

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 703**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2009 E 09705604 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2176408**

54 Título: **Ácidos nucleicos que comprenden la fórmula (NuGIXmGnNv)a y sus derivados como agentes/adyuvantes inmunoestimuladores**

30 Prioridad:

31.01.2008 EP 08001827

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

11.06.2015

73 Titular/es:

**CUREVAC GMBH (100.0%)
PAUL-EHRLICH-STR. 15
72076 TUBINGEN, DE**

72 Inventor/es:

**KRAMPS, THOMAS;
VOSS, SÖHNKE;
PROBST, JOCHEN y
HOERR, INGMAR**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 537 703 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

Ácidos nucleicos que comprenden la fórmula $(N_uG_iX_mG_nN_v)_a$ y sus derivados como agentes/adyuvantes inmunoestimuladores

5

La presente invención se refiere moléculas de ARN que consisten en o comprenden las SEQ ID N° 117, 118 o 119 como agentes/adyuvantes inmunoestimuladores y a composiciones que los contienen, opcionalmente comprendiendo un adyuvante adicional. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica o a una vacuna que contiene en cada caso las moléculas de ARN arriba citadas como agente inmunoestimulante y opcionalmente al menos un componente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo un agente antigénico. Igualmente, la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica o de la vacuna para el tratamiento de enfermedades cancerosas, enfermedades infecciosas, alergias y enfermedades autoinmunitarias, etc. Del mismo modo, la presente invención incluye el uso de las moléculas de ARN arriba citadas para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estas enfermedades.

Tanto en la vacunación convencional como genética, con frecuencia ocurre el problema de que sólo se produce una respuesta inmunitaria pequeña y con ello a menudo inadecuada en el organismo que se trata o inocula. Por esta razón, con frecuencia los llamados adyuvantes se agregan a las vacunas o a los componentes farmacéuticamente activos, esto es sustancias o composiciones que son capaces de incrementar y/o afectar de forma selectiva una respuesta inmune, por ejemplo a un antígeno. Por ejemplo, es sabido que la efectividad de ciertos ingredientes activos medicinales inyectables se puede mejorar significativamente combinando el ingrediente activo con un adyuvante capaz de afectar a la liberación del ingrediente activo dentro del sistema celular huésped y opcionalmente a su captación dentro de las células huésped. De esta manera es posible lograr un efecto comparable a la administración periódica de dosis muy pequeñas en intervalos regulares. El término "adyuvante" se refiere convencionalmente en este contexto a un compuesto o composición que sirve como portador o sustancia auxiliar para inmunógenos y/u otros compuestos farmacéuticamente activos. Típicamente, el término "adyuvante" se debe interpretar en un sentido amplio y referirse como un espectro amplio de sustancias o estratagógenos que son capaces de incrementar la inmunogenicidad de los antígenos incorporados en o co-administrados con un adyuvante en cuestión. Los adyuvantes se pueden dividir adicionalmente, sin limitarse a, potenciadores inmunes, sistemas de suministro antigénicos o incluso combinaciones de los mismos.

En la técnica se han propuestos diversos compuestos y composiciones como adyuvantes, por ejemplo adyuvante de Freund, óxidos de metal (hidróxido de aluminio, etc.), alumbre, quelatos inorgánicos o sales de los mismos, varios aceites similares a parafina, resinas sintéticas, alginatos, mucoides, compuestos de polisacárido, caseinatos, así como compuestos aislados y/o coágulos sanguíneos, tales como, por ejemplo, derivados de fibrina, etc. Sin embargo, en la mayoría de los casos estos adyuvantes producen efectos secundarios no deseables, por ejemplo irritación e inflamación de la piel en el sitio de administración. También se observan en algunos casos incluso efectos secundarios tóxicos, en particular necrosis tisular. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos estos adyuvantes conocidos sólo provocan una estimulación inadecuada de la respuesta inmunitaria debido a que activan únicamente las células B.

Los compuestos aislados de animales, por ejemplo la gelatina, en general no son adecuados como adyuvantes con fines inmunoestimuladores. Aunque estos compuestos usualmente no presentan un efecto negativo sobre el organismo huésped o las células huésped en cuestión, típicamente emigran muy rápidamente del sitio de inyección dentro del organismo huésped o dentro de las células huésped, de modo que generalmente las propiedades deseadas para un adyuvante, por ejemplo la liberación retardada de un ingrediente activo inyectado opcionalmente junto con el adyuvante, etc., muy pocas veces se consiguen. En algunos casos, esta distribución rápida puede ser contrarrestada con taninos u otros compuestos (inorgánicos). Sin embargo, el metabolismo de estos compuestos adicionales y su paradero en el cuerpo no se han explicado completamente. Así, en este caso es muy razonable asumir que estos compuestos se acumulan en los desechos y así interfieren considerablemente en los mecanismos de filtración, por ejemplo en las células renales, hepáticas y/o del bazo. También, la propiedad de la gelatina de hincharse cuando se administra parenteralmente puede conducir a efectos secundarios desagradables bajo condiciones *in vivo*, por ejemplo a un hinchamiento, en particular en el sitio de administración, y a una sensación de enfermedad.

En el caso de los compuestos aislados de sangre y/o coágulos sanguíneos, por ejemplo derivados de fibrina, etc., se han demostrado efectos inmunoestimuladores típicos. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos, cuando se administran como adyuvantes, no son adecuados para ello debido a sus efectos secundarios sobre el sistema inmunitario (que se producen en paralelo a las propiedades inmunogénicas requeridas). Por ejemplo, muchos de estos compuestos se clasifican como alergénicos y en algunas circunstancias conducen a un exceso de reacción del sistema inmunitario, excediendo ampliamente el grado deseado. Por tanto, estos compuestos tampoco son adecuados como adyuvantes para la inmunoestimulación por las razones mencionadas.

Por consiguiente, es un primer objetivo de la presente invención proporcionar agentes inmunoestimuladores que actúen como adyuvantes y estimulen el sistema inmunitario innato, preferiblemente cuando se administran en combinación con otros compuestos biológicamente activos, en particular cuando se administran junto con compuestos inmunomoduladores, en particular en combinación con compuestos que estimulan específicamente el sistema inmunitario adaptivo, tales como antígenos.

En este contexto, es sabido que también se pueden producir efectos inmunoestimulantes (no específicos) empleando directamente ácidos nucleicos para desencadenar una respuesta inmune no específica (es decir innata), por ejemplo con secuencias de CpG-ADN bacteriano, que no sólo sirve para la información genética. Por ejemplo, es sabido que el ADN desempeña una función central en la producción de respuestas inmunitarias no específicas. El ADN bacteriano, por ejemplo, es sabido que actúa como una señal "de peligro" para alertar a las células inmunitarias, tales como macrófagos y células dendríticas, y para promover las respuestas inmunitarias de células T polarizadas con Th1 protector. Parece resultar la acción inmunoestimulante de la presencia de motivos CG no metilados (ácido nucleico) y, por tanto, se ha propuesto este CpG-ADN como agente inmunoestimulador como tal (véase por ejemplo el documento US 5.663.153). El CpG-ADN provoca directamente la activación de miembros del sistema inmune innato que se producen en la regulación por incremento de moléculas co-estimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias. Esta propiedad inmunoestimuladora del ADN también se puede lograr con oligonucleótidos de ADN que se estabilizan mediante la modificación fosforotioato (véase por ejemplo el documento US 6.239.116). Este ADN inmunoestimulador también se puede combinar con otros compuestos inmunoestimuladores. Por ejemplo, la PatenteUS 6.406.705 describe composiciones inmunoestimuladoras que contienen una combinación sinérgica de un oligodesoxiribonucleótido CpG y un compuesto no ácido nucleico para ejercer un efecto estimulante en el sistema inmunitario innato.

Sin embargo, desde varios puntos de vista el uso de ADN para ejercer una respuesta inmune no específica puede ser menos ventajoso. El ADN sólo se descompone de manera relativamente lenta *in vivo*, de modo que, cuando se usa un ADN inmunoestimulador (extraño), pueden formarse anticuerpos anti-ADN, lo cual se ha confirmado en un modelo animal en ratones (Gilkeson y *col.*, J. Clin. Invest. 1995, 95: 1398-1402). Así, la persistencia del ADN (extraño) en el organismo puede conducir a una sobreactivación del sistema inmunitario, que se sabe que en los ratones da como resultado una esplenomegalia (Montheith y *col.*, Anticancer Drug Res. 1997, 12(5): 421-432). Además, el ADN (extraño) puede interactuar con el genoma huésped y causar mutaciones, en particular por su integración en el genoma del huésped. Por ejemplo, se puede insertar el ADN (extraño) introducido en un gen intacto, lo que representa una mutación que puede impedir o incluso eliminar completamente la función del gen endógeno. Como resultado de estos eventos de integración se pueden destruir sistemas enzimáticos que son vitales para la célula. Sin embargo, también existe el riesgo de que la célula modificada se transforme así en un estado degenerado. Esta transformación puede ocurrir por ejemplo, si, por la integración del ADN (extraño), se modifica un gen que es crítico para la regulación del crecimiento celular. Por tanto, en los procesos conocidos hasta la fecha, no se puede descartar un posible riesgo de formación de cáncer debido al uso de ADN (extraño) como agente inmunoestimulador.

Por tanto, generalmente es más ventajoso usar moléculas de ARN específico con un compuesto para inducir una respuesta (no específica) del sistema inmunitario innato. En este contexto, el sistema inmunitario innato, como parte del sistema inmunitario, es el sistema dominante de la defensa del huésped en la mayoría de organismos y comprende barreras tales como barreras humorales y químicas, que incluyen, por ejemplo, inflamación, el sistema de complemento y barreras celulares. Adicionalmente, el sistema inmunitario innato se basa en un pequeño número de receptores, llamados receptores de reconocimiento de patrones o receptores de patrón molecular asociado a patógenos (receptores PAMP), tal como miembros de la familia del receptor similar a Toll (TLR) (véase por ejemplo Trinchieri y Sher, Nature reviews, Immunology, Volumen 7, Marzo de 2007). Estos TLRs son proteínas transmembrana que reconocen los ligandos del medio ambiente extracelular o del lumen de los endosomas. Después del enlace del ligando transducen la señal por la vía de las proteínas adaptadoras citoplásmicas que conducen al desencadenamiento de una respuesta de defensa en el huésped e implican la producción de péptidos antimicrobianos, quimoquinas y citoquinas pro-inflamatorias, citoquinas antivirales, etc. (véase por ejemplo Meylan, E., J. Tschoopp, y *col.* (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response". Nature 442(7098): 39-44).

Hasta ahora, se han identificado al menos 10 miembros de los receptores similares a Toll (TLRs) en humanos y 13 en ratones, que en parte se ha identificado en relación a su modo de acción. En humanos, los receptores similares a Toll (TLRs) incluyen TLR1-TLR2 (ligando conocido: lipopéptido de triacilo), TLR1-TLR6 (ligando conocido: lipopéptido de diacilo), TLR2 (ligando conocido: Péptidoglicano), TLR3 (ligando conocido: ARNs), TLR4 (ligando conocido: LPS (lipopolisacárido) de bacterias Gram-negativas), TLR5 (ligando conocido: flagelina(s) bacteriana(s)), TLR7/8 (ligando conocidos: imidazoquinolinas, análogos de guanosina (guanina) y ARNs), TLR9 (ligandos conocidos: CpG ADN de bacterias, virus y protozoarios y hemozina de pigmento de malaria (producto de digestión de la hemoglobina)) y TLR10. Después del reconocimiento de los patógenos microbianos, estos TLRs desencadenan típicamente las rutas de señalización intracelulares que dan como resultado la inducción de citoquinas inflamatorias (por ejemplo TNF-alfa, IL-6, IL-1-beta e IL-12), interferón

tipo I (IFN-beta y IFN-alfa múltiple) y quimoquinas (Kawai, T. y S. Akira (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* 13(5): 816-25).

5 En este contexto, los ARN son ventajosos por varias razones. Por ejemplo, como se muestra ahora y se menciona anteriormente, el ARNs es capaz de enlazarse a los receptores TLR-7/8 y el ARNs es capaz de enlazarse a los receptores TLR y ejercer como consecuencia un efecto inmunoestimulador. Adicionalmente, el ARN como agente inmunoestimulador tiene típicamente una vida media esencialmente más corta *in vivo* que el ADN, evitando así las desventajas mencionadas anteriormente del ADN. No obstante, en la técnica, el uso de esas moléculas de ARN específicas conocidas como agentes inmunoestimuladores también tiene ciertas limitaciones. Por ejemplo, las secuencias de ARN específicas dadas a conocer hasta ahora en la técnica presentan sólo capacidades inmunoestimuladoras limitadas *in vivo*. Esto puede requerir una mayor cantidad de ARN para la inmunoestimulación, que, sin considerar el aumento del coste debido a la cantidad de ARN que se administra, conlleva el riesgo de efectos secundarios principalmente no deseados descritos en general anteriormente en este documento, por ejemplo irritación e inflamación en el sitio de administración, incluso aunque éstos se produzcan en una ventana temporal limitada. Tampoco se pueden descartar efectos secundarios tóxicos cuando se administran grandes cantidades del agente inmunoestimulador.

Otra limitación es la baja inducción de interferones de tipo I (por ejemplo IFNalfa e IFNbeta) por las moléculas de ARN inmunoestimuladoras conocidas que son inductores importantes de la actividad antiviral y antiproliferativa y la actividad citolítica en linfocitos, células exterminadoras naturales y macrófagos.

20 Moléculas de ARNs inmunoestimulantes conocidas son, por ejemplo, poli A:U y poli I:C. sin embargo, la desventaja de estas moléculas de ARNs inmunoestimulantes es su longitud indefinida, que puede conducir a estructuras moleculares no predecibles y, en consecuencia, a agregados. Estos agregados pueden producir además efectos secundarios no deseados, como oclusión de vasos sanguíneos o inmunoestimulación indebida en el sitio de inyección. Adicionalmente, estas estructuras moleculares no predecibles representan un problema en las rutinas de laboratorio y producción diarias, ya que no se puede llevar a cabo un control de calidad adecuado debido a los variables parámetros del producto. En este contexto, para aplicaciones farmacéuticas se prefiere una molécula de ácido nucleico definido con una longitud y estructura definidas y que es adecuada como adyuvante.

30 A pesar del éxito del ARN demostrado hasta aquí, existe una necesidad continuada por e interés considerable en agentes inmunoestimuladores mejorados que puedan ejercer por sí mismos una respuesta inmunitaria del sistema inmunitario innato en el paciente. Por consiguiente, es un segundo objetivo de la invención proporcionar agentes inmunoestimuladores que ejerzan una respuesta inmunitaria no específica activando el sistema inmunitario innato del paciente.

35 Ambos objetivos de la presente invención se resuelven por la provisión de moléculas de ARN que consisten en o comprende las SEQ ID nº 117, 118 o 119. Estas moléculas de ácido nucleico de la invención activan el sistema inmunitario innato, induciendo así una respuesta inmune no específica. Como adyuvantes (por ejemplo como componentes de una vacuna), pueden soportar además la actividad inmunoestimulante de un segundo compuesto que activa específicamente el sistema inmune adaptivo.

40 Las moléculas de ARN de la invención se derivan de un ácido nucleico (molécula) de fórmula (I):



donde:

- G es guanosina (guanina), uridina (uracilo) o un análogo de guanosina (guanina) o uridina (uracilo), preferiblemente guanosina (guanina) o un análogo de la misma;
- 45 X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citocina), o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos), preferiblemente uridina (uracilo) o un análogo de la misma;
- N es una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de aproximadamente 4 a 50, preferiblemente de aproximadamente 4 a 40, más preferiblemente de aproximadamente 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, seleccionándose cada N independientemente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citocina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);
- 50 a es un número entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 15, mucho más preferiblemente de 1 a 10;
- l es un número 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;
- 55 m es un número entero y es al menos 3; donde cuando m = 3, X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, y

- cuando $m > 3$, al menos ocurren 3 uridinas sucesivas (uracilos) o análogos de uridina (uracilo);
- n es un número 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 número entero de 0 a 50,
 preferiblemente donde cuando $u = 0$, $v \geq 1$, o cuando $v = 0$, $u \geq 1$;

donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (I) de acuerdo con la invención tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de al menos 100 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 150 nucleótidos, aún más preferiblemente de al menos 200 nucleótidos y mucho más preferiblemente al menos 250 nucleótidos.

La molécula de ARN de acuerdo con la invención es típicamente un ácido nucleico, que puede ser un ARN circular o lineal, un ARN de hebra individual o doble (que también se puede considerar como un ARN debido a la asociación no covalente de dos ARN monohebra) o un ARN parcialmente de doble hebra (que se forma típicamente por una molécula de ARN monohebra más larga y al menos más corta o mediante al menos dos moléculas de ARN monohebra que son aproximadamente iguales en longitud, siendo una o más moléculas de ARN monohebra en parte complementarias a una o más moléculas de ARN monohebra y forman así un ARN de doble hebra en esta región), por ejemplo un ARN (parcialmente) monohebra mezclado con regiones de un ARN (parcialmente) de doble hebra. Preferiblemente, la molécula de ARN de acuerdo con la invención puede estar en forma de un ARN monohebra o de doble hebra, más preferiblemente un ARN parcialmente de doble hebra. También se prefiere que la molécula de ARN de acuerdo con la invención esté en forma de una mezcla de un ARN monohebra y de doble hebra.

Es particularmente ventajoso, si la molécula de ARN de acuerdo con la invención es una molécula de ARN parcialmente de doble hebra, ya que este ARN inventivo (parcialmente de doble hebra) puede estimular positivamente la respuesta inmune innata en un paciente a tratar, dirigiendo los receptores PAMP (patrón molecular asociado a patógeno) para el ARN de hebra individual (TLR-7 y TLR-8) así como también los receptores PAMP para el ARN de doble hebra (TLR-3, RIG-I y MDA-5). Los receptores TLR-3, TLR-7 y TLR-8 se localizan en el endosoma y se activan para el ARN captado por el endosoma. En contraste, el RIG-I y MDA-5 son receptores citoplásmicos, que se activan por el ARN, que se captó directamente en el citoplasma o que se ha liberado de los endosomas (liberación endosomal o escape endosomal). Por consiguiente, cualquier molécula de ARN parcialmente de doble hebra es capaz de activar diferentes cascadas de señal de inmunestimulación y así puede conducir una respuesta inmune innata o mejorar esta respuesta significativamente.

La estructura $(N_u G_i X_m G_n N_v)_a$ de fórmula (I) de la cual se derivan las moléculas de ARN de la invención comprende el elemento $G_i X_m G_n$ como una estructura núcleo y adicionalmente elementos limítrofes N_u y/o N_v , donde el elemento completo $N_u G_i X_m G_n N_v$ puede ocurrir repetidamente, es decir al menos una vez, como se determina por el número entero a. En este contexto, los inventores descubrieron sorprendentemente que una molécula de ARN según la invención, es decir basada en la estructura $(N_u G_i X_m G_n N_v)_a$ como se define anteriormente, conduce a una respuesta inmune innata incrementada en un paciente, siendo particularmente indicada por un incremento de la liberación de IFN alfa, cuando se compara con la administración de la estructura núcleo $G_i X_m G_n$ de las moléculas de ARN de la invención como tal. Adicionalmente, una molécula que comprende la estructura núcleo anterior $G_i X_m G_n$ se puede amplificar en organismos bacterianos con un rendimiento significativamente mejor cuando está limitada por un elemento repetitivo N_u y/o N_v como se define en la fórmula (I). Este diseño molecular es particularmente ventajoso cuando se prepara un ARN de la invención empleando métodos de transcripción *in vitro* en lugar de métodos de síntesis en fase sólida, como es conocido en la técnica, que se limitan típicamente a un tamaño específico de ácidos nucleicos.

La estructura núcleo $G_i X_m G_n$ a partir de la cual se derivan las moléculas de ARN de la invención se define más particularmente a continuación:

G en la molécula de ácido nucleico de la fórmula (I) es un nucleótido o desoxinucleótido o comprende un nucleósido, siendo el nucleótido (nucleósido guanosina (guanina) o uridina (uracilo) o un análogo de la misma, más preferiblemente guanosina (guanina) o un análogo de los mismos. En este contexto, los análogos de nucleótido (nucleósido) 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). Por consiguiente, los análogos de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) son nucleótidos (nucleósidos) típicamente derivados químicamente con grupos o componentes funcionales de origen no nativo, que se agregan preferiblemente a, se modifican o se suprimen del nucleótido de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) de origen natural o que sustituyen los grupos o componentes funcionales de origen natural de un nucleótido de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) de origen natural. Por consiguiente, cada grupo o

componente funcional del nucleótido de guanosina (guanina) o uridina (uracilo) de origen natural se puede modificar por supresión del mismo, principalmente del componente base, el componente de azúcar (ribosa), cualquier grupo lateral funcional de origen natural y/o el componente fosfato que forma la cadena principal del oligonucleótido. Las porciones fosfato se pueden sustituir por, por ejemplo, fosforoamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, etc.; sin embargo, las cadenas principales fosfodiéster de origen natural aún son preferentes en el contexto de la presente invención.

Correspondientemente, 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 se ha alterado químicamente, por ejemplo mediante 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-(carboxihidroxi)metiluridina (uracilo), 5-fluorouridina (uracilo), 5-bromouridina (uracilo), 5-carboximetilaminometil-uridina (uracilo), 5-metil-2-tiouridina (uracilo), metil éster de ácido N-uridin-(uracil)-5-oxiacético, 5-metilaminometil-uridina (uracilo), 5-metoxiuridina (uracilo), metil éster de ácido uridin-(uracil)-5-oxiacético, ácido uridin-(uracil)-5-oxiacético (v). La preparación de estos análogos es conocida del experto en la materia, por ejemplo a partir de las patentes US N° 4.373.071, 4.401.796, 4.415.732, 4.458.066, 4.500.707, 4.668.777, 4.973.679, 5.047.524, 5.132.418, 5.153.319, 5.262.530 y 5.700.642. En el caso de un análogo como se describe anteriormente, son especialmente preferentes de acuerdo con la invención aquellos análogos que incrementan la inmunogenicidad de la molécula de ARN según la invención y/o no interfieren con una modificación adicional que se haya introducido. Al menos una guanosina (guanina) o uridina (uracilo) o un análogo de las mismas puede ocurrir 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 aún 100% de los nucleótidos de los elementos de la estructura núcleo G_i y/o G_n son una guanosina (guanina) de origen natural, una uridina (uracilo) de origen natural y/o un análogo de las mismas y/o exhiben propiedades de un análogo de las mismas como se define aquí. Específicamente, el elemento de estructura núcleo G_i y/o G_n contiene al menos un análogo de una guanosina (guanina) de origen natural y/o una uridina (uracilo) de origen natural en todo caso. Más específicamente, todos los nucleótidos (nucleósidos) de estos elementos de la estructura núcleo G_i y/o G_n son análogos, que pueden - más preferiblemente - ser análogos idénticos para el mismo tipo de nucleótidos (nucleósidos) (por ejemplo, todos los nucleótidos de guanosina (guanina) se proporcionan como 1-metilguanosina (guanina)) o pueden ser distintos (por ejemplo al menos dos diferentes análogos de guanosina sustituyen el nucleótido de guanosina de origen natural).

El número de nucleótidos (nucleósidos) del elemento de la estructura núcleo G (G_i y/o G_n) está determinado por l y n. l y n, independientemente uno del otro, son en cada caso un número entero de 1 a 100, de 1 a 90, de 1 a 80, de 1 a 70, de 1 a 60, preferiblemente de 1 a 50, todavía más específicamente de 1 a 40 y aún más específicamente de 1 a 30, pudiendo ser el límite inferior de estos intervalos 1, pero altamente preferentemente 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 más. Específicamente, 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%, más específicamente al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos (nucleósidos) del elemento de 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, etcétera; cuando l o n = 5, G_i y/o G_n puede ser, por ejemplo, GGGUU, GGUGU, GUGGU, UGGGU, UGGUG, UGUGG, UUGGG, GUGUG, GGGGU, GGGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG o GGGGG, etc; etc. Un nucleótido (nucleósidos) de los elementos de estructura núcleo G_i y/o G_n directamente adyacentes a X_n ventajosamente no es una uridina (uracilo) o un análogo de la misma. Más específicamente los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de estructura núcleo G_i y/o G_n directamente adyacentes a X_m son al una guanosina (guanina) o un análogo de la misma, más preferiblemente un estiramiento 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 un análogo de las mismas. Adicionalmente, un nucleótido de los elementos de 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 posteriormente) ventajosamente no es una uridina (uracilo) o un análogo de la misma. Más específicamente, los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de 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 posteriormente) son al menos una guanosina (guanina) o un análogo de la misma, más preferiblemente un estiramiento de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aún 20 o más guanosinas (guaninas) o un análogo de las mismas.

Del mismo modo, preferiblemente, para la fórmula (I), cuando l o n > 1, al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o aún 100% de los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de estructura núcleo G_i y/o G_n son guanosina (guanina) o un análogo de la misma, como se define anteriormente. Los nucleótidos (nucleósidos) restantes a 100% en los elementos de estructura núcleo G_i y/o G_n (cuando guanosina (guanina) constituye menos del 100% de estos nucleótidos (nucleósidos)) pueden ser entonces uridina (uracilo) o un análogo de la misma, como se define anteriormente aquí.

X, particularmente X_m , en la molécula de ácido nucleico de fórmula (I) también es un elemento de la estructura núcleo y es un nucleótido o desoxinucleótido o comprende un nucleósido, seleccionándose el nucleótido (nucleósidos) típicamente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de la misma, preferiblemente uridina (uracilo) o un análogo de la misma. En este contexto, los análogos de nucleótido (nucleósidos) se definen como variantes no de origen nativo de nucleótidos (nucleósidos) de origen natural. Por consiguiente, los análogos son nucleótidos (nucleósidos) químicamente derivados con grupos funcionales no de origen nativo, que ventajosamente añaden a o se suprimen del nucleótido (nucleósido) de origen natural o que sustituyen los grupos funcionales de origen natural de un nucleótido (nucleósido). Así, cada componente de nucleótido de origen natural se puede modificar, principalmente el componente base, el componente de azúcar (ribosa o desoxirribosa) y/o el componente fosfato que forma la cadena principal del oligonucleótido. Las porciones fosfato se pueden sustituir por, por ejemplo, fosforoamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, etc., donde, sin embargo, es preferente la cadena principal fosfodiéster de origen natural. Específicamente, al menos el 10%, más específicamente al menos el 20%, más específicamente al menos el 30%, más específicamente al menos el 50%, más específicamente al menos el 70% y aún más específicamente al menos el 90% de todos los nucleótidos "X" pueden exhibir propiedades de un análogo como se define aquí cuando el ácido nucleico inventivo contiene al menos un análogo. Los análogos que sustituyen un tipo de nucleótido específico dentro del elemento de estructura núcleo " X_m " pueden ser idénticos, por ejemplo todos los nucleótidos (nucleósidos) de citidina (citosina) que ocurren en el elemento de la estructura núcleo " X_m " se forman por un análogo de citidina (citosina) específico, por ejemplo 2-tiocitidina (citosina), o pueden ser distintos de un nucleótido (nucleósidos) 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 implicar ninguna limitación, cualquier guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina) o citidina (citosina) de origen natural o de origen no natural que se han alterado químicamente, por ejemplo por acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyen 1-metiladenosina (adenina), 2-metiladenosina (adenina), 2-metil-N6-isopenteniladenosina (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, dihidrouridina (uracilo), 4-tiouridina (uracilo), 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5-(carboxihidroximetil)uridina (uracilo), 5-fluorouridina (uracilo), 5-bromouridina (uracilo), 5-carboximetilaminometil-uridina (uracilo), 5-metil-2-tiouridina (uracilo), metil éster de ácido N-uridin-(uracil)-5-oxiacético, 5-metilaminometil-uridina (uracilo), 5-metoxiaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5'-metoxicarbonilmetil-uridina (uracilo), 5-metoxiuridina (uracilo), metil éster de ácido uridin-(uracil)-5-oxiacético, ácido uridin-(uracil)-5-oxiacético (v), queosina, beta-D-manosilqueosina, wibutoxosina e inosina. La preparación de estos análogos es conocida del experto en la materia, por ejemplo de los documentos 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 se describe anteriormente, se da particular preferencia de acuerdo con la invención a aquellos análogos de nucleótidos (nucleósidos) que aumentan la inmunogenicidad de la molécula de ARN según la invención y/o que no interfieren con una modificación adicional que se haya introducido.

