores usados para la PCR contiene típicamente la secuencia de un sitio de unión a ARN polimerasa. Se prefiere además que el extremo 5' del cebador tenga una longitud de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos adicionales, en especial 15 a 30 nucleótidos más y en particular alrededor de 20 nucleótidos.

Antes de la reacción de transcripción *in vitro*, el ácido (desoxi)ribonucleico, por ejemplo la plantilla de ADN o ARN específica, se purifica típicamente y se libera de RNasa para así asegurar un alto rendimiento. La purificación puede lograrse mediante cualquier proceso conocido en la técnica, por ejemplo con un gradiente de cloruro de cesio o un proceso de intercambio iónico.

De acuerdo con la etapa de método b) del método de transcripción *in vitro* de la invención, el ácido (desoxi)ribonucleico se añade a un medio de transcripción *in vitro*. Un medio de transcripción *in vitro* adecuado contiene primero un ácido (desoxi)ribonucleico como el preparado en la etapa a), por ejemplo de aproximadamente alrededor de 0,1 a aproximadamente 10 µg, de preferencia aproximadamente de alrededor de 1 a aproximadamente 5 µg, en especial alrededor de 2,5 µg y en particular alrededor de aproximadamente 1 µg, de este ácido nucleico. Un medio de transcripción *in vitro* adecuado contiene opcionalmente además un agente reductor, por ejemplo DTT, en especial alrededor de 1 a aproximadamente 20 µl de aproximadamente DTT 50 mM, en particular aproximadamente alrededor de 5 µl de DTT aprox. 50 mM. El medio de transcripción *in vitro* contiene además nucleótidos (AMP, GMP, UMP y/o CMP), por ejemplo una mezcla de nucleótidos. En el caso de la presente invención, los nucleótidos comprenden preferentemente nucleósidos modificados químicamente como los definidos arriba. Estos nucleótidos (modificados químicamente) pueden servir como reemplazo para uno o más de los nucleótidos de origen natural AMP, GMP, UMP y/o CMP, y opcionalmente uno o más nucleótidos de origen natural AMP, GMP, UMP y/o CMP si

no todos los nucleótidos de origen natural AMP, GMP, UMP y/o CMP van a ser reemplazados. Los nucleótidos AMP, GMP, UMP y/o CMP están presentes típicamente en la matriz de nucleótidos a una concentración de alrededor de 0,1 a 10 mM por nucleótido, de preferencia de 0,1 a 1 mM por nucleótido, en especial alrededor de 4 mM en total. Los nucleótidos (químicamente) modificados como los descritos arriba (aproximadamente 1 mM por nucleótido, de preferencia aproximadamente 4 mM en total) se añaden típicamente en una cantidad tal que el nucleótido nativo sea reemplazado completamente por los nucleótidos modificados que comprenden un nucleósido modificado químicamente como el definido arriba. Sin embargo, también es posible usar mezclas de uno o más nucleótidos modificados como los definidos arriba y uno o más nucleótidos naturales en lugar de un nucleótido particular, es decir, uno o más nucleótidos modificados químicamente como los descritos arriba pueden ocurrir como un reemplazo de uno o más de los nucleótidos de origen natural AMP, GMP, UMP y/o CMP, y opcionalmente además uno o más nucleótidos de origen natural AMP, GMP, UMP y/o CMP pueden estar presentes, si no todos los nucleótidos de origen natural AMP, GMP, UMP y/o CMP van a ser reemplazados. Mediante adición selectiva de la base deseada al medio de transcripción *in vitro*, el contenido, es decir la ocurrencia y cantidad, de la modificación de nucleótido deseada en el al menos un ARN(m) de la invención transcrito, que será complejado con el compuesto policatiónico, o el al menos un ARNm libre, que codifica para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, puede entonces controlarse. Un medio de transcripción *in vitro* adecuado igualmente contiene una ARN polimerasa, por ejemplo T7-ARN polimerasa (por ejemplo, T7-Opti mRNA kit, CureVac, Tübingen, Alemania), T3-ARN polimerasa o SP6, típicamente alrededor de 10 a 500 U, de preferencia alrededor de 25 a 250 U, muy preferiblemente alrededor de 50 a 150 U y más preferiblemente alrededor de 100 U de ARN polimerasa. El medio de transcripción *in vitro* preferentemente se mantiene además libre de RNasa para evitar así la degradación del ARN(m) transcrito. Por tanto, un medio de transcripción *in vitro* adecuado contiene opcionalmente además un inhibidor de RNasa.

En una etapa c) del método de transcripción *in vitro* de la invención, el ácido (desoxi)ribonucleico de la etapa b) es incubado y transcrito en el medio de transcripción *in vitro*, típicamente durante alrededor de 30 a 120 minutos, de preferencia durante alrededor de 40 a 90 minutos y muy preferiblemente durante alrededor de 60 minutos, aproximadamente a 30 a 45°C, preferiblemente a 37 a 42°C. La temperatura de incubación es regida por la ARN polimerasa usada, por ejemplo en el caso de T7 ARN polimerasa es de aproximadamente 37°C. El ácido nucleico obtenido por la transcripción es preferentemente el al menos un ARN(m), que será complejado con el compuesto policatiónico, o el al menos un ARNm libre, que codifica para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente, ambos como se definió aquí.

Después de la incubación de acuerdo con la etapa de método c) anterior, la purificación de la reacción puede opcionalmente tener lugar en la etapa d) del método de transcripción *in vitro* anterior. Para este fin, puede emplearse cualquier proceso adecuado conocido en la técnica, por ejemplo procesos de purificación cromatográficos, tales como cromatografía de afinidad, filtración en gel, etc. Mediante la purificación, los nucleótidos no incorporados, es decir, en exceso, pueden ser eliminados del medio de transcripción *in vitro*. Para ello puede emplearse cualquier método adecuado conocido en la técnica anterior, por ejemplo métodos de purificación cromatográficos como cromatografía de afinidad, filtración en gel, etc. Mediante esta purificación puede obtenerse un ARN transcrito limpio de una secuencia de ARN como la aquí definida, por ejemplo de un al menos un ARN(m) que será complejado con el compuesto policatiónico, o del al menos un ARNm libre, que codifican para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente. Por ejemplo, después de la transcripción, la mezcla de reacción que contiene el ARN transcrito puede ser típicamente digerida con DNasa para eliminar así la plantilla de ADN todavía presente en la mezcla de reacción. El ARN transcrito puede ser subsecuentemente o alternativamente precipitado con LiCl. La purificación del ARN transcrito puede entonces tener lugar por HPLC de fase inversa de par iónico (IP RP). Esto hace posible en particular separar los fragmentos más largos y cortos unos de otros de forma efectiva. Preferentemente, en este contexto la purificación tiene lugar por un método de purificación de ARN a escala preparativa, la cual se distingue además porque el ARN aquí definido, particularmente el al menos un ARN(m) que será complejado con el compuesto policatiónico, o del al menos un ARNm libre, que codifican para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente, es purificado por HPLC usando una fase inversa porosa como fase estacionaria (Mensajero PURO). Por ejemplo, para la purificación en la etapa d) del método de transcripción *in vitro* de la invención, puede emplearse una fase inversa como fase estacionaria para la purificación por HPLC. Para la cromatografía con fases inversas, típicamente un compuesto no polar sirve como fase estacionaria y un disolvente polar, por ejemplo mezclas de agua, que normalmente se emplea en forma de tampones, con acetonitrilo y/o metanol, sirve como la fase móvil para la elución. De preferencia, la fase inversa porosa tiene un tamaño de partícula de  $8,0 \pm 2 \mu\text{m}$ , en especial  $\pm 1 \mu\text{m}$ , en particular  $\pm 0,5 \mu\text{m}$ . El material de fase inversa puede estar en forma de esferas. La purificación se puede llevar a cabo de una manera particularmente favorable con una fase inversa porosa que tenga este tamaño de partícula, opcionalmente en forma de esferas, obteniéndose entonces resultados de separación particularmente buenos. La fase inversa empleada preferentemente es porosa, ya que con fases inversas estacionarias que no son porosas, tales como las descritas, por ejemplo, por Azarani A. y Hecker K.H., se acumulan presiones demasiado altas, por lo que la purificación preparativa del ARN como el aquí definido, particularmente el al menos un ARN(m) que será complejado con el compuesto policatiónico, o el al menos un ARNm libre, que codifican para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente, no es posible en absoluto, sólo con gran dificultad. La fase inversa preferentemente tiene un tamaño de poro de 200 Å a 5.000 Å, en particular un tamaño de poro de 300 Å a 4.000 Å. Son particularmente preferentes tamaños de poro para las fases inversas de 200 Å-400 Å, 800 Å-1.200 Å y 3.500 Å-4.500 Å. Con una fase inversa con estos tamaños de poro, se logran resultados particularmente buenos con

respecto a la purificación del ARN aquí definido en la etapa de proceso d). El material para la fase inversa es de preferencia un poliestireno-divinilbenceno, en particular un poliestireno-divinilbenceno no alquilado. Las fases estacionarias con poliestireno-divinilbenceno se conocen *per se*. Para la purificación en la etapa del método d), pueden emplearse poliestireno-divinilbencenos conocidos *per se* y ya empleados en métodos HPLC y disponibles comercialmente. Es de uso particularmente preferente un poliestireno-divinilbenceno poroso no alquilado que en particular tiene un tamaño de partícula de  $8,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$  y un tamaño de poro de 250 Å-300 Å, 900 Å-1.100 Å o 3.500 Å-4.500 Å para la purificación en la etapa de método d). Las ventajas descritas arriba pueden lograrse de forma particularmente favorable con este material para las fases inversas. La purificación por HPLC se puede llevar a cabo mediante el método de pares iónicos, un ión con una carga positiva se añade a la fase móvil como contraión al ARN cargado negativamente. De esta manera, se forma un par iónico de carácter lipófilo, alentado por la fase estacionaria no polar del sistema de fase inversa. En la práctica, las condiciones precisas para el método de par iónico deben elaborarse empíricamente para cada problema de separación concreto. El tamaño del contraión, su concentración y el pH de la solución contribuyen ampliamente al resultado de la separación. De manera ventajosa, se añaden a la fase móvil sales de alquilamonio, tales como acetato de trietilamonio y/o compuestos de tetraalquilamonio, como tetrabutilamonio. Preferentemente se añade acetato de trietilamonio 0,1M y el pH se ajusta a aproximadamente 7. La selección de la fase móvil depende de la naturaleza de la separación deseada. Esto significa que la fase móvil encontrada para una separación específica, tal como se puede conocer, por ejemplo, de la técnica anterior, no puede ser transferida fácilmente a otro problema de separación con una expectativa de éxito adecuada. Las condiciones de elución ideales, en particular la fase móvil usada, deben ser determinadas para cada problema de separación mediante experimentos empíricos. Puede emplearse una mezcla de un disolvente acuoso y un disolvente orgánico como fase móvil para la elución del ARN aquí definido, en particular el al menos un ARN(m) que será complejoado con el compuesto policatiónico, o el al menos un ARNm libre, que codifican para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente, mediante el método HPLC. En este contexto, es ventajoso emplear un tampón que tenga, en particular, un pH de alrededor de 7, por ejemplo 6,5-7,5, por ejemplo 7,0, como disolvente acuoso; de preferencia, se emplea tampón de acetato de trietilamonio, en particular un tampón de acetato de trietilamonio 0,1M, el cual, como se describió arriba, actúa también como contraión para el ARN aquí definido en el método de pares iónicos. El disolvente orgánico empleado en la fase móvil puede ser acetonitrilo, metanol o una mezcla de ambos, en particular acetonitrilo. La purificación del ARN aquí definido en la etapa de método d) usando un método de HPLC como el descrito, particularmente la purificación del al menos un ARN(m) que será complejoado con el compuesto policatiónico, o del al menos un ARNm libre, que codifican para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente, se lleva a cabo de manera particularmente favorable con estos disolventes orgánicos. En particular, la fase móvil es una mezcla de acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7, y acetonitrilo. También es particularmente favorable que la fase móvil contenga de un 5,0% en volumen a un 20,0% en volumen de disolvente orgánico, con respecto a la fase móvil, y el resto para constituir el 100% en volumen es el disolvente acuoso. Es muy particularmente favorable para el método de acuerdo con la invención que la fase móvil contenga de un 9,5% en volumen a un 14,5% en volumen de disolvente orgánico, con respecto a la fase móvil, y el resto para formar el 100% en volumen sea el disolvente acuoso. La elución del ARN aquí definido, particularmente del al menos un ARN(m) que será complejoado con el compuesto policatiónico, o del al menos un ARNm libre, que codifican para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente, se puede llevar a cabo subsecuentemente en forma isocrática o por separación por gradientes. En el caso de una separación isocrática, la elución del ARN aquí la definida se lleva a cabo con un solo agente de elución o una mezcla de varios agentes de elución que permanezcan constantes, siendo posible que los disolventes descritos arriba en detalle se empleen como agente de elución.

Se proporciona un método para transfectar y opcionalmente administrar la composición inmunoestimuladora de la invención o sus componentes como los definidos arriba, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención, como las definidas arriba, que no forma parte de la invención, comprendiendo las siguientes etapas:

- a) recolección de células sanguíneas, células presentadoras de antígenos profesionales (APCs), especialmente células dendríticas (DCs), y
- b) transfección de las células sanguíneas, células presentadoras de antígeno profesionales (APCs), y especialmente células dendríticas (DCs), *in vitro* con la composición inmunoestimuladora de la invención o sus componentes, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención.

Preferentemente, en el contexto de la presente invención, "células sanguíneas" significa una mezcla o una población enriquecida a sustancialmente pura de glóbulos rojos, granulocitos, células mononucleares (PBMCs) y/o plaquetas sanguíneas de sangre completa, suero sanguíneo u otra fuente, por ejemplo del bazo o nódulos linfáticos, donde sólo existe una pequeña proporción de APCs profesionales. De preferencia, las células sanguíneas se caracterizan típicamente porque contienen una pequeña proporción de células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales bien diferenciadas, especialmente células dendríticas (DCs). Las células sanguíneas pueden ser de preferencia células sanguíneas frescas, es decir, el periodo entre la toma de las células sanguíneas (especialmente en la toma de sangre) y la transfección es muy corto, por ejemplo menos de 12 horas, de preferencia menos de 6 horas, en particular menos de 2 horas y de forma muy particularmente preferente menos de 1 hora. Sin embargo, las células sanguíneas también pueden ser células sanguíneas obtenidas después de la toma de sangre antes de que se requiera, por ejemplo, una operación o un tratamiento como el aquí definido y que se almacenen posteriormente hasta su uso.

- Las células sanguíneas pueden ser tomadas de un animal o paciente humano mediante métodos estándares, por ejemplo. Así, puede obtenerse sangre completa pinchando un vaso adecuado. El suero se obtiene de forma conocida coagulando los constituyentes hemáticos sólidos. Las PBMCs pueden mencionarse como ejemplo de población parcial enriquecida de células sanguíneas. Estas son aisladas convencionalmente mediante un método descrito primero por Boyum (Nature 204, 793-794, 1964; Scan. J. Lab. Clin. Invest. Suppl. 97, 1967): esto se hace generalmente tomando sangre del individuo y añadiéndola, por ejemplo, a una solución de densidad 1,077 g/ml (25°C) que contiene convencionalmente Ficoll y diatrizoato de sodio, para centrifugación por gradiente de densidad. Durante la centrifugación cuidadosa a temperatura ambiente, las PBMCs se recogen en la interfase Ficoll/sangre, mientras que los glóbulos rojos y los glóbulos blancos restantes se sedimentan. La interfase con las PBMCs se recupera y se lava convencionalmente con un tampón adecuado, por ejemplo PBS estéril. Preferentemente, las PBMCs se someten a un tratamiento isotónico corto con una solución acuosa, por ejemplo de cloruro de amonio. Finalmente, las PBMCs se lavan una o más veces con un tampón tal como PBS (estéril). Las células obtenidas pueden ser después opcionalmente almacenadas bajo condiciones adecuadas, convencionalmente a -70°C, hasta su uso.
- Las células sanguíneas inmediatamente antes de la transfección son en particular células sanguíneas frescas, es decir sólo hay un corto periodo entre la recogida de las células sanguíneas (especialmente la toma de sangre) en la etapa (a) y la transfección de acuerdo con la etapa (b), por ejemplo menos de 12 horas, de preferencia menos de 6 horas, en particular menos de 2 horas y de manera muy particular menos de 1 hora.
- Las células dendríticas (DCs) tal como se usan en el método de la invención anteriormente mencionado de transfección y opcionalmente administración, son típicamente células presentadoras de antígenos (APCs) potentes que poseen típicamente la capacidad de estimular células T naives. Comprenden un sistema de leucocitos ampliamente distribuido en todos los tejidos, especialmente en aquellos que proporcionan una interfase ambiental. Las DCs poseen un linaje hematopoyético heterogéneo, ya que subconjuntos de diferentes tejidos han demostrado poseer una morfología, fenotipo y función diferencial. La capacidad de estimular la proliferación de células T naives parece ser compartida entre estos diferentes subconjuntos de DCs. Se ha sugerido que los llamados subconjuntos derivados de mieloides y linfoides de DCs llevan a cabo una función estimuladora o tolerogénica específica, respectivamente. Las DCs se derivan de progenitores de médula ósea y circulan en la sangre como precursores inmaduros antes de su migración a tejidos periféricos. Dentro de los tejidos diferentes, las DCs se diferencian y se vuelven activas en la asimilación y procesamiento de antígenos, y su presentación subsecuente sobre la superficie celular ligada a moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC). Después de la estimulación adecuada, las DCs sufren mutación adicional y migran a tejidos linfoides secundarios, donde presentan antígenos a células T e inducen una respuesta inmune. Las DCs tienen cada vez más interés científico y clínico gracias a su papel clave en las respuestas de los hospederos anticáncer y su uso potencial como adyuvantes biológicos en vacunas tumorales, así como por su implicación en la inmunobiología de tolerancia y autoinmunidad. Sin embargo, las células dendríticas (DCs) también se pueden usar en el contexto de la presente invención sin que se requiera o contemple una respuesta inmune más baja. Estas células dendríticas (DCs) como las definidas arriba pueden aislarse de diferentes tejidos como los mencionados arriba o de sangre, particularmente de muestras de sangre como las descritas arriba.
- Preferentemente, las células sanguíneas, células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales, especialmente células dendríticas (DCs), usadas para el método de transfección y opcionalmente para la administración de una composición farmacéutica o la vacuna proceden del paciente real a tratar con la composición farmacéutica de la presente invención (células autólogas). Así, preferentemente, la composición farmacéutica o la vacuna contiene células sanguíneas autólogas como células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales, especialmente células dendríticas (DCs).
- La transfección de las células sanguíneas, células presentadoras de antígenos profesionales (APCs), especialmente células dendríticas (DCs), es igualmente llevada a cabo mediante métodos habituales, por ejemplo por métodos de electroporación o químicos, especialmente lipofección, de preferencia sólo mediante la administración de la composición de la invención sin reactivos de transfección adicionales.
- El ARN aquí definido, particularmente el al menos un ARN(m) que será complejo con el compuesto policatiónico, o el al menos un ARNm libre, que codifican para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente, usado para la transfección *in vitro* de acuerdo con la etapa (b) se prepara mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, especialmente mediante síntesis química o, de manera particularmente preferible, por los métodos biológicos moleculares que ya han sido mencionados arriba.
- Como se definió arriba, puede existir la necesidad de transfectar las células sanguíneas, células presentadoras de antígenos profesionales (APCs), especialmente células dendríticas (DCs), usadas para la transfección y opcionalmente la administración, con un ARN como el aquí definido, particularmente la composición inmunoestimuladora de la invención o sus componentes, o la composición farmacéutica o vacuna de la invención. Además, la administración de estas células transfectadas a un paciente, a tejidos y/u organismos vivos *in vivo*, particularmente puede contemplarse su retransplante en el organismo huésped en el caso de células autólogas, llevándose a cabo como una etapa c) opcional del método mencionado arriba. En este contexto, un organismo (o un ser) significa típicamente un mamífero seleccionado de, sin estar restringidos a los mismos, el grupo que comprende humanos y animales, incluyendo por ejemplo cerdo, cabra, ganado, puerco, perro, gato, burro, mono, simio o roedores, incluyendo ratón, hámster y conejo. Además, los tejidos vivos como los mencionados arriba se derivan

preferentemente de estos organismos. La administración de las células transfectadas a esos tejidos y/u organismos vivos puede realizarse mediante cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo sistémicamente, incluyendo, por ejemplo, inyecciones intra- o transdérmicas, vía oral, parenteral, incluyendo subcutánea, intramuscular o intravenosa, vía tópica y/o intranasal, como se ha definido anteriormente.