El número de elementos de la estructura de núcleo X en la molécula de ácido nucleico de la fórmula (I) viene determinado por m. "m" es un número 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 $m > 3$, al menos 3 o más uridinas (uracilos) directamente sucesivas, o un análogo de las mismas, están presentes en el elemento X de la fórmula (I) anterior. Esta secuencia de al menos 3 o más uridinas (uracilos) directamente sucesivos se refiere, en relación a 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 o 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 define anteriormente. Esta secuencia de uridina (uracilo) monotónica ocurre al menos una vez en el elemento de la estructura núcleo X de la molécula de ácido nucleico de fórmula (I). Por tanto, es posible, por ejemplo, para 1, 2, 3, 4, 5 o más de secuencias de uridina (uracilo) monotónica que tienen al menos 3 o más uridinas (uracilos) o análogos de las mismas presentes, que ocurra que las secuencias de uridina (uracilo) monotónicas se puedan interrumpir en el elemento de la estructura de núcleo X mediante al menos una guanosina (guanina), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de las mismas, preferiblemente 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, AUUU, GUUU o CUUU, etc. Cuando $n = 10$, X_m puede ser, por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, UUUUUUUUUU, UUUUUUUUUU, UUUGUUUUU, UUUGUUUUU, UUUGUUUUU, UUUUUUUUUU, etc. Los nucleótidos de X_m adyacente a G_1 o G_n de la molécula de ácido nucleico de fórmula (I) comprenden preferiblemente uridina (uracilo) o análogos de la misma. Cuando $m > 3$, típicamente al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o aún 100%, de los

nucleótidos de X_m son uridina (uracilo) o un análogo de la misma, como se define anteriormente. Los nucleótidos restantes de X_m hasta el 100% (existiendo menos del 100% uridina (uracilo) en la secuencia X_m) son entonces guanina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de las mismas, como se define anteriormente.

- 5 La molécula de ARN de la invención derivada de la fórmula (I) anterior también contiene el elemento frontera N. El elemento frontera N es típicamente una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de aproximadamente 4 a 50, específicamente de aproximadamente 4 a 40, más específicamente de aproximadamente 4 a 30 nucleótidos (nucleósidos), aún más específicamente de aproximadamente 4 a 20 nucleótidos (nucleósidos), donde el límite inferior de estos intervalos también puede ser al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más. Específicamente, los nucleótidos (nucleósidos) de cada N se seleccionan independientemente de guanina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) y/o un análogo de las mismas. En otras palabras, el elemento frontera N en la molécula de ácido nucleico de fórmula (I) puede ser una secuencia, que se puede componer de cualquier secuencia (aleatoria), disponible en la técnica, seleccionándose cada N independientemente de guanina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) y/o un análogo de estos nucleótidos, o de un homopolímero de estos nucleótidos (nucleósidos), en cada caso de forma que una secuencia tenga una longitud de aproximadamente 4 a 50, específicamente de aproximadamente 4 a 40, más específicamente de aproximadamente 4 a 30 nucleótidos (nucleósidos) y aún más específicamente de aproximadamente 4 a 30 o 4 a 20 nucleótidos (nucleósidos) de acuerdo con la definición anterior.
- 10
- 15
- 20 Más específicamente, N puede ser una secuencia de ácido nucleico dentro de las definiciones anteriores donde la secuencia comprende típicamente no más de 2 nucleótidos (nucleósidos) idénticos como se define anteriormente en una posición directamente vecina, es decir la secuencia no comprende típicamente estiramientos de más de dos nucleótidos (nucleósidos) idénticos seleccionados de adenosina (adenina), citidina (citosina), uridina (uracilo) y/o guanina (guanina), y/o un análogo de las mismas (es decir un estiramiento "aa", "cc", "uu", "gg" y/o un análogo de los mismos), más preferiblemente sin estiramiento, es decir sin nucleótidos (nucleósidos) idénticos como se define anteriormente en una posición directamente vecina. Adicional o al menos, 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 específicamente de aproximadamente 0 a 50%, 5 a 45%, o 10 a 40%, más específicamente de aproximadamente 15 a 35%, aún más específicamente de aproximadamente 20 a 30%, y mucho más específicamente de aproximadamente 25%; un contenido de uridina (uracilo) o un análogo de la misma específicamente de aproximadamente 0 a 50%, 5 a 45%, o 10 a 40%, más específicamente de aproximadamente 15 a 35%, aún más específicamente preferiblemente de aproximadamente 20 a 30%, y mucho más específicamente de aproximadamente 25%; un contenido de citidina (citosina) o un análogo de la misma específicamente de aproximadamente de 0 a 50%, de 5 a 45%, o de 10 a 40%, más específicamente de aproximadamente 15 a 35%, aún más específicamente de aproximadamente 20 a 30%, y mucho más específicamente de aproximadamente 25%; un contenido de guanina (guanina) o un análogo de la misma específicamente de aproximadamente de 0 a 50%, de 5 a 45%, o de 10 a 40%, más específicamente de aproximadamente de 15 a 35%, aún más específicamente de aproximadamente 20 a 30%, y mucho más específicamente de aproximadamente 25%. Más específicamente, N puede ser una secuencia de ácido nucleico dentro de las definiciones anteriores donde la secuencia comprende típicamente un contenido de cada adenosina (adenina), guanina (guanina), citidina (citosina) y uridina (uracilo) de aproximadamente 25%. Ejemplos de estas secuencias de N incluyen por ejemplo agcu, aguc, augc, acgu, gcua, gcau, gacu, guca, cuag, caug, cagu, cgau, uagc, uacg, ucga, ucag, agcugca, gcaucaug, caguucga, etc.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

El número de elementos frontera N en la molécula de ácido nucleico de fórmula (I), es decir, su repetición, viene determinada por los números enteros u y/o v. Así, N en la molécula de ácido nucleico de fórmula (I) puede ocurrir como un elemento frontera (repetitivo) N_u y/o N_v , donde u y/o v pueden ser, independientemente entre sí, un número entero de 0 o 1 a 100, más específicamente de 0 o 1 a 50, aún más específicamente de 0 o 1 a 40 y mucho más específicamente de 0 o 1 a 30, por ejemplo de 0 o 1 a 5, 10, 20, 25, o 30; o de 5 a 10, 10 a 15, 15 a 20, 20 a 25 o 25 a 30. Más específicamente, al menos un elemento frontera (repetitivo) N_u y/o N_v pueden estar presentes en la fórmula (I), es decir u o v no son 0, más preferiblemente, ambos elementos frontera (repetitivos) N_u y/o N_v están presentes, aún más preferiblemente en las definiciones anteriores.

50

Adicionalmente, la combinación de los elementos de estructura de núcleo y los elementos frontera en elemento $N_u G_1 X_m G_n N_v$ pueden ocurrir como elementos repetitivos de acuerdo con la fórmula (I), $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a$, como se define anteriormente, donde el número de repeticiones del elemento combinado de acuerdo con la fórmula (I), $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a$, viene determinado por el número entero a. Específicamente, a es un número entero de aproximadamente 1 a 100, 1 a 50, 1 a 20, más específicamente un número entero de aproximadamente 1 a 15, mucho más específicamente un número entero de aproximadamente 1 a 10. En este contexto, los elementos repetitivos $N_u G_1 X_m G_n N_v$ pueden ser iguales o diferentes entre sí.

55

60

ES 2 537 703 T3

La fórmula (I) $(N_uG_iX_mG_nN_v)_a$ como se define anteriormente puede comprender una estructura núcleo $G_iX_mG_n$ seleccionada de al menos una de las siguientes secuencias de SEQ ID NO: 1-80:

- GGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 1);
- GGGGGUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 2);
- 5 - GGGGGUUGGGGG (SEQ ID NO: 3);
- GUGUGUGUGUGUUGGGGG (SEQ ID NO: 4);
- GGUUGGUUGGUUUGGUUGGUU (SEQ ID NO: 5);
- GGGGGGGGGUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 6);
- GGGGGGGUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 7);
- 10 - GGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 8);
- GGGGGGGUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 9);
- GGGGGGUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 10);
- GGGGGGUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 11);
- GGGGGGUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 12);
- 15 - GGGGGUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 13);
- GGGGGUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 14);
- GGGGUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 15);
- GGGUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 16);
- GGUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 17);
- 20 - GUUUUUUUUUUUUUUUUUG (SEQ ID NO: 18);
- GGGGGGGGGUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 19);
- GGGGGGGGGUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 20);
- GGGGGGGGUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 21);
- GGGGGGGGUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 22);
- 25 - GGGGGGGUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 23);
- GGGGGGGUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 24);
- GGGGGGGUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 25);
- GGGGGGGUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 26);
- GGGGGGUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 27);
- 30 - GGGGGUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 28);
- GGGGGUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 29);
- GGGUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 30);
- GGUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 31);
- GGGGGGGGGGUUUUGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 32);
- 35 - GGGGGGGGGUUUUUGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 33);
- GGGGGGGGGUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 34);
- GGGGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 35);
- GGGGGGGGUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 36);
- GGGGGGGGUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 37);
- 40 - GGGGGGGGUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 38);
- GGGGGGGGUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 39);
- GGGGGGGUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 40);
- GGGGGGUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 41);
- GGGGGGUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 42);
- 45 - GGGGUUUUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 43);
- GGGUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 44);
- GUUUG (SEQ ID NO: 45);
- GGUUGG (SEQ ID NO: 46);
- GGGUUGG (SEQ ID NO: 47);
- 50 - GGGGUUUGGG (SEQ ID NO: 48);
- GGGGGUUGGGG (SEQ ID NO: 49);
- GGGGGGUUUGGGG (SEQ ID NO: 50);
- GGGGGGUUUGGGGG (SEQ ID NO: 51);
- GGGGGGGUUGGGGGG (SEQ ID NO: 52);
- 55 - GGGGGGGGUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 53);
- GGUUUGG (SEQ ID NO: 54);
- GGUUUUGG (SEQ ID NO: 55);
- GGUUUUUGG (SEQ ID NO: 56);
- GGUUUUUUGG (SEQ ID NO: 57);
- 60 - GGUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 58);
- GGUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 59);
- GGUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 60);
- GGUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 61);
- GGUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 62);
- 65 - GGUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 63);
- GGUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 64);

- GGUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 65);
- GGUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 66);
- GGGUUUGGG (SEQ ID NO: 67);
- GGGUUUGGG (SEQ ID NO: 68);
- 5 - GGGUUUUUGGG (SEQ ID NO: 69);
- GGGUUUUUGGG (SEQ ID NO: 70);
- GGGUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 71);
- GGGUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 72);
- 10 - GGGUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 73);
- GGGUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 74);
- GGGUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 75);
- GGGUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 76);
- GGGUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 77);
- 15 - GGGUUUUUUUUUUUUUGGGUUUUUUUUUUUUUUUGGGUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 78);
- GGGUUUUUUUUUUUUUUUGGGGGUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 79);
- GGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGG (SEQ ID NO: 80);

La molécula de ARN de la invención puede derivarse de una molécula de ácido nucleico alterativa de acuerdo con la fórmula (Ia)

$$(N_u C_l X_m C_n N_v)_a$$

- donde:
- C es citidina (citosina), uridina (uracilo) o un análogo de citidina (citosina) o uridina (uracilo), preferiblemente citidina (citosina) o un análogo de la misma;
 - 25 X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de los nucleótidos (nucleósidos) mencionados anteriormente, preferiblemente uridina (uracilo) o un análogo de la misma;
 - N es en cada caso una secuencia de ácidos nucleicos que tiene independiente entre sí una longitud de aproximadamente 4 a 50, preferiblemente de aproximadamente 4 a 40, más preferiblemente de aproximadamente 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, cada N se selecciona independientemente de
 - 30 guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);
 - a es un número entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 15, mucho más preferiblemente de 1 a 10;
 - l es un número entero de 1 a 40,
 - 35 en 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;
 - m es un número entero y es al menos 3;
 - donde cuando $m = 3$, X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma,
 - 40 cuando $m > 3$, al menos 3 uridinas sucesivas (uracilos) o análogos de uridina (uracilo) ocurren;
 - n es un número 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;
 - 45 u,v pueden ser independientemente uno de otro un número entero de 0 a 50, preferiblemente donde cuando $u = 0$, $v \geq 1$, cuando $v = 0$, $u \geq 1$;

donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, o de al menos 100 nucleótidos o de al menos 150 nucleótidos o de al menos 200 nucleótidos o de al menos 250 nucleótidos.

50 Para la fórmula (Ia), cualquiera de las definiciones dadas anteriormente para los elementos N (es decir N_u y N_v) y X (X_m), particularmente la estructura núcleo como se define anteriormente, así como también los números enteros a, l, m, n, u y v, aplican correspondientemente a los elementos de la fórmula (Ia), donde en la fórmula (Ia) la estructura de núcleo se define por $C_l X_m C_n$. La definición de los elementos frontera N_u y N_v es idéntica a las definiciones dadas anteriormente para N_u y N_v .

55 Más particularmente, C en la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) es un nucleótido o desoxinucleótido o comprende un nucleósido, siendo el nucleótido (nucleósidos) típicamente citidina (citosina) o uridina (uracilo) o un análogo de las mismas. En este contexto, los análogos de nucleótidos de citidina (citosina) o uridina (uracilo) se definen como variantes no de origen nativo de nucleótidos de citidina (citosina) o uridina (uracilo) de origen natural. Por consiguiente, los análogos de citidina (citosina) o uridina (uracilo) son nucleótidos

(nucleósidos) químicamente derivados con grupos funcionales no de origen nativo, que se agregan preferiblemente a o se suprimen de los nucleótidos (nucleósidos) de citidina (citosina) o uridina (uracilo) de origen natural o los cuales sustituyen los grupos funcionales de origen natural de un nucleótido (nucleósido) de citidina (citosina) o uridina (uracilo). Por consiguiente, cada componente del nucleótido de citidina (citosina) o uridina (uracilo) de origen natural se puede modificar, principalmente el componente base, el componente de azúcar (ribosa) y/o componente fosfato que forma la cadena principal del oligonucleótido. Las porciones fosfato se pueden sustituir por, por ejemplo, fosforoamidatos, fosforotioatos, nucleótidos pepetídicos, metilfosfonatos etc., siendo preferente la cadena principal fosfodiéster de origen natural.

Por consiguiente, los análogos de citidina (citosina) o uridina (uracilo) incluyen, sin implicar ninguna limitación, cualquier citidina (citosina) o uridina (uracilo) de origen natural o no de origen natural que se ha alterado químicamente, por ejemplo mediante acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyendo, por ejemplo, 2-tiocitidina (citosina), 3-metilcitidina (citosina), 4-acetilcitidina (citosina), dihidrouridina (uracilo), 4-tiouridina (uracilo), 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5-(carboxihidroxilmetil)uridina (uracilo), 5-fluorouridina (uracilo), 5-bromo-uridina (uracilo), 5-carboximetilaminometil-uridina (uracilo), 5-metil-2-tiouridina (uracilo), metil éster de ácido N-uridin-(uracil)-5-oxiacético, 5-metilaminometil-uridina (uracilo), 5-metoxiaminometil-2-tiouridina (uracilo), 5'-metoxicarbonilmetil-uridina (uracilo), 5-metoxiuridina (uracilo), metil éster de ácido uridin-(uracil)-5-oxiacético, ácido uridin(uracil)-5-oxiacético (v). La preparación de estos análogos es conocida del experto en la materia, por ejemplo de los documentos 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 se describe anteriormente, se da preferencia de acuerdo con la invención especialmente a aquellos análogos que incrementan la inmunogenicidad de la molécula de ARN de acuerdo con la invención y/o que no interfieren con una modificación adicional introducida. Al menos una citidina (citosina) o uridina (uracilo) o un análogo de las mismas puede ocurrir en los elementos de la estructura de núcleo C_i y/o C_n , opcionalmente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 90% o aún 100% de los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de estructura del núcleo C_i y/o C_n son una citidina (citosina) de origen natural, una uridina (uracilo) de origen natural y/o un análogo de las mismas y/o exhiben propiedades de un análogo de las mismas como se define aquí. Específicamente, el elemento de la estructura de núcleo C_i y/o C_n contiene al menos un análogo de una citidina (citosina) de origen natural y/o una uridina (uracilo) de origen natural en todo caso. Más específicamente, todos los nucleótidos (nucleósidos) de estos elementos de la estructura de núcleo C_i y/o C_n son análogos, los cuales pueden – ventajosamente - ser análogos idénticos para el mismo tipo de nucleótidos (nucleósidos) (por ejemplo todos los nucleótidos de citidina (citosina) se proporcionan como 2-tiocitidina (citosina)) o pueden ser distintos (por ejemplo al menos dos análogos de citidina (citosina) diferentes que sustituyen el nucleótido de citidina (citosina) de origen natural).

El número de nucleótidos (nucleósidos) del elemento de la estructura de núcleo C (C_i y/o C_n) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) viene determinado por l y n. l y n, independientemente uno del otro, son en cada caso un número entero de 1 a 90, de 1 a 80, de 1 a 70, de 1 a 60, preferiblemente de 1 a 50, todavía más preferiblemente de 1 a 40, y aún más preferiblemente de 1 a 30, donde el límite inferior de estos intervalos 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. Específicamente, para cada número 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%, más específicamente al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o aún el 100% de los nucleótidos (nucleósidos) del elemento de la estructura de núcleo C (C_i y/o C_n) son citidina (citosina) o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4, C_i 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_i y/o C_n pueden ser, por ejemplo, CCCUU, CCUCU, CUCCU, UCCCU, UCCUC, UCUCU, UUCCC, CUCUC, CCCC, CCCUC, CCUCC, CUCCC, UCCCC, o CCCCC, etc; etc. Un nucleótido (nucleósido) de los elementos de la estructura de núcleo C_i y/o C_n adyacentes directamente a X_m en la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) no es específicamente una uridina (uracilo) o un análogo de la misma. Más específicamente los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de la estructura de núcleo C_i y/o C_n adyacentes directamente a X_m en la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) son al menos una citidina (citosina) o un análogo de la misma, más específicamente un estiramiento de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aún 20 o más citidinas (citosinas) o un análogo de las mismas. Adicionalmente, un nucleótido (nucleósido) de los elementos de la estructura de núcleo C_i y/o C_n adyacentes directamente a N, por ejemplo N_u , y/o N_v (o N_{w1} o N_{w2} como se definen posteriormente) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) ventajosamente no es una uridina (uracilo) o un análogo de la misma. Más específicamente, los nucleótidos (nucleósidos) de los elementos de la estructura núcleo C_i y/o C_n adyacentes directamente a N, por ejemplo N_u , y/o N_v (o N_{w1} o N_{w2} como se definen posteriormente) en la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) son al menos una citidina (citosina) o un análogo de la misma, más específicamente un estiramiento de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aún 20 o más citidinas (citosinas) o un análogo de las mismas. Del mismo modo, ventajosamente, para la fórmula (Ia), cuando l o n > 1, al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos de los elementos de la estructura núcleo C_i y/o C_n son citidina (citosina) o un análogo de la misma, como se define anteriormente. Los nucleótidos (nucleósidos) restantes hasta el

100% de los elementos de la estructura núcleo C_i y/o C_n (cuando la citidina (citosina) constituye menos del 100% de estos nucleótidos (nucleósidos)) pueden ser entonces uridina (uracilo) o un análogo de la misma, como se ha definido antes aquí.

5 X, particularmente X_m , como otro elemento de la estructura núcleo en la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (Ia), es ventajosamente como se ha definido anteriormente para la fórmula (I). El número de elementos de la estructura núcleo X en la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) viene dado por m. "m" es un número entero y es típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, de 20 a 30, de 30 a 40, de 40 a 50, de 50 a 60, de 60 a 70, de 70 a 80, de 80 a 90, de 90 a 100, de 100 a 150, de 150 a 200, o aún más, donde cuando $m = 3$, X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, y cuando $m > 3$, al menos están presentes 3 o más uridinas (uracilos) directamente sucesivas o análogos de las mismas en el elemento X de la fórmula (Ia) anterior. Esta secuencia de al menos 3 o más uridinas (uracilos) directamente sucesivas se denomina, en esta solicitud, "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 o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, de 20 a 30, de 30 a 40, de 40 a 50, de 50 a 60, de 60 a 70, de 70 a 80, de 80 a 90, de 90 a 100, de 100 a 150, de 150 a 200 uridinas (uracilos) u opcionalmente análogos de uridina (uracilo) como se define anteriormente. Esta secuencia de uridina (uracilo) monotónica ocurre por lo menos una vez en el elemento de la estructura núcleo X de la molécula de ácido nucleico de la fórmula (Ia). Por tanto, es posible que ocurran, por ejemplo, 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, con lo cual las secuencias de uridina (uracilo) monotónicas se pueden interrumpir en el elemento de estructura de núcleo X mediante al menos una guanosina (guanina), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de las mismas, ventajosamente 2, 3, 4, 5 o más. Por ejemplo, cuando $m = 3$, X_m es un UUU. Cuando $m = 4$, X_m pueden ser, por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, UUAU, UUUG, UUAU, UUUU, AUUU, GUUU o CUUU, etc. Cuando $n = 10$, X_m pueden ser, por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, UUUAAUUUUC, UUUUGUUUUA, UUUGUUUGUU, UUGUUUUGUU, UUUUUUUUUU, etc. Los nucleótidos (nucleósidos) de X_m adyacentes a C_i o C_n de la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) ventajosamente comprenden uridina (uracilo) o análogos de la misma. Cuando $m > 3$, típicamente al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o aún 100%, de los nucleótidos de X_m son uridina (uracilo) o un análogo de la misma, como se define anteriormente. Los nucleótidos (nucleósidos) restantes de X_m hasta el 100% (donde existe 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 define anteriormente.

Del mismo modo, el ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (Ia) anterior contiene un elemento limítrofe N, particularmente N_u y/o N_v , donde el elemento frontera N, particularmente N_u y/o N_v , así como también números enteros x e y son como se han definido anteriormente.

El elemento $N_u C_i X_m C_n N_v$ puede ocurrir como un elemento repetitivo de acuerdo con la molécula de ácido nucleico de fórmula (Ia) $(N_u C_i X_m C_n N_v)_a$, como se define anteriormente, determinándose el número de repeticiones de este elemento de acuerdo con la fórmula (Ia) $(N_u C_i X_m C_n N_v)_a$ por el número entero a. Específicamente, a es un número entero de aproximadamente 1 a 100, de 1 a 50, de 1 a 20, más específicamente un número entero de aproximadamente de 1 a 15, mucho más específicamente un número entero de aproximadamente 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 entre sí.

La molécula de fórmula (Ia) $(N_u C_i X_m C_n N_v)_a$, como se define anteriormente, puede comprender una estructura núcleo $C_i X_m C_n$ seleccionada de al una de las siguientes secuencias de SEQ ID NO: 81-83:

45 - CCCUUUUUUUUUUUUUUUUUCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCCUUUUUUUUUUUUUUUUCC (SEQ ID NO: 81)
 - CCCUUUCCCUUUUCCCUUUUCCCUUUUCCCUUUUCCCUUUUCCCUUUUCC (SEQ ID NO: 82)
 - CCCUUUUUUUUUUUUUUUUUCCCUUUUUUUUUUUUUUUUCC (SEQ ID NO: 83)

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquier fórmula (I) (o (Ia)), particularmente cada elemento repetitivo individual $N_u G_i X_m G_n N_v$ (o $N_u C_i X_m C_n N_v$) de la misma, puede ser monohebra, de doble hebra o parcialmente de doble hebra, etc. como se define para la fórmula (I) en general.

Si la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquier fórmula (I) (o (Ia)) es una molécula de ácido nucleico monohebra, la secuencia es típicamente de monohebra sobre su longitud completa.

Del mismo modo, si la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquier fórmula (I) (o (Ia)) es una molécula de ácido nucleico de doble hebra, la secuencia es típicamente de doble hebra sobre su longitud completa.

En la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquier fórmula (I) (o (Ia)) es una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, la secuencia de ácidos nucleicos de una molécula de ácido nucleico de cualquier

En el contexto de la presente invención, un elemento modificador poli(X), particularmente poli(X)_s y/o poli(X)_t, de una molécula de ácido nucleico inventiva de acuerdo con la fórmula (II) es típicamente una secuencia de ARN monohebra, de doble hebra o parcialmente de doble hebra, como se define anteriormente en general. Preferiblemente, el elemento modificador poli(X), particularmente poli(X)_s y/o poli(X)_t, es un estiramiento homopolimérico de ácidos nucleicos, donde X puede ser cualquier nucleótido o comprende un nucleósido como se ha definido anteriormente para X de una molécula de ácido nucleico inventiva de acuerdo con la fórmula (I) o (Ia). Preferiblemente, X se puede seleccionar independientemente para cada poli(X), particularmente poli(X)_s y/o poli(X)_t, de un nucleótido o desoxinucleótido o comprende un nucleósido, donde el nucleótido (nucleósido) se selecciona de guanina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina), inosina o un análogo de estos nucleótidos, por ejemplo de un estiramiento de hebra individual de citidinas (citosinas) (poli(C)), de guanina (guanina) (poli(G)), de adenosina (adenina) (poli(A)), de uridinas (uracilos) (poli(U)), de inosinas (poli(I)), etc., o de un estiramiento de doble hebra homopolimérico de inosinas y citidinas (citosinas) (poli(I:C)), de adenosina (adenina) y uridinas (uracilos) (poli(A:U)), etc., donde la secuencia homopolimérica, particularmente poli(I:C) y/o poli(A:U), se puede acoplar al ARN de la invención vía cualquiera de sus hebras, por ejemplo usando la secuencia de poli-C, poli-I, poli-A o poli-U. La longitud del elemento modificador poli(X), particularmente poli(X)_s y/o poli(X)_t, del ARN de la invención viene determinada por los números enteros s y/o t, donde s y/o t, independientes entre sí, pueden ser un número entero de aproximadamente 5 a 100, preferiblemente de manera aproximada de 5 a 70, más preferiblemente de manera aproximada de 5 a 50, aún más preferiblemente de manera aproximada de 5 a 30 y mucho más preferiblemente de manera aproximada de 5 a 20.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, un ARN de acuerdo con la invención puede tener específicamente una longitud de al menos 200 nucleótidos y más preferiblemente de al menos 250 nucleótidos.

Más preferiblemente, el poli(X) en una molécula de ARN inventiva se puede seleccionar de un poli(X) como se define anteriormente, más preferiblemente de poli(I:C) y/o de poli(A:U). Estos elementos modificadores poli(X), particularmente poli(I:C) y/o poli(A:U), se pueden acoplar a la secuencia de SEQ ID NO 117, 118 o 119 vía cualquiera de sus hebras, por ejemplo usando la secuencia poli-C, poli-G, poli-I, poli-A o poli-U.

Similarmente, la molécula de ARN inventiva de acuerdo con la invención puede ser una molécula de ARN monohebra, de doble hebra o parcialmente de doble hebra, como se define anteriormente.

Si el ARN de la invención es una molécula de ácido nucleico monohebra, la secuencia es típicamente monohebra sobre su longitud completa.

Del mismo modo, si la molécula de ARN es una molécula de ácido nucleico de doble hebra, la secuencia es típicamente de doble hebra sobre su longitud completa.

Si la molécula de ARN inventiva es una molécula de ARN parcialmente de doble hebra, la secuencia de ARN de tal molécula de ARN de la invención puede ser monohebra en la región fuera de la estructura del núcleo G_iX_mG_n, y de doble hebra en la región de la estructura de núcleo. Aún más preferiblemente, la estructura de núcleo G_iX_mG_n (o C_iX_mC_n) puede ser de doble hebra en tal región de la estructura de núcleo, donde está presente un estiramiento de uridinas (uracilos), más preferiblemente sobre el estiramiento de uridina (uracilo) completo o al menos en el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98 o 99% del mismo.

Adicionalmente, si la molécula de ARN inventiva es una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra, otras partes (que la estructura de núcleo G_iX_mG_n) de la molécula de ARN inventiva pueden ser de doble hebra. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de una molécula de ARN de la invención puede ser de doble hebra en la región fuera de la estructura de núcleo G_iX_mG_n, por ejemplo en los elementos frontera N_u y/o N_v, y/o en el elemento modificador poli(X), por ejemplo poli(X)_s y/o poli(X)_t (tal como por ejemplo una secuencia de poli(I:C) o poli(A:U)), y por ejemplo monohebra en la región de dicha estructura de núcleo, la estructura de núcleo G_iX_mG_n. Por ejemplo por lo menos uno de los elementos frontera N_u y/o N_v, y/o al menos uno de los elementos modificadores poli(X), por ejemplo poli(X)_s y/o poli(X)_t, pueden ser de doble hebra, mientras que los elementos restantes de la molécula de ARN de la invención, por ejemplo la estructura de núcleo G_iX_mG_n y/u otros elementos, pueden permanecer monohebra.

Adicionalmente, puede proporcionarse una mezcla de una molécula de ARN de la invención monohebra y una molécula de ARN (parcialmente) de doble hebra de acuerdo con la invención, preferiblemente 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 preferente adicional, una molécula de ARN inventiva de acuerdo con la invención se puede modificar insertando un tallo o un tallo-lazo.

La molécula de ARN de acuerdo con la invención puede tener una longitud de al 200 nucleótidos y más preferiblemente de al menos 250 nucleótidos.

Particularmente, las moléculas de ARN inventivas presentan variantes de SEQ ID NO 117, 118 o 119. En unamolécula de ARN de acuerdo con la invención, los elementos frontera N, es decir N_u y/o N_v , que limitan la estructura núcleo $G_iX_mG_n$, se aumentan adicionalmente mediante al menos un tallo o una estructura de tallo-lazo, que consiste preferiblemente en elementos tallo-lazo individuales tallo1 y tallo2. En las moléculas de ARN inventivas, los elementos G, X y N, particularmente la estructura núcleo $G_iX_mG_n$, y los números enteros a, l, m, n, u y v son como se define anteriormente. Más preferiblemente el número a = 1. Opcionalmente un u y/o v pueden ser 0. Adicionalmente, los elementos N_{w1} y N_{w2} , adyacentes a los elementos de tallo-lazo tallo1 y tallo2 representan elementos frontera adicionales, que se definen como se describe anteriormente para los elementos frontera N_u y/o N_v . Particularmente, el elemento frontera N en general es como se describe anteriormente para N en la fórmula (I) anterior y los enteros w1 y w2 se seleccionan independientemente entre sí y se definen como anteriormente en la fórmula (I) para los números enteros u y/o v.

En este contexto, una estructura de tallo o tallo-lazo es un apareamiento de bases intramolecular que puede ocurrir en el ADN monohebra o, más comúnmente, en el ARN. La estructura también es conocida como horquilla o bucle de horquilla. Esto ocurre cuando dos regiones de la misma molécula, por ejemplo elementos de tallo-lazo tallo1 y tallo2, elementos de secuencia usualmente palindrómica en las secuencias de ácidos nucleicos, forman pares base entre sí, que conducen a (una hélice doble que termina en) un lazo no apareado. Así, el lazo no apareado representa típicamente una región del ácido nucleico que muestra nada o casi nada de homología con la secuencia del tallo1 o del tallo2 y por ello no es capaz del apareamiento de bases con ninguno de estos elementos de tallo-lazo. La estructura en forma chupa-chups es un bloque de construcción clave de muchas estructuras secundarias del ARN. La formación de una estructura tallo-lazo es así dependiente de la estabilidad de la hélice resultante y de las regiones lazo, donde el primer requisito es típicamente la presencia de una secuencia que puede plegarse de nuevo en sí misma para formar una hélice doble apareada. La estabilidad de los elementos tallo-lazo apareados se determina por la longitud, el número de desigualdades o desajustes que contiene (un número pequeño de desigualdades es típicamente tolerable especialmente en una hélice larga) y la composición base de la región apareada. Por ejemplo, los apareamientos entre guanosina (guanina) y citidina (citosina) pueden ser preferidos en estas secuencias, puesto que tienen tres enlaces de hidrógeno y son más estables comparados con los apareamientos adenosina (adenina)-uridina (uracilo), que tienen únicamente dos. En el ARN, los apareamientos guanosina (guanina)-uridina (uracilo) que caracterizan dos enlaces de hidrógeno pueden entonces ser favorables. La estabilidad del lazo también afecta a la formación de la estructura tallo-lazo. "Lazos" (es decir solo el lazo sin los elementos tallo-lazo de tallo1 y tallo2) con menos de tres bases de longitud son estéricamente menos preferibles. Sin embargo, los tallos, es decir las formaciones que no muestran un lazo (definido) sino sólo una región no apareada entre el tallo1 y el tallo2 también se pueden incluir. En el contexto de la presente invención, la longitud óptima del lazo tiende a ser aproximadamente 4-100 bases, más preferiblemente de 4 a 50 o aún de 4 a 30 o aún de 4 a 20 bases.

Por consiguiente, en el contexto de una molécula de ARN de acuerdo con la invención, los elementos tallo-lazo tallo1 y tallo2 representan típicamente partes de una estructura tallo o tallo-lazo, donde la estructura de tallo o tallo-lazo se puede formar por los elementos tallo-lazo tallo1 y tallo2, y se puede formar un lazo por una secuencia localizada entre estos elementos tallo-lazo. El tallo o tallo-bucle puede tener la forma de una hélice en la región apareada base. Cada elemento tallo-lazo tallo1 y tallo2 es preferiblemente un ácido nucleico como se define anteriormente, más preferiblemente un ARN, y más preferiblemente un ARN monohebra, donde cualquiera de los nucleótidos (nucleósidos) o análogos como se definen anteriormente para el elemento de estructura núcleo X se pueden usar como nucleótidos (nucleósidos) para ya sea el tallo1 y/o el tallo2. Adicionalmente, el elemento tallo-lazo tallo1 representa una secuencia palindrómica del elemento tallo-lazo tallo2. Ambas secuencias son, por tanto, preferiblemente capaces del apareamiento de bases entre sí y así juntas forman la base para un tallo o un tallo-lazo.

Por lo tanto, los elementos tallo-lazo tallo1 o tallo2 se pueden seleccionar por pares a partir de cualquier secuencia de ácidos nucleicos, con la condición de que los elementos tallo-lazo tallo1 o tallo2 sean palindrómicos entre sí, es decir que una secuencia sea igual a la otra secuencia (complementaria) leída al revés o muestre una homología con esta secuencia de al menos el 90%, más preferiblemente de al menos el 95% y mucho más preferiblemente de al menos el 99% con la otra secuencia leída al revés. Estas secuencias palindrómicas tallo1 y tallo2 se pueden formar en cada caso mediante una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de aproximadamente 5 a 50, más preferiblemente de manera aproximada de 5 a 40 y mucho más preferiblemente de manera aproximada de 5 a 30 ácidos nucleicos, seleccionados de adenosina (adenina), guanosina (guanina), citidina (citosina), uridina (uracilo), timidina (timina) o análogos de las mismas como se definen aquí.

Secuencias ilustrativas para los tallo-lazo tallo1 y tallo2 pueden incluir por ejemplo:

a) para el tallo1:
UAGCGAAGCUCUUGGACCUA (SEQ ID NO: 95)

- para el tallo2:
UAGGUCCAAGAGCUUCGCUA (SEQ ID NO: 96)
- b) para el tallo1:
UAGGUCCAAGAGCUUCGCUA (SEQ ID NO: 96)
- 5 para el tallo2:
UAGCGAAGCUCUUGGACCUA (SEQ ID NO: 95)
- c) para el tallo1:
GCCGCGGGCCG (SEQ ID NO: 97)
- 10 para el tallo2:
CGGCCCGCGGC (SEQ ID NO: 98)
- d) para el tallo1:
CGGCCCGCGGC (SEQ ID NO: 98)
- para el tallo2:
GCCGCGGGCCG (SEQ ID NO: 97)
- 15 e) para el tallo1:
GACACGGUGC (SEQ ID NO: 99)
- para el tallo2:
GCACCGUGCA (SEQ ID NO: 100)
- f) para el tallo1:
GCACCGUGCA (SEQ ID NO: 100)
- 20 para el tallo2:
GACACGGUGC (SEQ ID NO: 99)
- g) para el tallo1:
ACCUAGGU(SEQ ID NO: 101)
- 25 para el tallo2:
ACCUAGGU(SEQ ID NO: 101)
- h) para el tallo1:
UGGAUCCA(SEQ ID NO: 102)
- para el tallo2:
UGGAUCCA(SEQ ID NO: 102)
- 30 i) para el tallo1:
CCUGC (SEQ ID NO: 103)
- para el tallo2:
GCAGG (SEQ ID NO: 104)
- 35 j) para el tallo1:
GCAGG (SEQ ID NO: 105)
- para el tallo2:
CCUGC (SEQ ID NO: 106), etc.

40 De acuerdo con una primera *alteARN*tiva, la estructura núcleo $G_iX_mG_n$ del ARN de la invención se puede localizar dentro del tallo-lazo, es decir la estructura núcleo $G_iX_mG_n$ se puede localizar entre los elementos tallo-lazo tallo1 y tallo2, formando así preferiblemente un lazo. Esta molécula de ARN tiene la composición $(N_u \text{ tallo1 } G_iX_mG_n \text{ tallo2 } N_v)_a$, como se define anteriormente. Cuando u y/o $v = 0$ y $a = 1$, se puede llegar a una molécula de ARN específica "tallo1 $G_iX_mG_n$ tallo2", que también pertenece a la presente invención.

45 De acuerdo con otra *alteARN*tiva, la estructura núcleo $G_iX_mG_n$ del ARN de la invención se puede localizar fuera de la estructura tallo-lazo, donde del mismo modo los elementos tallo-lazo tallo1 y tallo2 pueden estar separados entre sí por una secuencia, preferiblemente un elemento frontera N , por ejemplo N_{w1} o N_{w2} , que entonces pueden formar una estructura lazo apareando las bases de los elementos tallo-lazo tallo1 y tallo2. Adicionalmente, 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, tal ARN tiene la composición $(N_u G_iX_mG_n N_v)_a \text{ tallo1 } N_{w1} \text{ tallo2 } N_{w2}$, como se define anteriormente.

55 Las moléculas de ARN de acuerdo con la invención como se han definido anteriormente se puede preparar usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos tales como síntesis en fase sólida, así como también métodos *in vitro*, como reacciones de transcripción *in vitro*. Preferiblemente, se usa la transcripción *in vitro* para preparar las moléculas de ácido nucleico de la invención. Como se descubrió sorprendentemente por los inventores de la presente invención, las moléculas de ARN según la invención como se han definidas demuestran una estimulación aún mejor del sistema inmune innato cuando se preparan mediante transcripción *in vitro* debido a su 5'-fosfato, en comparación con las moléculas de ARN según la invención preparadas por métodos sintéticos. Esta estimulación del sistema inmune innato es, sin limitarse a, contribuida por la activación del receptor RIG-1. Por consiguiente, las moléculas de ARN de acuerdo con la invención como se definen anteriormente son particularmente preferentes cuando se preparan mediante una reacción de transcripción *in vitro*.

La molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se proporciona típicamente como un "oligonucleótido estabilizado", es decir como un oligoribonucleótido o un oligodesoxiribonucleótido que es resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo por un exo- o endo-nucleasa). Esta estabilización se puede efectuar, por ejemplo, por una cadena principal de fosfato modificada de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente. Los nucleótidos que se usan preferiblemente en este contexto contienen una cadena principal fosfato modificada con fosforotioato, preferiblemente al menos uno de los oxígenos del fosfato contenido en la cadena principal fosfato se reemplaza por un átomo de azufre. Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen, por ejemplo, análogos no iónicos, por ejemplo alquil y aril fosfonatos donde el oxígeno del fosfonato cargado se reemplaza por un grupo alquilo o arilo, o fosfodiésteres y alquilfosfotriésteres, donde el residuo oxígeno cargado está presente en forma alquilada. Sin embargo, la cadena principal del fosfodiéster de origen natural es aún preferente.

La molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede estabilizar de igual modo. Desde el punto de vista de la seguridad, el uso de moléculas de ARN es ventajoso. En particular, el ARN no implica el riesgo de ser integrado establemente dentro del genoma de la célula transfectada. Además, el ARN se degrada esencialmente más fácilmente *in vivo*. Del mismo modo, no se han detectado hasta ahora anticuerpos anti-ARN, debido presumiblemente a la vida media relativamente corta del ARN *in vivo* en comparación con el ADN. En comparación con el ADN, el ARN es considerablemente menos estable en solución, lo cual es, *inter alia*, debido básicamente a las enzimas degradadoras de ARN, llamadas ARNsas (ribonucleasas). Aún las contaminaciones de ribonucleasas más pequeñas son suficientes para degradar el ARN completamente en solución. Generalmente, estas contaminaciones de ARNsas pueden ser eliminadas sólo mediante tratamientos especiales, en particular con pirocarbonato de dietilo (DEPC). Por consiguiente, la degradación natural del ARNm en el citoplasma celular se regula muy finamente. A este respecto, se conocen diversos mecanismos en la técnica anterior. Así, la estructura terminal típicamente es de importancia crítica para una ARNm *in vivo*. En el extremo 5' de los ARNm de origen natural es usualmente una denominada "estructura de terminación" (un nucleótido de guanosina (guanina) modificado) y el extremo 3' una secuencia de hasta 200 nucleótidos de adenosina (adenina) (la llamada cola poli-A)

La molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, particularmente si se proporciona como un ARN(m), puede por tanto estabilizarse contra la degradación por las ARNsas mediante la adición de una "estructura de terminación 5'". Se da preferencia particular a este respecto a una m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A o G(5')ppp(5')G como "estructura terminación 5'". Sin embargo, esta modificación se introduce sólo cuando una modificación, por ejemplo una modificación con lípidos, todavía no se ha introducido en el extremo 5' de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente o si la modificación no interfiere con las propiedades inmunogénicas de la molécula de ARN (no modificada o modificada químicamente) de acuerdo a la invención como se define anteriormente.

Adicionalmente, el extremo 3' de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede modificar mediante una secuencia de al menos 50 ribonucleótidos adenosina, preferiblemente al menos 70 ribonucleótidos adenosina, más preferiblemente al menos 100 ribonucleótidos adenosina, de manera particularmente preferente al menos 200 ribonucleótidos adenosina (adenina) (la llamada "cola poli-A"). Particularmente, la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente puede contener, especialmente si el ARN está en forma de un ARN(m), una cola poli-A en el terminal 3' de típicamente aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de adenosina, preferiblemente manera aproximada 10 a 100 nucleótidos de adenosina, más preferiblemente de manera aproximada 20 a 100 nucleótidos de adenosina o a un más preferiblemente de manera aproximada 40 a 80 nucleótidos de adenosina.

Adicionalmente, el extremo 3' de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede modificar mediante una secuencia de al menos 50 ribonucleótidos citidina, preferiblemente al menos 70 ribonucleótidos de citidina, más preferiblemente al menos 100 ribonucleótidos de citidina, de manera particularmente preferible al menos 200 ribonucleótidos de citidina (la llamada "cola poli-C"). Particularmente, la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se describe anteriormente puede tener, especialmente si el ARN está en forma de un ARN(m), una cola poli-C en el terminal 3' típicamente de aproximadamente de 10 a 200 nucleótidos citidina, preferiblemente de manera aproximada de 10 a 100 nucleótidos citidina, más preferiblemente de manera aproximada 20 a 70 nucleótidos citidina o aún más preferiblemente de manera aproximada 20 a 60 o incluso de 10 a 40 nucleótidos citidina.

Análogamente, en este caso también, esta modificación ("cola poli-A y/o cola poli-C") se puede introducir únicamente si no se ha introducido todavía una modificación, por ejemplo una modificación con lípidos, en el extremo 3' de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente o si la modificación no interfiere con las propiedades inmunogénicas de la molécula de ARN (modificada o modificada químicamente) de acuerdo con la invención como se define anteriormente.

Las modificaciones mencionadas anteriormente, es decir la inserción de una estructura de "terminación 5'" o

la inserción de una "cola poli-A y/o una "cola poli-C" en el extremo 3', previene la degradación prematura de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente *in vivo* y, por consiguiente, estabiliza la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente *in vivo*.

5 De acuerdo con una realización particular, la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente puede contener una modificación con lípidos. Esta molécula de ácido nucleico modificada con lípidos de acuerdo con la invención comprende típicamente una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, al menos una ligadura covalentemente enlazada con esa molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención y al menos un lípido covalentemente enlazado con la ligadura respectiva. AlteARNtivamente, la molécula de ARN modificada con lípido de acuerdo con la invención
10 comprende (al menos una) de las SEQ ID NO 117, 118 o 119 y al menos un lípido (bifuncional) covalentemente enlazado (sin una ligadura) con esa molécula de ARN de acuerdo con la invención. De acuerdo con una tercera alteARNtiva, la molécula de ARN modificada con lípido de acuerdo con la invención comprende un ácido nucleico de SEQ ID NO 117, 118 o 119 como se define anteriormente, al menos una ligadura covalentemente enlazada con esa molécula de ARN de acuerdo con la invención y al menos un
15 lípido covalentemente enlazado con la ligadura respectiva, y también al menos un lípido (bifuncional) covalentemente enlazado (sin ligadura) con esa molécula de ARN de acuerdo con la invención.

El lípido contenido en la molécula de ácido nucleico modificada con lípido de acuerdo con la invención es típicamente un lípido o un residuo lipofílico que es preferiblemente por sí mismo biológicamente activo. Estos lípidos incluyen preferiblemente sustancias o compuestos naturales tales, por ejemplo vitaminas, por ejemplo
20 α -tocoferol (vitamina E), que incluye RRR- α -tocoferol (anteriormente D- α -tocoferol), L- α -tocoferol, el racemato D,L- α -tocoferol, succinato de vitamina E (VES), o vitamina A y sus derivados, por ejemplo ácido retinoico, retinol, vitamina D y sus derivados, por ejemplo vitamina D y también sus precursores ergosterol, vitamina E y sus derivados, vitamina K y sus derivados, por ejemplo vitamina K y compuestos de quinona o fitol relacionados, o esteroides, tales como ácidos biliares, por ejemplo ácido cólico, ácido desoxicólico,
25 ácido deshídrocólico, cortisona, dioxigenina, testosterona, colesterol o tiocolesterol. Los lípidos o residuos lipofílicos adicionales dentro del alcance de la presente invención incluyen, sin implicar ninguna limitación, polialquilenglicoles (Oberhauser y *col.*, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533), grupos alifáticos, por ejemplo alcanos de 1 a 20 átomos de carbono, alquenos de 1 a 20 átomos de carbono o alcoholes de 1 a 20 átomos de carbono, etc., por ejemplo dodecanodiol, hexadecanol o residuos undecilo (Saison-Behmoaras y *col.*,
30 EMBO J, 1991, 10, 111; Kabanov y *col.*, FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk y *col.*, Biochimie, 1993, 75, 49), fosfolípidos, por ejemplo fosfatidilglicerol, diacilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, di-hexadecil-rac-glicerol, esfingolípidos, cerebrósidos, gangliósidos, o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan y *col.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea y *col.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777), poliamidas o
35 polialquilenglicoles, por ejemplo polietilenglicol (PEG) (Manoharan y *col.*, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969), hexaetilenglicol (HEG), residuos palmitina o palmitilo (Mishra y *col.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229), octadecilaminas o residuos de hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke y *col.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923), y también ceras, terpenos, hidrocarburos alicíclicos, residuos de ácidos grasos saturados o mono- o poli- insaturados, etc.

40 El enlace entre el lípido y la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente puede tener lugar, en principio, en cualquier nucleótido, en la base o el componente de azúcar de cualquier nucleótido del ácido nucleico inventivo, en el extremo 3' y/o 5', y/o en el esqueleto fosfato de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente. Se da particular preferencia de acuerdo con la invención a una modificación del lípido terminal de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la
45 invención en el extremo 3' y/o 5' de la misma. Una modificación terminal tiene diversas ventajas sobre las modificaciones dentro de la secuencia. Por una parte, las modificaciones dentro de la secuencia pueden influir en el comportamiento de hibridación, que puede tener un efecto adverso en caso de los residuos estéricamente demandantes. Por otra parte, en el caso de la preparación sintética de una molécula de ácido nucleico modificada con lípido de acuerdo con la invención que se modifica solo térmicamente, la síntesis de
50 la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede llevar a cabo con monómeros comercialmente disponibles que son obtenibles en grandes cantidades, y se pueden usar protocolos de síntesis conocidos en la técnica previa.

De acuerdo con una primera realización preferente, el enlace entre la molécula de ARN de según la invención y al menos un lípido a emplear se lleva a cabo *vía* un "enlazador" (covalentemente enlazado con la molécula
55 de ARN según la invención como se define anteriormente). Los enlazadores dentro del alcance de la presente invención tienen típicamente al menos dos y opcionalmente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30 o más grupos reactivos, seleccionados de, por ejemplo, grupos hidroxilo, amino, alcoxi, etc. Un grupo reactivo sirve preferiblemente para enlazar la molécula de ARN descrita anteriormente de acuerdo con la invención como se define anteriormente, por ejemplo un oligonucleótido de ARN. Este grupo reactivo puede estar
60 presente en forma protegida, por ejemplo como un grupo DMT (cloruro de dimetoxitritilo) como un grupo Fmoc, como un grupo MMT (monometroxitritilo), como un grupo TFA (ácido trifluoroacético), etc. Además, los

grupos sulfuro se pueden proteger mediante disulfuros, por ejemplo alquiltios tales como 3-tiopropanol, o con componentes activados, tal como 2-tiopiridina. Uno o más grupos reactivos adicionales sirven de acuerdo con la invención para el enlace covalente de uno o más lípidos. De acuerdo con la primera realización, por tanto, una molécula de ARN según la invención como se define anteriormente se puede enlazar *vía* un
 5 enlazador covalentemente unido preferiblemente a al menos un lípido, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-20, 20-30 o más lípido(s), particularmente al menos 3-8 o más lípido(s) por molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente. Los lípidos enlazados se pueden así enlazar separadamente entre sí en diferentes posiciones de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente, o pueden estar presentes en forma de un complejo en una o más posiciones de la molécula de ARN según la
 10 invención como se define anteriormente. Un grupo reactivo adicional del enlazador se puede usar para el enlace directo o indirecto (separable) a un material portador, por ejemplo una fase sólida. Enlazadores preferentes de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, glicol, glicerol y derivados de glicerol, 2-aminobutil-1,3-propanodiol y derivados/esqueletos de 2-aminobutil-1,3-propanodiol, enlazadores de pirrolidina o moléculas orgánicas que contienen pirrolidina (en particular para una modificación en el extremo 3'), etc. El glicerol o los derivados de glicerol (ancla C₃) o un derivado/esqueleto de 2-aminobutil-1,3-propanodiol (ancla C₇) se usan de manera particularmente preferente de acuerdo con la invención como enlazadores. Es particularmente preferente un derivado de glicerol (ancla C₃) como enlazador cuando la modificación con lípidos se puede introducir *vía* un enlace éter. Si la modificación con lípidos se va a introducir *vía* una amida o un enlace uretano, es preferente, por ejemplo, un esqueleto 2-aminobutil-1,3-propanodiol (ancla C₇). A este
 20 respecto, la naturaleza del enlace formado entre el enlazador y la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente es preferiblemente tal que es compatible con las condiciones y la química de la amidita, es decir preferiblemente no es un ácido ni una base lábil. Se proporciona preferencia particular a los enlaces que son fácilmente obtenibles de manera sintética y no se hidrolizan por el procedimiento de escisión amoniaca en un proceso de síntesis de ácidos nucleicos. Los enlaces adecuados son en principio todos los enlaces correspondientemente adecuados, preferiblemente enlaces éster, amida, uretano y éter. Además de la buena accesibilidad de los materiales de partida (pocas etapas de síntesis), se da preferencia particular al enlace éter debido a su estabilidad biológica relativamente alta en la hidrólisis enzimática.

De acuerdo con una segunda realización preferente, la (al menos una) molécula de ácido ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se enlaza directamente con al menos un lípido (bifuncional) como se describe anteriormente, es decir empleando un enlazador como se describe anteriormente. En este caso, el lípido (bifuncional) usado de acuerdo con la invención contiene preferiblemente dos grupos reactivos u opcionalmente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más grupos reactivos, un primer grupo reactivo que sirve para enlazar el lípido directa o indirectamente a un material portador aquí descrito y al menos un grupo reactivo adicional que sirve para enlazar una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente. De
 30 acuerdo con la segunda realización, una molécula de ARN según la invención como se define anteriormente puede enlazar por tanto preferiblemente al menos un lípido (directamente sin un enlazador), por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-20, 20-30 o más lípido(s), en particular al menos 3-8 o más lípido(s) por molécula de ARN según la invención como se define anteriormente. Los lípidos enlazados se pueden enlazar separadamente entre sí en diferentes posiciones de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, o pueden estar presentes en forma de un complejo en una o más posiciones de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente. AlteARNtivamente, al menos una molécula de ARN según la invención como se define anteriormente, por ejemplo opcionalmente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30 o más moléculas de ARN según la invención como se define anteriormente, se puede enlazar de acuerdo con la segunda realización a un lípido como se describe anteriormente *vía* sus grupos reactivos. Los lípidos
 35 que se pueden usar para esta segunda realización incluyen en particular aquellos lípidos (bifuncionales) que permiten el acoplamiento (preferiblemente en sus terminales u opcionalmente intermolecularmente), por ejemplo polietilenglicol (PEG) y derivados del mismo, hexaetilenglicol (HEG) y derivados del mismo, alcanodiolos, aminoalcanos, tioalcanos, etc. La naturaleza del enlace entre un lípido (bifuncional) y una molécula de ARN según la invención como se define anteriormente, como se ha indicado, es preferiblemente como se describe para la primera realización preferente.
 40
 45
 50

De acuerdo con una tercera realización, el enlace entre la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se describe anteriormente y al menos un lípido como se describe anteriormente puede tener lugar *vía* las dos realizaciones mencionadas de manera simultánea. Por ejemplo, la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente se pueden enlazar en una posición del ácido nucleico con al menos un lípido *vía* un enlazador (análogamente a la primera realización) y en una posición diferente de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente directamente con al menos un lípido sin un enlazante (análogamente a la segunda realización). Por ejemplo, en el extremo 3' de una molécula de ARN según la invención como se define anteriormente, se puede enlazar al menos un lípido como se describe anteriormente covalentemente con el ARN *vía* un enlazante, y en el extremo 5' de la molécula de ARN según la invención, se puede enlazar un lípido como se describe anteriormente covalentemente con el ARN sin enlazador. AlteARNtivamente, en el extremo 5' de una molécula de ARN según la invención como se define anteriormente se puede enlazar al menos un lípido como se describe anteriormente covalentemente con la molécula de ácido nucleico *vía* un enlazador, y en el extremo 3' de la molécula ARN según la invención como
 55
 60

se define anteriormente se puede enlazar un lípido como se describe anteriormente covalentemente con la molécula de ácido nucleico sin enlazador. Del mismo modo, el enlace covalente puede tener lugar no sólo en los terminales de la molécula de ARN de la invención como se define anteriormente, sino también intramolecularmente, como se describe anteriormente, por ejemplo en el extremo 3' e intramolecularmente en el extremo 5' e intramolecularmente en el extremo 3' y 5' e intramolecularmente, solo intramolecularmente, etc.