5 De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona también un método para la preparación de la composición inmunoestimuladora de la invención, que comprende las siguientes etapas:

a) preparar un "componente adyuvante" que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con un compuesto péptido o proteína policatiónico, mezclando el al menos un ARN(m) como el definido en una relación específica con el compuesto policatiónico, como se define arriba; y

10 b) preparar la composición inmunoestimuladora de la invención añadiendo en una relación específica como la definida arriba el al menos un ARNm libre como el definido arriba al componente adyuvante preparado de acuerdo con la etapa a), donde el al menos un ARNm libre como el definido arriba codifica para al menos un antígeno como el definido arriba.

15 El llamado "componente adyuvante" se prepara de acuerdo con la etapa a) del método de preparación de la invención complejando el al menos un ARN(m) del componente adyuvante con un compuesto péptido o proteína policatiónico en una relación específica para formar un complejo estable. Como se definió anteriormente, es importante que ningún compuesto policatiónico libre o sólo una cantidad insignificante del mismo quede en el componente adyuvante después de complejarse con el ARN(m). En consecuencia, la relación entre el ARN(m) y el compuesto policatiónico en el componente adyuvante se selecciona típicamente de manera que el ARN(m) está totalmente complejado no queda ningún compuesto policatiónico libre o sólo una cantidad insignificamente pequeña en la composición. De preferencia, la relación del componente adyuvante, es decir, la relación entre el ARN(m) y el compuesto policatiónico se selecciona en un rango de aproximadamente 6:1 (p/p) a alrededor de 0,25:1 (p/p), en especial de alrededor de 5:1 (p/p) a aproximadamente 0,5:1 (p/p), en particular alrededor de 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p) o de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p), y con total preferencia una relación de alrededor de 3:1 (p/p) a aproximadamente 2:1 (p/p).

25 La relación del primer componente (es decir, el componente adyuvante que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con el compuesto policatiónico) y el segundo componente (es decir, el al menos un ARNm libre) se selecciona en la composición inmunoestimuladora de la invención en base a la relación molar de ambas moléculas de ARN entre sí, es decir, el ARN(m) del componente adyuvante, estando complejado con un compuesto policatiónico y el al menos un ARNm libre del segundo componente. Típicamente, la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente puede seleccionarse de manera que la relación molar sea suficiente para las anteriores definiciones en (p/p). La relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente está en el rango de 0,1:1 a 1:0,01. Preferentemente, la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente puede seleccionarse, por ejemplo, de la relación molar antes definida, por ejemplo una relación molar de 0,1:1, 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1:0,9, 1:0,8, 1:0,7, 1:0,6, 1:0,5, 1:0,4, 1:0,3, 1:0,2, 1:0,1, 1:0,01, etc. o de cualquier intervalo formado por cualquiera dos de los valores anteriores, por ejemplo un intervalo seleccionado de 0,1:1 a 1:0,1, 1:1.

30 Todavía más preferiblemente, la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente puede seleccionarse, por ejemplo, de una relación molar de aproximadamente 1:1. En esta realización particular, cualquiera de las definiciones anteriores con respecto a (p/p) y/o relación N/P también puede aplicarse.

35 En el contexto del presente método de la invención, el compuesto policatiónico se selecciona de un péptido o proteína policatiónico adecuado para complejarse y así estabilizar un ácido nucleico, en particular un ARN(m), por ejemplo asociando el ácido nucleico al compuesto policatiónico. La asociación o formación de complejos del ARN(m) modificado de la composición inmunoestimuladora de la invención con compuestos policatiónicos como los definidos arriba preferentemente proporciona propiedades adyuvantes al ARN(m) y confiere un efecto estabilizador sobre el ARN(m) del componente adyuvante por complejación. El procedimiento para estabilizar el ARN(m) modificado se describe en general en la EP-A-1083232, pero también se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica.

40 De acuerdo con la etapa b) del método de preparación de la invención descrito arriba, la composición inmunoestimuladora de la invención se obtiene añadiendo en una relación específica al menos un ARNm libre como el definido arriba al componente adyuvante preparado de acuerdo con la etapa a), donde el al menos un ARNm libre definido arriba codifica para al menos un antígeno, como se definió anteriormente. Como se describió más arriba, la relación entre el componente adyuvante (que comprende al menos un ARN(m) complejado con el compuesto policatiónico) y el segundo componente (al menos un ARNm libre) en la composición inmunoestimuladora de la invención puede seleccionarse de acuerdo con los requerimientos específicos de una terapia particular, por ejemplo una terapia para cáncer o antitumoral, una terapia génica, una terapia anti-alergia (desensibilización), vacunación profiláctica o terapéutica, etc. Típicamente, la relación entre el componente adyuvante y el segundo componente de la composición inmunoestimuladora de la invención se selecciona de manera que se desarrolla una estimulación significativa del sistema inmunológico innato debido al componente adyuvante. En paralelo, la relación se selecciona

de manera que una cantidad significativa del al menos un ARNm libre pueda ser provista *in vivo* llevando a una traducción eficiente de la proteína expresada *in vivo*. Preferentemente, la relación componente adyuvante:ARNm libre en la composición inmunoestimuladora de la invención se selecciona de un intervalo como el definido arriba, por ejemplo alrededor de 5:1 (p/p) a aproximadamente 1:10 (p/p), en especial de un intervalo de alrededor de 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:8 (p/p), todavía más preferiblemente de un intervalo de alrededor de 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:5 (p/p) o 1:3 (p/p), y en particular la relación componente adyuvante:ARNm libre en la composición inmunoestimuladora de la invención se selecciona de una relación de aproximadamente 1:1 (p/p).

Opcionalmente, pueden añadirse componentes adicionales como los definidos arriba a la composición inmunoestimuladora de la invención, en una o más etapas adicionales.

De acuerdo con una realización final, la presente invención proporciona también kits, particularmente kits de partes, que comprenden como componentes, solos o en combinación, la composición inmunoestimuladora de la invención o sus componentes, es decir, el al menos un ARN(m) complejado con un compuesto catiónico o policatiónico, y el al menos un ARNm libre que codifica para al menos una proteína, antígeno y/o anticuerpo terapéuticamente activo, respectivamente, y/o una composición farmacéutica o vacuna de la invención y opcionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosis de estos componentes. Estos kits, de preferencia kits de partes, pueden aplicarse, por ejemplo, para cualquiera de las aplicaciones o usos mencionados arriba.

### Figuras

Las siguientes figuras ilustran adicionalmente la invención.

Figura 1: ilustra los resultados de la expresión de luciferasa después de la inyección intradérmica de ARNm que codifica para luciferasa *in vivo*, donde una composición que comprende una cantidad de 10 µg de ARNm libre que codifica para la luciferasa (Pp Luc) con o sin una combinación con LacZ-ARNm (wt LacZ) complejado con protamina (2:1 y 1:1) fueron preparadas e inyectadas vía intradérmica en el pabellón auricular del oído. Como puede observarse, los complejos LacZ-ARNm:protamina, que han sido formulados en una relación 1:1 ó 2:1, respectivamente, no tuvieron influencia negativa en la expresión de la luciferasa, es decir, no estaba presente ninguna protamina libre en la solución o sólo en una cantidad muy pequeña que no tuvo una influencia negativa en la traducción. En consecuencia, no fue posible una formación de complejos entre la protamina y el ARNm de pPLuc, lo cual indica la estabilidad de los complejos LacZ-ARNm:protamina ya formados.

Figura 2: muestra los resultados de una reacción de vacunación en el modelo E.G7-OVA para propósitos terapéuticos. Para el experimento, 300.000 células tumorales E.G7-OVA fueron implantadas en ratones C57 BL/6 y los ratones fueron vacunados 8 veces en 2 semanas con la composición inmunoestimuladora de la invención, que comprende 20 µg de ARNm enriquecido en GC que codifica para la ovalbúmina de *Gallus gallus*. En un primer experimento, se usó tanto un ARN completamente complejado con protamina en una relación 3:1 como un ARN donde el ARN complejado se mezcló con ARN libre en una relación 1:1, 1:4 y 1:8 (p/p). Como se puede observar en la Figura 2, el ARN libre así como la protamina sola no tuvieron ningún efecto en el crecimiento tumoral en comparación con el control tampón (solución de Ringer-lactato). Sorprendentemente, una vacunación con un ARN complejado con protamina en una relación 3:1 (ARN:protamina) reduce significativamente el crecimiento del tumor. La adición de ARN libre incrementa la respuesta del tumor todavía más, demostrándose que una relación de más de 1:8 (ARN complejado:ARN libre), por ejemplo 1:4 o incluso 1:1, es particularmente adecuada.

Figura 3: describe los resultados de una reacción de vacunación en el modelo E.G7-OVA para propósitos terapéuticos similares a los del experimento de la Figura 2. Para este segundo experimento se usó tanto un ARN completamente complejado con protamina en una relación 3:1 como un ARN de acuerdo con un protocolo mejorado, mezclándose el ARN complejado con ARN libre en una relación ARN:protamina de 3:1 + ARN libre (1:1). Como se puede observar en la Figura 3, la combinación del ARN complejado y el ARN libre, particularmente en las relaciones descritas, lleva a una defensa anti-tumor mejorada.

Figura 4: muestra el análisis estadístico (matemático) del experimento de acuerdo con la Figura 3. La Figura 4 muestra particularmente que la diferencia entre los grupos son significativas. El análisis estadístico (matemático) se llevó a cabo con el software GraphPad Prism y los valores p se determinaron usando la prueba de Mann Whitney. El análisis subraya los resultados mostrados en la Figura 3.

Figura 5: ilustra los resultados de la detección de las propiedades inmunoestimuladoras y la estimulación de hPBMCs con ARNm (CAP-GgOva(GC)-muag-A70-C30). Para este experimento  $2 \times 10^5$  hPBMCs fueron sembradas en 200 µl de medio por pocillo en placas de 96 pocillos y se añadieron 50 µl de la composición de la invención, que comprende 10 µg de ARNm que codifica para ovalbúmina de *Gallus gallus* para estimular la liberación de citoquinas durante la noche a 37°C. La secreción de citoquinas (TNFalfa e IL6) en hPBMCs con las composiciones que comprendían ARN asociado y libre mostraron una elevación significativa en la detección ELISA, indicando adecuadas propiedades inmunoestimuladoras.

Figura 6: describe los resultados de la inducción de una respuesta inmune humoral *in vivo*, donde ratones C57 BL/6 fueron vacunados 8 veces cada una con 16 µg de ARNm enriquecido con GC (CAP-CgOva(GC)-muag-A70-C30) que codificaba para la ovalbúmina de *Gallus gallus* o con un ARN de control "irrelevante" (pB-Luc ARN). Como se puede observar en la Figura 6, la combinación de un ARN complejado con un ARN libre, particularmente

en una relación de (1:1), lleva a una respuesta inmune humoral elevada en comparación con la vacunación con un ARN completamente complejo.

Figura 7: muestra la secuencia de ARNm de acuerdo con SEQ ID NO: 120, que tiene una longitud de 1.365 nucleótidos y fue llamada "CAP-GgOva(GC)-muag-A70-C30". La secuencia de ARNm CAP-GgOva(GC)-muag-A70-C30 contenía los siguientes elementos de secuencia:

Secuencia optimizada en GC para un mejor uso de codones y estabilización muag (alfa-globina-3'-UTR mutada)  
70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola poli-A),  
30 x citosina en el extremo 3'-terminal (cola poli-C).

El ORF se indica en cursiva, la muag (alfa-globina-3'-UTR mutada se indica con una línea discontinua, la cola poli-A está subrayada con una sola línea y la cola poli-C está subrayada con doble línea.

Figura 8: ilustra la secuencia de ARNm de acuerdo con SEQ ID NO: 121, que tiene una longitud de 1.816 nucleótidos y fue llamada "T7TS-Ppluc(wt)-A70". La secuencia de codificación (CDS) de la secuencia de ARNm completa se indica en cursiva, la cola poli-A está subrayada con una sola línea.

Figura 9: muestra el análisis estadístico de la expresión de luciferasa en ratones Balb/c. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad Prism y los valores p se determinaron usando la prueba de Mann Whitney. Los resultados de la Figura 9 muestran que el ARN complejo de acuerdo con la invención (2:1 (50%) + libre (50%)) presenta la misma expresión cuando se compara con ARN desnudo y ARN complejo en una relación 4:1 con protamina. Como puede observarse, las diferencias entre los grupos relevantes no son significativas (ns). Así, se puede proporcionar una estimulación inmune eficientemente con el ARN complejo de la invención, donde el nivel de expresión se mantiene en comparación con un ARN desnudo y un ARN complejo en relación de 4:1 con protamina (véase la Figura 10).

Figura 10: ilustra el análisis estadístico de la inducción de IL-12 en ratones Balb/c. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad Prism y los valores se determinaron usando la prueba de Mann Whitney. Los resultados muestran que la diferencia entre el ARN complejo de la invención (2:1 (50% + libre (50%)) y el grupo 4:1 (100%) que comprende la misma cantidad de ARN y protamina es significativa. Así, puede proporcionarse una estimulación inmune eficientemente con el ARN complejo de la invención, donde el nivel de expresión se mantiene en comparación con un ARN desnudo y un ARN complejo en relación de 4:1 con protamina (véase también Figura 9).

Figura 11: muestra la inducción de anticuerpos IgG2a contra la hemaglutinina (HA) de antígeno de la gripe. Así, los ratones fueron vacunados 2 veces con 20 µg de ARN enriquecido con GC que codificaba para hemaglutinina (HA) desnuda o formulada con clorhidrato de protamina (Prot. Val) o sulfato de protamina (Prot. Leo) como se indica. Como puede observarse en la Figura 11, la combinación de un ARN complejo con un ARN libre lleva a una respuesta inmune humoral elevada en comparación con la vacunación con un ARN completamente complejo. En comparación con un ARN desnudo, el ARN complejo lleva a títulos de anticuerpo IgG2a más altos, un indicador de la respuesta conducida por Th1. La asociación de ARN con clorhidrato de protamina (Protamine Valeant) tiene un efecto más potente que la asociación con sulfato de protamina.

Figura 12: ilustra la inducción de anticuerpos específicos de IgG2a contra el antígeno HA de la gripe durante 15 semanas después de la inmunización. Así, los ratones fueron vacunados 2 veces con 20 µg de ARNm enriquecido con GC que codificaba para hemaglutinina (HA) desnuda o complejada con protamina (ARN:protamina 2:1 + ARN libre (1:1) (p/p)) y se midieron los anticuerpos IgG2a en los puntos de tiempo indicados. Se analizaron sueros en diferentes puntos de tiempo después de la inmunización mediante ELISA. Se muestran gráficamente los títulos de anticuerpos específicos de hemaglutinina del subtipo IgG2a para los grupos tratados con el tampón (80% RiLa), ARNm de HA desnuda o complejada.

Figura 13: muestra la inducción de anticuerpos contra la HA de antígeno de la gripe por el ensayo HAI. Así, los ratones fueron vacunados 2 veces con 20 µg de ARNm enriquecido con GC que codificaba para hemaglutinina (HA) desnuda o formulada con protamina (ARN:protamina 2:1 + ARN libre (1:1) (p/p)) y el ensayo

Figura 14: muestra la secuencia de ARNm que codifica para la hemaglutinina de antígeno patógeno (HA) del virus de la gripe.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos están diseñados para ilustrar la invención.