La molécula de ARN modificada con lípido de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede obtener preferiblemente mediante varios procesos. La modificación con lípidos puede en principio – como se define anteriormente – ser introducida en cualquier posición de la molécula de ARN la invención como se define anteriormente, por ejemplo en los extremos 3' y/o 5' o en el esqueleto fosfato de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente y/o en cualquier base o en el azúcar de cualquier nucleótido de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente. De acuerdo con la invención, son preferentes las modificaciones de lípidos terminales en los extremos 3' y/o 5' de los de acuerdo con la invención como se define anteriormente. Mediante esta modificación química terminal es posible de acuerdo con la invención obtener un gran número de moléculas de ácidos nucleicos diferentemente derivados. El proceso para preparar estas moléculas de ARN modificadas con lípidos de acuerdo con la invención como se define anteriormente se selecciona preferiblemente dependiendo de la posición de la modificación con lípidos.

Si, por ejemplo, la modificación con lípidos tiene lugar en el extremo 3' de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, entonces la modificación con lípidos se lleva a cabo típicamente antes o después de preparar la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente. La preparación de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente se puede llevar a cabo mediante síntesis directa del ácido nucleico u opcionalmente mediante la adición de un ácido nucleico ya sintetizado o un ácido nucleico de muestras aisladas de otras fuentes.

De acuerdo con una primera *alteARNtiva*, la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente se sintetiza directamente antes de introducir el lípido, típicamente mediante procesos conocidos en la técnica anterior para la síntesis de ácidos nucleicos. Para ello, un nucleótido (nucleósido) de partida se enlaza preferiblemente a una fase sólida, por ejemplo *vía* una molécula de acoplamiento, por ejemplo un residuo succinilo, y la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se sintetiza, por ejemplo mediante el proceso de la química de amidita. Entonces se enlaza un enlazador como se describe anteriormente aquí covalentemente, preferiblemente *vía* un primer grupo reactivo del enlazador, al extremo 3' de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente. Un lípido como se describe aquí se puede entonces enlazar covalentemente con el enlazador *vía* de segundo grupo reactivo del enlazador. *AlteARNtivamente*, el enlazador se puede enlazar covalentemente con el lípido antes de ese enlace al extremo 3' de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente. En este caso, sólo es necesario el enlace de un primer grupo reactivo del enlazador con el extremo 3' de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente. Después de la síntesis de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, o después del enlace del lípido, la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente se puede separar de la fase sólida y desproteger. Si la síntesis se ha llevado a cabo en solución, se puede llevar a cabo una etapa de lavado y purificación para eliminar reactivos no reaccionados así como también disolventes y productos secundarios no deseados después de la síntesis de la molécula de ARN modificada con lípido de acuerdo con la invención (y opcionalmente antes de la separación del material portador).

De acuerdo con una *alteARNtiva* adicional, se sintetiza una molécula de ARN modificada con lípido 3' de acuerdo con la invención como se define anteriormente después de introducir el lípido sobre un grupo reactivo del enlazador o se enlaza al grupo reactivo del enlazador como una molécula de ARN ya sintetizada de acuerdo con la invención como se define anteriormente. Para ello, por ejemplo, un primer grupo reactivo de un enlazador como se describe anteriormente se puede hacer reaccionar con un lípido como se describe aquí anteriormente. Después, preferiblemente en una segunda etapa, un segundo grupo reactivo del enlazador se proporciona con un grupo de protección estable en ácido, por ejemplo DMT, Fmoc, etc., a fin de permitir el enlace subsecuente de la molécula de acuerdo con la invención como se define anteriormente para ese grupo reactivo. El enlazador luego se puede enlazar directa o indirectamente a una fase sólida *vía* un tercer grupo reactivo. Es posible el enlace indirecto, por ejemplo, *vía* una molécula (acoplamiento) que se puede enlazar tanto covalentemente a la ligadura como a la fase sólida. Esta molécula (acoplamiento) es, por ejemplo, un residuo succinilo, etc., como se describe aquí anteriormente. La eliminación del grupo protector en el tercer grupo reactivo del enlazador y el enlace o síntesis de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente en el grupo reactivo que ahora es accesible tiene lugar de la forma usual. Finalmente, la molécula de ácido nucleico modificada con lípido de acuerdo con la invención se escinde típicamente del material portador (y los grupos protectores del ácido nucleico se eliminan opcionalmente). Sin embargo, un lípido adicional también se puede acoplar opcionalmente al extremo 3' de la molécula de ARN acoplada de acuerdo con la invención, preferiblemente según una de las etapas descritas aquí anteriormente.

De acuerdo con una variante de esta *alteARNtiva* mencionada anteriormente, un enlazador como se describe anteriormente se puede enlazar directa o indirectamente a una fase sólida *vía* un primer grupo reactivo. Un grupo de protección estable en ácido se enlaza entonces primero a un segundo grupo reactivo del enlazador. Después del enlace del grupo protector al segundo grupo reactivo, un lípido como se describe anteriormente primero se enlaza a un tercer grupo reactivo del enlazador. Del mismo modo se lleva a cabo preferiblemente la eliminación del grupo protector en el tercer grupo reactivo del enlazador, el enlace o síntesis de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente en el grupo reactivo que ahora es accesible, y la escisión de la molécula de ácido nucleico modificada con lípido de acuerdo con la invención del material portador (y opcionalmente la eliminación de los grupos protectores en el ácido nucleico).

De acuerdo con una modalidad particularmente preferente de la modificación del lípido 3' de una molécula de ARN según la invención como se define anteriormente, esta molécula de ARN modificada con lípidos de acuerdo con la invención se puede sintetizar *vía* un enlazador que tiene tres grupos reactivos (un compuesto ancla trifuncional) en base a una sustancia fundamental de glicerol (ancla C₃) y que tiene un lípido monofuncional, por ejemplo un residuo palmitilo, colesterol o tocoferol. Como material de partida para la síntesis del enlazador se puede emplear, por ejemplo, alfa, beta-isopropilidenglicerol (un glicerol que contiene un grupo protector cetil), que preferiblemente primero se convierte en alcoholato con hidruro de sodio y se hace reaccionar con bromuro de hexadecilo y un lípido en una síntesis de Williamson para formar el éter correspondiente. *AlteARNtivamente*, el enlace éter se puede enlazar en la primera etapa mediante un método diferente, por ejemplo mediante la formación de un tosilato de α,β -isopropilidenglicerol, y la reacción del tosilato con el grupo reactivo de un lípido, por ejemplo un protón ácido, para formar el éter correspondiente. En una segunda etapa, el grupo protector cetil se puede eliminar con un ácido, por ejemplo ácido acético, ácido clorhídrico diluido, etc., y luego el grupo hidroxilo primario del diol se puede proteger selectivamente con cloruro de dimetoxitritilo (DMT-Cl). En la última etapa, la reacción del producto obtenido en la etapa anterior con anhídrido succínico se lleva a cabo preferiblemente para formar el succinato con DMAP como catalizador. Este enlazador es particularmente adecuado, por ejemplo, para el enlace de residuos palmitilo o tocoferol como lípido.

De acuerdo con otra *alteARNtiva*, la modificación con lípidos 3' de una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, se efectúa usando un lípido (bifuncional), por ejemplo polietilenglicol (PEG) o hexaetilenglicol (HEG), sin usar un enlazador como se describe anteriormente. Estos lípidos bifuncionales tienen típicamente dos grupos funcionales como se describe anteriormente, donde un extremo el lípido bifuncional se puede enlazar preferiblemente al material portador *vía* una molécula (acoplamiento), por ejemplo un ancla succilobase lábil, etc., como se describe aquí, y la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede sintetizar en el otro extremo del lípido bifuncional (E. Bayer, M. Maier, K. Bleicher, H.-J. Gaus *Z. Naturforsch.* 50b (1995) 671). Por la omisión de la tercera funcionalización y de un enlazador, respectivamente, como se usa anteriormente aquí, la síntesis de esta molécula de ARN modificada con lípido de acuerdo con la invención se simplifica. Para la preparación, el lípido bifuncional usado según la invención, por ejemplo polietilenglicol, primero se mono sustituye típicamente con un grupo protector, por ejemplo DMT. En una segunda etapa, la esterificación del lípido protegido en un grupo reactivo se lleva a cabo usualmente con anhídrido succínico, con catálisis de DMAP, para formar el succinato. Después, en una tercera etapa, el lípido bifuncional se puede acoplar a un material portador y desproteger, después de lo cual la síntesis de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente tiene lugar en una cuarta etapa según un proceso como se describe anteriormente aquí. Opcionalmente luego se llevan a cabo la desprotección de la molécula de ARN sintetizada de acuerdo con la invención como se define anteriormente y la escisión del ARN modificado con lípido del material portador.

De acuerdo con otra realización preferente, la modificación con lípido de una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente tiene lugar en el extremo 5' del ARN. La modificación con lípido se lleva a cabo entonces típicamente después de la provisión o después de la síntesis de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente. La provisión de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede llevar a cabo - como se define anteriormente - *vía* una síntesis directa de la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente o mediante la adición de una molécula de ARN ya sintetizada según la invención como se define anteriormente. Preferentemente, la síntesis de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente tiene lugar de manera análoga al método anteriormente descrito, de acuerdo con los procesos de síntesis de ácido nucleico conocidos en la técnica anterior, en especial de acuerdo con el proceso de fosforamidita.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, la modificación con lípidos de una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente tiene lugar en el extremo 5' de la molécula de ARN de acuerdo con la invención mediante fosforamiditas especialmente modificadas después de un proceso de fosforamidita para la síntesis del ARN. Estas amiditas, que se obtienen fácilmente mediante síntesis, se acoplan convenientemente a al menos un monómero comercialmente disponible o a un ácido nucleico ya

5 sintetizado. Estas reacciones se distinguen por una mejor cinética rápida de reacción y rendimientos de acoplamientos muy altos. La síntesis de las amiditas modificadas tiene lugar preferiblemente por la reacción de una fosforamidita, por ejemplo beta-cianoetil-monoclorofosforamidita (mono-(2-cianoetil éster)-diisopropilamida cloruro de ácido fosforoso), con un alcohol, disuelto en un disolvente adecuado, por ejemplo en diclorometano absoluto, con un lípido tal como se describe anteriormente, por ejemplo un alcohol lipídico de tocoferol, colesterol, hexadecanol, DMT-PEG, etc. Del mismo modo preferiblemente, el DIPEA se agrega a la solución de reacción como aceptor ácido.

10 Estas fosforamiditas utilizadas para la síntesis de las moléculas de ARN modificadas con lípidos en 5' de acuerdo con la invención son relativamente resistentes a la hidrólisis y se pueden purificar (antes de la síntesis) por cromatografía con gel de sílice. Para ello, una pequeña cantidad de una base débil, por ejemplo trietilamina, se agrega típicamente al eluyente a fin de evitar la descomposición de la amidita. Es importante que esta base se elimine completamente del producto otra vez para evitar rendimientos de acoplamiento deficientes. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante secado simple en vacío, pero preferiblemente mediante purificación de las fosforamiditas por precipitación con metil *tert*-butil éter usando pentano. Si las amiditas modificadas con lípido usadas tienen una viscosidad muy alta, por ejemplo están presentes en forma de un aceite viscoso, también se puede llevar a cabo una cromatografía de columna (rápida), que hace posible dispensarse con trietilamina como base. Sin embargo, esta purificación no se lleva a cabo típicamente en el caso de las amiditas modificadas con PEG debido a que contienen el grupo protector DMT ácido lábil.

20 Para la reacción de acoplamiento de las fosforamiditas modificadas con lípido en el extremo 5' de una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se usan preferiblemente aquellos disolventes en los que las amiditas usadas son suficientemente solubles. Por ejemplo, debido a la alta lipofilia de las amiditas usadas de acuerdo con la invención, su solubilidad en acetonitrilo puede ser limitada. Además del acetonitrilo como disolvente típico, preferentemente se emplea una solución de hidrocarburos clorados para las reacciones de acoplamiento, por ejemplo una solución 0,1M en diclorometano (absoluto). Sin embargo, el uso de diclorometano requiere algunos cambios en el protocolo estándar del ciclo de síntesis. Por ejemplo, a fin de evitar la precipitación de la amidita en los tubos del dispositivo de síntesis automática y en el material portador, todas las válvulas y tubos que entran en contacto con la amidita se lavan a chorro con diclorometano (absoluto) antes y después de la etapa de acoplamiento actual y se secan por soplado.

30 Cuando se usan las amiditas modificadas con lípidos, típicamente se obtienen altos rendimientos de acoplamiento, comparables con el rendimiento de acoplamiento de las amiditas usadas convencionalmente en la técnica anterior. La cinética de la reacción de las amiditas modificadas con lípidos generalmente es más lenta. Por ello, los tiempos de acoplamiento se prolongan preferiblemente (notablemente) cuando se usan las amiditas modificadas con lípidos, en comparación con los protocolos estándar. Estos tiempos de acoplamiento pueden ser determinados fácilmente por el experto en la materia. Debido a que se puede omitir una etapa de terminación después del acoplamiento, es también posible, si se requiere, llevar a cabo un ciclo de síntesis adicional con la misma amidita modificada con lípido para incrementar el rendimiento total de la reacción. En este caso, la etapa de destrilación normalmente no se lleva a cabo, por ejemplo en caso de los lípidos modificados con DMT tal como DMT-PEG.

40 En las síntesis de las moléculas de ARN modificadas con lípido en 5' de acuerdo con la invención, la vía del triéster fosfito por la cual el lípido se enlaza a la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede oxidar mediante un agente de sulfuración. Para ello, se usa preferiblemente un agente de sulfuración que logra la oxidación del fosfotriéster tan completamente como sea posible. De otra manera, la reacción de sulfuración, por ejemplo por razones estéricas, puede entonces proceder incompletamente, ya que se obtiene sólo una cantidad pequeña de producto o nada de producto en absoluto después de la escisión amoniacal y la desprotección del MON. Este fenómeno es dependiente del tipo de modificación, el agente de sulfuración usado y las condiciones de sulfuración. Así, la oxidación se lleva a cabo preferiblemente con yodo. Como resultado, aunque se introduce un enlace fosfodiéster, no se debe esperar que, debido a la proximidad del residuo lipídico, este enlace sea reconocido como sustrato por las nucleasas.

55 En una modificación con lípidos, los enlazadores o lípidos (bifuncionales) contenidos en la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, u opcionalmente la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente por sí misma, puede, como se describe aquí anteriormente, acoplarse directa o indirectamente a un material portador. El acoplamiento directo se lleva a cabo preferiblemente de manera directa con el material portador, mientras que el acoplamiento indirecto al material portador se lleva a cabo típicamente vía una molécula adicional (acoplamiento). El enlace formado por el acoplamiento a un material portador es preferiblemente un enlace covalente (separable) con el enlazador o el lípido bifuncional y/o un enlace covalente (separable) con la fase sólida. Compuestos adecuados como moléculas (acoplamiento) son, por ejemplo, ácidos dicarboxílicos, por ejemplo residuos succinilo (= anclas succinilo), residuos de oxalilo (= anclas oxalilo), etc. Los enlazadores, lípidos (bifuncionales) u opcionalmente

moléculas de ARN de acuerdo con la invención como se definen anteriormente que, como por ejemplo, los residuos aminoalquilo (por ejemplo residuos aminopropilo o aminohexanilo), portan una función amino libre, se pueden enlazar al material portador *vía* un enlazador ftalamida. Los enlazadores que contienen tiol, lípidos (bifuncionales) u opcionalmente moléculas de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se puede enlazar en la forma disulfuro al material portador. Materiales portadores adecuados en relación con la invención son, en particular, fases solidas tales como CPG, Tentagel[®], PS-PEG amino-funcionalizado (Tentagel[®] S NH₂), etc., preferiblemente Tentagel[®] o PS-PEG amino-funcionalizado ((Tentagel[®] S NH₂). De acuerdo con una realización particular, para el acoplamiento a un material portador es posible acoplar, por ejemplo, los succinatos de los enlazadores descritos o de los lípidos bifuncionales usados de acuerdo con la invención, preferiblemente TBTU/NMM (tetrafluoroborato de 1H-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio/N-metilmorfolina) como reactivo de acoplamiento, al PS-PEG aminofuncionalizado (Tentagel^{MR} S NH₂). En el caso de los materiales portadores PS-PEG en la escala de 1 μ mol convencionalmente empleados, los mejores resultados se obtienen típicamente con cargas de 50 a 100 μ mol/g (E. Bayer, K. Bleicher, M. Maier *Z. Naturforsch.* 50b (1995) 1096). Si, sin embargo, los nucleótidos se van a sintetizar sobre a gran escala de acuerdo con la invención, la carga de los materiales portadores es preferiblemente tan alta como sea posible ($\geq 100 \mu$ mol). De acuerdo con la invención, también este proceso da resultados con buenos rendimientos de acoplamiento (M. Gerster, M. Maier, N. Clausen, J. Schewitz, E. Bayer *Z. Naturforsch.* 52b (1997) 110). Por ejemplo, los materiales portadores tales como, por ejemplo, resinas con una carga de hasta 138 μ mol/g u opcionalmente más se pueden usar con buenos rendimientos de síntesis. Debido a que los rendimientos de acoplamiento con los enlazadores descritos anteriormente o los lípidos bifuncionales son aproximadamente 100%, la carga del material portador se puede ajustar de manera relativamente precisa *vía* la estequiometría de estos compuestos. La carga se controla preferiblemente por cuantificación espectroscópica del grupo protector DMT escindido (véase la parte experimental). Las funciones amino residuales aún presentes en el material portador se pueden terminar con anhídrido acético. Esta terminación se lleva a cabo normalmente después de la carga del material portador, pero también puede tener lugar directamente en la síntesis del ácido nucleico, por ejemplo en un sintetizador de ADN. Para las síntesis de ácidos nucleicos modificados con lípidos en los materiales portadores de PS-PEG derivados se usan preferiblemente ciclos de síntesis desarrollados específicamente para el Tentagel^{MR} que tienen en cuenta las propiedades características del material (E. Bayer, M. Maier, K. Bleicher, H.-J. Gaus *Z. Naturforsch.* 50b (1995) 671, E. Bayer, K. Bleicher, M. Maier *Z. Naturforsch.* 50b (1995) 1096.). Cambios preferentes en comparación con el protocolo estándar incluyen:

- Tiempos de reacción prolongados en las etapas de acoplamiento, terminación y oxidación;
- Mayor número de etapas de destrilación;
- Etapas de lavado prolongadas después de cada etapa;
- Uso de una solución de lavado que contiene ácido ascórbico (0,1M en dioxano/agua = 9:1) después de la etapa de oxidación normalmente necesaria (para la oxidación del fosfito triéster) durante el proceso de amidita para eliminar trazas de yodo.

Se debe observar que la naturaleza de la modificación puede tener influencia en las etapas individuales del ciclo de síntesis. Por ejemplo, en el caso de los materiales portadores derivados con PEG₁₅₀₀, se observa una cinética de reacción considerablemente lenta, que requiere que las etapas de destrilación se prolonguen nuevamente así como el tiempo de acoplamiento. Estos cambios y adaptaciones están dentro del alcance de la capacidad normal del experto en la materia y se puede llevar a cabo en cualquier momento dentro del contexto de la presente descripción. Con estos ciclos de reacción así modificados, se pueden sintetizar tanto los fosforodiestéres como los fosforotiatos modificados con lípidos. Los rendimientos de acoplamiento de las amiditas en los enlazadores o lípidos bifuncionales usados de acuerdo con la invención no empeoran con los residuos de lípido, sino que se corresponden con valores convencionales (97-99%). La posibilidad de la derivatización 5' y la introducción de modificaciones adicionales, por ejemplo en la base, azúcar o cadena principal fosfato, se mantiene cuando se usan estas modificaciones 3'.

La molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente como ARN químicamente no modificado o como ARN (químicamente) modificado, por ejemplo como una molécula de ARN modificada con lípido de acuerdo con la invención como se define anteriormente, también se puede estabilizar formando un complejo de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, por ejemplo, sin que limitarse a, con un polímero catiónico, péptidos catiónicos o polipéptidos, preferiblemente con un polímero policatiónico tal como polilisina o poliarginina o alteARNtivamente con lípidos catiónicos o lipofectantes, con una histona, una nucleolina, protamina, oligofectamina, espermina o espermidina, y polisacáridos catiónicos, en particular quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, plurónicos, y/o derivados de los mismos, etc.. Las histonas y protaminas son proteínas catiónicas que compactan naturalmente el ADN. Así, son responsables *in vivo* de la condensación del ADN no transcrito y del ADN de ciertos virus. Como histonas a emplear en el contexto de la presente invención para formar un complejo con la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se pueden mencionar en particular las histonas H1, H2a, H3 y H4. Sin embargo, son específicamente preferentes la protamina (protamina P1 o P2) o secuencias parciales catiónicas de protamina. En el contexto de la presente invención, el compuesto se puede representar ventajosamente por una secuencia de péptidos derivada de la protamina P1 o P2, y más

precisamente correspondiente a la secuencia (catiónica) (SRSRYRQRQRSRRRRRR (SEQ ID NO: 109) o RRLHRIHRRQHRSCRRRKRR (SEQ ID NO: 110). Otros compuestos adecuados para formar complejos con la molécula de ARN según la invención como se define anteriormente se pueden seleccionar de los compuestos adyuvantes tal como se definen aquí, sin limitarse a los mismos.

5 En este contexto, "formar un complejo" significa que la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente se enlaza a un compuesto estabilizante como se define anteriormente, por ejemplo un polímero catiónico, péptidos catiónicos o polipéptidos, etc., formando un complejo no covalente entre el ácido nucleico y el compuesto estabilizante. Aquí, "no covalente" significa que se forma una asociación reversible del ácido nucleico y el compuesto estabilizante por interacciones no covalentes de estas moléculas, donde las moléculas se asocian por algún tipo de interacción de electrones diferente a un enlace covalente, por ejemplo por enlaces de van der Waals, es decir por atracción electrostática débil que surge de una fuerza atractiva no específica entre ambas moléculas. La asociación de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente y el compuesto estabilizante está en equilibrio con la disociación de este complejo. Sin limitarse a una teoría, se espera que el equilibrio se desplace intracelularmente hacia la molécula de ARN disociada de acuerdo con la invención como se define anteriormente y el compuesto estabilizante.

De acuerdo con una realización, la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente pueden ser un agente inmunoestimulante si se administra sin ningún otro compuesto farmacéuticamente activo, o se puede usar como adyuvante si se administra junto con un componente farmacéuticamente activo, por ejemplo como una composición que contiene tanto el componente farmacéuticamente activo como el componente adyuvante (por ejemplo una composición de vacuna que contiene un antígeno específico y una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente como adyuvante).

Preferentemente, una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente como "agente inmunoestimulante" es capaz de desencadenar una reacción inmunitaria antigénico-específica (como se proporciona por el sistema inmunitario innato), preferiblemente de manera inmunoestimulante. Una reacción inmune se puede producir generalmente de varias formas. Un factor importante para una respuesta inmune adecuada es la estimulación de subpoblaciones de células T diferentes. Los linfocitos T se diferencian típicamente en dos subpoblaciones, las células T colaboradoras 1 (Th1) y las células T colaboradoras 2 (Th2), con lo cual el sistema inmunitario es capaz de destruir los patógenos intracelulares (Th1) y extracelulares (Th2) (por ejemplo antígenos). Las dos poblaciones de células Th difieren en el patrón de proteínas efectoras (citoquinas) producidas por ellos. Así, las células Th1 asisten a la respuesta inmunitaria celular por la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otra parte, promueven la respuesta inmunitaria humoral por la estimulación de células B para la conversión en células de plasma y por la formación de anticuerpos (por ejemplo contra antígenos). Por tanto, la relación Th1/Th2 es de gran importancia en la respuesta inmune. En conexión con la presente invención, la relación Th1/Th2 de la respuesta inmune preferiblemente está desplazada por el agente inmunoestimulante, es decir por la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, en dirección a la respuesta celular, es decir la respuesta Th1, induciéndose así en consecuencia una respuesta inmunitaria predominantemente celular. Como se define anteriormente, las moléculas de ARN de la invención ejercen por sí mismas una respuesta inmune inespecífica que permite que el ARN se use como tal (sin agregar otro componente farmacéuticamente activo) como agente inmunoestimulador. Si se administra junto con otro componente farmacéuticamente activo, preferiblemente un componente específicamente inmunoestimulador, el ARN de la invención sirve como adyuvante que soporta la respuesta inmune específica inducida por el otro componente farmacéuticamente activo.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen al menos una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible) y/o sustancias auxiliares adicionales y aditivos y/o adyuvantes (primera realización de una composición inventiva). Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen al menos una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, por ejemplo una, dos, tres, cuatro, seis, siete o más moléculas de ARN, un componente farmacéuticamente activo y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o sustancias auxiliares adicionales y aditivos y/o adyuvantes (segunda realización de una composición inventiva).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden típicamente una cantidad segura y efectiva de al menos una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, o una, dos, tres, cuatro, seis, siete o más moléculas de ARN. Como se usa aquí, "cantidad segura y efectiva" se refiere a una cantidad de cada una o de todas las moléculas de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente en la composición que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una condición a tratar, por ejemplo un tumor, enfermedades autoinmunes,

alergias o enfermedades infecciosas, etc. Al mismo tiempo, sin embargo, una “cantidad segura y efectiva” es lo suficientemente pequeña para evitar efectos secundarios serios, esto es permite una relación sensible entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites típicamente cae dentro del alcance del juicio médico sensible. En relación con la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, la expresión “cantidad segura y efectiva” se refiere preferiblemente una cantidad que es adecuada para estimular el sistema inmune de manera que no se produzcan reacciones inmunitarias excesivas o dañinas pero que, preferiblemente, tampoco estas reacciones inmunitarias estén por debajo de un nivel medible. Una “cantidad segura y efectiva” de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente variará dependiendo de la condición particular a tratar y también de la edad y condición física del paciente a tratar, de la gravedad de la condición, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia acompañante, del vehículo farmacéuticamente aceptable particular usado y de factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del clínico. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden usar de acuerdo con la invención para humanos y también para propósitos médicos veterinarios.