### Ejemplo 1: Preparación de un constructo de ARNm que codifica para la Pp luciferasa (*Photinus pyralis*)

Para los siguientes experimentos se emplea una secuencia de ADN que codificaba para Pp luciferasa (*Photinus pyralis*) y que corresponde al ARNm respectivo que codifica para secuencias de Pp luciferasa aquí usadas, se preparó y se usó para experimentos de transfección y vacunación subsecuentes. Así, la secuencia de ADN que corresponde al ARNm que codifica la para Pp luciferasa nativa se modificó con un marcador poli-A (A70), llevando a

la SEQ ID NO: 121 (véase Figura 8). El constructo final tenía una longitud de 1.816 nucleótidos y se llamó "T7TS-Ppluc(wt)-A70".

### Ejemplo 2: Preparación de un constructo de ARNm que codifica para la ovalbúmina de *Gallus gallus*

5 Para los siguientes experimentos se empleó una secuencia de ADN adicional, que codifica para la ovalbúmina de *Gallus gallus* y que corresponde a las secuencias de ARNm respectivas, se preparó y se usó para experimentos de transfección y vacunación subsecuentes. Así, la secuencia de ADN que correspondía al ARNm que codifica para la ovalbúmina de *Gallus gallus* nativa fue optimizada con GC para un mejor uso de codones y estabilización. Después, la secuencia de ADN que corresponde a la secuencia de ARNm de ovalbúmina de *Gallus gallus* de codificación fue transferida en un constructo RActive modificado con un marcador poli-A y un marcador poli-C (A70-C30). El constructo final tenía una longitud de 1.365 nucleótidos y se llamó "CAP-GgOva(GC)-muag-A70-C30". Contenia los siguientes elementos de secuencia:

15 Secuencia optimizada con GC para un mejor uso de codones y estabilización muag (alfa-globina-3'-UTR mutada)  
70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola poli-A),  
30 x citosina en el extremo 3'-terminal (cola poli-C).

La secuencia de ARNm correspondiente se muestra en la Figura 7 (véase SEQ ID NO: 120).

### Ejemplo 3: Experimentos de transcripción *in vitro*

20 El ADN plasmídico recombinante fue linearizado y posteriormente transcrito *in vitro* usando la T7 ARN polimerasa. La plantilla de ADN fue después degradada mediante digestión con DNaseI. El ARN fue recuperado mediante precipitación con LiCl y limpiado mediante extracción por HPLC (PUREMessenger<sup>®</sup>, CureVac GmbH, Tübingen, Alemania).

### Ejemplo 4: Elaboración de la composición de la invención

El ARNm usado en los experimentos abajo fue asociado con protamina mediante la adición de protamina al ARNm en las relaciones indicadas (1:1-1:4) (p/p). Después de la incubación durante 10 minutos, se añadió el ARN libre.

### 25 Ejemplo 5: Expresión de la luciferasa después de una inyección intradérmica de ARNm que codifica para la luciferasa *in vivo*

30 En este experimento se investigó la influencia de las composiciones que comprenden complejos ARNm:protamina fácilmente preparadas y/o el ARNm libre en la traducción. Así, una composición que comprendía una cantidad de 10 µg de ARNm libre que codifica para luciferasa (Pp Luc) con o sin combinación con LacZ-ARNm complejado con protamina (2:1 y 1:1) se prepararon y se inyectaron vía intradérmica en el pabellón auricular del oído.

35 El ARNm que codifica para Pp luciferasa se preparó como se describió arriba. La composición a administrar contenía o nada de ARN adicional complejado, lacZ-ARNm:protamina en una concentración de 2:1 o lacZ-ARNm:protamina en una concentración de 1:1. Como control se administró una composición que no contenía ARNm que codificaba para la Pp luciferasa (*Photinus pyralis*). Se usó protamina como control. Para preparar estas composiciones, lacZ-ARNm se formuló en una primera etapa con protamina en diferentes cantidades y relaciones (2:1 y 1:1 (p/p)) y se añadieron como un primer componente. Luego, se añadió ARNm de Pp Luc libre 10 minutos más tarde a la composición.

40 Después de 24 horas se retiraron los pabellones auriculares del oído y se congelaron en nitrógeno líquido. Para homogeneización, las muestras se pusieron en un TissueLyser durante 3 minutos a 30 s<sup>-1</sup>. Después se añadieron 800 µl de tampón de lisis (25 mM Tris-HCl pH (7,5-7,8); 2 mM EDTA; 10% (p/v) glicerol; 1% (p/v) Triton-X-100; 2 mM DTT; 1 mM PMSF) y las muestras se pusieron de nuevo en el TissueLyser durante 6 minutos a 30 s<sup>-1</sup>. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 13.500 rpm y 4°C. Se retiró el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta la medición de luciferasa. Los sobrenadantes fueron mezclados con tampón de luciferina (25 mM glicilglicina, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM ATP, 62,5 µM luciferina) y la luminiscencia se midió con un luminómetro (Lumat LB 9507; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania).

45 Como resultado (véase la Figura 1), los complejos LacZ-ARNm:protamina, formulados en una relación 1:1 ó 2:1, no tuvieron respectivamente influencia negativa en la expresión de luciferasa, es decir, no había ninguna protamina libre presente en la solución o sólo una cantidad muy pequeña que no tuvo influencia negativa en la traducción. En consecuencia, no fue posible ninguna formación de complejos entre la protamina y el ARNm de ppLuc, lo cual indica la estabilidad de los complejos LacZ-ARNm:protamina ya formados.

### 50 Ejemplo 6: Vacunación en el modelo E.G7-OVA para propósitos terapéuticos

#### Método general:

55 300.000 células tumorales E.G7-OVA fueron implantadas en ratones C57 BL/6. Las siguientes 3 semanas los ratones fueron vacunados 8 veces en 3 semanas con la composición de la invención, que comprendía 20 µg de ARNm enriquecido con GC que codificaba para la ovalbúmina de *Gallus gallus*. El tamaño del tumor se midió 18 días después de la implantación de las células tumorales.

A) Primer experimento

300.000 células tumorales E.G7-OVA fueron implantadas en ratones C57 BL/6. Dentro de las siguientes dos semanas los ratones fueron vacunados 8 veces cada vez con 20 µg de ARNm enriquecido con GC que codificaba para la ovalbúmina de *Gallus gallus*. Para este experimento, se usó un ARN completamente complejoado con protamina en una relación 3:1 o un ARN donde el ARN complejoado se mezcló con ARN libre en una relación 1:1, 1:4 y 1:8 (p/p).

Los resultados se muestran en la Figura 2. Como puede observarse en la Figura 2, ARN libre y la protamina sola no tienen ningún pequeño efecto en el crecimiento tumoral en comparación con el control de tampón (solución de Ringer-lactato). Sorprendentemente, una vacunación con un ARN complejoado con protamina en una relación 3:1 (ARN:protamina) reduce significativamente el crecimiento del tumor. La adición del ARN libre incrementa la respuesta del tumor todavía más, donde una relación de más de 1:8 (ARN asociado:ARN libre), por ejemplo 1:4 o incluso 1:1, ha demostrado ser particularmente adecuada.

B) Segundo experimento

300.000 células tumorales E.G7-OVA fueron implantadas en ratones C57 BL/6. Dentro de las siguientes tres semanas los ratones fueron vacunados 8 veces cada vez con 20 µg de ARNm enriquecido con GC que codificada para ovalbúmina de *Gallus gallus*. Para este experimento, se usó un ARN completamente complejoado con protamina en una relación 3:1 o un ARN de acuerdo con un protocolo mejorado, donde el ARN complejoado se mezcló con ARN libre en una relación de ARN:protamina 3:1 + ARN libre (1:1).

Los resultados de este experimento se ilustran en la Figura 3. Como se puede observar en la Figura 3, la combinación de ARN complejoado y ARN libre, particularmente en las relaciones descritas, lleva a una defensa contra el tumor mejorada.

El análisis estadístico (matemático) se llevó a cabo con el software GraphPad Prism. Los valores p se determinaron usando la prueba de MannWhitney (véase Figura 4).

**Ejemplo 7: Detección de las propiedades inmunoestimuladoras y estimulación de hPBMC con ARNm**

Para este experimento hPBMC fueron aisladas por centrifugación en Ficoll (20 minutos a 2.000 rpm) y posteriormente lavadas dos veces en PBS. Las hPBMC fueron después resuspendidas en FCS, 10% de DMSO a una densidad de  $5 \times 10^7$ /ml. Alícuotas de 1 ml se congelaron y almacenaron a -80°C.

Antes del experimento, las hPBMC fueron descongeladas por resuspensión en PBS, seguido de dos lavados en PBS. Las hPBMC fueron luego suspendidas en X-vivo 15, 1% de glutamina, 1% de Pen/Strep a una velocidad de  $1 \times 10^6$ /ml. Después de sembrar hPBMCs a  $2 \times 10^5$  por pocillo en placas de 96 pocillos, se añadieron 50 µl de la composición de la invención, que comprendía 8 µg de ARNm que codificaba para ovalbúmina de *Gallus gallus*, para estimular la liberación de citoquinas durante la noche a 37°C.

Así, PMCs humanas fueron incubadas durante 20 horas con ARN que codificaba para ovalbúmina de *Gallus gallus* (OVA) complejada con protamina (3:1) más 50% de ARN libre (formulado como sigue: ARN:protamina 3:1 + ARN libre (1:1) (p/p)). Se midió y detectó la secreción de citoquinas (TNFalfa e IL6) en el sobrenadante usando ELISA estándar.

Para la cuantificación de TNFalfa e IL6 (ELISA) se recubrieron placas Maxisorb durante la noche (4°C) con anticuerpo de captura (1 µg/ml) y posteriormente se bloquearon con 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Después de tres lavados con Tween 0,05%, 50 µl (TNFα) o 50 µl (IL-6), se añadieron 15 a 100 µl del sobrenadante de hPBMC ajustado con un tampón de bloqueo a los pocillos. La unión se dejó proceder durante dos horas (RT). La placa se lavó después y se añadieron 100 µl de peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina. Después de la incubación durante 30 minutos y lavado, se añadió a un sustrato colorimétrico (TMB, Perbio Science). Se midieron las densidades ópticas a 450 nm usando un lector de placas ELISA Tecan. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y las etapas de lavado incluyen al menos 3 etapas usando PBS/Tween20 (0,05% v/v).

Se añadieron 100 µl/pocillo de una mezcla de Strept-HRP (diluida 1/1000) y anticuerpo de detección biotinilado (0,5 µg/ml). La incubación durante una hora a temperatura ambiente fue seguida por tres lavados con Tween 0,05%. Finalmente, se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato Amplex Red HRP (50 µM), 0,014% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La fluorescencia se midió en un lector de placas Spectramax Gemini (Ex 540 nm, Em 590 nm, límite 590 nm).

Los resultados se muestran en la Figura 5. Como se puede observar en la Figura 5, las composiciones que comprenden ARN complejoado y libre exhiben una propiedad inmunoestimuladora que se refleja por una secreción significativa de TNFalfa e IL-6 en hPBMCs.

**Ejemplo 8: Inducción de una respuesta inmune humoral**

Ratones C57 BL/6 fueron vacunados 8 veces cada vez con 16 µg de ARNm enriquecido con GC que codificaba para ovalbúmina de *Gallus gallus* o un ARN de control "irrelevante" (pB-Luc ARN). Así, el ARN se formuló completamente con protamina en una relación 2:1 o con la relación de acuerdo con un protocolo mejorado ARN:protamina 2:1 +

ARN libre (1:1) (p/p)). Dos semanas después de la última vacunación se tomaron muestras de sangre y se determinó la expresión de anticuerpos específicos de ovalbúmina.

5 Para la detección de anticuerpos específicos de antígeno, placas MaxiSorb (Nalgene Nunc International) fueron recubiertas con antígeno (ovalbúmina, proteína recombinante). Después de bloquear con 1xPBS, 0,05% de Tween y 1% de BSA, las placas fueron incubadas con suero de ratones durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario acoplado a biotina. Tras lavar la placa, se incubó con peroxidasa de rábano y la actividad de la enzima se determinó midiendo la conversión del sustrato (ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (OD 450 nm). Las densidades ópticas se midieron a 450 nm usando un lector de placas ELISA Tecan.

10 Los resultados se muestran en la Figura 6. Como se puede observar en la Figura 6, la combinación de un ARN complejado con un ARN libre lleva a una respuesta inmune humoral elevada en comparación con la vacunación con un ARN completamente complejado.

**Ejemplo 9: Análisis estadístico de la expresión de la luciferasa en ratones Balb/c**

15 En este experimento se investigó la influencia de diferentes estrategias de formulación con protamina en la traducción de luciferasa. 2 ratones por grupo fueron inyectados en 4 sitios vía intradérmica con

- (1) una composición que comprendía 50% de Luc-ARN complejada con protamina (2:1) en combinación con 50% de ARN libre,
- (2) una composición que comprendía Luc-ARN complejada con protamina en relación 4:1,
- (3) 100% de Luc-ARN libre, o
- 20 (4) tampón de Ringer-lactato como control.

Cada muestra comprendía 10 µg de ARNm que codificaba para luciferasa (Luc-ARN, es decir, el constructo descrito arriba "T7TS-Ppluc(wt)-A70" de acuerdo con SEQ ID NO: 121) en 50 µl de tampón de Ringer-lactato. Los grupos primero y segundo comprendían también la misma cantidad de protamina, pero fueron formulados de forma diferente. La composición inmunoestimuladora del grupo (1) se preparó de acuerdo con la invención.

25 Los resultados se muestran en la Figura 9. La Figura 9 muestra el análisis estadístico de la expresión de luciferasa en ratones Balb/c. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad Prism y los valores p se determinaron usando la prueba de Mann Whitney. Los resultados de la Figura 9 muestran que el ARN complejado de acuerdo con la invención (2:1 (50%) + libre (50%), grupo (1)) exhibe la misma expresión cuando se compara con ARN desnudo y ARN complejado en relación de 4:1 con protamina (grupos (2) y (3)). Como se puede ver, las diferencias entre los grupos relevantes no son significativas (ns). Así, puede proporcionarse eficientemente una estimulación inmune con la composición inmunoestimuladora de la invención, donde el nivel de expresión se mantiene en comparación con ARN desnudo y ARN complejado en la relación 4:1 con protamina (véase también la Figura 10).

**Ejemplo 10: Análisis estadístico de la inducción de IL-12 en ratones Balb/c**

35 Para este experimento, 40 µg de ARN que codificaba para luciferasa (Luc-ARN, es decir, el constructo "T7TS-Ppluc(wt)-A70" descrito arriba de acuerdo con SEQ ID NO: 121) en las siguientes composiciones:

- (1) 2:1 (50%) + libre (50%) comprendido 20 µg Luc-ARN complejado con protamina (2:1) (p/p) y 20 µg de Luc-ARN libre (es decir, una composición inmunoestimuladora de la invención),
- (2) 4:1 (100%) comprendía 40 µg de Luc-ARN complejado con protamina (4:1) (p/p),
- 40 (3) 40 µg de Luc-ARN libre,
- (4) 10 µg de protamina, y
- (5) 800 µl de RiLa (todas las muestras fueron disueltas en tampón de Ringer-lactato hasta un volumen final de 800 µl)

45 se inyectaron vía intravenosa en la vena de la cola de ratones Balb/c (4 ratones por grupo). Después de 4 horas, se tomó sangre punzando las venas retro-orbitales y se usó el suero para ELISA de citoquina (IL-12). El ELISA se llevó a cabo como se describió para el Ejemplo 7.

Los resultados se muestran en la Figura 10. La Figura 10 ilustra el análisis estadístico de la inducción de IL-12 en ratones Balb/c de acuerdo con el ejemplo 10. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad Prism y los valores p se determinaron usando la prueba de Mann Whitney. Los resultados muestran que la diferencia entre la composición inmunoestimuladora de la invención (2:1 (50%) + libre (50%)) y el grupo 4:1 (100%), que comprende la misma cantidad de ARN y protamina, es de hecho significativa. Así, puede proporcionarse eficientemente una estimulación inmune con la composición inmunoestimuladora de la invención, donde el nivel de expresión se mantiene en comparación con ARN desnudo y ARN complejado en relación 4:1 con protamina (véase también la Figura 9).

55 **Ejemplo 11: Inducción de una respuesta inmune humoral contra un antígeno viral**

Vacunación:

5 Ratones BALB/c fueron vacunados dos veces con 20 µg de ARNm enriquecido con GC que codificaba para hemaglutinina (HA) de *influenza A/Puerto Rico/8/34 (PR8)* o tampón de inyección (80% de Ringer Lactato). De esta manera, el ARN fue ya sea formulado completamente con protamina en una relación 2:1 o la relación fue de acuerdo con la invención ARN:protamina 2:1 + ARN libre (1:1) (p/p). Para las formulaciones, se probaron dos protaminas diferentes, clorhidrato de protamina (Protamin Valeant) y sulfato de protamina (Protamin LEO).

Detección de anticuerpos específicos

10 En diferentes puntos de tiempo después de la última vacunación se tomaron muestras de sangre y se determinó la expresión de anticuerpos específicos de hemaglutinina por ELISA (Figura 11 y Figura 12) o ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI) (Figura 13).

Detección de anticuerpos específicos de antígeno por ELISA

15 Para la detección de anticuerpos específicos de antígeno por ELISA, placas MaxiSorb (Nalgene Nunc International) fueron recubiertas con antígeno (PR8 inactivado). Después de bloquear con 1xPBS, 0,05% de Tween y 1% de BSA, las placas fueron incubadas con sueros de ratones durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario acoplado a biotina. Después de lavar la placa se incubó con peroxidasa de rábano y se determinó la actividad enzimática midiendo la conversión del sustrato (ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (OD 405 nm). Las densidades ópticas se midieron a 405 nm usando un lector de placas Tecan. Los resultados del análisis de los sueros obtenidos dos semanas después de la inmunización se muestran en la Figura 11. Como puede verse en la Figura 11, la combinación de un ARN complejado con ARN libre lleva a una elevada respuesta inmune humoral en comparación con la vacunación con un ARN completamente complejado. En comparación con ARN desnudo, el ARN complejado lleva a títulos de anticuerpos IgG2a más altos, un indicador de la respuesta dirigida por Th1. La asociación de ARN con clorhidrato de protamina (Protamine Valeant) tiene un efecto más fuerte que la asociación con sulfato de protamina.