De acuerdo con la primera realización, la molécula de ARN descrita anteriormente según la invención como se define anteriormente por sí misma puede ser el agente inmunoestimulador (sin adición de ninguno otro componente farmacéuticamente activo). Esto es así, en particular, si la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente contiene una modificación con lípidos. El lípido puede mejorar las propiedades inmunoestimuladoras de las moléculas de ARN inventivas o pueden formar bien una molécula terapéuticamente activa, tal como, por ejemplo, una vitamina o esteroide, como se describe anteriormente, por ejemplo alfa-tocoferol (vitamina E), D-alfa-tocoferol, L-alfa-tocoferol, D,L-alfa-tocoferol, succinato de vitamina E (VES), vitamina A y sus derivados, vitamina D y sus derivados, vitamina K y sus derivados, etc. La composición farmacéutica de acuerdo con la segunda realización de la invención puede contener (además de la al menos una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente) al menos un componente farmacéuticamente activo adicional. A este respecto, un componente farmacéuticamente activo es un compuesto que tiene un efecto terapéutico contra una indicación particular, preferiblemente enfermedades de cáncer, autoinmunes, alergias o enfermedades infecciosas. Estos compuestos incluyen, sin implicar ninguna limitación, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, compuestos orgánicos o inorgánicos de peso molecular bajo (terapéuticamente activos) (peso molecular inferior a 5.000, preferiblemente inferior a 1.000), azúcares, antígenos o anticuerpos, agentes terapéuticos ya conocidos en la técnica anterior, células antigénicas, fragmentos celulares antigénicos, fracciones celulares; patógenos (virus, bacterias, etc.) modificados, atenuados o desactivados (por ejemplo químicamente o por irradiación), etc.

De acuerdo con una primera realización de la segunda realización (de una composición de acuerdo con la invención), el componente farmacéuticamente activo contenido en la composición farmacéutica es un componente inmunomodulador, preferiblemente un componente inmunoestimulador. Más preferiblemente, el componente farmacéuticamente activo es un antígeno o inmunógeno. Se entiende por “antígeno” e “inmunógeno” cualquier estructura que es capaz de llevar a cabo la formación de anticuerpos y/o la activación de una respuesta inmunitaria celular, es decir una respuesta inmune específica (y no un adyuvante) de acuerdo con la invención. Por tanto, los términos “antígeno” y “inmunógeno” se usan como sinónimos. Ejemplos de antígenos son péptidos, polipéptidos, es decir también proteínas, células, extractos celulares, polisacáridos, conjugados de polisacárido, lípidos, glicolípidos y carbohidratos. Entran en consideración como antígenos, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos animales, de plantas, virales, bacterianos, fúngicos y protozoológicos, antígenos autoinmunes o alérgenos. Se da preferencia a los antígenos superficiales de células tumorales y antígenos superficiales, en particular formas secretadas, de patógenos virales, bacterianos, fúngicos o protozoológicos. El antígeno puede, por supuesto, estar presente, por ejemplo en una vacuna de acuerdo con la invención, también como un hapteno acoplado a un portador adecuado. Otros componentes antigénicos, por ejemplo patógenos desactivados o atenuados (como se describe anteriormente) también se pueden usar.

Los (poli)péptidos antigénicos incluyen todos los péptidos antigénicos conocidos, por ejemplo antígenos tumorales, etc. Ejemplos específicos de antígenos tumorales son *inter alia* antígenos superficiales específicos de tumor (TSSAs), por ejemplo 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinina-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-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, proteína similar a coactosina, collage XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, 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, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201-R17I, HLA-A11/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-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmadura, kaliceína-2, kaliceína-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, MC1R, 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, NFYC/m, 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, PAI-1, PAI-2, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-Cinasa, Pin-1, Pml/PARalfa, POTE, PRAME, PRDX5/m, prosteína, 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-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGFbeta, TGFbetaRII, 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. Cualquier clase de antígeno tumoral es adecuada para el propósito de la presente invención, por ejemplo antígenos tumorales conocidos implicados en la neovascularización, que afectan a la estructura de la matriz extracelular, etc. Los antígenos tumorales se pueden proporcionar en la composición farmacéutica como proteína o antígeno de péptido o como ARNm o ADN que codifica con antígenos tumorales o epítomos de los mismos, preferiblemente los antígenos tumorales anteriores.

Mediante una segunda alteARNtiva de la segunda realización (para una composición de acuerdo con la invención que contiene el ARN inventivo (como adyuvante) y el componente farmacéuticamente activo adicional), el componente farmacéuticamente activo es un anticuerpo. A este respecto, se puede usar cualquier anticuerpo terapéuticamente adecuado. Se da preferencia particular de acuerdo con la invención a un anticuerpo dirigido contra antígenos, proteínas o ácidos nucleicos que desempeñan una parte importante en las enfermedades cancerosas o infecciosas, por ejemplo proteínas superficiales celulares, genes supresores de tumor o inhibidores de los mismos, factores de crecimiento y alargamiento, proteínas relevantes de apoptosis, antígenos tumorales, o antígenos como se describe anteriormente en este documento, et.

De acuerdo con una tercera alteARNtiva de la segunda realización, el componente farmacéuticamente activo contenido en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es un ácido nucleico. Este ácido nucleico puede ser monohebra o de doble hebra y puede estar en la forma de un homo- o hetero-dúplex y también en forma lineal o circular. Un ácido nucleico contenido como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica no se limita en términos de su longitud y puede incluir cualquier secuencia de ácidos nucleicos de origen natural o su complemento o un fragmento de la misma. Del mismo modo, el ácido nucleico usado a este respecto puede ser parcial o completamente de naturaleza sintética. Por ejemplo, el ácido nucleico puede incluir un ácido nucleico que codifica una proteína (terapéuticamente relevante) y/o que es capaz de llevar a cabo una reacción inmunitaria, por ejemplo un antígeno o un ácido nucleico que codifica un antígeno. Aquí, un antígeno es preferiblemente un antígeno como se describe anteriormente en este documento.

Preferiblemente, el ácido nucleico contenido como un componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es un ARNm. Este ARNm se puede agregar en su forma desnuda a la composición farmacéutica de acuerdo con la invención o en una forma estabilizada que reduce o incluso previene la degradación del ácido nucleico *in vivo*, por ejemplo por exo- y/o endo-nucleasas.

Por ejemplo, el ARNm contenido como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede estabilizar por una terminación 5' definida anteriormente, y alteARNtivamente o adicionalmente por una cola poli-A y/o una cola poli-C en el extremo 3' de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente al menos 70 nucleótidos, más preferiblemente al menos 100 nucleótidos, particularmente al menos 200 nucleótidos. Como se ha mencionado, la estructura terminal es de importancia crítica *in vivo*. El ARN se reconoce como ARNm vía estas estructuras y se regula la degradación. Además, sin embargo, existen procesos adicionales que estabilizan o desestabilizan el ARN. Muchos de estos aún son desconocidos, pero una interacción entre el ARN y las proteínas con frecuencia parece decisiva. Por ejemplo, se ha descrito recientemente un "sistema de vigilancia de ARNm" (Hellerin y Parker, Ann. Rev. Genet. 1999, 33: 229 a 260) donde el ARNm incompleto o sin sentido se reconoce por las interacciones de proteínas de retroalimentación particulares en el citosol y se hace tratable para la degradación, la mayoría de estos procesos son llevados a cabo por exonucleasas.

La estabilización del ARNm contenido como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también se puede llevar a cabo asociando o formando un complejo del ARNm con, o enlazado a, un compuesto catiónico, en particular un compuesto policatiónico, por ejemplo un péptido (poli)catiónico o proteína. En particular el uso de protamina, nucleolina, espermina o espermidina como proteína policatiónica (enlace de ácido nucleico) es particularmente efectivo. Adicionalmente también es posible el uso de otros péptidos o proteínas catiónicas, tal como poli-L-lisina o histonas. Este procedimiento para estabilizar el ARNm se describe en el documento EP-A-1083232. Sustancias catiónicas

preferidas adicionales que se pueden usar para estabilizar el ARNm presente como componente farmacéuticamente activo incluyen compuestos catiónicos tales como los dados a conocer aquí en relación con los adyuvantes que son adecuados para el depósito y el suministro de la molécula de ARN inventiva, por ejemplo polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polietilénimina (PEI) o poli-L-lisina (PLL), etc. Además de la acción de la molécula de ARN modificada con lípido en la forma de un adyuvante en la mejora de la permeabilidad celular, lo cual es ventajoso, la asociación y formación de complejo de ARNm con compuestos catiónicos, por ejemplo proteínas catiónicas o lípidos catiónicos, por ejemplo oligofectamina como un reactivo formador de complejos basado en lípido, incrementa preferiblemente la transferencia del ARNm presente como componente farmacéuticamente activo dentro de las células o del organismo a tratar. También se refiere a la descripción aquí con respecto al efecto estabilizador para la molécula de ARN de la invención por la formación de complejos, que es válida para la estabilización del ARNm también.

Otro procedimiento para estabilizar el ARNm como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es el cambio de la secuencia del ARNm eliminando o cambiando los llamados elementos de secuencia desestabilizantes (DSEs). Las proteínas de señal son capaces de enlazarse a estos elementos de secuencia desestabilizantes (DSEs), que ocurren en el ARNm eucariótico en particular y regulan la degradación enzimática del ARNm *in vivo*. Por tanto, con el fin de estabilizar adicionalmente un ARNm presente como componente farmacéuticamente activo, preferiblemente se hacen uno o más cambios en comparación con la región correspondiente del ARNm de tipo silvestre de modo que no están presentes elementos de secuencia desestabilizantes. Por supuesto, también es preferente de acuerdo con la invención eliminar los DSEs presentes opcionalmente en las regiones no traducidas (3'- y/o 5'-UTR) del ARNm. Ejemplos de DSEs anteriores son secuencias ricas en AU ("AURES"), que ocurren en las secciones 3'-UTR de numerosos ARNms inestables (Caput y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1986, 83: 1670 a 1674). Así, el ARNm usado como componente farmacéuticamente activo se modifica preferiblemente en comparación con el ARNm de tipo silvestre de manera que no contiene ninguna de tales secuencias desestabilizantes. Esto también es así en aquellos motivos de secuencia que se reconocen por posibles endonucleasas, por ejemplo la secuencia GAACAAG que está contenida en el segmento 3'-UTR del gen que codifica el receptor de transferina (Binder y *col.*, EMBO J. 1994, 13: 1969 a 1980). Estos motivos de secuencia también se eliminan preferiblemente de la molécula de ARN modificada con lípido de acuerdo con la invención.

El ARNm como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede modificar adicionalmente, por ejemplo para una traducción eficiente que puede ser deseable, de manera que se produce el enlace efectivo de los ribosomas al sitio de enlace ribosomal (secuencia Kozak: GCCGCCACCAUGG (SEQ ID NO: 111), el AUG forma el codón de inicio. Se ha observado a este respecto que un contenido en A/U incrementado alrededor de esta posición permite un enlace de ribosoma más eficiente para el ARNm.

Además, es posible introducir uno o más de los llamados IRES (sitio(s) de entrada de ribosoma interno) (secuencias) en el ARNm usado como componente farmacéuticamente activo. Así, un IRES puede funcionar como el sitio de enlace ribosomal únicamente, pero también puede servir para proporcionar un ARNm que codifica una pluralidad de péptidos o polipéptidos a traducir independientemente entre sí por los ribosomas ("ARN multicistriónico"). Ejemplos de secuencias IRES que se pueden usar de acuerdo con la invención son aquellas de picoARNvirus (por ejemplo FMDV), virus de plagas (CFFV), virus de la polio (PV), virus de encefalomiocarditis (ECMV), virus de pies y boca (FMDV), virus de hepatitis C (HCV), virus de fiebre porcina convencional (CSFV), virus de leucemia murina (MLV), virus de deficiencia inmunitaria del simio (SIV) o virus de parálisis de grillo (CrPV).

El ARNm usado opcionalmente como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también puede contener en sus regiones no traducidas 5'- y/o 3' secuencias estabilizadoras que son capaces de incrementar la vida media del ARNm en el citosol. Estas secuencias estabilizadoras pueden tener un 100% de homología de secuencia con secuencias de origen natural de virus, bacterias y eucariotas, pero también pueden ser parcial o completamente de naturaleza sintética. Como ejemplo de secuencias estabilizadoras que se pueden usar en la presente invención se pueden mencionar las secuencias no traducidas (UTR) del gen de beta-globina, por ejemplo de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*. Otro ejemplo de secuencia estabilizadora tiene la fórmula general (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC (SEQ ID NO: 112), que está contenida en el 3'-UTR del ARNm muy estable que codifica α -globina, alfa-(I)-colágeno, 15-lipoxigenasa o para la tirosina-hidroxilasa (véase Holcik y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1997, 94: 2410 a 2414). Por supuesto, estas secuencias estabilizadoras se pueden usar individualmente o en combinación entre sí, así como también en combinación con otras secuencias estabilizadoras conocidas de experto en la materia.

Con el fin de incrementar adicionalmente una traducción eventualmente deseada, el ARNm usado como componente farmacéuticamente activo puede tener las siguientes modificaciones en comparación con un ARNm de tipo silvestre correspondiente, donde las modificaciones pueden estar presentes como alteraciones o en

combinación entre sí. Por otra parte, el contenido G/C de la región de ARNm modificado que codifica un péptido o polipéptido puede ser mayor que el contenido G/C de la región de codificación del ARNm de tipo silvestre que codifica el péptido o polipéptido, la secuencia de aminoácidos codificada para ser comparada no modificada con el tipo silvestre. Esta modificación se basa en el hecho de que, para una traducción eficiente de un ARNm, la estabilidad del ARNm como tal es crítica. Así, la composición y secuencia de los diversos nucleótidos desempeña una gran papel. En particular, las secuencias que tienen un contenido de G(guanosina (guanina))/C(citidina (citosina)) son más estables que las secuencias que tienen un contenido de A(adenosina (adenina))/U(uridina (uracilo)). De acuerdo con la invención, por lo tanto, a la vez que se mantiene la secuencia de aminoácidos traducida, los codones varían en comparación con el ARNm de tipo silvestre de manera que contienen más nucleótidos G/C. Debido a que los diversos codones codifican el mismo aminoácido (degeneración del código genético) se pueden determinar los codones que son ventajosos para la estabilidad (uso de codón alterativo). En la dependencia del aminoácido que es codificado por el ARNm, son posibles diferentes posibilidades para la modificación de la secuencia de ARNm en comparación con la secuencia de tipo silvestre. En el caso de los aminoácidos codificados por los codones que contienen sólo nucleótidos G o C, no es necesaria la modificación del codón. Por consiguiente, los codones para Pro (CCC o CCG), Arg (CGC o CGG), Ala (GCC o GCG) y Gly (GGC o GGG) no requieren ningún cambio debido a que no están presentes A o U. En los siguientes casos, los codones que contienen los nucleótidos A y/o U se cambian por la sustitución de diferentes codones que codifican los mismos aminoácidos pero no contienen A y/o U. Ejemplos son: los codones para Pro se pueden cambiar de CCU o CCA a CCC o CCG; los codones para Arg se pueden cambiar de CGU o CGA o AGA o AGG a CGC o CGG; los codones para Ala se pueden cambiar de GCU o GCA a GCC o GCG; los codones para Gly se pueden cambiar de GGU o GGA a GGC o GGG. En otros casos, aunque los nucleótidos A y U no se pueden eliminar de los codones, es posible reducir el contenido de A y U empleando codones que contienen pocos nucleótidos A y/o U. Por ejemplo: los codones para Phe se pueden cambiar de UUU a UUC; los codones para Leu se pueden cambiar de UUA, CUU o CUA a CUC o CUG; los codones para Ser se pueden cambiar de UCU o UCA o AGU a UCC, UCG o AGC; el codón para Tyr se pueden cambiar de UAU a UAC; el codón de detención UAA se puede cambiar a UAG o UGA; el codón para Cys se puede cambiar de UGU a UGC; el codón His se puede cambiar de CAU a CAC; el codón para Gln se puede cambiar de CAA a CAG; los codones para Ile se pueden cambiar de AUU o AUA a AUC; los codones para Thr se pueden cambiar de ACU o ACA a ACC o ACG; el codón para Asn se puede cambiar de AAU a AAC; el codón para Lys se puede cambiar de AAA a AAG; los codones para Val se pueden cambiar de GUU o GUA a GUC o GUG; el codón para Asp se puede cambiar de GAU a GAC; el codón para Glu se puede cambiar de GAA a GAG. En este caso de los codones para Met (AUG) y Trp (UGG), por otra parte, no hay posibilidad de modificación de secuencia. Las sustituciones listadas anteriormente se pueden usar, por supuesto, individualmente, pero también en todas las combinaciones posibles para incrementar el contenido G/C del ARNm modificado en comparación con la secuencia original. De esta manera, por ejemplo, todos los codones para Thr que ocurren en la secuencia original (de tipo silvestre) se pueden cambiar a ACC (o ACG). Preferiblemente, sin embargo, se usan las combinaciones de las posibilidades de sustitución anteriores, por ejemplo: sustitución de todos los codones en la secuencia original que codifica Thr a ACC (o ACG) y la sustitución de todos los codones que codifican originalmente Ser a UCC (o UCG o AGC); sustitución de todos los codones en la secuencia original que codifica Ile a AUC y la sustitución de todos los codones que codifican originalmente Lys a AAG y la sustitución de todos los codones que codifican originalmente Tyr a UAC; sustitución de todos los codones en la secuencia original que codifica Val a GUC (o GUG) y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Glu a GAG y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Ala a GCC (o GCG) y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Arg a CGC (o CGG); sustitución de todos los codones en la secuencia original que codifica Val a GUC (o GUG) y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Glu a GAG y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Ala a GCC (o GCG) y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Gly a GGC (o GGG) y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Asn a AAC; sustitución de todos los codones en la secuencia original que codifican Val a GUC (o GUG) y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Phe a UUC y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Cys a UGC y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Leu a CUG (o CUC) y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Gln a CAG y sustitución de todos los codones que codifican originalmente Pro a CCC (o CCG); etc. Preferiblemente, el contenido G/C de la región (o de cada otra sección adicional presente opcionalmente) del ARNm que codifica el péptido o polipéptido se incrementa en al menos 7% puntos, más preferiblemente en al menos 15% puntos, particularmente en al menos 20% puntos, en comparación con el contenido G/C de la región codificada del ARNm de tipo silvestre que codifica el péptido o polipéptido correspondiente y es preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 70% y mucho más preferiblemente al menos un 90%. Es particularmente preferente a este respecto incrementar el contenido G/C del ARNm modificado en comparación con la secuencia de tipo silvestre al máximo grado posible.

Una modificación preferida adicional de un ARNm usado como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica se basa en el descubrimiento en que la eficiencia de traducción también se determina por una frecuencia diferente en la ocurrencia de los ARNts en las células. Si, por tanto, los llamados codones "raros" están presentes en un número incrementado en una secuencia de ARN, entonces el ARNm correspondiente se traduce notablemente más deficientemente que en el caso donde los codones

que codifican los ARNts relativamente “frecuentes” presentes. Así, de acuerdo con la invención, la región de codificación en el ARNm usado como componente farmacéuticamente activo se modifica en comparación con la región correspondiente del ARNm de tipo silvestre de manera que al menos un codón de la secuencia de tipo silvestre que codifica un ARNt relativamente raro en las células se reemplaza por un codón que codifica una ARNt relativamente frecuente en la célula y que lleva el mismo aminoácido como el ARNt relativamente raro. Por medio de esta codificación, las secuencias de ARN son así modificadas de forma que los codones que se introducen están disponibles en los ARNts que ocurren frecuentemente. Los ARNts que ocurren relativamente de manera frecuente en la célula y que, en contraste, son relativamente raros son conocidos del experto en el campo; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666. Por medio de esta modificación es posible de acuerdo con la invención reemplazar todos los codones de la secuencia de tipo silvestre que codifica un ARNt relativamente raro en la célula por un codón que codifica un ARNt relativamente frecuente en la célula y que lleva el mismo aminoácido como el ARNt relativamente raro. Se prefiere particularmente combinar el contenido G/C secuencial, incrementado, en particular máximo, en el ARNm como se describe anteriormente con los codones “frecuentes” sin cambiar la secuencia de aminoácidos de un péptido o polipéptido antigénico (uno o más) codificados por la región de codificación del ARNm. Antígenos preferidos, que se pueden codificar por el ARNm enriquecido/optimizado o G/C, se han citado anteriormente.

De acuerdo con una cuarta alterativa de la segunda realización (para la composición de la presente invención), el ácido nucleico contenido componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es un ARNds, preferiblemente un ARNsi. Un ARNds o un ARNsi es de interés particular en conexión con el fenómeno de interferencia del ARN. Se llamó la atención al fenómeno de la interferencia del ARN en el curso de la investigación inmunológica. En años recientes, se ha descubierto un mecanismo de defensa basado en ARN que ocurre tanto en el reino de los hongos como en el reino de las plantas y animales y actúa como un “sistema inmunitario del genoma”. El sistema de describió originalmente en varias especies independientemente una de otra, primero en *C. elegans*, antes de que fuera posible identificar los mecanismos subyacentes de los procesos por ser idénticos: resistencia a los virus mediada por ARN en plantas, PTGS (silenciación génica postranscripcional) en plantas, e interferencia de ARN en eucariotas se basan por consiguiente en un procedimiento común. La técnica *in vitro* de la interferencia de ARN (ARNi) se basa en las moléculas de ARN de doble hebra (ARNds), las cuales 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 esta transfección de células de mamífero con ARNds largo, la activación de la proteína cinasa R y ARNsaL produce efectos no específicos, tales como, por ejemplo, una respuesta de interferón (Stark y col. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67: 227-264; He and Katze (2002) Viral Immunol. 15: 95-119). Estos efectos no específicos se evitan cuando se usa el llamado ARNsi más corto, por ejemplo 21-a 23-mer, (ARN de interferencia pequeño), debido a que los efectos no específicos no se desencadenan por el ARNsi que es más corto que 30 bp (Elbashir y col. (2001) Nature 411: 494-498). Recientemente, las moléculas de ARNds también se han usado *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).

El ARN de doble hebra (ARNds) usado eventualmente como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención contiene preferiblemente una secuencia que tiene la estructura general 5'-(N₁₇₋₂₉)-3', donde N es cualquier base y representa nucleótidos. La estructura general se compone de un ARN de doble hebra que tiene una macromolécula compuesta de ribonucleótidos, comprendiendo el ribonucleótido una pentosa (ribosa o desoxirribosa), una base orgánica y un fosfato. Las bases orgánicas del ARN en este punto comprenden las bases purínicas adenosina (adenina) (A) y guanosina (guanina) (G) y las bases pirimidínicas citidina (citosina) (C) y uridina (uracilo) (U). El ARNds usado eventualmente como componente farmacéutico activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención contiene estos nucleótidos o análogos de nucleótidos con una estructura orientada. Los ARNds usados como componente farmacéuticamente activo de acuerdo con la invención tienen preferiblemente la estructura general 5'-(N₁₉₋₂₅)-3', más preferiblemente 5'-(N₁₉₋₂₄)-3', todavía más preferiblemente 5'-(N₂₁₋₂₃)-3', donde N es cualquier base. Preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente el 95% y especialmente el 100% de los nucleótidos del ARNds usado como componente farmacéuticamente activo será complementario a una sección de la secuencia de ARN(m) de una proteína o antígeno (terapéuticamente relevante) descrito (como componente farmacéuticamente activo) anteriormente aquí. El 90% de complementariedad significa que, con una longitud de un ARNds usado de acuerdo con la invención de por ejemplo 20 nucleótidos, no hay más de 2 nucleótidos sin complementariedad correspondiente con la sección correspondiente del ARN(m). La secuencia de ARN de doble hebra usado opcionalmente en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es, sin embargo, preferiblemente de complementariedad completa en su estructura general con una sección del ARN(m) de una proteína o antígeno descrito como componente farmacéuticamente activo anteriormente aquí.

En principio, todas las secciones que tienen una longitud de 17 a 29, preferiblemente de 19 a 25, pares de bases que ocurren en la región de codificación del ARN(m) pueden servir como secuencia objetivo para un

ARNds usado eventualmente como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Igualmente, los ARNds usados como componente farmacéuticamente activo también se pueden dirigir contra la secuencia de nucleótidos de una proteína o antígeno (terapéuticamente relevantes) descritos (como componente farmacéuticamente activo) anteriormente aquí que no caen en la
 5 región de codificación, en particular en la región no de codificación 5' del ARN(m), por ejemplo, por tanto, contra las regiones no de codificación del ARN(m) que tienen una función reguladora. Por tanto, la secuencia objetivo del ARNds usado como componente farmacéuticamente activo de una proteína o antígeno descrito anteriormente aquí puede caer en la región traducida y no traducida del ARN(m) y/o en la región de los
 10 elementos de control. La secuencia objetivo de un ARNds usado como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también puede caer en la región de solapamiento de la secuencia no traducida y traducida; en particular, la secuencia objetivo puede comprender al menos un nucleótido aguas arriba del triplete de inicio de la región de codificación del ARN(m).

Un nucleótido modificado puede ocurrir preferiblemente en un ARNds usado eventualmente como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La
 15 expresión "nucleótido modificado" de acuerdo con la invención se refiere a que el nucleótido en cuestión se ha modificado químicamente. La persona experta en la técnica entiende por la expresión "modificación química" que el nucleótido modificado está modificado en comparación con los nucleótidos de origen natural por reemplazo, adición o eliminación de uno o más átomos o grupos de átomos. Al menos un nucleótido modificado en ARNds usado de acuerdo con la invención sirve por otra parte para la estabilidad y por otra
 20 parte para evitar la disociación. Preferiblemente, de 2 a 10 y más preferiblemente de 2 a 5 nucleótidos en un ARNds usado de acuerdo con la invención se han modificado. Ventajosamente, al menos un grupo 2'-hidroxi de los nucleótidos del ARNds en la estructura de doble hebra se ha reemplazado por un grupo químico, preferiblemente un grupo 2'-amino o 2'-metilo. Al menos un nucleótido de al menos una hebra de la estructura de doble hebra también puede ser un así "nucleótido bloqueado", con un anillo de azúcar modificado
 25 químicamente, preferiblemente por un puente 2'-O, 4'-C-metileno. Ventajosamente, varios nucleótidos del ARNds usados de acuerdo con la invención son nucleótidos bloqueados. Por otra parte, mediante la modificación de la cadena principal de un ARNds usado de acuerdo con la invención se puede prevenir la degradación prematura. Se da preferencia particular a este respecto a un ARNds que se ha modificado en la forma de fosforotioato, 2'-O-metil- ARN, LNA, gapmeros LNA/DNA, etc.y, por tanto, tienen una vida media
 30 más prolongada *in vivo*.