20

25 En la Figura 12, sueros de diferentes puntos de tiempo después de inmunización fueron analizados por ELISA. Se representan gráficamente los títulos de anticuerpos específicos de hemaglutinina del subtipo IgG2a para los grupos tratados con tampón (80% RiLa), ARNm de HA desnudo o complejado. La complejación se hizo con Protamin Valeant después de un protocolo mejorado de ARN:protamina 2:1 + ARN libre (1:1) (p/p).

Detección de anticuerpos específicos de antígeno por ensayo HAI:

30 Sueros de ratones inmunizados también se analizaron mediante ensayo HAI. En un ensayo HAI se detectan anticuerpos que neutralizan el virus al bloquear la interacción de la hemaglutinina viral y el ácido siálico en la célula huésped.

35 Los sueros fueron inactivados a 56°C durante 10 minutos para destruir complemento e inhibidores de HAI. Los sueros fueron incubados con caolín durante 20 minutos y preadsorbidos en glóbulos rojos de pollo durante 30 minutos para eliminar factores no específicos que influyeran en la hemaglutinación. Muestras de suero pre-tratadas fueron añadidas a una placa de fondo en U de 96 pocillos en dilución en serie y duplicados. Se añadieron entonces 25 µl que contenían 4 unidades de hemaglutinina de PR8 inactivado en PBS y 50 µl de glóbulos rojos de pollo al 0,5% y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Los títulos de HAI finales fueron definidos como el recíproco de la dilución de suero más alta que inhibió completamente la hemaglutinación de los glóbulos rojos. Se representan los títulos de sueros de diferentes puntos de tiempo después de la inmunización para los grupos tratados con tampón (80% RiLa), ARNm de HA desnudo o complejado. La complejación se hizo con Protamin Valeant y el protocolo mejorado ARN:protamina 2:1 + ARN libre (1:1) (p/p). Se asume que un título de 40 es protector en el caso de infección por gripe. Los ratones inmunizados con ARN HA complejado muestran un título HAI duradero de más de 40, mientras que el ARNm de HA desnudo llevó a títulos en promedios más bajos que el título protector de 40.

40

45



# ES 2 502 915 T3

<400> 6  
gggggggggu uugggggggg 20

5 <210> 7  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

10 <400> 7  
ggggggggguu uugggggggg 20

15 <210> 8  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

20 <400> 8  
gggggggguuu uuuggggggg 20

25 <210> 9  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

30 <400> 9  
gggggggguuu uuuugggggg 20

35 <210> 10  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

40 <400> 10  
gggggguuuu uuuugggggg 20

45 <210> 11  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

50 <400> 11  
gggggguuuu uuuuuggggg 20

55 <210> 12  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

60 <400> 12  
gggggguuuu uuuuuugggg 20

65 <210> 13  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial

# ES 2 502 915 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

5 <400> 13  
ggggguuuuu uuuuuugggg 20

10 <210> 14  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

15 <400> 14  
ggggguuuuu uuuuuuggg 20

20 <210> 15  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

25 <400> 15  
gggguuuuuu uuuuuuggg 20

30 <210> 16  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

35 <400> 16  
gggguuuuuu uuuuuuugg 20

40 <210> 17  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

45 <400> 17  
gguuuuuuuu uuuuuuugg 20

50 <210> 18  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

55 <400> 18  
guuuuuuuuu uuuuuuuug 20

60 <210> 19  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

65 <400> 19  
gggggggggg uuuggggggg gg 22

# ES 2 502 915 T3

5 <210> 20  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

10 <400> 20  
gggggggggu uuuggggggg gg 22

15 <210> 21  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

20 <400> 21  
gggggggguu uuuugggggg gg 22

25 <210> 22  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

30 <400> 22  
gggggggguu uuuuuggggg gg 22

35 <210> 23  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

40 <400> 23  
ggggggguuu uuuuuggggg gg 22

45 <210> 24  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

50 <400> 24  
ggggggguuu uuuuuugggg gg 22

55 <210> 25  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

60 <400> 25  
ggggggguuu uuuuuuggg gg 22

65 <210> 26  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

# ES 2 502 915 T3

<400> 26  
gggggguuuu uuuuuuuggg gg 22

5 <210> 27  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

10 <400> 27  
gggggguuuu uuuuuuuggg gg 22

15 <210> 28  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

20 <400> 28  
gggggguuuu uuuuuuuggg gg 22

25 <210> 29  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

30 <400> 29  
gggggguuuu uuuuuuuuug gg 22

35 <210> 30  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

40 <400> 30  
ggguuuuuuu uuuuuuuuug gg 22

45 <210> 31  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

50 <400> 31  
gguuuuuuuu uuuuuuuuuu gg 22

55 <210> 32  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

60 <400> 32  
gggggggggg guuugggggg gggg 24

65 <210> 33  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial

## ES 2 502 915 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

5 <400> 33  
ggggggggggg uuuuggggggg gggg 24

10 <210> 34  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

15 <400> 34  
ggggggggggu uuuuggggggg gggg 24

20 <210> 35  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

25 <400> 35  
ggggggggggu uuuuuggggg gggg 24

30 <210> 36  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

35 <400> 36  
ggggggggguu uuuuuggggg gggg 24

40 <210> 37  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

45 <400> 37  
ggggggggguu uuuuuuggg gggg 24

50 <210> 38  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

55 <400> 38  
ggggggggguu uuuuuuugg gggg 24

60 <210> 39  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

65 <400> 39  
gggggggguuu uuuuuuugg gggg 24

<210> 40  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 40  
 ggggggguuu uuuuuuuuug gggg 24

10 <210> 41  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 41  
 gggggguuuu uuuuuuuuug gggg 24

20 <210> 42  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 42  
 gggggguuuu uuuuuuuuuu gggg 24

30 <210> 43  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 43  
 gggguuuuuu uuuuuuuuuu gggg 24

40 <210> 44  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 44  
 ggguuuuuuu uuuuuuuuuu uggg 24

50 <210> 45  
 <211> 32  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 45  
 guuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu ug 32

60 <210> 46  
 <211> 34  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 65 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"



## ES 2 502 915 T3

<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"  
<400> 53  
5 gggggggggu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuug gggggggg 47

<210> 54  
<211> 7  
<212> RNA  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 54  
15 gguuugg 7

<210> 55  
<211> 8  
<212> RNA  
20 <213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 55  
25 gguuuugg 8

<210> 56  
<211> 9  
<212> RNA  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 56  
35 gguuuuugg 9

<210> 57  
<211> 10  
<212> RNA  
40 <213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 57  
45 gguuuuuugg 10

<210> 58  
<211> 11  
<212> RNA  
50 <213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 58  
55 gguuuuuuug g 11

<210> 59  
<211> 12  
<212> RNA  
60 <213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

<400> 59  
65 gguuuuuuuu gg 12

# ES 2 502 915 T3

5 <210> 60  
<211> 13  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

10 <400> 60  
gguuuuuuuu ugg 13

15 <210> 61  
<211> 14  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

20 <400> 61  
gguuuuuuuu uugg 14

25 <210> 62  
<211> 15  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

30 <400> 62  
gguuuuuuuu uuugg 15

35 <210> 63  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

40 <400> 63  
gguuuuuuuu uuuugg 16

45 <210> 64  
<211> 17  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

50 <400> 64  
gguuuuuuuu uuuuugg 17

55 <210> 65  
<211> 18  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

60 <400> 65  
gguuuuuuuu uuuuuugg 18

65 <210> 66  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

# ES 2 502 915 T3

<400> 66  
gguuuuuuuu uuuuuuugg 19

5 <210> 67  
<211> 9  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

10 <400> 67  
ggguuuggg 9

15 <210> 68  
<211> 10  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

20 <400> 68  
ggguuuuggg 10  
<210> 69  
<211> 11  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

25 <400> 69  
ggguuuuugg g 11

30 <210> 70  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

35 <400> 70  
ggguuuuuug gg 12

40 <210> 71  
<211> 13  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

45 <400> 71  
ggguuuuuuu ggg 13

50 <210> 72  
<211> 14  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

55 <400> 72  
ggguuuuuuu uggg 14

60 <210> 73  
<211> 15  
<212> RNA  
<213> Artificial

65

# ES 2 502 915 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

5 <400> 73  
ggguuuuuuu uuuggg 15

10 <210> 74  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

15 <400> 74  
ggguuuuuuu uuuggg 16

20 <210> 75  
<211> 17  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

25 <400> 75  
ggguuuuuuu uuuggg 17

30 <210> 76  
<211> 18  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

35 <400> 76  
ggguuuuuuu uuuggg 18

40 <210> 77  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

45 <400> 77  
ggguuuuuuu uuuggg 19

50 <210> 78  
<211> 57  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

55 <400> 78  
ggguuuuuuu uuuggg guuuuuuuuu uuugggu uuuuuuuuuu uuuggg 57

60 <210> 79  
<211> 42  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"

65 <400> 79  
ggguuuuuuu uuuggg gggguuuuuuu uuuuuuuuug gg 42

<210> 80

# ES 2 502 915 T3

- <211> 51  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "GIXmGn"  
  
<400> 80  
ggguuugggu uuggguuugg guuuggguuu ggguuugggu uuggguuugg g 51
- 10 <210> 81  
<211> 57  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "CIXmCn"  
  
<400> 81  
ccuuuuuuuu uuuuuuuucc cuuuuuuuuu uuuuuucccu uuuuuuuuuu uuuuucc 57
- 20 <210> 82  
<211> 51  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "CIXmCn"  
  
<400> 82  
ccuuuucccu uuccuuucc cuuuccuuu ccuuucccu uuccuuucc c 51
- 30 <210> 83  
<211> 42  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Estructura núcleo ejemplo "CIXmCn"  
  
<400> 83  
ccuuuuuuuu uuuuuuuucc cccuuuuuuu uuuuuuuuuc cc 42
- 40 <210> 84  
<211> 60  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 45 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (I)  
  
<400> 84  
uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60
- 50 <210> 85  
<211> 60  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 55 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (I)<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(60)  
<223> la secuencia es ARN de doble hebra
- 60 <400> 85  
uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60  
  
<210> 86  
<211> 60
- 65 <212> RNA  
<213> Artificial

# ES 2 502 915 T3

<220>  
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (Ia)  
<400> 86  
uagcgaagcu cuuggaccua ccuuuuuuuu uuuuuuuccc ugCGuuccua gaaguacacg 60

5  
<210> 87  
<211> 60  
<212> RNA  
<213> Artificial

10  
<220>  
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (Ia)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(60)

15  
<223> la secuencia es ARN de doble hebra  
<400> 87  
uagcgaagcu cuuggaccua ccuuuuuuuu uuuuuuuccc ugCGuuccua gaaguacacg 60

<210> 88  
<211> 40  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula general (II)

20  
25  
<400> 88  
cccccccccc ccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg 40

<210> 89  
<211> 40  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula general (II)

30  
35  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> la secuencia es dsRNA (poly(I:C))

40  
<400> 89  
cccccccccc ccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg 40

<210> 90  
<211> 40  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula general (II)

45  
50  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(37)  
<223> secuencia de doble hebra ((A:U)  
<400> 90  
cccccccccc ccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg 40

55  
<210> 91  
<211> 40  
<212> RNA  
<213> Artificial

60  
<220>  
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula general (II)  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(40)

65  
<223> secuencia de doble hebra RNA

# ES 2 502 915 T3

<400> 91  
 cccccccccc cccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg 40

5 <210> 92  
 <211> 80  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula general (II)

10 <400> 92  
**ccccccccc cccccccccc uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg 60**  
**ugcguuccua gaaguacacg 80**

15 <210> 93  
 <211> 80  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>

20 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula general (II)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(80)  
 <223> secuencia de doble hebra RNA

25 <400> 93  
**ccccccccc cccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60**  
**uagcgaagcu cuuggaccua 80**

30 <210> 94  
 <211> 80  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula general (II)  
 <220>

35 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(80)  
 <223> secuencia de doble hebra RNA

40 <400> 94  
**ccccccccc cccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60**  
**uagcgaagcu cuuggaccua 80**

45 <210> 95  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 1 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 96)

50 <400> 95  
 uagcgaagcu cuuggaccua 20

55 <210> 96  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 2 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 95)

60 <400> 96  
 uagguccaag agcuucgcu 20

<210> 97

## ES 2 502 915 T3

- <211> 11  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
5 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 1 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 98)  
  
<400> 97  
gccgcgggcc g 11
- 10 <210> 98  
<211> 11  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 15 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 2 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 97)  
  
<400> 98  
cgccccgagg c 11
- 20 <210> 99  
<211> 10  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 25 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 1 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 100)  
  
<400> 99  
gacacggugc 10
- 30 <210> 100  
<211> 10  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 35 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 2 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 99)  
<400> 100  
gcaccgugca 10
- 40 <210> 101  
<211> 8  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 45 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 1/tallo 2 (secuencia intrínsecamente palíndroma)  
  
<400> 101  
accuaggu 8
- 50 <210> 102  
<211> 8  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 55 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 1/tallo 2 (secuencia intrínsecamente palíndroma)  
  
<400> 102  
uggaucca 8
- 60 <210> 103  
<211> 5  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>
- 65 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 1 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 104)  
<400> 103  
ccugc 5

ES 2 502 915 T3

<210> 104  
 <211> 5  
 <212> RNA  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 2 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 103)

<400> 104  
 10 gcagg 5

<210> 105  
 <211> 5  
 <212> RNA  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 1 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 106)

<400> 105  
 20 gcagg 5

<210> 106  
 <211> 5  
 <212> RNA  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: ejemplo de secuencia de tallo 2 (secuencia palíndroma a SEQ ID NO: 105)

<400> 106  
 30 ccugc 5

<210> 107  
 <211> 60  
 <212> RNA  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: ácido nucleico de la invención según fórmula (IIIa) o (IIIb)

<400> 107  
 40 uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuuuuuuuuggg uagguccaag agcuucgcu 60

<210> 108  
 <211> 122  
 <212> RNA  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: ácido nucleico de la invención según fórmula (IIIa) o (IIIb)

<400> 108  
**uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuuuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60**  
**gccgcggggcc gugcguuccu agaaguacac gcggcccgcg gcugcguucc uagaaguaca 120**  
 50 **cg . 122**

<210> 109  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 55 <213> desconocida  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de protamina P1  
 <400> 109

**Ser Arg Ser Arg Tyr Tyr Arg Gln Arg Gln Arg Ser Arg Arg Arg Arg**  
**1 5 10 15**

**Arg Arg**

- 5 <210> 110
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> desconocida
- <220>
- <223> Descripción de secuencia: secuencia de protamina P2
- 10 <400> 110

**Arg Arg Arg Leu His Arg Ile His Arg Arg Gln His Arg Ser Cys Arg**  
**1 5 10 15**

**Arg Arg Lys Arg Arg**  
**20**

- 15 <210> 111
- <211> 13
- <212> RNA
- <213> desconocido
- <220>
- <223> Descripción de secuencia: secuencia Kozak
- 20 <400> 111
- gccgccacca ugg 13
- 25 <210> 112
- <211> 15
- <212> RNA
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223> Descripción de secuencia: secuencia de estabilización genérica de fórmula  
(C/U)CCANxCCC(U/A)PyxUC(C/U)CC
- <220>
- <221> variación
- <222> (1)..(1)
- 35 <223> /reemplazo="citidina (citosina)"  
/reemplazo="uridina (uracilo)"
- <220>
- <221> misc\_feature
- 40 <222> (1)..(1)
- <223> ácido nucleico = citidina (citosina) o uridina (uracilo)
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (5)..(5)
- 45 <223> Nx = a, g, c o u o cualquier otro ácido nucleico
- <220>
- <221> variación
- <222> (5)..(5)
- 50 <223> /reemplazo="citidina (citosina)" /reemplazo="uridina (uracilo)" /reemplazo="guanosina"  
/reemplazo="adenosina", o cualquier otro ácido nucleico
- <220>
- <221> unidad de repetición
- 55 <222> (5)..(5)
- <223> x = cualquier número

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> ácido nucleico = uridina (uracilo) o adenosina  
 5

<220>  
 <221> variación  
 <222> (9)..(9)  
 <223> /reemplazo="uridina (uracilo)"  
 10 /reemplazo="adenosina"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 15 <223> Py = pirimidina

<220>  
 <221> unidad de repetición  
 <222> (10)..(10)  
 20 <223> x = cualquier número

<220>  
 <221> variación  
 <222> (10)..(10)  
 25 <223> /reemplazo="pirimidina"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 30 <223> ácido nucleico = citidina (citosina) o uridina (uracilo)

<220>  
 <221> variación  
 <222> (13)..(13)  
 35 <223> /reemplazo="citidina (citosina)"  
 /reemplazo="uridina (uracilo)"

<400> 112  
 nccanccnn ucnc 15  
 40

<210> 113  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: oligo RNA40 immuno estimulador

<400> 113  
 gcccgucugu ugugugacuc 20  
 50

<210> 114  
 <211> 229  
 <212> RNA  
 <213> Seucneica artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (I)

<400> 114  
**gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcauauuc** **60**  
**agaguauugg cccccgugua gguuauucuu gacagacagu ggagcuuauu cacucccagg** **120**  
**auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc** **180**  
**acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uauuagauc** **229**  
 60

ES 2 502 915 T3

<210> 115  
 <211> 547  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (I)

<400> 115  
**gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcauauuc 60**  
**agaguauugg cccccgugua gguuauucuu gacagacagu ggagcuuauu cacucccagg 120**  
**auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180**  
**acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uauuagaucu cggauuacag 240**  
**cuggaaggag caggaguagu guucuugcuc uaaguaccga gugugcccaa uaccgauca 300**  
**gcuuauuaac gaacggcucc uccucuuaa cugcagcgua agugcggaau cuggggauca 360**  
**aauuacugac ugccuggauu acccucggac auauaaccuu guagcacgcu guugcuguau 420**  
**aggugaccaa cgcccacucg aguagaccag cucucuuaa cggacaau agaggaggcg 480**  
**cggucaaucu acuucuggcu aguuuagaau aggcugcacc gaccucuava aguagcgugu 540**  
 10 **ccucuag 547**