Los extremos del ARN de doble hebra (ARNds) usado como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden modificar preferiblemente a fin de
 35 contrarrestar la degradación en la célula o la disociación en hebras individuales, en particular para evitar la degradación prematura por las nucleasas. Se produce una disociación normalmente indeseable de las hebras individuales del ARNds en particular cuando se emplean bajas concentraciones de los mismos o longitudes de cadena corta. Para la inhibición particularmente efectiva de la disociación, la cohesión efectuada por los pares de nucleótidos de la estructura de doble hebra del ARNds usado de acuerdo con la invención se puede incrementar mediante al menos uno, preferiblemente más de uno, enlace(s) químico(s). Un ARNds usado como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención
 40 cuya disociación se ha reducido tiene mayor estabilidad frente a la degradación enzimática y química en la célula o en el organismo (*in vivo*) o *ex vivo* y, por tanto, tiene una vida media más prolongada. Una posibilidad adicional para prevenir la disociación prematura en la célula del ARNds usado de acuerdo con la invención es formar bucle(s) de horquilla en cada extremo de las hebras. En una realización particular, un ARNds usado en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención tiene así una estructura de horquilla a fin de
 45 ralentizar la cinética de disociación. En esta estructura, se forma una estructura de bucle preferiblemente en el extremo 5' y/o 3'. Esta estructura de bucle no tiene puentes de hidrogeno y, por tanto, no es complementaria típicamente entre las bases de nucleótidos. Típicamente, este bucle tiene una longitud de al menos 5, preferiblemente al menos 7 nucleótidos y así enlaza las dos hebras individuales complementarias de un ARNds usado de acuerdo con la invención. A fin de prevenir la disociación de las hebras, los
 50 nucleótidos de dos hebras del ARNds usado de acuerdo con la invención también se pueden modificar así preferiblemente, ya que se logra la resistencia del enlace de puente de hidrogeno, por ejemplo incrementando la capacidad de enlace del puente de hidrogeno, entre las bases denido a los nucleótidos opcionalmente modificados. Como resultado, la estabilidad de interacción entre las hebras se incrementa y el ARNds se protege contra el ataque por las ARNsas.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, el ARNds usado como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se dirige contra el
 55 ARN(m) de una proteína o antígeno como se describe anteriormente aquí. Así, el ARNds usado suprime preferiblemente la traducción de una proteína o antígeno descrito anteriormente en una célula en un grado de al menos el 50%, más preferiblemente el 60%, todavía más preferiblemente el 70% y mucho más preferiblemente al menos el 90%, es decir la célula contiene preferiblemente no más de la mitad de la
 60 concentración celular de origen natural (sin tratamiento con ARNds usado de acuerdo con la invención) de una proteína o antígeno descrito anteriormente. La supresión de la traducción de estas proteínas o antígenos

- en las células después de la adición de las moléculas de ARNs usadas de acuerdo con la invención se basa en el fenómeno de la interferencia del ARN causada por estas moléculas. El ARNs usado de acuerdo con la invención es un llamado ARNsi, el cual desencadena el fenómeno de interferencia de ARN y puede enlazar el ARN(m) de una proteína o antígeno descrito anteriormente. La medición o demostración de la supresión de traducción desencadenada en la células por el ARNs usado de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo por tinción Northern, PCR en tiempo real cuantitativa o, al nivel de proteína, con anticuerpos específicos contra una proteína o antígeno descrito anteriormente. El ARNs usado eventualmente como componente farmacéuticamente activo en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, y un ARNsi correspondiente, se pueden preparar mediante procesos conocidos del experto en la materia.
- 5
- 10 La composición farmacéutica (de acuerdo con la primera o la segunda realización) de acuerdo con la invención contiene típicamente un vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible). La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible)” usado en este documento incluye preferiblemente la base líquida o no líquida de la composición. El término “compatible” como se usa en este documento se refiere a que los constituyentes de la composición farmacéutica son capaces de mezclarse con el componente farmacéuticamente activo, con el ARN de la invención como agente inmunoestimulante o como adyuvante como tal y con otro componente, de manera que no se produce una interacción que reduzca esencialmente la efectividad farmacéutica de la composición bajo las condiciones de uso usuales. Por supuesto, los vehículos farmacéuticamente aceptables deben tener una pureza suficientemente alta y toxicidad suficientemente baja para ser adecuados para la administración a una persona a tratar.
- 15
- 20 Si la composición se proporciona en forma líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprenderá típicamente uno o más vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables (compatibles). La composición puede comprender como vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables (compatibles) por ejemplo agua libre de pirógenos; solución salina isotónica o soluciones tampón (acuosas), por ejemplo fosfato, citrato, etc., soluciones tampón, aceites vegetales, por ejemplo aceite de nuez molida, aceite de semilla de algodón, aceite de amaranto, aceite oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles, tales como, por ejemplo, polipropilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico, etc. En particular, para la inyección de la composición farmacéutica inventiva se puede emplear una solución tampón, preferiblemente una solución tampón acuosa, que contiene una sal de sodio, preferiblemente al menos 50 mM en sal de sodio, una sal de calcio, preferiblemente al menos 0,01 mM y opcionalmente una sal de potasio, preferiblemente al menos 3 mM. De acuerdo con una realización preferida, 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, hidrogenocarbonatos o sulfatos, etc. Sin limitarse a, ejemplos de sales de sodio incluyen por ejemplo NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, ejemplos de sales de potasio óptimas incluyen KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, y ejemplos de sales de calcio incluyen por ejemplo CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Adicionalmente, los aniones orgánicos de los cationes mencionados anteriormente pueden estar contenidos en la solución tampón. De acuerdo con una realización especial, la solución tampón adecuada para propósitos de inyección como se define anteriormente puede contener sales seleccionadas de entre cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂) y opcionalmente cloruro de potasio (KCl) donde pueden estar presentes aniones adicionales a los cloruros. Típicamente, las sales en la solución tampón de inyección están presentes en una concentración de al menos de cloruro de sodio (NaCl) 50 mM, por lo menos cloruro de potasio (KCl) 3 mM y al menos cloruro de calcio (CaCl₂) 0,01 mM. La solución tampón de inyección puede ser hipertónica, isotónica o hipotónica con referencia al medio de referencia específico, es decir la solución tampón puede tener un contenido de sal más alto, idéntico o más bajo con referencia al medio de referencia específico, donde preferiblemente se usan estas concentraciones de las sales mencionadas anteriormente que no conducen al celular por osmosis u otros efectos de concentración. Medios de referencia son por ejemplo métodos “*in vivo*” que ocurren en líquidos tales como sangre, líquido linfático, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, por ejemplo líquidos que se pueden usar como medios de referencia en métodos “*in vitro*”, como soluciones tampón comunes o líquidos. Estas soluciones tampón comunes o líquidos son conocidos del experto. La solución de Ringer-Lactato es particularmente preferente como base líquida.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- Si la composición se proporciona en forma sólida, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprenderá típicamente uno o más vehículos sólidos farmacéuticamente aceptables (compatibles). La composición puede comprender como portadores sólidos farmacéuticamente aceptables (compatibles) por ejemplo una o más cargas o diluyentes sólidos o líquidos o también se pueden usar compuestos encapsulantes que son adecuados para la administración a una persona. Ejemplos de estos vehículos sólidos farmacéuticamente aceptables (compatibles) son por ejemplo azúcares, por ejemplo lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, por ejemplo almidón de maíz o de patata; 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, etc.
- 55
- 60 La selección de un vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible) se determina en principio según se administra la composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica de

acuerdo con la invención se puede administrar, por ejemplo, vía sistémica. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasnovial, intraeste ARNI, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial, y vías tópicas sublinguales y/o intranasales. La cantidad adecuada de la composición farmacéutica a usar se puede determinar por experimentos de rutina con modelos animales. Estos modelos incluyen, sin implicar ninguna limitación, conejo, borrego, ratón, rata, perro y modelos primates no humanos. Las formas de dosificación unitarias preferidas para la inyección incluyen soluciones estériles de agua, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de estas soluciones se debe ajustar a aproximadamente 7,4. Los vehículos adecuados para la inyección incluyen hidrogeles, dispositivos para la liberación controlada o retardada, ácido poliláctico y matrices de colágeno. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la aplicación tópica incluyen aquellos para el uso en lociones, cremas, geles y similares. Si el compuesto se va a administrar peroralmente, tabletas, capsulas, y similares son la forma de dosis unitaria preferida. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la preparación de formas de dosis unitarias que se pueden usar para la administración oral son bien conocidos en la técnica anterior. La selección de éstos dependerá de consideraciones secundarias, tales como el sabor, el coste y la capacidad de almacenamiento, que no son críticos para los propósitos de la presente invención y que se puedan determinar sin dificultad por el experto en la materia.

A fin de incrementar adicionalmente la inmunogenicidad, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede contener adicionalmente una o más sustancias auxiliares. Así preferentemente se consigue una acción sinérgica de la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente y de una sustancia auxiliar opcionalmente contenida adicionalmente en la composición farmacéutica (y, eventualmente, un componente farmacéuticamente activo) como se describe anteriormente. Dependiendo de los diversos tipos de sustancias auxiliares, a este respecto varios mecanismos pueden entrar en consideración. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de las células dendríticas (DCs), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40, forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, como sustancia auxiliar se puede emplear cualquier agente que afecte al sistema inmune de la manera de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, como GM-CSF, que permiten una respuesta inmunitaria producida por el adyuvante inmunoestimulante de acuerdo con la invención que se mejora y/o se afecta de forma premeditada. Las sustancias auxiliares particularmente preferidas son citoquinas, tales como monocinas, linfocinas, interleucinas o quimocinas, que promueven la respuesta inmunitaria, tal 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, INF-alfa, IFN-beta, INF-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, tal como hGH.

Aditivos adicionales que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son emulsionantes, por ejemplo Tween^{MR}; agentes humectantes, por ejemplo lauril sulfato de sodio; agentes colorantes; saborizantes, vehículos farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizadores; antioxidantes; conservantes.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención (primera realización (sin componente farmacéuticamente activo) y segunda realización (con componente farmacéuticamente activo)) también puede contener adicionalmente un adyuvante. Así, la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente como agente inmunoestimulador o como adyuvante (para la segunda realización de la composición farmacéutica inventiva) se puede combinar con agentes/adyuvantes inmunoestimuladores. Dentro del alcance de la presente invención, agentes/adyuvantes adecuados para estos propósitos son en particular aquellos compuestos que mejoran (por uno o más mecanismos) la propiedad/propiedades biológicas de la molécula de ARN (modificado o no modificado) de acuerdo con la invención, es decir sustancias particulares que potencian la acción inmunoestimulante de la molécula de ARN según la invención. Ejemplos de agentes/adyuvantes que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen, sin implicar ninguna limitación, péptidos catiónicos estabilizadores o polipéptidos como se describe anteriormente, tales como protamina, nucleolina, espermina o espermidina, y polisacáridos catiónicos, en particular quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, plurónicos, solución de alumbre, hidróxido de aluminio, ADJUMER^{MR} (polifosfaceno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alumbre); gel de hidróxido de aluminio altamente absorbente de proteínas; gel de hidróxido de aluminio de baja viscosidad; AF o SPT (emulsión de escualeno (5%), Tween 80 (0.2%), Pluronic L121 (1.25%), solución salina tampón fosfato, pH 7,4); AVRIDINE^{MR} (propanodiamina); BAY R1005^{MR} hidroacetato de ((N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoil-amida); CALCITRIOL^{MR} (1,25-dihidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de calcio); holotoxina de cólera, proteína de fusión de fragmento de cólera-toxin-A1-proteína-A-D, sub-unidad B de la toxina del cólera; CRL 1005 (copolímero en bloque P1205); liposomas que contienen citoquina; DDA (bromuro dimetildioctadecialamonio); DHEA (deshidroepiandrosterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complejo de DOC/alumbre (sal sódica de ácido desoxicólico); adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; gamma-inulina; adyuvante Gerbu (mezcla de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N-

acetilmuramil-L-alanil-D-glutamina (GMDP), ii) cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA), iii) complejo de sal de zinc-L-prolina (ZnPro-8); GM-CSF; GMDP (N-acetilglucosaminil-(b1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina); imiquimod (1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina); ImmTher^{MR} dipalmitato (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRVVs (inmunoliposomas preparados de vesículas de deshidratación-rehidratación); interferón-gamma; interleucina-1beta; interleucina-2; interleucina-7; interleucina-12; ISCOMS^{Mr} ("Complejos Inmunoestimulantes"); ISCOPREP 7.0.3^{MR}; liposomas; LOXORIBINE^{MR} (7-ailil-8-oxoguanosina (guanina)); adyuvante oral LT (enterotoxina-protóxina lábil de E.coli); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59^{MR}; (emulsión de escualeno-agua); MONTANIDE ISA 51^{MR} (adyuvante de Freund incompleto purificado); MONTANIDE ISA 720^{MR} (adyuvante de aceite metabolizable); MPL^{MR} lípido A de (3-Q-desacil-4'-monofosforilo); MTP-PE y liposomas de MTP-PE ((sal de monosodio de N-acetil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosforil-oxi)etilamida); MURAMETIDE^{MR} (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH₃); MURAPALMITINE^{MR} y D-MURAPALMITINE^{MR} (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoil); NAGO (neuraminidasa-galactosa-oxidasa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISVs (vesículas surfactantes no iónicas); PLEURAN^{MR} (beta-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico; micro-/nano-esferas); PLURONIC L121^{MR}; PMMA (metacrilato de polimetilo); PODDS^{MR} (microesferas proteínoides); derivados de carbamato de polietileno; poli-rA: poli-rU (complejo de ácido poliadenilico-ácido poliuridilico); polisorbato 80 (Tween 80); cocleatos de proteína (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON^{MR} (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^{MR} ("formulación adyuvante Syntex"); proteoliposomas Sendai y matrices de lípido que contienen Sendai; Span-85 (trioleato de sorbitan); Specol (emulsión de Marcol 52, Span 85 y Tween 85); escualeno o Robane^{MR} (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 octadecil-tirosina); Theramid^{MR} (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida); Theronyl-MDP (Termurtide^{MR} o [thr 1]-MDP; N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina); partículas Ty (Ty-VLPs o partículas similares a virus); liposomas Walter-Reed (liposomas que contienen lípido A adsorbido en hidróxido de aluminio), y similares, etc.. Los lipopéptidos, tales como Pam3Cys, son también particularmente adecuados para combinarse con la molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, en forma de un adyuvante inmunoestimulador (véase Deres y col., Nature 1989, 342: 561-564).

Los adyuvantes citados anteriormente se pueden clasificar en varias clases, que incluyen adyuvantes adecuados para depósito y suministro, para co-estimulación, adyuvantes adecuados como antagonistas, etc. Adyuvantes preferidos adecuados para depósito y suministro pueden incluir por ejemplo sales de aluminio, tal como Adju-phos, Alhydrogel, Rehydral, etcétera, emulsiones, tales como CFA, SAF, IFA, MF59, Provac, TiterMax, Montanide, Vaxfectin, etc., copolímeros, tal como Optivax (CRL1005), L121, Poloaxmer4010), etc., liposomas, tal como Stealth, etc., cocleatos, tal como BIORAL, etc., adyuvantes derivados de plantas tal como QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM, etc. Adyuvantes preferidos adecuados para la coestimulación pueden incluir por ejemplo Tomatine, biopolímeros como PLG, PMM, Inulina, etc., adyuvantes derivados de microbios tal como Romurtide, DETOX, MPL, CWS, Mannosa, CpG7909, ISS-1018, IC31, Imidazoquinolinas, Ampligen, Ribi529, IMOxine, IRIVs, VLPs, toxina del cólera, toxina lábil al calor, Pam3Cys, Flagellin, ancla GPI, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP, etc. Adyuvantes preferidos adecuados como antagonistas por ejemplo pueden incluir neuropéptido CGRP, etc.

Son particularmente preferidos como adyuvantes adecuados para depósito y suministro compuestos catiónicos o policatiónicos que incluyen protamina, nucleolina, espermina o espermidina u otros péptidos o proteínas catiónicas tal como poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos de penetración celular (CPPs), incluyendo péptidos de enlace de VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, Penetratina, VP22 derivados o péptidos análogos, HSV VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTDs, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, péptido(s) de MPG, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de Calcitonina, péptidos derivados de Antenapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, FGF, Lactoferrina, Transportan, Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, protamina, espermina, espermidina o histonas. Adicionalmente, las proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos preferidos se pueden seleccionar de las siguientes proteínas o péptidos que tienen la siguiente fórmula total: (Arg)_l;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x, donde l + m + n + o + x = 8-15, y l, m, n u o independientemente entre sí pueden ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, con la condición de que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos el 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 o Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4, con la condición de que el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los aminoácidos de oligopéptido. Oligoargininas particularmente preferidas en este contexto son por ejemplo Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₇, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R, etc. Compuestos catiónicos o policatiónicos preferidos adicionales que se pueden usar como adyuvantes pueden incluir polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenimina (PEI), lípidos catiónicos, por ejemplo DOTMA: cloruro de [1-(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM,

SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil fosfatidiletanol-amina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: bromuro de Dimiristo-oxipropil-dimetilhidroxietil-amonio, DOTAP: dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano, DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadeciloxipropil)(2-hidroxietil)]-dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oximetiloxi)etil]trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisucciniloxi)etil]trimetilamonio, oligofectamina, o polímeros catiónicos o policationicos, por ejemplo poliaminoácidos modificados, tal como β -aminoácido-polímeros o poliamidas invertidas, etc., polietilenos modificados, tal como PVP (bromuro de poli(N-etil-4-vinilpiridinio)), etc., acrilatos modificados, tal como pDMAEMA (poli(dimetilaminoetil metilacrilato)), etc., amidoaminas modificadas tal como pAMAM (poli(amidoamina)), etc., polibetaaminoéster modificado (PBAE), tal como polímeros de 1,4-butanodiol-diacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificado en el extremo de diamina, etc., dendrímeros, tales como dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros basados en pAMAM, etc., poliimina(s), tal como PEI: poli(etileneimina), poli(propileneimina), etc., polialilamina, polímeros basados en cadena principal de azúcar, tal como polímeros basados en ciclodextrina, polímeros basados en dextrano, quitosano, etc., polímeros basados en cadena principal silano, tal como copolímeros PMOXA-PDMS, etc., polímeros en bloque que consisten en una combinación de uno o más bloques catiónicos (por ejemplo seleccionado de entre los polímeros catiónicoscitados anteriormente) y uno o más bloques hidrofílicos o hidrofóbicos (por ejemplo polietilenglicol); etc. La asociación o formación de complejo de la molécula de ARN inventiva de acuerdo con la invención como se define anteriormente con compuestos catiónicos o policationicos proporciona preferiblemente propiedades adyuvantes al ARN y confiere un efecto estabilizante al ARN mediante la formación de complejos. El procedimiento para la estabilización del ARN inventivo se describe en general en el documento EP-A-1083232. Son particularmente preferidos como compuestos catiónicos o policationicos aquellos seleccionados del grupo consistente en protamina, nucleolina, espermina, espermidina, oligoargininas como se definen anteriormente, tal como Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₇, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R, etc.

Los adyuvantes que pueden tener un efecto coestimulante incluyen ácidos nucleicos de fórmula (IV): G_lX_mG_n donde: G es guanósina (guanina), uridina (uracilo) o un análogo de guanósina (guanina) o uridina (uracilo); X es guanósina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente; l es un número entero de 1 a 40, donde cuando l = 1 G es guanósina (guanina) o un análogo de la misma, cuando l > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son guanósina (guanina) o un análogo de la misma; m es un número entero y es al menos 3; donde cuando m = 3 X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, cuando m > 3 al menos 3 uridinas sucesivas (uracilos) o análogos de uridina (uracilo) están presentes; n es un número entero de 1 a 40, donde cuando n = 1 G es guanósina (guanina) o un análogo de la misma, cuando n > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son guanósina (guanina) o un análogo de la misma; o ácidos nucleicos de fórmula (V): C_lX_mC_n, donde: C es citidina (citosina), uridina (uracilo) o un análogo de citidina (citosina) o uridina (uracilo); X es guanósina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente; l es un número 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 los nucleótidos son citidina (citosina) o un análogo de la misma; m es un número entero y es al menos 3; donde cuando m = 3 X es uridina (uracilo) o un análogo de la misma, cuando m > 3 al menos 3 uridinas sucesivas (uracilos) o análogos de uridina (uracilo) están presentes; n es un número 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 los nucleótidos son citidina (citosina) o un análogo de la misma.

Cualquier compuesto conocido por ser inmunoestimulador debido a su afinidad de enlace (como ligandos) a los receptores similares a Toll: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13 puede ser adecuadamente empleado como componente adicional para estimular adicionalmente la respuesta inmune inducida por las moléculas de ARN de la invención en las composiciones farmacéuticas inventivas.

Otra clase de compuestos que se pueden agregar a una composición farmacéutica de la invención son ácidos nucleicos CpG, en particular CpG-ARN o CpG-DNA. Un CpG-ARN o CpG-DNA pueden ser un CpG-DNA monohebra (CpG-DNA_{ss}), un CpG-DNA de doble hebra (ADN_{ds}), un CpG-ARN monohebra (CpG-ARN_{ss}) o un CpG-ARN de doble hebra (CpG-ARN_{ds}). El ácido nucleico CpG está preferiblemente en forma de CpG-ARN, más preferiblemente en la forma de CpG-ARN monohebra (CpG-ARN_{ss}). El ácido nucleico CpG contiene preferiblemente al menos una o más de secuencia(s) de dinucleótido de citidina (citosina)/guanina (mitogénica) (motivo(s) CpG)). De acuerdo con una primera alterna preferida, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, es decir C (citidina (citosina)) y G (guanina) del motivo CpG, no está metilado. Todas las citidinas adicionales (citosinas) o guaninas contenidas opcionalmente en estas secuencias pueden estar o no metiladas. De acuerdo con una alterna preferida adicional, sin embargo, la C (citidina (citosina)) y la G (guanina) del motivo CpG también puede estar presente en forma metilada.

- De acuerdo con una realización particularmente preferente, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención también se puede proporcionar como una vacuna. Las vacunas de acuerdo con la invención comprenden típicamente (corresponden a) una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La composición de estas vacunas de acuerdo con la invención se caracteriza por una clase específica de componentes farmacéuticamente activos incorporados en la composición de la vacuna. Típicamente, el compuesto farmacéuticamente activo será una sustancia inmunoestimulante que evoca una respuesta inmunitaria específica (adaptiva) contra un cierto antígeno/s. La respuesta inmunitaria específica (adaptiva) inducida permite al sujeto desarrollar una respuesta inmunitaria (evocada por un modo activo o pasivo) contra por ejemplo un patógeno específico o un tumor específico.
- 5
- 10 La composición farmacéutica inventiva y, en particular la vacuna inventiva se caracterizan específicamente por la manera en que se administran. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de la invención, en particular vacunas, se administran preferiblemente de manera sistémica. Las vías para la administración de esta composición/vacuna farmacéutica inventiva incluyen típicamente la vía oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesteARNI, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial y las vías tópicas sublinguales y/o intranasales. AlteARNtivamente, las vacunas o la composición farmacéutica de la invención se pueden administrar vía intradérmica, subcutánea, intramuscular. Las composiciones/vacunas se formulan por tanto preferiblemente en forma líquida o sólida como se define anteriormente para las composiciones farmacéuticas en general. Las sustancias auxiliares adicionales (como se definen anteriormente) pueden incrementar adicionalmente la inmunogenicidad, en particular de la vacuna, y se pueden incorporar preferiblemente en una vacuna de acuerdo con la invención. Ventajosamente, una o más de estas sustancias auxiliares como se definen aquí anteriormente se seleccionan dependiendo de la inmunogenicidad y otras propiedades del componente farmacéuticamente activo de la vacuna de acuerdo con la invención.
- 15
- 20
- De acuerdo con un objetivo preferido adicional de la presente invención, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en particular la vacuna inventiva, se usan para el tratamiento de las indicaciones mencionadas a manera de ejemplo posteriormente aquí. Con una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en particular una vacuna inventiva, es posible tratar, por ejemplo, enfermedades o condiciones que se asocian con varias respuestas inmunitarias patológicamente ausentes o que requieren una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria incrementada, dentro del contexto de una terapia, por ejemplo enfermedades específicas de tumor o específicas de patógenos, enfermedades infecciosas, etc., o enfermedades que se pueden tratar cambiando la respuesta inmunitaria (excedente) a una respuesta inmunitaria dominada por TH1 y/o desensibilizando al paciente que sufre una respuesta inmunitaria excesiva, por ejemplo en alergias o enfermedades autoinmunes. La producción de esta respuesta inmunitaria o el incremento de una respuesta inmunitaria ya existente pero en su caso inadecuada debido a la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se basa esencialmente en su capacidad de desencadenar una reacción inmunitaria específica no de antígeno. Un factor importante para una respuesta inmunitaria adecuada es la estimulación de diferentes subpoblaciones de células T. Los linfocitos T se diferencian típicamente en dos subpoblaciones, las células T-colaboradoras 1 (Th1) y las células T-colaboradoras 2 (Th2), con las cuales el sistema inmunitario es capaz de destruir patógenos (por ejemplo antígenos) intracelulares (Th1) y extracelulares (Th2). Las dos poblaciones de células Th difieren en el patrón de las proteínas efectoras (citoquinas) producidas por los mismos. Así, las células Th1 ayudan a la respuesta inmunitaria celular mediante la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las Th2, por su parte, promueven la respuesta inmunitaria tumoral mediante la estimulación de las células B para la conversión en células de plasma y por la formación de anticuerpos (por ejemplo contra antígenos). La relación Th1/Th2 es por tanto de gran importancia en la respuesta inmune. En el contexto de la presente invención, la relación Th1/Th2 de la respuesta inmunitaria es desplazada preferiblemente por la composición farmacéutica de acuerdo con la invención que contiene al menos una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, por ejemplo una, dos, tres, cuatro, seis, siete, o más moléculas de ARN, en dirección hacia la respuesta celular, es decir la respuesta TH1, induciéndose en consecuencia una respuesta inmune predominantemente celular. Únicamente por este desplazamiento y la ocurrencia preferida o aún exclusiva de una respuesta inmunitaria de Th1 es posible un tratamiento eficiente de las indicaciones mencionadas anteriormente. Preferiblemente, o por tanto, las presentes composiciones farmacéuticas o vacunas de acuerdo con la invención se usan para desencadenar respuestas inmunitarias específicas de tumor o específicas de patógenos. Estas composiciones o vacunas farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden usar en particular para incrementar las respuestas inmunitarias de células presentadoras de antígenos (APCs). También de forma particularmente preferente, las composiciones o vacunas farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento de enfermedades de cáncer o tumorales, preferiblemente seleccionadas entre carcinomas de colon, melanomas, carcinomas renales, linfomas, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), tumores gastrointestinales, carcinomas pulmonares, gliomas, tumores tiroideos, carcinomas mamarios, tumores de la próstata, hepatomas, varios tumores inducidos por virus tales como, por ejemplo, carcinomas inducidos por virus del papiloma (por ejemplo carcinoma cervical), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus del herpes (por ejemplo linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV),
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

tumores inducidos por hepatitis B (carcinoma hepatocelular), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neuromas/neurinomas acústicos, cáncer cervical, cáncer pulmonar, cáncer de la faringe, carcinomas anales, glioblastomas, linfomas, carcinomas rectales, astrocitomas, tumores cerebrales, cáncer de estómago, retinoblastomas, basaliomas, metástasis cerebral, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer pancreático, 5 cáncer testicular, melanomas, carcinomas tiroidales, cáncer de la vejiga, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, carcinomas bronquiales, tumor de la hipófisis, Micosis fungoides, cáncer esofágico, cáncer de mama, carcinoides, neurinomas, espinaliomas, linfomas de Burkitt, cáncer laríngeo, cáncer renal, timomas, carcinomas corpus, cáncer óseo, linfomas no de Hodgkin, cáncer uretral, síndrome de CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendrogliomas, cáncer vulvar, cáncer intestinal, carcinomas de colon, 10 carcinomas esofágicos, afectación de verrugas, tumores del intestino delgado, craneofaringeomas, carcinomas de ovario, tumores/sarcomas de tejido blando, cáncer ovárico, cáncer de hígado, carcinomas pancreático, carcinomas cervicales, carcinomas endometriales, metástasis del hígado, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de la vesícula biliar, leucemia, plasmocitomas, cáncer uterino, tumor de etapa, cáncer de próstata etc. Se prefiere particularmente si el lípido usado en el ácido nucleico modificado con 15 lípido o como componente farmacéuticamente activo en la composición es alfa-tocoferol (vitamina E), D-alfa-tocoferol, L-alfa-tocoferol, D,L-alfa-tocoferol o succinato de vitamina E (VES). El alfa-tocoferol (vitamina E) no es muy tóxico y tiene una potente actividad antitumoral (A. Bendich, L.J. Machlin *Am. J. Clin. Nutr.* **48** (1988) 612) que lo hace parecer muy prometedor en la terapia de cáncer. Como una explicación para la inhibición de la proliferación de células tumorales o la actividad citotóxica de las mismas, son conocidos dos mecanismos 20 *inter alia*: por una parte, la vitamina E es un antioxidante potente y un buen aceptor radical (C. Borek *Ann. NY Acad. Sci.* 570 (1990) 417); por otra parte, es capaz, estimulando la respuesta inmunitaria, de prevenir el crecimiento tumoral (G. Shklar, J. Schwartz, D.P. Trickler, S. Reid *J. Oral Pathol. Med.* 19 (1990) 60). En algunos trabajos recientes se ha descubierto además una conexión entre la expresión del gen supresor de tumor p53 en las células tumorales (cáncer escamoso oral) y el tratamiento con succinato de vitamina E 25 (VES) (J. Schwartz, G. Shklar, D. Trickler *Oral Oncol. Europ. J. Cancer* 29B (1993) 313). Así, ha sido posible observar tanto una estimulación de la producción del p53 de tipo silvestre, que actúa como un supresor de tumor, y una reducción del p53 mutado, que desarrolla actividad oncogénica. De forma interesante, la actividad biológica del VES en estas células tumorales es dependiente de dosis en dos aspectos: en la dosis fisiológica (0,001 a 50 $\mu\text{mol/l}$), se observa un incremento del crecimiento celular; en dosis farmacológica (100 a 154 $\mu\text{mol/l}$), se inhibe el crecimiento celular. Esto se ha mostrado en cultivo celular (T.M.A. Elattar, A.S. Virji 30 *Anticancer Res.* 19 (1999) 365). También ha sido posible inducir la apoptosis en varias líneas de células de cáncer de mama mediante el tratamiento con VES (W. Yu, K. Israel, Q.Y. Liao, C. M. Aldaz, B.G. Sanders, K. Kline *Cancer Res.* 59 (1999) 953). La apoptosis inducida se inicia por la vía de una interacción del ligando Fas y el receptor Fas. Esto es de particular relevancia debido a que no ha sido posible hasta ahora observar 35 este mecanismo en las líneas celulares correspondientes. Existen varios isómeros de vitamina E que difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo aromático. En los trabajos descritos, se usó la forma biológicamente más activa de la vitamina E de origen natural, α -tocoferol. Esto a su vez ocurre en varios heteroisómeros, debido a que la molécula contiene tres centros ópticamente activos. La forma natural de la vitamina E es RRR-alfa-tocoferol (anteriormente D-alfa-tocoferol), pero el racemato (D,L-alfa-tocoferol) se usa 40 predominantemente en la actualidad. Todas las formas mencionadas anteriormente de vitamina E se incluyen igualmente como lípidos dentro del alcance de la presente invención.

También de forma particularmente preferente, al menos una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, se usan para el 45 tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin implicar ninguna limitación, estas enfermedades infecciosas se seleccionan preferiblemente de entre gripe, malaria, SARS, fiebre amarilla, SIDA, borreliosis de Lyme, Leishmaniasis, ántrax, meningitis, enfermedades infecciosas virales tales como SIDA, Condiloma acuminata, verrugas huecas, Fiebre de dengue, fiebre de tres días, virus del ébola, resfriado, meningoencefalitis estacional temprana (FSME), catarro, culebrilla, hepatitis, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, Herpes zoster, influenza, encefalitis Japonesa, fiebre de Lassa, virus Marburg, rubeola, enfermedad de pies y boca, 50 mononucleosis, paperas, infección de virus de Norwalk, fiebre glandular de Pfeiffer, viruela, polio (cojera de la niñez), pseudo-crup ("garrotillo"), quinta enfermedad, rabia, verrugas, fiebre del Nilo del Oeste, varicela, virus citomegálico (CMV), enfermedades infecciosas bacterianas tales como prostatitis (inflamación de la próstata), ántrax, apendicitis, borreliosis, botulismo, *Camfilobacter*, *Clamidia tracomatis* (inflamación de la uretra, conjuntivitis), cólera, difteria, donavanosis, epiglotitis, fiebre tifoidea, gangrena gaseosa, gonorrea, fiebre del conejo, *Helicobacter pylori*, tosferina, linfogranuloma venéreo, osteomielitis, enfermedad del Legionario, lepra, 55 listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, ántrax, otitis media, *Mycoplasma hominis*, sepsis neonatal (Corioamnionitis), noma, paratifo, plaga, síndrome de Reiter, fiebre manchada de las montañas rocosas, paratífus de *Salmonella*, tífus de *Salmonella*, escarlatina, sífilis, tétanos, alucinación, enfermedad de tsutsugamushi, tuberculosis, tifus, vaginitis (colpitis), chancro blando y de enfermedades infecciosas 60 causadas por parásitos, protozoarios u hongos, tales como amebiasis, bilharziosis, enfermedad de Chagas, pie de atleta, manchas de hongo de levadura, escabiosis, malaria, oncocercosis (ceguera de los ríos), o enfermedades fúngicas, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad de sueño), Leishmaniosis visceral, dermatitis del pañal, esquistosomiasis, envenenamiento del pescado (Ciguatera), candidiasis, Leishmaniosis cutánea, lambliasis (giardiasis), o enfermedad de sueño, o de enfermedades infecciosas

causadas por Echinococcus, tenia del pescado, tenia del zorro, tenia canina, piojos, tenia de bovino, tenia de porcino, tenia miniatura.

Así, al menos un ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, o la composición farmacéutica de la invención se pueden usar para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o enfermedad alérgica. La alergia es una condición que implica típicamente una hipersensibilidad inmunológica adquirida anormal a ciertos antígenos o alérgenos extraños. Normalmente, las alergias dan como resultado una respuesta inflamatoria local o sistémica para esos antígenos o alérgenos y conducen a una inmunidad del cuerpo contra estos alérgenos. Los alérgenos en este contexto incluyen por ejemplo hierbas, polen, mohos, fármacos o numerosos desencadenadores ambientales, et. Sin que se limite a la teoría, se suponen implicados varios mecanismos de enfermedades diferentes en el desarrollo de las alergias. De acuerdo con un esquema de clasificación de P. Gell y R. Coombs, la palabra "alergia" se restringe a hipersensibilidades de tipo I que son causadas por el mecanismo IgE. La hipersensibilidad de tipo I se caracteriza por la activación excesiva de las células mastoides y basófilos por el IgE, que resulta en una respuesta inflamatoria sistémica que puede resultar en síntomas tan benignos como un catarro hasta un choque anafiláctico que pone en riesgo la vida y hasta la muerte. Los tipos bien conocidos de alergias incluyen, sin limitarse a los mismos, asma alérgica (que conduce al hinchamiento de la mucosa nasal), conjuntivitis alérgica (que conduce a la rojez y comezón de la conjuntiva), rinitis alérgica ("fiebre del heno"), anafilaxis, angioedema, dermatitis atópica (eczema), urticaria (comezón), eosinofilia, respiratorias, alergias a las picaduras de insectos, alergias de la piel (que conducen a e incluyen varios sarpullidos, tales como eczema, comezón (urticaria) y dermatitis (contacto)), alergias a los alimentos, alergias a medicamentos, etc. Con respecto a la presente invención, por ejemplo, se proporciona una composición o vacuna farmacéutica inventiva, que contiene un alérgeno (por ejemplo un alérgeno de gato, de polvo, un antígeno de termita, un antígeno de plantas (por ejemplo un antígeno de abedul), etc.) ya sea como proteína, como ARNm (o ADN) que codifica ese alérgeno de proteína, en combinación con un ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente. Una composición farmacéutica de la presente invención puede cambiar la respuesta inmunitaria (excesiva) a una respuesta TH1 más fuerte, suprimiendo o atenuando en consecuencia una respuesta IgE no deseada.

Del mismo modo, al menos un ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, o la composición farmacéuticamente activa de la invención, se puede usar para preparar un medicamento para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes se pueden dividir ampliamente en sistémicas y específicas de órganos o desórdenes autoinmunitarios localizados, dependiendo de las características clínico-patológicas principales de cada enfermedad. La enfermedad autoinmune se puede dividir en las categorías de síndromes sistémicos, que incluyen SLE, síndrome de Sjögren, Escleroderma, Artritis reumatoide y polimiositis o síndrome locales que pueden ser endocrinológicos (DM Tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison etcétera), dermatológico (pemfigus vulgaris), hematológico (anemia hemolítica autoinmunitaria), neural (esclerosis múltiple) o puede implicar virtualmente cualquier masa circunscrita de tejido corporal. Las enfermedades autoinmunes a tratar se pueden seleccionar del grupo consistente en enfermedades autoinmunes de tipo I o enfermedades autoinmunes de tipo II o enfermedades autoinmunes de tipo III o enfermedades autoinmunes de tipo IV, tal como, por ejemplo, esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes, diabetes tipo I (Diabetes mellitus), lupus eritematoso sistémico (SLE), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, 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, pérdida de cabello, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, Miastenia gravis, neurodermitis, Polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (PSS), psoriasis, síndrome de Reiter, artritis reumática, psoriasis, vasculitis, etcétera, o diabetes tipo II. Mientras que el modo exacto de cómo el sistema inmunitario induce una reacción inmunitaria contra los antígenos no se ha aclarado hasta ahora, existen varios descubrimientos con respecto a la etiología. Así, la autoreacción puede ser debida a un desvío de las células T. Un sistema inmunitario normal requiere la activación de células B por las células T antes de que las primeras puedan producir anticuerpos en grandes cantidades. Este requerimiento de una célula T se puede desviar en casos raros, tal como infección por los organismos que producen superantígenos que son capaces de iniciar la activación policlonal de células B, o aún de células T al enlazarse directamente a una subunidad de receptores de células T en una forma no específica. Otra explicación deduce la enfermedad autoinmune de una mimica molecular. Un antígeno exógeno puede compartir similitudes estructurales con ciertos antígenos hospederos; así, cualquier anticuerpo producido contra este antígeno (que imita los autoantígenos) también puede, en teoría, enlazarse a los antígenos hospederos y amplificar la respuesta inmunitaria. La forma más sobresaliente de mimica molecular se observa en los estreptococos beta-hemolíticos de grupo A que comparte antígenos con el miocardio humano, responsable de manifestaciones cardíacas de la fiebre reumática. La presente invención permite por tanto la provisión de una composición farmacéutica que contiene un antígeno (como proteína, ARNm o ADN que codifica una proteína de autoantígeno) y un ácido nucleico de la invención que permite típicamente que el sistema inmunitario se desensibilice.

La invención se refiere también al uso de al menos una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente en la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención o de una vacuna de acuerdo con la invención para el tratamiento de las indicaciones aquí descritas anteriormente, por ejemplo para el tratamiento de las citadas enfermedades tumorales, autoinmunitarias, alergias y enfermedades infecciosas. AlteARNtivamente, la invención incluye el uso (terapéutico) de al menos una molécula de ARN de acuerdo con la invención como se define anteriormente, para el tratamiento de enfermedades tumorales o infecciosas, enfermedades autoinmunes y alergias como se describe aquí anteriormente.

También se proporciona el uso de la molécula de ARN según la invención para tratar un trastorno o enfermedad seleccionada del grupo consistente en enfermedades de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes y alergias mediante la administración a un paciente que lo necesite una cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula de ARN de acuerdo con la invención.

Figuras

Las siguientes Figuras se proponen para ilustrar la invención adicionalmente.

Figura 1: muestra la capacidad de inducción de $\text{TNF}\alpha$ de ARNs formulados con DOTAP de acuerdo con la fórmula (I). Los PBMCs se sembraron en una densidad de $2 \cdot 10^5$ /pocillo/200 μl de medio y estimuladas con ARN (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) formulado con DOTAP (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 20 horas. Luego se realizó el $\text{TNF}\alpha$ -ELISA con sobrenadantes sin células. Como se puede observar en la Figura 1, la secreción de $\text{TNF}\alpha$ se induce significativamente por los ácidos nucleicos inventivos de acuerdo con la fórmula (I), particularmente por las secuencias de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NOs: 114 a 119 de ácidos nucleicos inventivos de acuerdo con la fórmula (I) como se define anteriormente, es decir, secuencias de ARNm de acuerdo con SEQ ID NOs: 114 a 119 (SEQ ID NO: 114 (R820/(N100)₂), SEQ ID NO: 115 (R719/(N100)₅), SEQ ID NO: 116 (R720/(N100)₁₀), SEQ ID NO: 117 (R821/(N40T20N40)₂), SEQ ID NO: 118 (R722/(N40T20N40)₅) y SEQ ID NO: 119 (R723/(N40T20N40)₁₀)) y controles $\text{G}_2\text{U}_{20}\text{G}_{20}$ (GGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGG), Seq. U_{21} : UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU (Fosfodiéster) y Poli(U) (Sigma, 800-1000 kDa).

Figura 2: muestra la capacidad de inducción del $\text{IFN}\alpha$ de ARNs formulados con DOTAP de acuerdo con la fórmula (I). Los PBMCs se sembraron en una densidad de $2 \cdot 10^5$ /pocillo/200 μl de Medio y se estimularon con ARN (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) formulado con DOTAP (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 20 horas. Luego se realizó un $\text{IFN}\alpha$ -ELISA con sobrenadantes sin células. Como se puede observar en la Figura 2, la secreción de $\text{IFN}\alpha$ se induce significativamente por los ácidos nucleicos de, particularmente por las secuencias ARNm de acuerdo con SEQ ID NOs: 114 a 119, es decir, secuencias ARNm de acuerdo con SEQ ID NOs: 114 a 119 (SEQ ID NO: 114 (R820/(N100)₂), SEQ ID NO: 115 (R719/(N100)₅), SEQ ID NO: 116 (R720/(N100)₁₀), SEQ ID NO: 117 (R821/(N40T20N40)₂), SEQ ID NO: 118 (R722/(N40T20N40)₅), y SEQ ID NO: 119 (R723/(N40T20N40)₁₀)) y controles $\text{G}_2\text{U}_{20}\text{G}_{20}$ (GGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGG), Seq. U_{21} : UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU (Fosfodiéster) y Poli(U) (Sigma, 800-1000 kDa).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proponen para ilustrar la invención adicionalmente.

1. Síntesis de ácidos nucleicos de ejemplo

Oligonucleótidos de ARN, como ejemplos del ácido nucleico se prepararon por síntesis de fase sólida automática por medio de química de fosforamidita (que incluyen secuencias de acuerdo con SEQ ID NOs: 84-85, SEQ ID NOs: 86-87, SEQ ID NOs: 88-94 y SEQ ID NOs: 107-108. En cada caso los grupos 2'-hidroxilo específicos de ARN de los nucleótidos se protegieron con grupos protectores TBDMS. En la síntesis de los fosforotioatos, el reactivo Beaucage se usó para la oxidación. La escisión del material portador y de los grupos protectores lábiles base se llevó a cabo con metilamina y la escisión del grupo protector TBDMS se llevó a cabo con fluorhidrato de trietilamina.

El producto crudo se purificó por HPLC o por cromatografía de par iónico, por cromatografía de intercambio iónico o por una combinación de los dos métodos, desalineados y secos. Se verificó la pureza del producto y se corrigió la composición base por espectrometría de masas.

De acuerdo con una forma alteARNtiva, las secuencias anteriores se prepararon para la traducción *in vitro* con base en vectores de ADN o secuencias de oligonucleótidos que llevan las secuencias inventivas.

2. Inmunoestimulación *in vitro* con ácidos nucleicos ejemplares

5 a) Para la estimulación de las BDMCs (células dendríticas derivadas de médula ósea) de ratón, 3 µl de oligofectamina se mezclaron con 30 µl de medio IMDM sin FCS (BioWhittaker, nº de catálogo BE12-722F) y se inocularon a temperatura ambiente durante 5 minutos. 6 µg de un ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID
 10 NOs: 84-94 y 107-108 (cada tipo de ácido nucleico formando un solo experimento), respectivamente, en la forma de ARN, se mezclaron con 60 µl de IMDM sin FCS y se mezclaron con oligofectamina/IMDM, y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. 33 µl de esta mezcla se colocaron para el cultivo durante toda la noche en un pocillo de una placa de cultivo microtitulada de 96 pocillos que contenía
 200.000 BDMCs de ratón en 200 µl de medio IMDM sin FCS. Después de 4 horas, se agregaron 100 µl de
 10 IMDM que contenía FCS al 20% y, después de 16 horas co-incubación, se eliminó el sobrenadante y se sometió a prueba para la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-12 (IL-12) por un ELISA de citoquina. Se llevaron a cabo pruebas comparativas análogamente a las secuencias anteriores usando el ARNm de tipo silvestre no terminado inmunoestimulante de la beta-galactosidasa (lacZ), complejada con protamina.

15 Fue posible mostrar que los ácidos nucleicos ensayados presentes en la forma de ARN, en particular las secuencias SEQ ID NOs: 84-94 y 107-108, tenían buenas propiedades inmunoestimulantes para la estimulación de una respuesta inmune innata.

20 b) Se obtuvieron PBMCs humanas vía un gradiente de densidad Ficoll y se cultivaron durante toda la noche en el medio X-VIVO-15 (BioWhittaker, nº de catálogo BE04-418Q), que contenía glutamina al 1% y penicilina al 1%, en presencia de 10 µg/ml de los ácidos nucleicos en forma de ARN, en particular de las secuencias SEQ ID NOs: 84-94 y 107-108 (cada tipo de ácido nucleico formando un solo experimento).

25 Para la estimulación, se mezclaron, 3 µl de oligofectamina con 30 µl de medio X-VIVO-15 (BioWhittaker, nº de catálogo BE04-418Q) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. 6 µg de los ácidos nucleicos en forma de ARN, en particular las secuencias SEQ ID NOs: 84-94 y 107-108 (cada tipo de ácido nucleico en un solo experimento), respectivamente, se mezclaron con 60 µl de medio X-VIVO-15 (BioWhittaker, nº de catálogo BE04-418Q) y, se mezclaron con oligofectamina/medio X-VIVO, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. 33 µl de esta mezcla se colocaron para cultivo durante toda la noche en un pocillo de una placa de cultivo microtitulada de 96 pocillos que contenía 200.000 PBMCs en 200 µl de medio X-VIVO-15 (BioWhittaker, no. de catálogo BE04-418Q). Después de la co-incubación durante 16 horas, se eliminó el sobrenadante y se sometió a prueba por la interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12) y
 30 TNF α por medio de un ELISA de citoquina. Las pruebas de comparación se llevaron a cabo análogamente a las secuencias de acuerdo con la invención (véase lo anterior) con el oligo-ARN 40 inmunoestimulante (5'-GCCCGUCUGUUGUGACUC-3', SEQ ID NO: 113).

Fue posible demostrar que los ácidos nucleicos en forma de ARN tenían buenas propiedades inmunoestimulantes.

35 3. Inmunoestimulación *in vivo* con ácidos nucleicos ejemplares – uso como adyuvante

Se inyectaron ratones BALB/c (5 por grupo) con proteína beta-galactosidasa y con un adyuvante (como se define aquí) en los días 0 y 10. Los ratones se sacrificaron el día 20 y se usó suero sanguíneo para un ensayo de anticuerpos contra la proteína beta-galactosidasa por ELISA, los valores IL-6, IL-12 y TNF-alfa se determinaron análogamente para los cultivos *in vitro* descritos anteriormente.

40 4. Estimulación de células humanas con un adyuvante como una molécula ácido nucleico

45 a) A fin de determinar la actividad inmunogénica de los ácidos nucleicos definidos anteriormente en la forma de adyuvantes, en particular de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de acuerdo con SEQ ID NOs: 84-94 y 107-108 (cada tipo de ácido nucleico forman nuevamente un solo experimento) se co-incubaron con células humanas. Para este fin, células PBMC humanas, por ejemplo, se co-incubaron durante 16 horas en el medio X-VIVO-15 (BioWhittaker, nº de catálogo BE04-418Q), enriquecido con L-glutamina 2 mM (BioWhittaker), 10 U/ml de penicilina (BioWhittaker) y 10 µg/ml de estreptomina, con 10 µg/ml de ARN (ARNm que codifica β -galactosidasa y opcionalmente con 10 µg/ml de protamina. El sobrenadante se eliminó y se analizó la liberación de IL-6 y TNFalfa por ELISA.

50 b) En un experimento adicional, se determinó la liberación de TNF-alfa por las células PBMC humanas después de la estimulación con ácidos nucleicos de acuerdo con la invención (SEQ ID NOs: 84-94 y 107-108, cada tipo de ácido nucleico en un solo experimento, véase lo anterior) y también los adyuvantes usados de acuerdo con la invención.

Para ese fin, las células PBMC humanas se co-incubaron durante 16 horas con 10 µg/ml de los ácidos nucleicos inventivos en medio X-VIVO 15 (BioWhittaker), enriquecido con L-glutamina 2 mM (BioWhittaker), 10 U/ml de penicilina (BioWhittaker) y 10 µg/ml de estreptomycin. Los sobrenadantes se eliminaron y se analizaron por ELISA.

5 **5. Secreción de TNF α e IFN- α en PBMCs humanas**

Para este experimento, varios ácidos nucleicos, es decir secuencias de ARNm de acuerdo con SEQ ID NOs: 114 a 119, se formularon con DOTAP (Roche).

Las secuencias de ácidos nucleicos usadas en el experimento fueron

- 10 SEQ ID NO: 114 (R₈₂₀/(N₁₀₀)₂);
 SEQ ID NO: 115 (R₇₁₉/(N₁₀₀)₅);
 SEQ ID NO: 116 (R₇₂₀/(N₁₀₀)₁₀);
 SEQ ID NO: 117 (R₈₂₁/(N₄₀T₂₀N₄₀)₂);
 SEQ ID NO: 118 (R₇₂₂/(N₄₀T₂₀N₄₀)₅); y

SEQ ID NO: 119 (R₇₂₃/(N₄₀T₂₀N₄₀)₁₀).

- 15 Las PBMCs humanas luego se estimularon con el ARNs formulado en una concentración de 8 µg/ml y 12 µg/ml de DOTAP durante 20 horas. Los sobrenadantes se investigaron para la secreción de TNF α y IFN- α usando un ELISA igualado-pareado.

- 20 Para el experimento, se obtuvieron PBMCs humanas vía un gradiente de densidad Ficoll y cultivo durante 20 horas en medio X-VIVO-15 (BioWhittaker, no. de catálogo BE04-418Q) que contenía glutamina al 1% y penicilina al 1%, en presencia de 2 o 4 µg/ml de los ácidos nucleicos anteriores para la estimulación de IFN α o TNF α respectivamente. Para la formulación y estimulación, 3 o 6 µg de ARN en solución tampón HBS se transfirieron a un frasquito que contenía 18 µg de metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) (Roche Diagnostics, n° de catálogo 11 811 177 001) en solución tampón HBS y se mezclaron cuidadosamente por pipeteo suave varias veces. La mezcla de transfección se incubó durante
 25 15 minutos a 15-25°C. 1 volumen de la mezcla de DOTAP/ácido nucleico se diluyó suavemente con 7,3 volúmenes de medio X-Vivo. 100 µl de esta mezcla se cultivaron durante toda la noche en un pocillo de una placa de cultivo microtitulada de 96 pocillos que contenía 2·10⁵ PBMCs en 100 µl de medio X-VIVO-15 (BioWhittaker, n° de catálogo BE04-418Q). Después de la co-incubación durante 20 horas, se eliminó el sobrenadante y se sometió a prueba para IFN α y TNF α por ELISA de citoquina. Las pruebas de comparación
 30 se llevaron a cabo análogamente a las secuencias de acuerdo con la invención (véase lo anterior) con el oligo G₂U₂₀G₂ inmuoestimulante (Fosfotioato modificado), Poli(U) (Sigma, Taufkirchen, Alemania) y el oligo U₂₁ (Fosfodiéster).

- 35 Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. La Figura 1 muestra la capacidad de inducción de TNF α del ARNs formulado con DOTAP. Las PBMCs se sembraron en una densidad de 2·10⁵/pocillo/200 µl de Medio y se estimularon con ARN (4 µg/ml) formulado con DOTAP (12 µg/ml) durante 20 horas. Luego se realizó un TNF α -ELISA con el sobrenadante sin células. La Figura 2 muestra la capacidad de inducción del IFN α de ARNs formulado con DOTAP. Las PBMCs se sembraron a una densidad de 2·10⁵/pocillo/200 µl de medio y se estimularon con ARN (2 µg/ml) formulado con DOTAP (12 µg/ml) durante 20 horas. Luego se realizó un IFN α -ELISA con el sobrenadante sin células.

- 40 Como se puede observar en la Figura 1 y en la Figura 2, tanto la secreción del TNF α como de IFN α es inducida significativamente por los ácidos nucleicos ensayados, en particular por las secuencias de ARNm de acuerdo con SEQ ID NOs: 114 a 119 (SEQ ID NO: 114 (R₈₂₀/(N₁₀₀)₂), SEQ ID NO: 115 (R₇₁₉/(N₁₀₀)₅), SEQ ID NO: 116 (R₇₂₀/(N₁₀₀)₁₀), SEQ ID NO: 117 (R₈₂₁/(N₄₀T₂₀N₄₀)₂), SEQ ID NO: 118 (R₇₂₂/(N₄₀T₂₀N₄₀)₅) y SEQ ID NO: 119 (R₇₂₃/(N₄₀T₂₀N₄₀)₁₀)) contras las secuencias de control G₂U₂₀G₂ (Fosfotioato modificado), Poli(U) (Sigma, Taufkirchen, Alemania) y el oligo U₂₁ (Fofodiéster).