<210> 116  
 <211> 1083  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (I)

<400> 116

**gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcauauuc 60**  
**agaguauugg cccccgugua gguuuuucu gacagacagu ggagcuuuu cacucccagg 120**  
**auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180**  
**acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uuuuagauu cggauuacag 240**  
**cuggaaggag caggaguagu guucuugcuc uaaguaccga gugugcccaa uaccggauca 300**  
**gcuuuuuuac gaacggcucc uccucuuga cugcagcgu agugcggaau cuggggauca 360**  
**aauuacugac ugccuggauu acccucggac auauaacuu guagcacgcu guugcuguau 420**  
**aggugaccaa cgcccacucg aguagaccag cucucuagu ccggacaaug auaggaggcg 480**  
**cggucaauu acuucggcu aguuuagaau aggcugcacc gaccucuua aguagcgugu 540**  
**ccucuagagc uacgcagguu cgcauuuuuu gcguugauu gugugcauag aacagaccuc 600**  
**uuuuucggug aaacgccaga augcuuuuuu ccauuuacuc uucccauuu gcguacggcc 660**  
**gaagacgagc gcuuuuucug uguacguucu cgcacauuga agaucagcg ggcauggugg 720**  
**uagggcaaua ggggagcugg guagcagcga aaaagggcc cugcgcacgu agcuucgug 780**  
**uucgucugaa acaaccggc auccguugua gcgauccgu uaucaguguu auucuuguc 840**  
**gcacuaagau ucauggugua gucgacaaua acagcgucu ggagauuuu ggucacgugc 900**  
**ccuaucccg gguugugcc ucucaggugc acagcgauu uuuuagccuu caagguacuc 960**  
**gacgugggua ccgauucgug acacuuccu agauuuuucc acuguguuag ccccgaccg 1020**  
**ccgaccuuuu cugguccauu guauacgau ucgucagcug gaucgauuuu aaaagcuuga 1080**  
**auu 1083**

5 <210> 117  
 <211> 229  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (I)

10 <400> 117  
**gggagaaagc ucaagcuuuu ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguuuuuu 60**  
**uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucuaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg 120**  
**auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguuuuuuu cccuuuuuuu uuuuuuuuuu 180**  
**uuuuuaguua augcgucua ugaauccagc gaugaugcug gccagauc 229**

15 <210> 118  
 <211> 546  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (I)

20 <400> 118

gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu 60  
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucucaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg 120  
 auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguaaauu cccuuuuuuu uuuuuuuuuu 180  
 uuuuuaguua augcgucuac ugaauccagc gaugaugcug gccagaucu ucgaccacaa 240  
 gugcauauag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu 300  
 cugagacuuc gcuagagacu acaguuacag cugcaguagu aaccacugcg gcuauugcag 360  
 gaaaucccg uacagguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag 420  
 guggaguguc acugcucucg aggucucacg agagcgcucg auacaguccu uggagaauuc 480  
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugugcgacg aucacagaga acuucuaauc augcaggucu 540  
 gcucua 546

- 5 <210> 119
- <211> 1083
- <212> RNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia: Secuencia ejemplo de fórmula (I)

10 <400> 119  
 gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu 60  
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucucaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg 120  
 auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguaaauu cccuuuuuuu uuuuuuuuuu 180  
 uuuuuaguua augcgucuac ugaauccagc gaugaugcug gccagaucu ucgaccacaa 240  
 gugcauauag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu 300  
 cugagacuuc gcuagagacu acaguuacag cugcaguagu aaccacugcg gcuauugcag 360  
 gaaaucccg uacagguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag 420  
 guggaguguc acugcucucg aggucucacg agagcgcucg auacaguccu uggagaauuc 480  
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugugcgacg aucacagaga acuucuaauc augcaggucu 540  
 gcucuagaac gaacugaccu gacgccugaa cuuaugagcg ugcguauuuu uuuuuuuuuu 600  
 uuuuuuuuuc cuccaacaa augucgauca auagcugggc uguuggagac gcgucagcaa 660  
 augccguggc uccauaggac guguagacu cuauuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucccggg 720  
 accacaaaua auauucuugc uugguugggc gcaagggccc cguaucaggu cauaaacggg 780  
 uacauguugc acaggcuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucgcugagu uauuccgguc 840  
 ucaaaagacg gcagacguca gucgacaaca cggucuaaag cagugcuaca aucugccgug 900  
 uucguguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuguga accuacacgg cgugcacugu aguucgcaau 960  
 ucuaugggua ccggcucaga guuaugccuu gguugaaaac ugcccagcau acuuuuuuuu 1020  
 uuuuuuuuuu uucauauucc caugcuaagc aagggaucc gcgagucaug uuaagcuuga 1080  
 auu 1083

- 15 <210> 120
- <211> 1365
- <212> RNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 502 915 T3

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ARNm según la SEQ ID NO: 1, que tiene una longitud de 1.365 nucleótidos y está terminada en "CAP-GgOva(GC)-muag-A70-C30".

<400> 120

	<b>gggagaaagc uuaccauggg cagcaucggg gccgcgucga uggaguucug cuucgacgug</b>	<b>60</b>
	<b>uucaaggagc ugaaggucca ccacgccaac gagaacaucu ucuacugccc gaucgccauc</b>	<b>120</b>
	<b>augagcgcgc ucgccauggu guaccugggc gccaaggaca gcacccggac gcagaucaac</b>	<b>180</b>
	<b>aagguggucc gcuucgaca gcugcccggc uucggggacu cgaucgaggc gcagugcggc</b>	<b>240</b>
	<b>accagcguga acgugcacag cucgcuccgg gacaucuga accagaucaac caagccgaac</b>	<b>300</b>
	<b>gacgucuaca gcuucagccu ggccucgagg cucuacgccg aggagcgua cccgauccug</b>	<b>360</b>
	<b>cccgaguacc ugcagugcgu gaaggagcuc uaccggggcg ggcuggagcc gaucaacuuc</b>	<b>420</b>
	<b>cagacggcgg ccgaccaggc ccgggagcug aucaacagcu ggguggagag ccagaccaac</b>	<b>480</b>
	<b>ggcaucaucc gcaacguccu ccagccgucg agcguggaca gccagaccgc gauggugcug</b>	<b>540</b>
	<b>gucaacgcca ucguguucaa gggccugugg gagaagacgu ucaaggacga ggacacccag</b>	<b>600</b>
	<b>gccaugcccu uccgggugac cgagcaggag ucgaagccgg uccagaugau guaccagauc</b>	<b>660</b>
	<b>gggcucuucc ggguggcgag cauggccagc gagaaugauga agauccugga gcugccguuc</b>	<b>720</b>
	<b>gccucgggca cgauagcau gcucgugcug cugcccagcg aggucagcgg ccucgagcag</b>	<b>780</b>
	<b>cuggagucga ucaucaacu cgagaagcug accgagugga ccagcagcaa cgugauggag</b>	<b>840</b>
	<b>gagcgcaaga ucaaggugua ccucccgagg augaagaugg aggagaagua caaccugacg</b>	<b>900</b>
	<b>ucgguccuga uggcgauggg gaucaccgac guguucagca gcucggcca ccucagcggc</b>	<b>960</b>
	<b>aucagcucgg ccgagagccu gaagaucagc caggcggugc acgccgcca cgcggaugc</b>	<b>1020</b>
5	<b>aacgaggccg gccgggaggu cguggggucg gccgaggcgg gcguggacgc cgccagcugc</b>	<b>1080</b>
	<b>agcgaggagu uccgcgcgga ccaccgguuc cuguucugca ucaagcaca cgccaccaac</b>	<b>1140</b>
	<b>gccgugcucu ucuucggccg gugcgugucg cccugaccac uaguuuaaag acugacuagc</b>	<b>1200</b>
	<b>ccgaugggcc uccaacggg cccuccuccc cuccuugcac cgagauuaau aaaaaaaaaa</b>	<b>1260</b>
	<b>aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaauuucc</b>	<b>1320</b>
	<b>cccccccccc ccccccccc ccccccccuc uagacaauug gaauu</b>	<b>1365</b>

<210> 121

<211> 1816

10 <212> RNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ARNm según SEQ ID NO: 2, que tiene una longitud de 1.816 nucleótidos y está terminada "T7TS-Ppluc(wt)-A70"

15

<400> 121

ES 2 502 915 T3

gggagacaag cuuggcauuc cgguacuguu gguaaagcca ccauggaaga cgccaaaaac 60  
 auaaagaaag gcccggcgcc auucuauccg cuggaagaug gaaccgcugg agagcaacug 120  
 cauaaggcua ugaagagaua cgcccugguu ccuggaacia uugcuuuuac agaugcacau 180  
 aucgaggugg acaucacuua cgcugaguac uucgaaaugu ccguucgguu ggagagaagcu 240  
 augaaacgau augggcugaa uacaaaucac agaaucgucg uaugcaguga aaacucucu 300  
 caauucuuua ugccgguguu gggcgcguaa uuuauccggag uugcaguugc gcccgcgaac 360  
 gacauuuua augaacguga auugcucaac aguauaggca uuucgcagcc uaccguggug 420  
 uucguuucca aaaagggguu gcaaaaaau uugaacgucg aaaaaaagcu cccaaucauc 480  
 caaaaaauua uuaucaugga uucuaaaacg gauuaccagg gauuucaguc gauguacacg 540  
 uucgucacau cucaucuacc ucccgguuuu aaugaauacg auuuugugcc agaguccuuc 600  
 gauagggaca agacaauugc acugaucaug aacuccucug gaucuaucugg ucugccuaaa 660  
 ggugucgcuc ugccucauag aacugccugc gugagauucu cgcaugccag agauccuauu 720  
 uuuggcaauc aaaucauucc ggauacugcg auuuuaagug uuguuccauu ccaucacggu 780  
 uuuggaaugu uuacuacacu cggauuuuug auauguggau uucgagucgu cuuaauguau 840  
 agauuugaag aagagcuguu ucugaggagc cuucaggauu acaagauuca aagugcgcug 900  
 cuggugccaa ccuauucuc cuucucgcc aaaagcacuc ugauugacia auacgauuuu 960  
 ucuaauuuac acgaaauugc uucugguggc gcucuccucu cuaaggaagu cggggaagcg 1020  
 guugccaaga gguuccaucu gccagguauc aggcaaggau augggcucac ugagacuaca 1080  
 ucagcuauuc ugauuacacc cgagggggau gauaaaccgg gcgcggucgg uaaaguuguu 1140  
 ccuuuuuuug aagcgaaggu uguggaucug gauaccggga aaacgcuggg cguuaaucaa 1200  
 agaggcgaac ugugugugag agguccuau auuauugucc guuauguaaa caauccggaa 1260  
 gcgaccaacg ccuugauuga caaggauuga uggcuacauu cuggagacau agcuuacugg 1320  
 gacgaagacg aacacuucuu caucguugac cgccugaagu cucugauuaa guacaaaggc 1380  
 uaucaggugg cucccgcuga auuggaaucc aucuugcucc aacaccccaa caucuucgac 1440  
 gcaggugucg caggucuucc cgacgaugac gccggugaac uucccgccgc cguuguuguu 1500  
 uuggagcacg gaaagacgau gacggaaaaa gagaucgugg auuacgucgc cagucaagua 1560  
 acaaccgcga aaaaguugcg cggaggaguu guguuugugg acgaaguacc gaaaggucuu 1620  
 accgaaaaac ucgacgcaag aaaaaucaga gagauccuca uaaaggccaa gaagggcgga 1680  
 aagaucgccg uguaaauucia guaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aacugcaggu cgacucuaga ggauccccgg 1800  
 guaccgagcu cgaauu 1816

5 <210> 122  
 <211> 13  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: secuencia Kozak  
 10 <400> 122  
 gccgccacca ugg 13

- <210> 123  
 <211> 15  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia: secuencia generica de una secuencia estabilizante de fórmula general:  
 (C/U)CCANx-CCC(U/A)PyxUC(C/U)CC
- <220>  
 10 <221> variación  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> /reemplazo="citosina" /reemplazo="uracilo"
- <220>  
 15 <221> variación  
 <222> (5)..(5)  
 <223> /reemplazo="citosina" /reemplazo="uracilo" /reemplazo="guanósina" /reemplazo="adenósina", o cualquier otro ácido nucleico
- <220>  
 20 <221> unidad de repetición  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> x = cualquier número
- <220>  
 25 <221> variación  
 <222> (9)..(9)  
 <223> /reemplazo="uracilo" /reemplazo="adenósina"
- <220>  
 30 <221> variación  
 <222> (10)..(10)  
 <223> /reemplazo="pirimidina"
- <220>  
 35 <221> unidad de repetición  
 <222> (10)..(10)  
 <223> x = cualquier número
- <220>  
 40 <221> variación  
 <222> (13)..(13)  
 <223> /reemplazo="citosina" /reemplazo="uracilo"
- <400> 123  
 nccanccnn ucnc 15
- <210> 124  
 <211> 1902  
 50 <212> RNA  
 <213> virus de la gripe  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de ARNm que codifica el antígeno patogénico hemaglutinina (HA) del virus de la
- 55 <400> 124

ES 2 502 915 T3

gggagaaagc uuaccaugaa ggccaaccug cucgugcugc ugugcgcccu cgcggccgcc	60
gacgccgaca ccaucugcau cggcuaccac gccacaaca gcaccgacac ggucgacacc	120
gugcuggaga agaacgugac cgucaccac uccgugaacc ugcucgagga cagccacaac	180
gggaagcugu gccggcugaa gggcaucgcg ccccuccagc uggggaagug caaucugcc	240
ggcuggcugc ucgggaacct ggagugcgac cccugcugc ccgugcguc cuggagcuac	300
aucgucgaga cgcccaacuc cgagaacggc aucugcuacc cgggcgacuu caucgacuac	360
gaggagcucc gggagcagcu gagcuccgug agcuccuucg agcgcuuca gaucuuuccc	420
aaggagagcu ccuggcccaa ccacaacacc aacgggguga ccgccgccug cagccacgag	480
ggcaagucca gcuucuaccg gaaccugcuc uggcugaccg agaaggaggg guccuacccc	540
aagcugaaga acagcuacgu caacaagaag ggcaaggagg ugcucgugcu gugggggaur	600
caccacccgc ccaacuccaa ggagcagcag aaccuguacc agaacgagaa cgcgucguc	660
agcuggguga cguccaacia caaccgccg uucacccccg agaucgccga gcgccccaa	720
guccgggacc aggccggccg caugaacuac uacuggacc uccugaagcc gggcgacacc	780
aucaucuucg aggccaacgg gaaccugauc gccccgaugu acgcguucgc ccucagccgg	840
ggcuucggga gcggcaucau cacguccaac gccagcaugc acgagugcaa caccaagugc	900
cagaccccc ugggcgccau caacuccagc cugcccuacc agaacaucca cccggugacc	960
aucggggagu gcccgaagua cgugcgucucc gccaaugcucc ggauggucac gggccugcg	1020
aaacaaccca gcauccaguc ccgggggucg uucggcgca ucgcccggguu caucgagggc	1080
ggcuggaccg ggauaugca cggcugguac ggguaaccacc accagaacga gcagggcagc	1140
ggguacgccg ccgaccagaa guccaccag aacgccauca acggcaucac caacaaggug	1200
aacacgguga ucgagaagau gaacauccag uucaccgcgg ucggcaagga guucaacaag	1260
cucgagaagc gcauggagaa ccugaacaag aagguggacg acggguuccu ggacaucugg	1320
accuacaacg ccgagcuccu ggugcugcuc gagaacgagc ggaccucgga cuuccacgac	1380
agcaacguca agaaccugua cgagaaggug aagucccagc ucaagaacaa cgccaaggag	1440
aucggcaacg ggugcuucga guucuaccac aagugcgaca acgagugcau ggagagcugc	1500
cgcaacggca cguacgacua cccaaguac uccgaggaga gcaagcugaa cggggagaag	1560
guggacgggg ugaagcugga guccaugggc aucuaccaga uccucgccau cuacagcacc	1620
gucgccucca gccuggugcu gcuggugucc cucggcgca ucagcuucug gaugugcagc	1680
aacggguccc ugcagugccg caucugcauc ugaccacuag uuauaagacu gacuagcccg	1740
augggccucc caacgggccc uccucccuc cuugcaccga gauuaauaaa aaaaaaaaaa	1800
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa auauuccccc	1860
cccccccccc ccccccccc ccccucuag acaauuggaa uu	1902

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunoestimuladora que comprende
  - a) un componente adyuvante, que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejo con un compuesto policatiónico que es un péptido o proteína policatiónico, como un primer componente, y
  - 5 b) al menos un ARNm libre que codifica para al menos un antígeno, como un segundo componente, donde la composición inmunoestimuladora es capaz de provocar o incrementar una respuesta inmune innata en un mamífero y donde la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante a) y el al menos un ARNm libre del segundo componente b) está en el rango de 0,1:1 a 1:0,01.
- 10 2. Composición inmunoestimuladora según la reivindicación 1, caracterizada porque el al menos un ARN(m) del componente adyuvante se selecciona de un oligonucleótido de ARN corto, un ARN de codificación, incluyendo un ARNm, un ARN inmunoestimulador, un ARNsi, un ARN antisentido, o ribo-interruptores, ribozimas o aptámeros.
3. Composición inmunoestimuladora según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque el al menos un ARN(m) del componente adyuvante es un ARNm.
- 15 4. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque el al menos un ARNm libre y el al menos un ARN(m) del componente adyuvante son idénticos entre sí.
5. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque el al menos un ARNm libre y el al menos un ARN(m) del componente adyuvante son diferentes uno del otro.
- 20 6. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la relación N/P en el componente adyuvante está en el rango de 0,5-2, preferentemente de 0,7-2 y en especial de 0,7-1,5.
7. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente b) puede seleccionarse de una relación molar de aproximadamente 1:1.
- 25 8. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el al menos un ARNm libre y/o el al menos un ARN(m) del componente adyuvante están estabilizados con GC.
9. Composición inmunoestimuladora según la reivindicación 8, caracterizada porque el contenido en G/C de la región de codificación del ARN estabilizado con GC incremento en comparación con el contenido en G/C de la región de codificación del ARN nativo, no estando alterada la secuencia de aminoácidos codificada del ARN(m) modificado estabilizado con GC en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARN(m) modificado nativo.
- 30 10. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el compuesto policatiónico se selecciona de protamina, nucleolina, espermina o espermidina, poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, poli-arginina, péptidos de penetración celular (CPPs), CPPs quiméricos, incluyendo Transportan o péptidos MPG, péptidos de unión a VIH, Tat, HIV-1 Tat (HIV), péptidos derivados de Tat, oligoargininas, miembros de la familia penetratina, incluyendo Penetratina, péptidos derivados de Antennapedia (de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, CPPs derivados antimicrobianos, incluyendo buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, KALA, PpTG20, péptidos ricos en prolina, L-oligómeros, péptidos ricos en arginina, péptidos de calcitonina, FGF, lactoferrina, poli-L-lisina, poli-arginina, histonas, péptidos derivados o análogos de VP22, HSV, VP22 (herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas incluyendo PTDs, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1 y péptidos de calcitonina, o de proteínas o péptidos que tienen la siguiente fórmula total: (Arg)<sub>i</sub>; (Lys)<sub>m</sub>; (His)<sub>n</sub>; (Orn)<sub>o</sub>; (Xaa)<sub>x</sub>, donde  $l + m + n + o + x = 8-15$ , y l, m, n u o, independientemente unos de otros, pueden ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, siempre que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y donde Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= de origen natural) o no nativos excepto de Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 siempre y cuando el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; o de oligoargininas, incluyendo Arg<sub>7</sub>, Arg<sub>8</sub>, Arg<sub>9</sub>, Arg<sub>7</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>, R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, YSSR<sub>9</sub>SSY, (RKH)<sub>4</sub>, Y(RKH)<sub>2</sub>R; o de poliaminoácidos, incluyendo β-aminoácido-polímeros o poliamidas inversas
- 45 11. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque el al menos un ARN libre codifica para un antígeno se selecciona de antígenos tumorales, incluyendo 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa5beta1-integrina, alfa5beta6-integrina, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, B7H4, BAGE-1, BCL-2, BING-4, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA 72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA, CLCA2, CML28, proteína igual a Coactosina, colágeno XIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10/MAGE-B1, DAM-6/MAGE-B2, EGFR/Her1,
- 55

- EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, EZH2, FGF-5, FN, Fra-1, G250/CAIX, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu/ErbB2, HERV-K-MEL, HNE, homoeobox NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmaduro, calicreína 2, calicreína 4, Ki67, KIAA0205, KK-LC-1, KM-HN-1, LAGE-1, Livin, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B65, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamaglobina A, MART-1/Melan-A, MART-2, proteína de matriz 22, MC1R, M-CSF, mesotelina, MG50/PXDN, MMP 11, MN/CA IX-antígeno, MRP-3, MUC1, MUC2, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, NGEP, NMP22, NPM/ALK, NSE, NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1, OFA-Ilrp, OGT, OS-9, osteocalcina, osteopontina, P15, P15, P190 menor BCR-ABL, P53, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PAP, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-quinasa, Pin1, POTE, PRAME, prosteína, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, RAGE-1, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP, survivina, survivina-2B, TA-90, TAG-72, TARP, TGFb, TGFbRII, TGM-4, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, tirosinasa, UPA, VEGF, VEGFR-2/FLK-1, WT1; o se selecciona de antígenos mutados expresados en enfermedades cancerosas, incluyendo alfa-actinina-4/m, ARTC1/m, bcr/abl, beta-catenina/m, BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN, EFTUD2/m, ELF2/m, ETV6-AML1, FN1/m, GPNMB/m, HLA-A\*0201-R1701, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M, KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT, MART2/m, ME1/m, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, clase miosina I/m, neo-PAP/m, NFYC/m, N-Rsas/M, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa, PRDX5/m, PTPRK/m, RBAF600/m, SIRT2/m, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TEL-AML1, TGFbRII, TPI/m.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
12. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque el al menos un ARNm libre codifica para:
- a) al uno, dos, tres o cuatro antígenos (diferentes) del siguiente grupo de antígenos:
- PSA (Antígeno Específico de Próstata) = KLK3 (calicreína-3),
  - PSMA (Antígeno de Membrana Específico de Próstata),
  - PSCA (Antígeno de Células Madre de Próstata),
  - STEAP (Antígeno Epitelial de Seis Transmembranas de la Próstata),
- o
- b) al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce antígenos (diferentes) del siguiente grupo de antígenos:
- hTERT,
  - WT1,
  - MAGE-A2,
  - 5T4,
  - MAGE-A3,
  - MUC1,
  - Her-2/neu,
  - NY-ESO-1,
  - CEA,
  - Survivina,
  - MAGE-C1, y/o
  - MAGE-C2,
- donde cualquier combinación de estos antígenos es posible.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
13. Composición farmacéutica que comprende un componente adyuvante, el cual comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejo con un compuesto policatiónico, que es un péptido o proteína policatiónico, como un primer componente, y al menos un ARNm libre que codifica para al menos un antígeno, como un segundo componente,
- donde la composición inmunoestimuladora es capaz de desarrollar o mejorar una respuesta inmune innata y adaptativa en un mamífero, y donde la composición inmunoestimuladora se prepara por un método que comprende los siguientes pasos:
- a) preparar un componente adyuvante que comprende o consiste en el al menos un ARN(m) complejo con un compuesto policatiónico que es un péptido o proteína policatiónico, mezclando el al menos un ARN(m) con el compuesto catiónico o policatiónico, que es un péptido o proteína policatiónico, de forma que la relación N/P en el componente adyuvante esté en el rango de 0,3-4; y

- b) preparar la composición inmunoestimuladora añadiendo el al menos un ARNm libre en una proporción específica al componente adyuvante preparado de acuerdo con la etapa a), de forma que la relación molar entre el ARN(m) del componente adyuvante y el al menos un ARNm libre del segundo componente esté en el rango de 0,1:1 a 1:0,01.
- 5 14. Composición farmacéutica que comprende una composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y opcionalmente un portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, caracterizada porque la composición farmacéutica es una vacuna.
- 10 16. Método para preparar una composición inmunoestimuladora según se define de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las siguientes etapas:
- a) preparar un componente adyuvante que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con un compuesto policatiónico, que es un péptido o proteína policatiónico, mezclando en una relación específica el al menos un ARN(m) y un compuesto policatiónico como el definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; y
- 15 b) preparar la composición inmunoestimuladora de la invención añadiendo en una relación específica al menos un ARNm libre como el definido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 al componente adyuvante preparado de acuerdo con la etapa a), donde el al menos un ARNm libre codifica para al menos un antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 20 17. Uso de una composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o de un componente adyuvante que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con un compuesto policatiónico, que es un péptido o proteína policatiónico, y al menos un ARNm libre, donde el al menos un ARNm libre codifica para al menos un antígeno, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis, tratamiento y/o reducción de cualquiera de las enfermedades y trastornos seleccionados de cánceres o enfermedades tumorales, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas, incluyendo enfermedades infecciosas virales, bacterianas o protozoológicas, o alergia o enfermedades alérgicas.
- 25 18. Kit que comprende la composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y/o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, y opcionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosis de la composición inmunoestimuladora y/o de la composición farmacéutica.
- 30 19. Composición inmunoestimuladora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en la profilaxis, tratamiento y/o reducción de una enfermedad, que comprende
- a) un componente adyuvante, que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con un compuesto policatiónico que es un péptido o proteína policatiónico, como un primer componente, y
- 35 b) al menos un ARNm libre que codifica para al menos un antígeno, como un segundo componente, donde la composición inmunoestimuladora es capaz de provocar o incrementar una respuesta inmune innata u opcionalmente una respuesta inmune adaptativa en un mamífero y donde el uso comprende administrar la composición a un paciente que la necesita en una cantidad segura y efectiva.

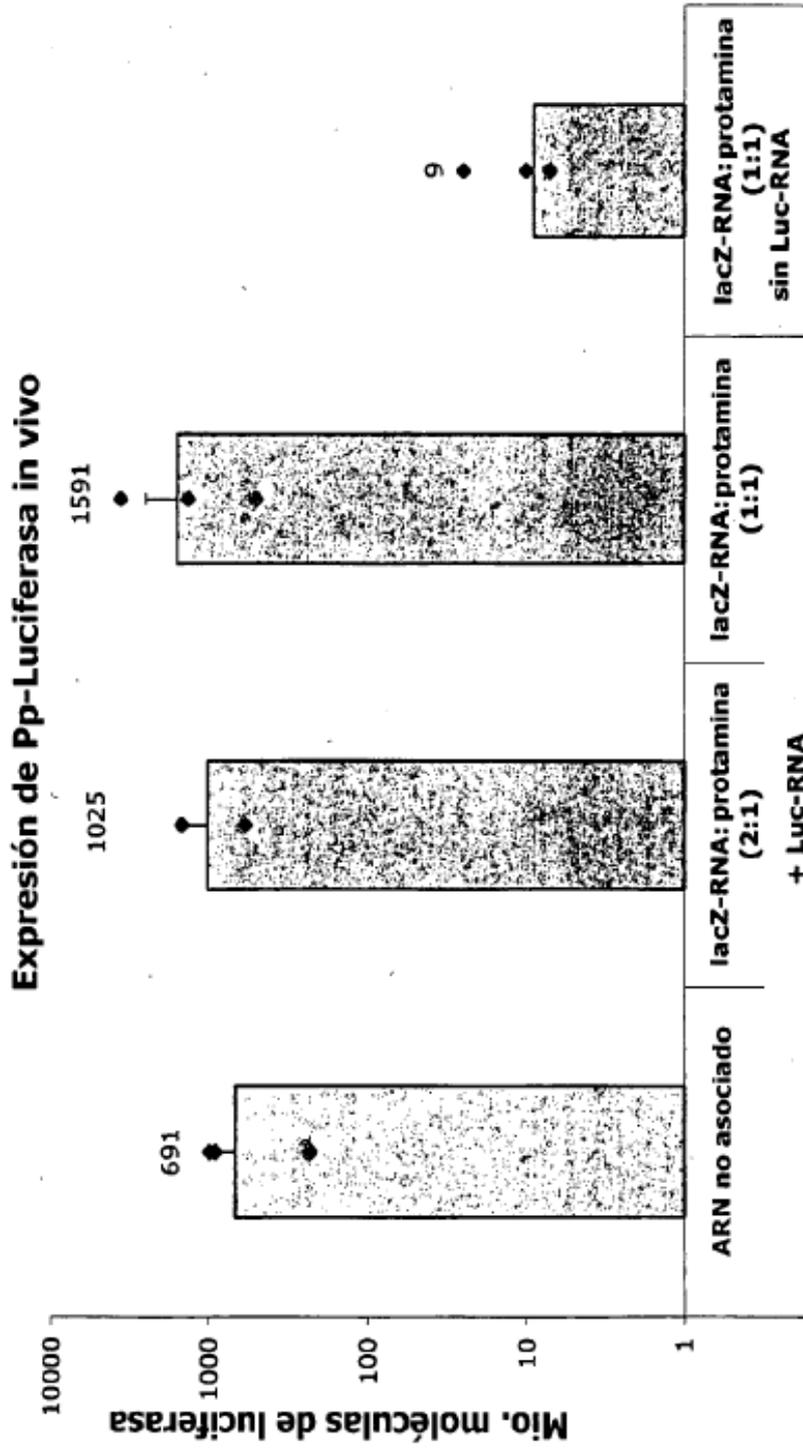
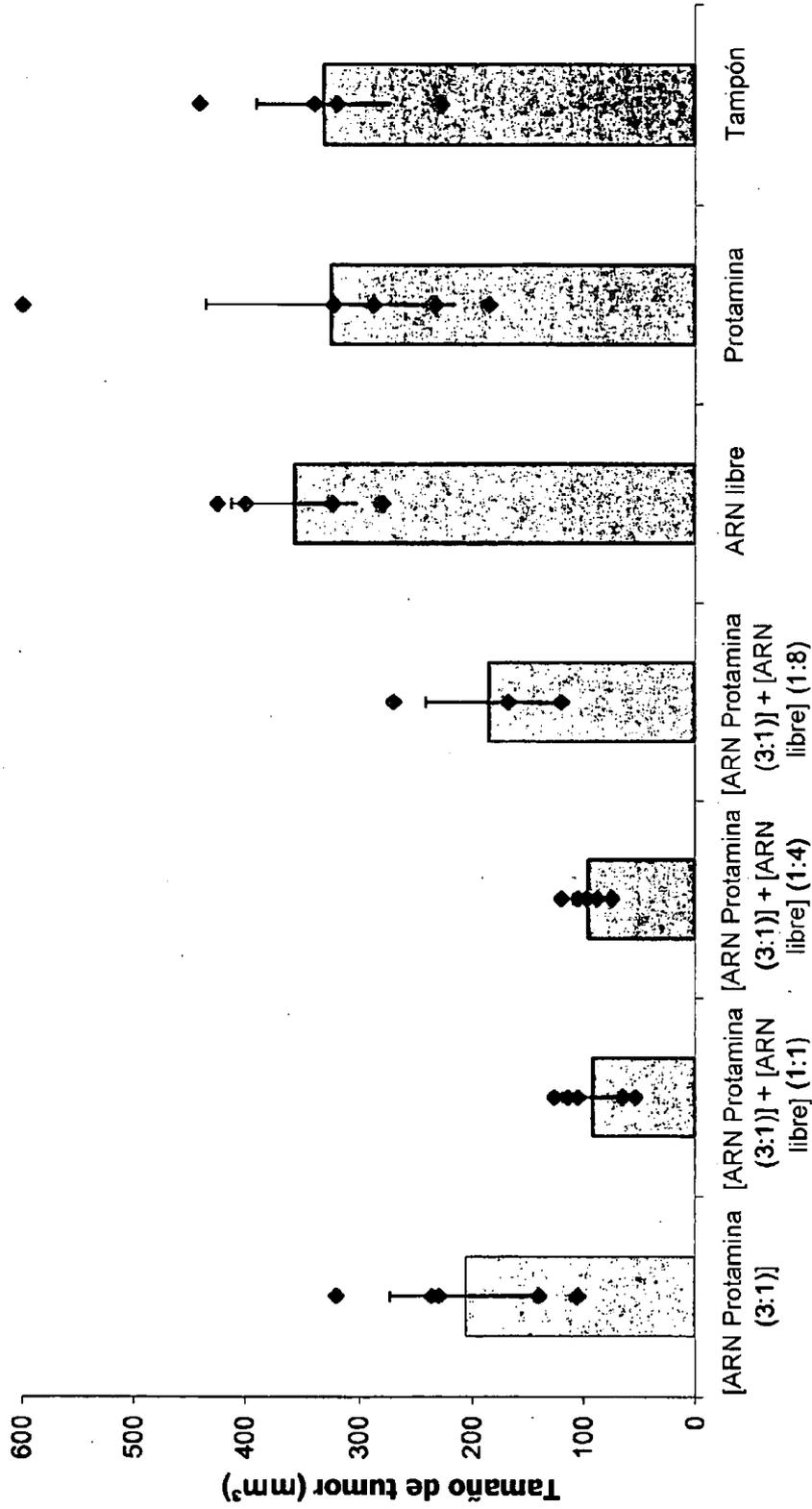
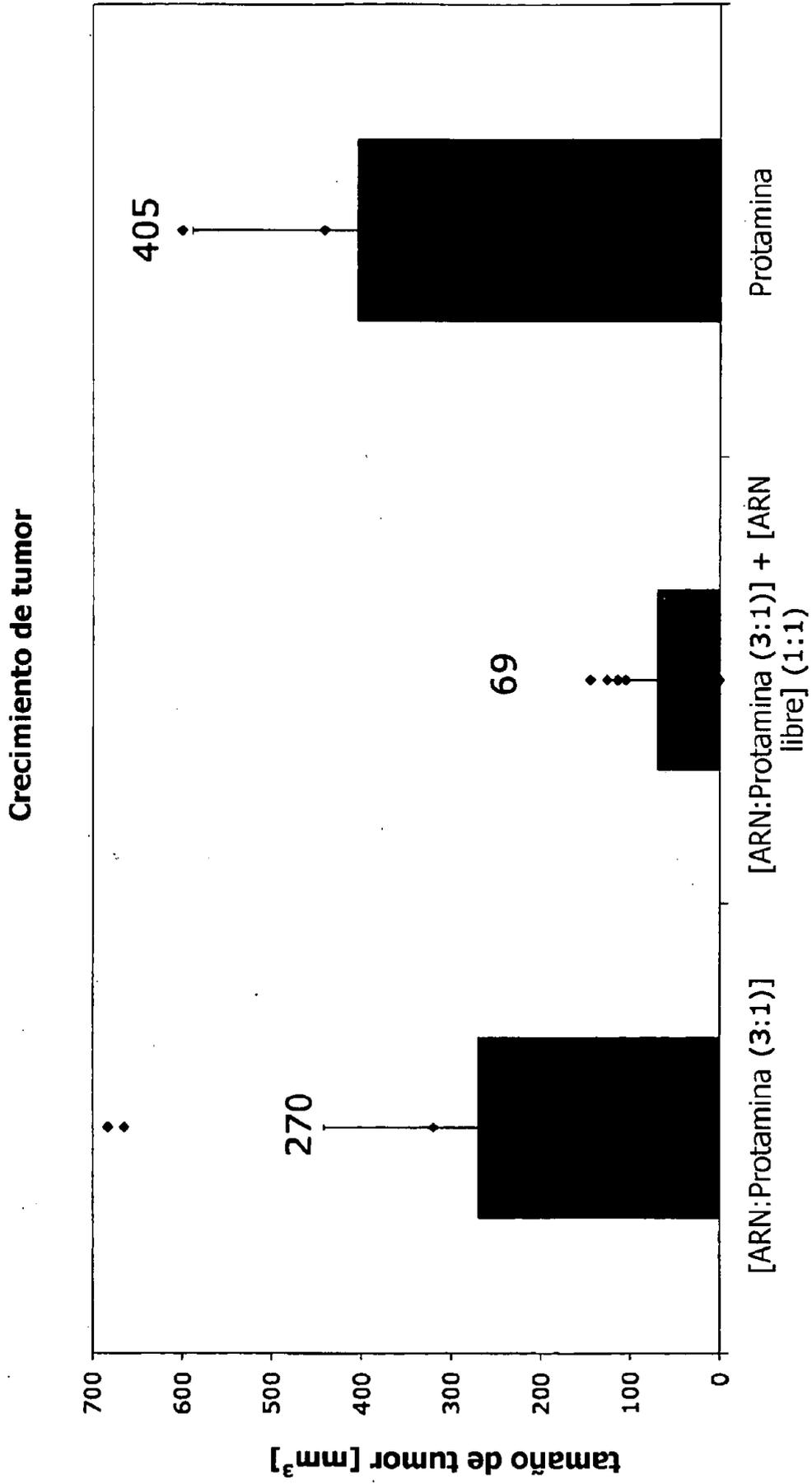


Figura 1

**Crecimiento de tumor**



**Figura 2**



**Figura 3**

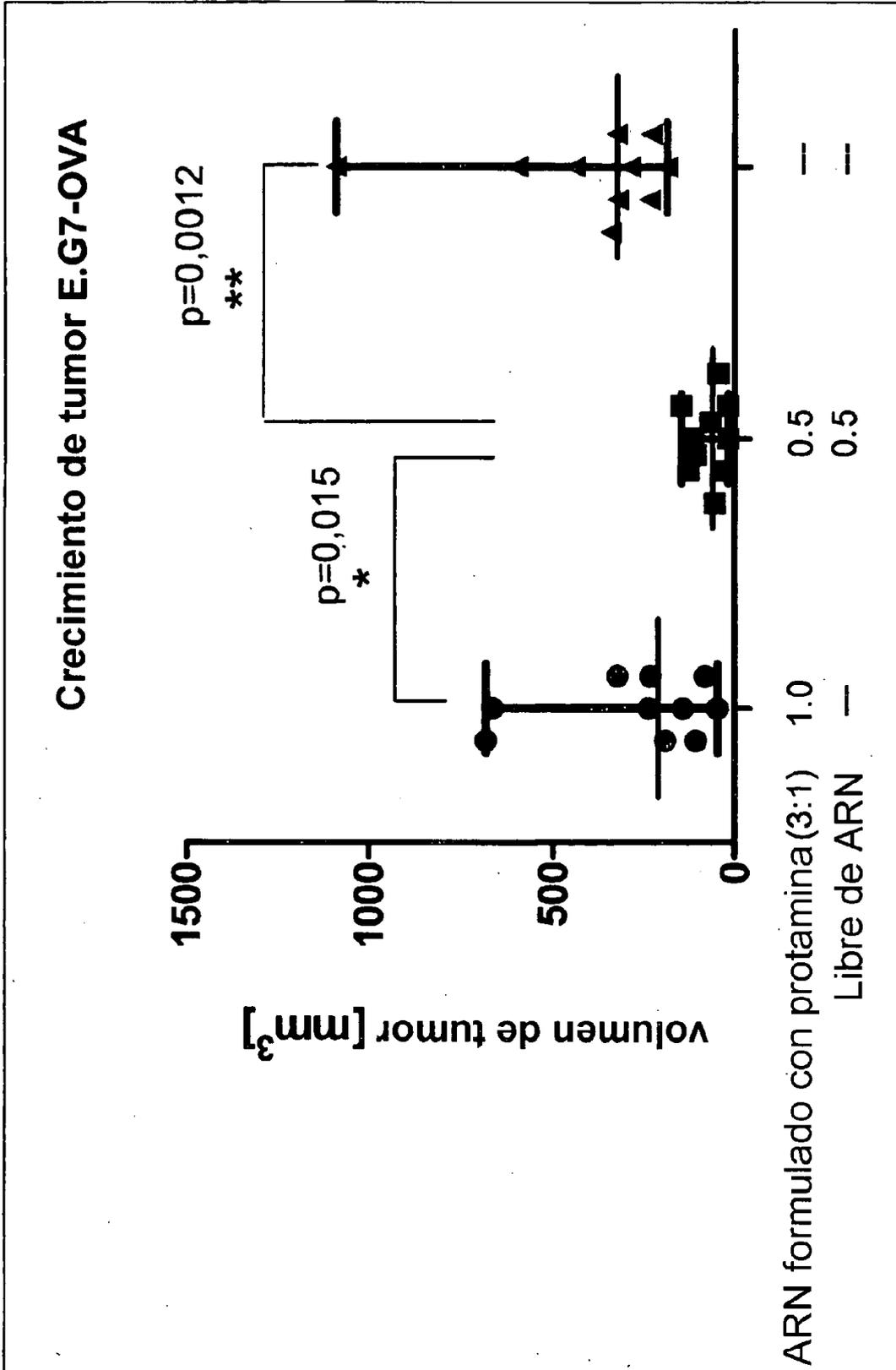


Figura 4

### Inmunoestimulación

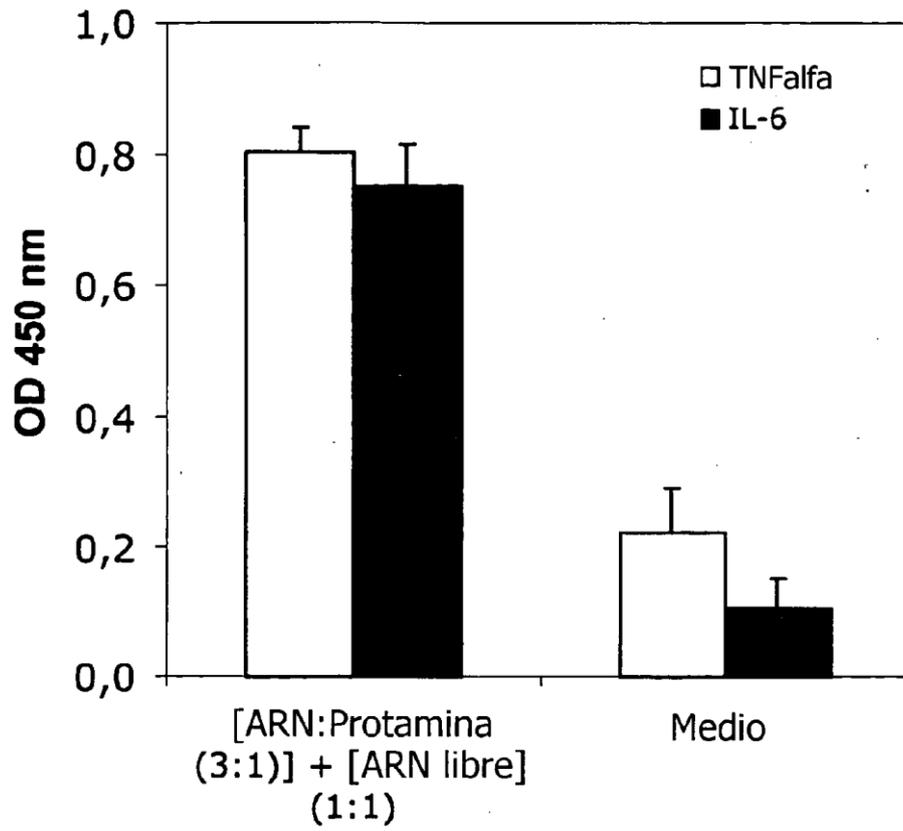


Figura 5

### Anticuerpos IgG2a específicos de OVA

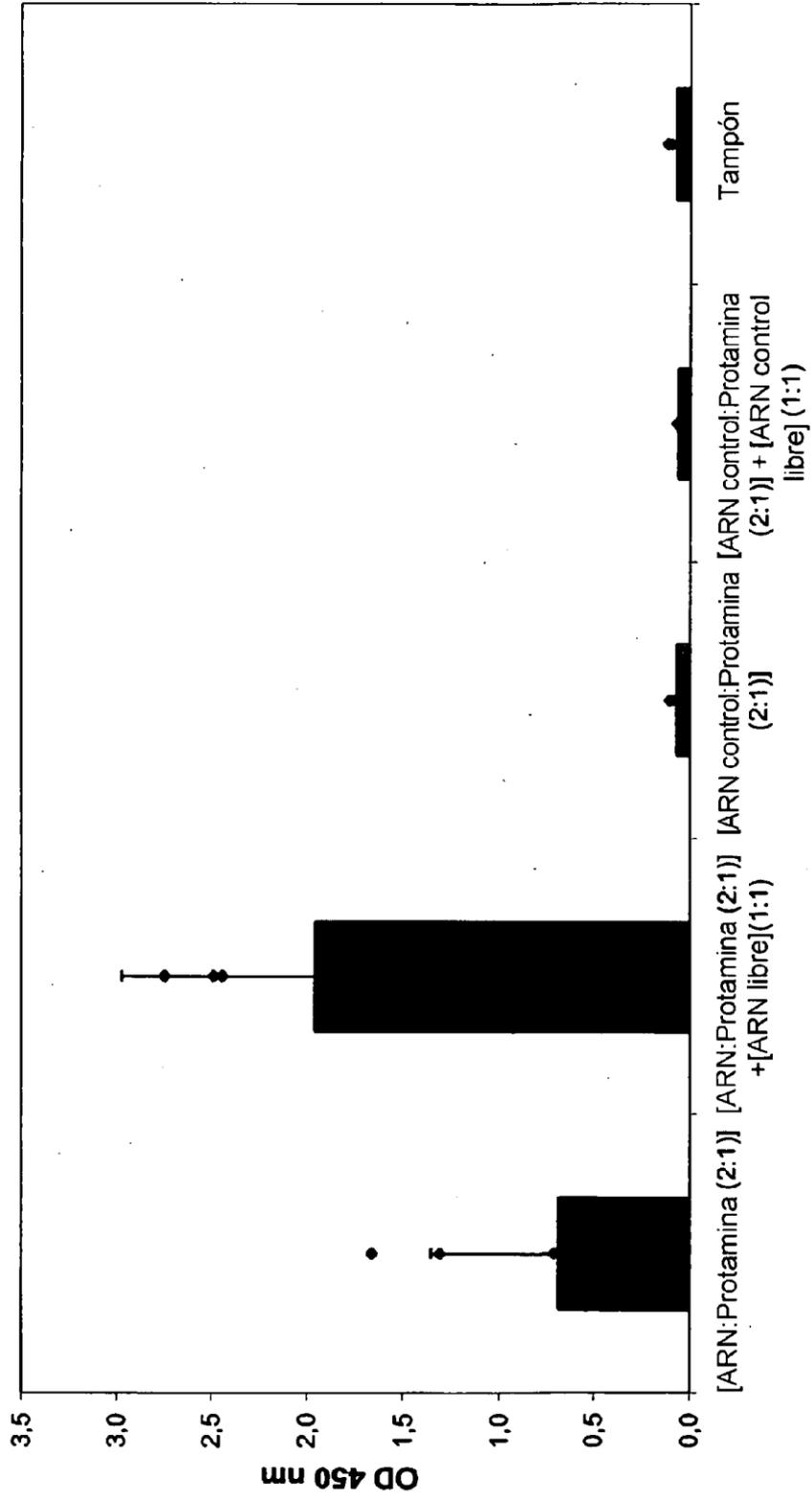


Figura 6

ES 2 502 915 T3

1 GGGAGAAAGC UUACCAUGGG CAGCAUCGGG GCCGCGUCGA UGGAGUUCUG  
 51 CUUCGACGUG UUCAAGGAGC UGAAGGUCCA CCACGCCAAC GAGAACAUCU  
 101 UCUACUGCCC GAUCGCCAUC AUGAGCGCGC UCGCCAUGGU GUACCUGGGC  
 151 GCCAAGGACA GCACCCGGAC GCAGAUCAAC AAGGUGGUCC GCUUCGACAA  
 201 GCUGCCCGGC UUCGGGGACU CGAUCGAGGC GCAGUGCGGC ACCAGCGUGA  
 251 ACGUGCACAG CUCGCUCCGG GACAUCUGA ACCAGAUCAC CAAGCCGAAC  
 301 GACGUCUACA GCUUCAGCCU GGCCUCGCGG CUCUACGCCG AGGAGCGCUA  
 351 CCCGAUCCUG CCCGAGUACC UGCAGUGCGU GAAGGAGCUC UACCGGGGGC  
 401 GGCUGGAGCC GAUCAACUUC CAGACGGCGG CCGACCAGGC CCGGGAGCUG  
 451 AUCAACAGCU GGGUGGAGAG CCAGACCAAC GGCAUCAUCC GCAACGUCCU  
 501 CCAGCCGUCG AGCGUGGACA GCCAGACCGC GAUGGUGCUG GUCAACGCCA  
 551 UCGUGUCAA GGGCCUGUGG GAGAAGACGU UCAAGGACGA GGACACCCAG  
 601 GCCAUGCCCU UCCGGGUGAC CGAGCAGGAG UCGAAGCCGG UCCAGAUGAU  
 651 GUACCAGAUU GGGCUCUUC GGGUGGCGAG CAUGGCCAGC GAGAAGAUGA  
 701 AGAUCCUGGA GCUGCCGUUC GCCUCGGGCA CGAUGAGCAU GCUCGUGCUG  
 751 CUGCCCGACG AGGUCAGCGG CCUCGAGCAG CUGGAGUCGA UCAUCAACUU  
 801 CGAGAAGCUG ACCGAGUGGA CCAGCAGCAA CGUGAUGGAG GAGCGCAAGA  
 851 UCAAGGUGUA CCUCCCGCGG AUGAAGAUGG AGGAGAAGUA CAACCUGACG  
 901 UCGGUCCUGA UGGCGAUGGG GAUCACCGAC GUGUUCAGCA GCUCGGCCAA  
 951 CCUCAGCGGC AUCAGCUCGG CCGAGAGCCU GAAGAUCAGC CAGGCGGUGC  
 1001 ACGCCGCCCA CGCGGAGAUC AACGAGGCCG GCCGGGAGGU CGUGGGGUGC  
 1051 GCCGAGGCGG GCGUGGACGC CGCCAGCGUC AGCGAGGAGU UCCGCGCGGA  
 1101 CCACCCGUUC CUGUUCUGCA UCAAGCACAU CGCCACCAAC GCCGUGCUCU  
 1151 UCUUCGGCCG GUGCGUGUCG CCCUGACCAC UAGUUAUAAG ACUGACUAGC  
 1201 CGGAUGGGCC UCCCAACGGG CCCUCCUCC CUCCUUGCAC CGAGAUUAAU  
 1251 AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
 1301 AAAAAAAAA AAAAUUUUC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC  
 1351 UAGACAAUUG GAAUU

Figura 7

GGGAGACAAGCUUGGCAUUCGGUACUGUUGGUAAGCCACCAUGGAAGACGCCAAAAACAU  
AAAGAAAGGCCCGCGCCAUUCUUCGCGUGGAAGAUGGAACCGCUGGAGAGCAACUGCAUA  
AGGCUAUGAAGAGAUACGCCUGGUUCCUGGAACAAUUGCUUUUACAGAUGCACAUUCGAG  
GUGGACAUCACUUACGCGUGAGUACUUCGAAAUGUCCGUUCCGUUUGGCAGAAGCUAUGAAACG  
AUAUGGGCUGAAUACAAAUCACAGAAUCGUCGUAUGCAGUGAAAACUCUCUUCAAUUCUUUA  
UGCCGGUGUUGGGCGCGUUAUUUAUCGGAGUUGCAGUUGCGCCCGCGAACGACAUUUUAAA  
GAACGUGAAUUGCVCAACAGUAUGGGCAUUUCGCAGCCUACCGUGGUGUUCGUUUCAAAAA  
GGGGUUGCAAAAAUUUUGAACGUGCAAAAAAGCUCCCAAUCAUCCAAAAAAUUUUUAUCA  
UGGAUUCUAAAACGGAUUACCAGGGAUUUCAGUCGAUGUACACGUUCGUCACAUUCUAUCUA  
CCUCCCGUUUUAAUGAAUACGAUUUUGGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAGACAAUUGC  
ACUGAUCAUGAACUCCUCUGGAUCUACUGGUCUGCCUAAAGGUGUCGUCUCUGCCUCAAGAA  
CUGCCUGCGUGAGAUUCUCGCAUGCCAGAGAUCCUAAUUUUUGGCAAUCAAAUCAUUCGGAU  
ACUGCGAUUUUAAGUGUUGUUCUUCUACACGGUUUUGGAAUGUUUACUACACUCGGAU  
UUUGAUUGUGGAUUUCGAGUCGUUUAAUGUAUAGAUUUUGAAGAAGAGCUGUUUCUGAGGA  
GCCUUCAGGAUUAACAAGAUUCAAGUGCGCUGCUGGGGCCAACCCUAAUUCUCCUUCUUCGCC  
AAAAGCACUCUGAUUGACAAAUACGAUUUAUCUAAUUUACACGAAAUUGCUUCUGGGGGCGC  
UCCCCUCUCUAAAGGAAGUCGGGGAAAGCGGUUGCCAAGAGGUUCCAUCUGCCAGGUUACAGGC  
AAGGAUUGGGCUCACUGAGACUACAUACAGCUAUUCUGAUUACACCCGAGGGGGGAUGAUAAA  
CCGGGCGCGGUCGGUAAAGUUGUUCUAAUUUUUGAAGCGAAGGUUGUGGAUCUGGAUACCGG  
GAAAACGCUUGGGCGUAAUCAAGAGGGCGAACUGUGUGUGAGAGGUCCUUAUGAUUAUGUCCG  
GUUAUGUAAACAAUCCGGAAGCGACCAACGCCUUGAUUGACAAGGAUGGAUGGCUACAUCU  
GGAGACAUAGCUUACUGGGACGAAGACGAACACUUCUUCUUCUUCGUGACCGCCUGAAGUCUCU  
GAUUAAGUACAAAGGCUAUCAGGUGGCUCGCGUGAAUUGGAAUCCAUCUUGCUCCAACACC  
CCAACAUUCUUCGACGCAGGUGUCGAGGUCUUCGCGACGAUGACGCGGUGAACUUCGCGC  
GCCGUUGUUGUUUGGAGCACGGAAAGACGAUGACGGAAAAAGAGAUUGGGAUUACGUCGC  
CAGUCAAGUAACAACCGCGAAAAAGUUGCGCGGAGGAGUUGUUGUUGUGGACGAAGUACCGA  
AAGGUCUUAACGGAAAAUCGACGCAAGAAAAAUCAGAGAGAUCCUCAUAAAGGCCAAGAAG  
GGCGAAAGAUCCCGUGUAAUUCUAGUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAUCGCAGGUCGACUCUAGAGGAUCCCC  
GGUACCGAGCUCGAAU

Figura 8

### Expresión de Pp Luciferasa in vivo

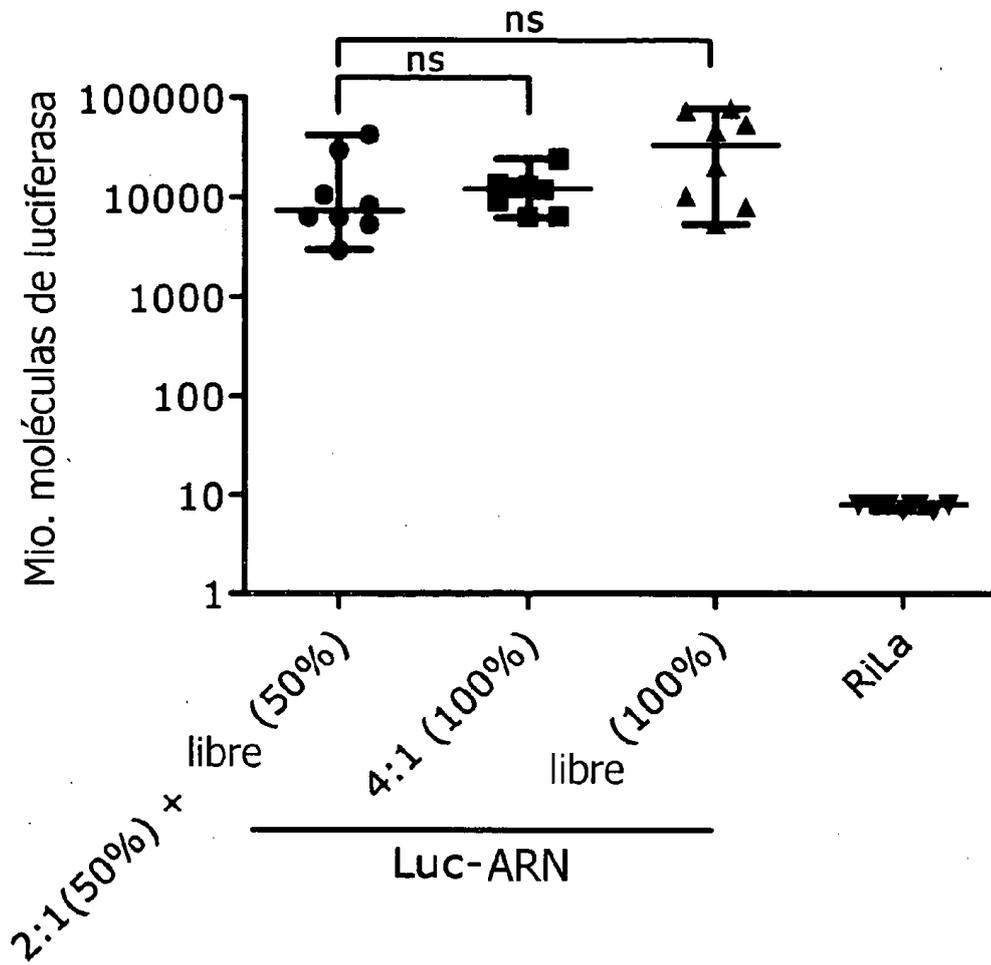


Figura 9

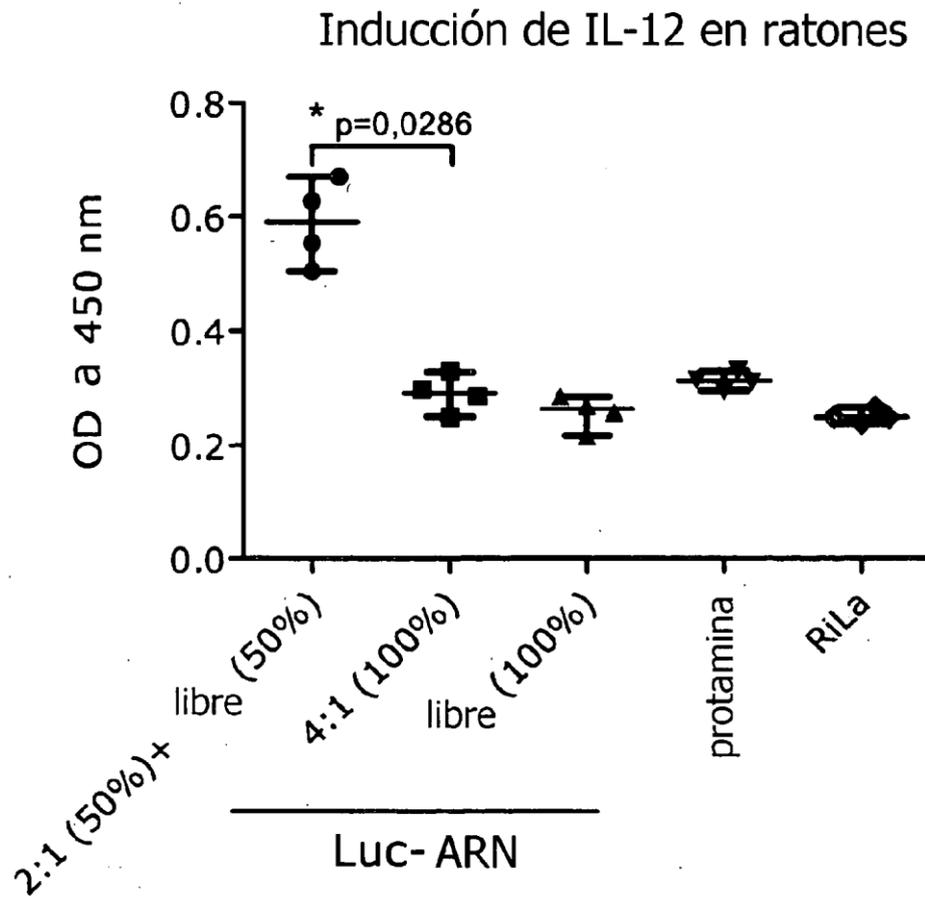


Figura 10

anticuerpos anti-HA (IgG2a)

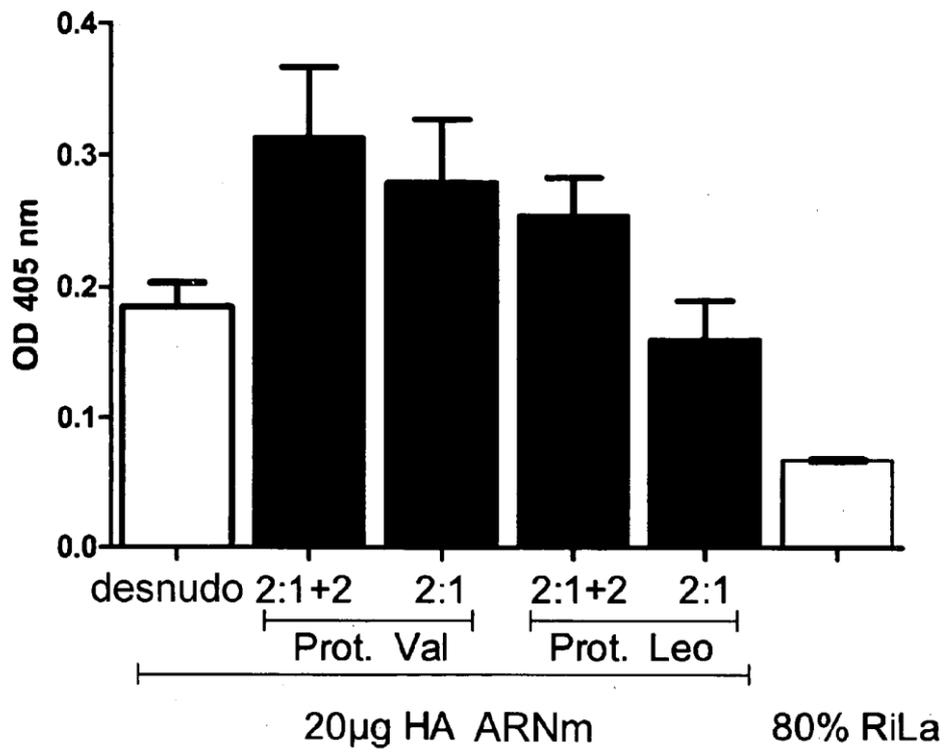
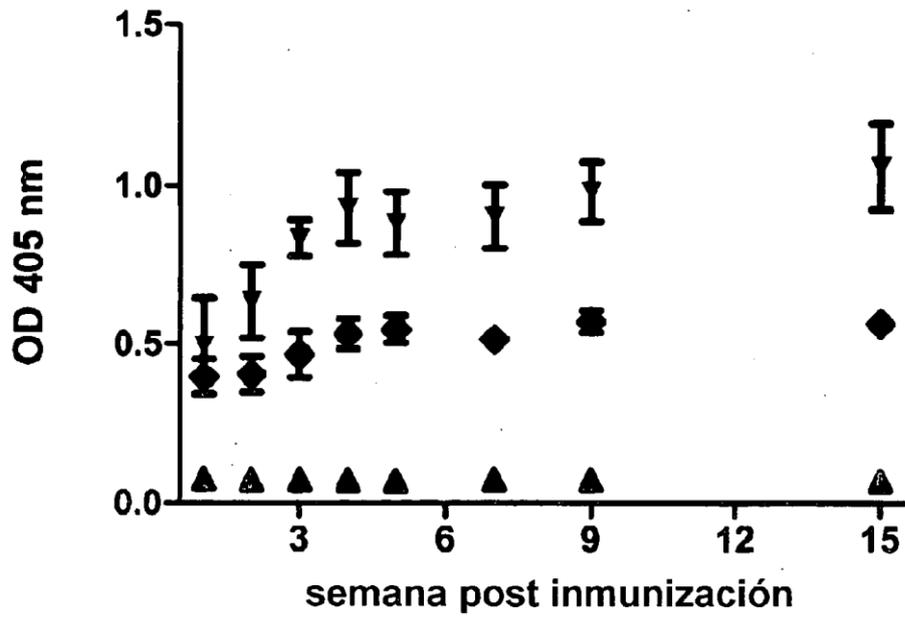


Figura 11

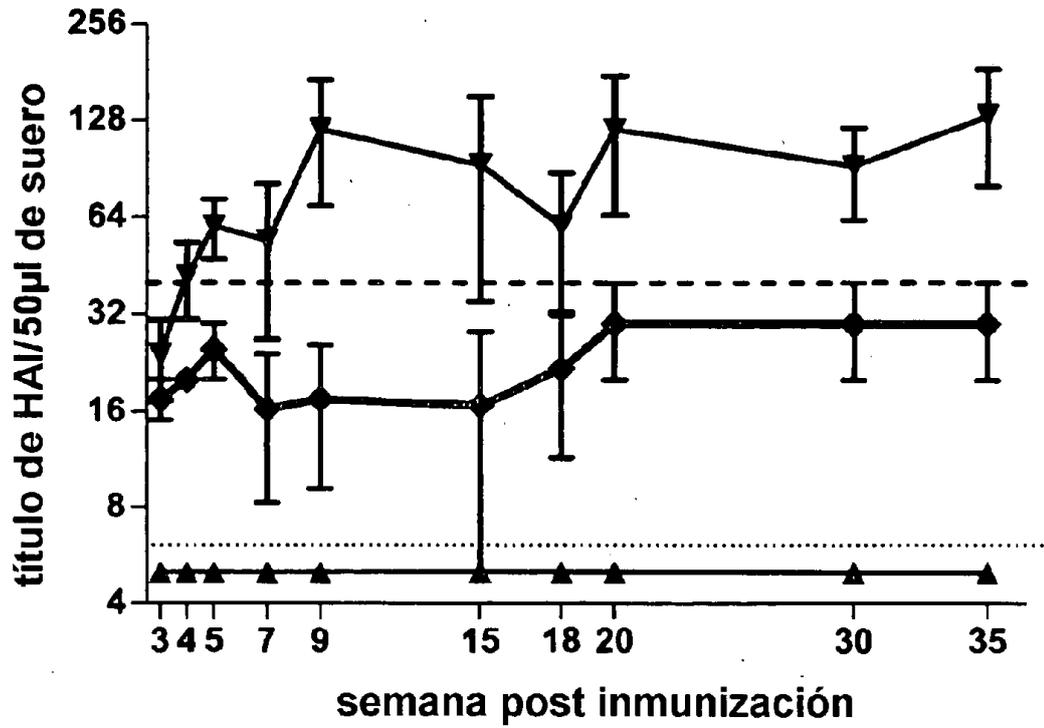
anticuerpos anti-HA (IgG2a)



- ▼ HA ARNm asociado; ARN:Protamina 2:1 + ARN libre (1:1)
- ◆ HA ARNm desnudo
- ▲ 80% RiLa

Figura 12

### Cinética de título de HAI



- ▼ HA ARNm asociado; ARN:Protamina 2:1 + ARN libre (1:1)
- ◆ HA ARNm desnudo
- ▲ 80% RiLa

Figura 13

GGGAGAAAGCUUACCAUGAAGGCCAACCCUGCUCGUGCUGCUGUGCGC  
 CCUCGCGGCCGCGCCGACGCCGACACCAUCUGCAUCGGCUACCACGCCA  
 ACAACAGCACCCGACACGGUCGACACCCGUGCUGGAGAAGAACGUGACC  
 GUCACCCACUCCGUGAACCUGCUCGAGGACAGCCACAACGGGAAGCU  
 GUGCCGGCUGAAGGGCAUCGCGCCCCUCCAGCUGGGGAAGUGCAACA  
 UCGCCGGCUGGCUGCUCGGGAACCCGGAGUGCGACCCCCUGCUGCCC  
 GUGCGCUCCUGGAGCUACAUCGUCGAGACGCCAACUCCGAGAACGG  
 CAUCUGCUACCCGGGCGACUUCAUCGACUACGAGGAGCUCGGGAGC  
 AGCUGAGCUCGGUGAGCUCUUCGAGCGCUUCGAGAUUCUCCCCAAG  
 GAGAGCUCUCCUGGCCAACCAACAACCAACGGGGUGACCGCCGCCUG  
 CAGCCACGAGGGCAAGUCCAGCUUCUACCCGAACCUGCUCUGGCUGA  
 CCGAGAAGGAGGGGUCCUACCCCAAGCUGAAGAACAGCUACGUCAAC  
 AAGAAGGGCAAGGAGGUGCUCGUGCUGUGGGGGAUCCACCACCCGCC  
 CAACUCCAAGGAGCAGCAGAACCUGUACCAGAACGAGAACCGGUACG  
 UCAGCGUGGUGACGUCCAACUACAACCCGCCGGUUCACCCCCGAGAUC  
 GCCGAGCGCCCCAAGGUCCGGGACCAGGCCGGCCGCAUGAACUACUA  
 CUGGACCCUCCUGAAGCCGGGCGACACCAUCAUCUUCGAGGCCAACG  
 GGAACCUGAUCGCCCCGAUGUACGCGUUCGCCUCAGCCGGGGCUUC  
 GGGAGCGGCAUCAUCACGUCCAACGCCAGCAUGCACGAGUGCAACAC  
 CAAGUGCCAGACCCCCUGGGCGCCAUCAACUCCAGCCUGCCCUACC  
 AGAACAUCCACCCGGUGACCAUCGGGGAGUGCCCCAAGUACGUGCGC  
 UCCGCCAAGCUCGGAUGGUCACGGGCCUGCGCAACAACCCAGCAU  
 CCAGUCCCGGGGGCUGUUCGGCGCGAUCGCCGGGUUCAUCGAGGGCG  
 GCUGGACCGGGAUGAUCGACGGCUGGUACGGGUACCACCACCAGAAC  
 GAGCAGGGCAGCGGGUACGCCGCCGACCAGAAGUCCACCAGAACGC  
 CAUCAACGGCAUCACCAACAAGGUGAACACGGUGAUCGAGAAGAUGA  
 ACAUCCAGUUCACCGCGGUCGGCAAGGAGUUCAACAAGCUCGAGAAG  
 CGCAUGGAGAACCUGAACAAGAAGGUGGACGACGGGUUCUGGACAU  
 CUGGACCUACAACGCCGAGCUCUCCUGGUGCUGCUCGAGAACGAGCGGA  
 CCCUGGACUUCACGACAGCAACGUCAAGAACCUGUACGAGAAGGUG  
 AAGUCCAGCUCAGAACAACGCCAAGGAGAUCCGCCAACGGGUGCUU  
 CGAGUUCUACCACAAGUGCGACAACGAGUGCAUGGAGAGCGUCCGCA  
 ACGGCACGUACGACUACCCCAAGUACUCCGAGGAGAGCAAGCUGAAC  
 CGGGAGAAGGUGGACGGGGUGAAGCUGGAGUCCAUGGGCAUCUACCA  
 GAUCCUCGCCAUUCUACAGCACCGUCGCCUCCAGCCUGGUGCUGCUGG  
 UGUCCUCGGCGCGAUCAGCUUCUGGAUGUGCAGCAACGGGUCCUG  
 CAGUGCCGCAUCUGCAUCUGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCC  
 GAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCCUCCCUCCUUGCACCAGAGAUUAA  
 UAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAUAUUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC  
 CCCCCUCUAGACAAUUGGAAU

Figura 14