Ventajas de la Invención

- 50 Una molécula de ARN de acuerdo con la invención se puede usar como agente inmuoestimulador como tal para estimular el sistema inmunitario innato de un paciente a tratar. Esta propiedad inmuoestimulante se puede mejorar por la adición de otros compuestos conocidos en la técnica, que estimulan activamente la respuesta inmunitaria innata a los ácidos nucleicos inventivos, por ejemplo por modificación con lípido o adición de adyuvantes adicionales. Las moléculas de ARN inventivas como se definen aquí, basadas en la estructura genérica (N_uG_iX_mG_nN_v)_a, exhiben una significativamente mejor amplificación en bacterias, por ejemplo *E. coli*. Además, es particularmente ventajoso, si el ARN inventivo es una molécula de ácido nucleico parcialmente de doble hebra o una mezcla de una molécula de ARNmonohebra y de doble hebra, ya que esta

molécula de ARN inventiva (parcialmente de doble hebra) puede estimular positivamente la respuesta inmune innata en un paciente a tratardirigiendo los receptores PAMP (patrón molecular asociado a patógenos) para el ARN monohebra (TLR-7 y TLR-8) así como también los receptores PAMP para el ARN de doble hebra (TLR-3, RIG-I y MDA-5). Los receptores TLR-3, TLR-7 y TLR-8 se localizan en el endosoma y se activan por el
5 ARN captado por el endosoma. En contraste, los RIG-I y MDA-5 son receptores citoplásmicos, que se activan por el ARN que se captó directamente dentro del citoplasma o que se ha liberado de los endosomas (liberación endosomal o escape endosomal). Por consiguiente, un ARN inventivo parcialmente de doble hebra es capaz de activar cascadas de señales inmunoestimuladoras diferentes y de conducir a una respuesta inmune innata incrementada o de mejorar esta respuesta significativamente. Una ventaja adicional
10 de la invención es la alta inducción de IFNalfa de citoquina antiviral, que es preferente en la estimulación del sistema inmunitario innato. Una limitación frecuentemente subestimada de los ácidos nucleicos inmunoestimulantes generalmente aceptados (por ejemplo poli A:U y poli I:C) es su estructura no definida, que resulta en restricciones reguladoras.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Curevac GmbH
- 5 <120> Ácidos nucleicos de fórmula (I) (NuGlxmGnNv)a y derivados de los mismos como agentes inmunoestimuladores/adyuvantes
- <130> cu01P072WO
- <140>
<141>
- 10 <150> EP 08001827.8
<151> 2008-01-31
- <160> 119
- <170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
<211> 20
<212>ARN
<213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de secuenciencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- 20 <400> 1
gguuuuuuuu uuuuuuggg 20
- <210> 2
<211> 20
<212>ARN
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 2
ggggguuuuu uuuuuggggg 20
- 30 <210> 3
<211> 40
<212>ARN
<213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- 35 <400> 3
ggggguuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuggggg 40
- <210> 4
<211> 39
40 <212>ARN
<213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- 45 <400> 4
gugugugugu guuuuuuuuu uuuuuuuugug ugugugugu 39

ES 2 537 703 T3

<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 11
gggggguuuu uuuuuggggg 20

5 <210> 12
<211> 20
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

10 <400> 12
gggggguuuu uuuuuugggg 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 13
ggggguuuuu uuuuuugggg 20

20 <210> 14
<211> 20
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

25 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 14
ggggguuuuu uuuuuuggg 20

30 <210> 15
<211> 20
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

35 <400> 15
gggguuuuuu uuuuuuggg 20

<210> 16
<211> 20
<212>ARN
40 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 16
gggguuuuuu uuuuuuugg 20

45 <210> 17
<211> 20
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

50 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 17
gguuuuuuuu uuuuuuugg 20

<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 24
ggggggguuu uuuuuugggg gg 22

5 <210> 25
<211> 22
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

10 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 25
ggggggguuu uuuuuugggg gg 22

15 <210> 26
<211> 22
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

20 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 26
ggggggguuu uuuuuugggg gg 22

25 <210> 27
<211> 22
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

30 <400> 27
ggggggguuu uuuuuugggg gg 22

35 <210> 28
<211> 22
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

40 <400> 28
ggggguuuuu uuuuuugggg gg 22

45 <210> 29
<211> 22
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 29
ggggguuuuu uuuuuuuug gg 22

50 <210> 30
<211> 22
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

55 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 30
ggguuuuuuu uuuuuuuug gg 22

- 5 <210> 31
<211> 22
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 31
gguuuuuuuu uuuuuuuuuu gg 22
- 10 <210> 32
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 32
gggggggggg guuuuuuuuuu gggg 24
- 20 <210> 33
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 33
gggggggggg uuuuuuuuuu gggg 24
- 25 <210> 34
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
30 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 34
gggggggggg uuuuuuuuuu gggg 24
- 35 <210> 35
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 35
gggggggggg uuuuuuuuuu gggg 24
- 40 <210> 36
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
45 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 36
gggggggggu uuuuuuuuuu gggg 24
- 50 <210> 37
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial

ES 2 537 703 T3

- <220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 37
gggggggguu uuuuuuuggg gggg 24
- 5 <210> 38
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
- 10 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 38
gggggggguu uuuuuuuggg gggg 24
- 15 <210> 39
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- 20 <400> 39
gggggggguu uuuuuuuggg gggg 24
- <210> 40
<211> 24
<212>ARN
- 25 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 40
- 30 ggggggguuu uuuuuuuug gggg 24
- <210> 41
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
- 35 <220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 41
gggggguuuu uuuuuuuug gggg 24
- <210> 42
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
- 40 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- 45 <400> 42
gggggguuuu uuuuuuuuuu gggg 24
- <210> 43
<211> 24
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
- 50 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- 55 <400> 43

ES 2 537 703 T3

<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

5 <400> 50
gggggguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuugggg g 41

<210> 51
<211> 43
<212>ARN
10 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 51
gggggguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuugggg ggg 43

15 <210> 52
<211> 45
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
20 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 52
ggggggguuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuugg ggggg 45

<210> 53
<211> 47
25 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

30 <400> 53
gggggggggu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuug ggggggg 47

<210> 54
<211> 7
<212>ARN
35 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 54
40 gguuugg 7

<210> 55
<211> 8
<212>ARN
<213> Artificial
45 <220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 55
gguuuugg 8

<210> 56
<211> 9
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
50 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

- <400> 56
gguuuuugg 9
- 5 <210> 57
<211> 10
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- 10 <400> 57
gguuuuugg 10
- <210> 58
<211> 11
<212>ARN
15 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 58
gguuuuuug g 11
- 20 <210> 59
<211> 12
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
25 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 59
gguuuuuuu gg 12
- <210> 60
<211> 13
30 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 60
35 gguuuuuuu ugg 13
- <210> 61
<211> 14
<212>ARN
<213> Artificial
40 <220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 61
gguuuuuuu uugg 14
- <210> 62
<211> 15
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
45 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 62
50 gguuuuuuu uuugg 15

<210> 63
<211> 16
<212>ARN
<213> Artificial
5 <220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 63
gguuuuuuuu uuuuugg 16

10 <210> 64
<211> 17
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
15 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 64
gguuuuuuuu uuuuugg 17

20 <210> 65
<211> 18
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
25 <400> 65
gguuuuuuuu uuuuuugg 18

30 <210> 66
<211> 19
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
35 <400> 66
gguuuuuuuu uuuuuugg 19

40 <210> 67
<211> 9
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 67
ggguuuggg 9

45 <210> 68
<211> 10
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
50 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 68
ggguuuuggg 10

55 <210> 69
<211> 11
<212>ARN
<213> Artificial
<220>

ES 2 537 703 T3

<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 69
ggguuuuugg g 11

5 <210> 70
<211> 12
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

10 <400> 70
ggguuuuuug gg 12

<210> 71
<211> 13
<212>ARN
15 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 71
ggguuuuuuu ggg 13

20 <210> 72
<211> 14
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
25 <223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 72
ggguuuuuuu uggg 14

<210> 73
<211> 15
30 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 73
35 ggguuuuuuu uggg 15

<210> 74
<211> 16
<212>ARN
<213> Artificial
40 <220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 74
ggguuuuuuu uuuggg 16

<210> 75
45 <211> 17
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

50 <400> 75
ggguuuuuuu uuuggg 17

ES 2 537 703 T3

- <210> 76
<211> 18
<212>ARN
<213> Artificial
5 <220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"

<400> 76
ggguuuuuuu uuuuuggg 18
- <210> 77
10 <211> 19
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 77
15 ggguuuuuuu uuuuuggg 19
- <210> 78
<211> 57
<212>ARN
20 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 78
25 ggguuuuuuu uuuuuuuugg guuuuuuuuu uuuuuugggu uuuuuuuuuu uuuuuggg 57
- <210> 79
<211> 42
<212>ARN
30 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 79
ggguuuuuuu uuuuuuuugg gggguuuuuu uuuuuuuuug gg 42
- <210> 80
<211> 51
<212>ARN
35 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "GIXmGn"
- <400> 80
40 ggguuugggu uuggguuugg guuuggguuu gggguuugggu uuggguuugg g 51
- <210> 81
<211> 57
<212>ARN
45 <213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "CIXmCn"
- <400> 81
50 ccuuuuuuuu uuuuuuuucc cuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuuuuuuuu uuuuccc 57
- <210> 82
<211> 51
<212>ARN
<213> Artificial

ES 2 537 703 T3

- <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "CIXmCn"
- <400> 82
ccuuuuuccu uuuccuuucc cuuuccuuuu cccuuuccu uuuccuuucc c 51
- 5 <210> 83
<211> 42
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
- 10 <223> Descripción de secuencia artificial: estructura núcleo ejemplar "CIXmCn"
- <400> 83
ccuuuuuuuu uuuuuuuucc cccuuuuuuu uuuuuuuuuc cc 42
- <210> 84
<211> 60
15 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula (I)
- <400> 84
20 uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcgguuccua gaaguacacg 60
- <210> 85
<211> 60
<212>ARN
<213> Artificial
25 <220>
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula (I)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(60)
- 30 <223> secuencia es ARN de doble hebra
- <400> 85
uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcgguuccua gaaguacacg 60
- <210> 86
<211> 60
35 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula (Ia)
- <400> 86
40 uagcgaagcu cuuggaccua ccuuuuuuuu uuuuuuuccc ugcgguuccua gaaguacacg 60
- <210> 87
<211> 60
<212>ARN
<213> Artificial
45 <220>
<223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula (Ia)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(60)
- 50 <223> secuencia es ARN de sobre hebra
- <400> 87
uagcgaagcu cuuggaccua ccuuuuuuuu uuuuuuuccc ugcgguuccua gaaguacacg 60

ES 2 537 703 T3

5 <210> 88
 <211> 40
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula general (II)

<400> 88
 ccccccccc ccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg 40

10 <210> 89
 <211> 40
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula general (II)

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> secuencia es ARNs (poly(I:C))

20 <400> 89
 ccccccccc ccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg 40

25 <210> 90
 <211> 40
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula general (II)

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(37)
 <223> secuencia es de doble hebra(A:U)

<400> 90
 ccccccccc ccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg 40

35 <210> 91
 <211> 40
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula general (II)

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> secuencia es ARN de doble hebra

<400> 91
 ccccccccc ccccccccc gguuuuuuuu uuuuuuuggg 40

45 <210> 92
 <211> 80
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según fórmula general (II)

<400> 92

cccccccccc ccccccccc uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg 60
ugcguuccua gaaguacacg 80

<210> 93
 <211> 80
 <212>ARN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según general fórmula (II)
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1) .. (80)
 <223> secuencia es ARN de doble hebra

 <400> 93

CCCCCCCCC CCCCCCCCCC gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60
uagcgaagcu cuuggaccua 80
 <210> 94
 15 <211> 80
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: Secuencia ejemplar según general fórmula (II)
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (80)
 <223> secuencia es ARN de doble hebra

 <400> 94

CCCCCCCCC CCCCCCCCCC gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60
uagcgaagcu cuuggaccua 80
 25
 <210> 95
 <211> 20
 <212>ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 1 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO:
 96)

 <400> 95
 uagcgaagcu cuuggaccua 20

 35 <210> 96
 <211> 20
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 2 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO:
 95)

 <400> 96
 uagguccaag agcuucgcu 20

 <210> 97
 45 <211> 11
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 1 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO:
 50 98)

ES 2 537 703 T3

- <400> 97
gccgcgggccc g 11
- <210> 98
<211> 11
5 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 2 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO: 97)
- 10 <400> 98
cggcccgcgg c 11
- <210> 99
<211> 10
15 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 1 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO:100)
- 20 <400> 99
gacacggugc 10
- <210> 100
<211> 10
25 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223>Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 2 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO:99)
- 30 <400> 100
gcaccgugca 10
- <210> 101
<211> 8
30 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
35 <223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 1/tallo 2 (secuencia palíndroma intrínseca)
- <400> 101
accuaggu 8
- <210> 102
<211> 8
40 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 1/tallo 2 (secuencia palíndroma intrínseca)
- 45 <400> 102
uggaucca 8
- <210> 103
<211> 5
50 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 1 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO:104)

ES 2 537 703 T3

<400> 103
ccugc 5

<210> 104
<211> 5
5 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 2 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO: 103)

10 <400> 104
gcagg 5

<210> 105
<211> 5
15 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 1 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO: 106)

20 <400> 105
gcagg 5

<210> 106
<211> 5
25 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar de tallo 2 (la secuencia es palíndroma de SEQ ID NO: 105)

<400> 106
ccugc 5

30 <210> 107
<211> 60
<212>ARN
<213> Artificial
<220>
35 <223> Descripción de secuencia: ácido nucleico inventivo según fórmula (IIIA) o (IIb)

<400> 107
uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg uagguccaag agcuucgcu 60

<210> 108
<211> 122
40 <212>ARN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia: ácido nucleico inventivo según fórmula (IIIA) o (IIb)

45 <400> 108

uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg	60
gccgcgggcc gugcguuccu agaaguacac gcggcccgcg gcugcguucc uagaaguaca	120
cg	122

<210> 109
<211> 18

<212> PRT
 <213>desconocida
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia de protamina Pi

5 <400> 109

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

Arg Arg

<210> 110
 <211> 21
 <212> PRT
 <213>desconocida
 <220>
 <223>Descripción de secuencia: secuencia de protaminaP2

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>ARN
 <213>desconocida
 <220>
 20 <223> Descripción de secuencia: secuencia Kozak

<400> 111
 gccgccacca ugg 13

25 <210> 112
 <211> 15
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia estabilizante genérica de fórmula
 (C/U)CCANxCCC(U/A)PyxUC(C/u)CC

30 <220>
 <221> variation
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazo="citidina (citosina)"
 /reemplazo="uridina (uracilo)"

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> ácido nucleico = citidina (citosina) o uridina (uracilo)
 <220>

40 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Nx = a, g, c o u o cualquier otro ácido nucleico
 <220>

45 <221> variation
 <222> (5)..(5)

<223> /reemplazo="citidina (citosina)" /reemplazo="uridina (uracilo)" /reemplazo="guanosina"
 /reemplazo="adenosina", ocualquier otro ácido nucleico
 <220>
 <221> repeat_unit
 5 <222> (5)..(5)
 <223> x = cualquier número
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 10 <223> ácido nucleico = uridina (uracilo) o adenosina
 <220>
 <221> variation
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazo="uridina (uracilo)"
 15 /reemplazo="adenosina"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> Py = pirimidina
 20 <220>
 <221> repeat_unit
 <222> (10)..(10)
 <223> x = cualquier número
 <220>
 25 <221> variation
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazo="pirimidina"
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (13)..(13)
 <223> ácido nucleico = citidina (citosina) o uridina (uracilo)
 <220>
 <221> variation
 <222> (13)..(13)
 35 <223> /reemplazo="citidina (citosina)"
 /reemplazo="uridina (uracilo)"

 <400> 112
 nccancccn ucnc 15

 <210> 113
 40 <211> 20
 <212>ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: oligo ARN 40 immunoestimulador

 45 <400> 113
 gcccgucugu ugugacuc 20

 <210> 114
 <211> 229
 <212>ARN
 50 <213>Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar según fórmula (I)

 <400> 114

ES 2 537 703 T3

gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcatauucuc 60
agaguauugg cccccgugua gguuuuuuuu gacagacagu ggagcuuuuu cacucccagg 120
auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180
acuagacgug aguuccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uuuuagauc 229

<210> 115

<211> 547

<212>ARN

5 <213>Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar según fórmula (I)

<400> 115

gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcatauucuc 60
agaguauugg cccccgugua gguuuuuuuu gacagacagu ggagcuuuuu cacucccagg 120
auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180

acuagacgug aguuccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uuuuagaucu cggauuacag 240
cuggaaggag caggaguagu guucuugcuc uaaguaccga gugugcccaa uacccgauca 300
gcuuuuuuac gaacggcucc uccucuuga cugcagcgua agugcggauu cuggggauca 360
aauuacugac ugccuggauu acccucggac auauaaccuu guagcacgcu guugcugvau 420
aggugaccaa cccccacucg aguagaccag cucucuuaugu cggacaauug auaggaggcg 480
cggucaaucu acuucuggcu aguuuagaau aggcugcacc gaccucuaua aguagcgugu 540
ccucuag 547

10 <210> 116

<211> 1083

<212>ARN

<213>Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia: secuencia ejemplar según fórmula (I)

<400> 116

gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcavaucuc	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 uacccgauca	300
gcuuauaac gaacggcucc uccucuuga cugcagcgua agugcggauu cuggggauca	360
aauuacugac ugccuggauu acccucggac auauaacuu guagcacgcu guugcuguau	420
aggugaccaa cgcccacucg aguagaccag cucucuuguu cgggacaauu auaggaggcg	480
cggucaauuc acuuucuggcu aguuuagaau aggcugcacc gaccucuaua aguagcgugu	540
ccucuagagc uacgcagguu cgcaauaaaa gcguugauua gugugcauag aacagaccuc	600
uuauucggug aaacgccaga augcuuuuuu ccauuuacuc uucccaaac gcguacggcc	660
gaagacgcgc gcuuauucug uguacguucu cgcaaugga agaaucagcg ggcauggugg	720
uagggcaaua ggggagcugg guagcagcga aaaagggcc cugcgcacgu agcuucgcu	780
uucgucugaa acaaccggc auccguugua gcgaucccgu uaucaguguu auucuuguc	840
gcacuaagau ucauggugua gucgacaaua acagcgucuu ggcagauucu ggucacgugc	900
ccuaugcccg ggcuugugcc ucucaggugc acagcgauac uuaaagccuu caagguacuc	960
gacgugggua ccgauucgug acacuuccua agauuuuucc acuguguuag ccccgcaccg	1020
ccgaccuaaa cugguccaau guauacgcau ucgcugagcg gaucgauauu aaaagcuuga	1080
auu	1083

<210> 117

<211> 229

<212>ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>Descripción de secuencia: secuencia ejemplar según fórmula (I)

<400> 117

gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguuuuu	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucucaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg	120
auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguuuauuc cccuuuuuuu uuuuuuuuuu	180
uuuuuaguaa augcgucuauc ugaauccagc gaugaugcug gcccagauc	229

10 <210> 118

<211> 546

<212>ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223>Descripción de secuencia: secuencia ejemplar según fórmula (I)

<400> 118

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

<210> 119

<211> 1083

<212>ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>Descripción de secuencia: secuencia ejemplar según fórmula (I)

<400> 119

gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu 60
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucucaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg 120
 auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguuauucu cccuuuuuuu uuuuuuuuuu 180
 uuuuuaguua augcgucuac ugaauccagc gaugaugcug gccagaucu ucgaccacaa 240
 gugcauauag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu 300
 cugagacuuc gcuagagacu acaguuaacag cugcaguagu aaccacugcg gcuauugcag 360
 gaaaucccgu ucagguuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag 420

 guggaguguc acugcucucg aggucucacg agagcgcucg auacaguccu uggaagaauc 480
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugugcgacg aucacagaga acuucuauc augcaggucu 540
 gcucuaagaac gaacugaccu gacgccugaa cuuauagagc ugcguauuuu uuuuuuuuuu 600
 uuuuuuuuuu cucccaacaa augucgauca auagcugggc uguuggagac gcgucagcaa 660
 augccguggc uccauaggac guguagacuu cuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucccggg 720
 accacaaaua auauucugc 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
 ucauagggua ccggcucaga guuaugccuu gguugaaaac ugcccagcau acuuuuuuuu 1020
 uuuuuuuuuu uucauauucc caugcuaagc aagggaugcc gcgagucaug uuaagcuuga 1080
 auu 1083

10

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ARN que consiste en o comprende SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118 o SEQ ID NO: 119 que estimula la respuesta immune innata dirigiendo los receptores TLR-7, TLR-8, TLR-3, RIG-1 o MDA-5.
- 5 2. Moléculas de ARN según la reivindicación 1, para su uso comoun medicamento.
3. Composición farmacéutica que contiene unamolécula de ARN según la reivindicación 1, un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente sustancias auxiliares adicionales, aditivos y/o adyuvantes.
- 10 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizada porque comprende adicionalmente al menos un componente farmacéuticamente activo, preferiblemente seleccionado del grupo consistente en péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, compuestos orgánicos o inorgánicos de bajo peso molecular (terapéuticamente activos) con un peso molecular inferior a 5.000, azúcares, antígenos, anticuerpos, patógenos, patógenos atenuados, patógenos desactivados, células (humanas), fragmentos celulares o fracciones y otros agentes terapéuticos, preferentemente adaptados para tener propiedades de transfección mejoradas, incluyendo mediante la formación de complejo con lípidos y/o compuestos policatiónicos, incluyendo péptidos policatiónicos.
- 15 5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizada porque la composición contiene al menos un adyuvante adicional, que es un agente inmunoestimulador, seleccionado del grupo consistente en péptidos catiónicos, incluyendo polipéptidos que incluyen protamina, nucleolina, espermina o espermidina, polisacáridos catiónicos, incluyendo quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, plurónicos, solución de alumbre, hidróxido de aluminio, ADJUMER^{MR} (polifosfaceno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alumbre); gel de hidróxido de aluminio altamente absorbente de proteínas; gel de hidróxido de aluminio de baja viscosidad; AF o SPT (emulsión de escualeno (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%), solución salina tampón de fosfato, pH 7,4); AVRIDINE^{MR} (propanodiamina); BAY R1005^{MR} (hidroacetato de (N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoil-amida); CALCITRIOL^{MR} (1 α ,25-dihidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de calcio); holotoxina de cólera, proteína de fusión de fragmento de cólera-toxin-A1-proteína-A-D, sub-unidad B de la toxina de cólera; CRL 1005 (copolímero en bloque P1205); liposomas que contienen citoquinas; DDA (bromuro dimetildiodecilaamonio); DHEA (deshidroepiandrosterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complejo DOC/alumbre (sal sódica de ácido desoxicólico); adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; gamma-inulina; adyuvante Gerbu (mezcla de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-glutamina (GMDP), ii) cloruro de dimetildiodecilaamonio (DDA), iii) complejo de sal de zinc-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^{MR} dipalmitato (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRVs (inmunoliposomas preparados de vesículas de deshidratación-rehidratación); interferón-gamma; interleucina-1beta; interleucina-2; interleucina-7; interleucina-12; ISCOMS^{Mr} ("Complejos Inmunoestimulantes"); ISCOPREP 7.0.3^{MR}; liposomas; LOXORIBINE^{MR} (7-alil-8-oxoguanosina (guanina)); adyuvante oral LT (enterotoxina-prototoxina lábil de E.coli); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59^{MR}; (emulsión de escualeno-agua); MONTANIDE ISA 51^{MR} (adyuvante de Freund incompleto purificado); MONTANIDE ISA 720^{MR} (adyuvante de aceite metabolizable); MPL^{MR} lípido A de (3-Q-desacil-4'-monofosforilo); MTP-PE y liposomas de MTP-PE ((sal de monosodio de N-acetil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosforilo)etilamida); MURAMETIDE^{MR} (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH₃); MURAPALMITINE^{MR} y D-MURAPALMITINE^{MR} (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoil); NAGO (neuraminidasa-galactosa- oxidasa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISVs (vesículas surfactantes no iónicas); PLEURAN^{MR} (beta-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico; micro-/nano-esferas); PLURONIC L121^{MR}; PMMA (metacrilato de polimetilo); PODDS^{MR} (microesferas proteinoides); derivados de carbamato de polietileno; poli-rA; poli-rU (complejo de ácido poliadenílico-ácido poliuridílico); polisorbato 80 (Tween 80); cocleatos de proteína (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON^{MR} (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^{MR} ("formulación adyuvante Syntex"); proteoliposomas Sendai y matrices de lípido que contienen Sendai; Span-85 (trioleato de sorbitan); Specol (emulsión de Marcol 52, Span 85 y Tween 85); escualeno o Robane^{MR} (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^{MR} (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida); Theronyl-MDP (Termurtide^{MR} o [thr 1]-MDP; N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina); partículas Ty (Ty-VLPs o
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

partículas similares a virus); liposomas Walter-Reed (liposomas que contienen lípido A adsorbido en hidróxido de aluminio), y lipopéptidos, que incluyen Pam3Cys,

5 en particular sales de aluminio, tal como Adju-phos, Alhydrogel, Rehydrogel, etc., emulsiones, tales como CFA, SAF, IFA, MF59, Provax, TiterMax, Montanide, Vaxfectin, etc., copolímeros, tal como Optivax (CRL1005), L121, Poloaxmer4010), etc., liposomas, tal como Stealth, etc., cocleatos, tal como BIORAL, etc., adyuvantes derivados de plantas tal como QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM, etc.; adyuvantes preferidos adecuados para la coestimulación pueden incluir por ejemplo Tomatina, biopolímeros, tal como PLG, PMM, Inulina, etc.; adyuvantes derivados de microbios tal como Romurtide, DETOX, MPL, CWS, Mannosa, CpG7909, ISS-1018, IC31, Imidazoquinolinas, Ampligen, Rib529, IMOXine, IRIVs, VLPs, toxina del cólera, toxina lábil al calor, Pam3Cys, Flagellin, ancla GPI, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP, etc., adyuvantes preferidos adecuados como antagonistas por ejemplo, pueden incluir neuropéptido CGRP,

15 o de compuestos catiónicos o policationicos, que son adecuados para depósito y suministro, que incluyen protamina, nucleolina, espermina o espermidina u otros péptidos o proteínas catiónicas tal como poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos de penetración de células (CPPs), que incluyen péptidos de enlace de VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, Penetratina, VP22 derivados o péptidos análogos, HSV VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTDs, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, péptido(s) de MPG, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de Calcitonina, péptidos derivados de Antenapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, FGF, Lactoferrina, Transportan, Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, protamina, espermina, espermidina o histonas. Adicionalmente, las proteínas o péptidos catiónicos o policationicos preferidos se pueden seleccionar de las siguientes proteínas o péptidos que tienen la siguiente fórmula total: (Arg)_l;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x, en donde l + m + n + o + x = 8-15, y l, m, n u o independientemente entre sí pueden ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, con la condición de que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos el 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 o Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4, con la condición de que el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido, polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polímeros catiónicos, que incluyen polietilenimina (PEI), lípidos catiónicos, que incluyen DOTMA: cloruro de [1-(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil fosfatidiletanol-amina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: bromuro de Dimiristo-oxipropil-dimetil-hidroxietyl-amonio, DOTAP: dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano, DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadeciloxipropil)(2-hidroxietyl)]dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oximetiloxi)etyl]trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisucciniloxi)etyl]trimetilamonio, oligofectamina, o polímeros catiónicos o policationicos, que incluyen poliaminoácidos modificados, que incluyen β -aminoácido-polímeros o poliamidas invertidas, etc., polietilenos modificados, incluyendo PVP (bromuro de poli(N-etil-4-vinilpiridinio)), acrilatos modificados, incluyendo pDMAEMA (poli(dimetilaminoetil metilacrilato)), etc., amidoaminas modificadas incluyendo pAMAM (poli(amidoamina)), polibetaaminoéster modificado (PBAE), incluyendo polímeros de 1,4-butanodiol-diacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificado en el extremo de diamina, dendrímeros, incluyendo dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros basados en pAMAM, poliimina(s), incluyendo PEI: poli(etilenimina), poli(propileneimina), etc., polialilamina, polímeros basados en cadena principal de azúcar, incluyendo polímeros basados en ciclodextrina, polímeros basados en dextrano, quitosano, polímeros basados en cadena principal de silano, incluyendo copolímeros PMOXA-PDMS, etc., polímeros en bloque que consisten en una combinación de uno o más bloques catiónicos (incluyendo por ejemplo aquellos seleccionados de los polímeros catiónicos citados anteriormente) y uno o más bloques hidrofílicos o hidrofóbicos (por ejemplo polietilenglicol);

55 o que se pueden seleccionar de ácidos nucleicos de fórmula (IV): G_lX_mG_n, donde: G es guanosina, uridina o un análogo de guanosina o uridina; X es guanosina, uridina, adenosina, timidina, citidina o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente; l es un número entero de 1 a 40, donde cuando l = 1 G es guanosina o un análogo de la misma, cuando l > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma; m es un número entero y es al menos 3; donde cuando m = 3 X es uridina o un análogo de la misma, cuando m > 3 están presentes al menos 3 uridinas sucesivas o análogos de uridina; n es un número entero de 1 a 40, donde cuando n = 1 G es guanosina o un análogo de la misma, cuando n > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma;

o de ácidos nucleicos de fórmula (V): $C_l X_m C_n$, donde: C es citidina, uridina o un análogo de citidina o uridina; X es guanosina, uridina, adenosina, timidina, citidina o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente; l es un número entero de 1 a 40, donde cuando l = 1 C es citidina o un análogo de la misma, cuando l > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son citidina o un análogo de la misma; m es un número entero y es al menos 3; donde cuando m = 3 X es uridina o un análogo de la misma, cuando m > 3 están presentes al menos 3 uridinas sucesivas o análogos de uridina; n es un número entero de 1 a 40, donde cuando n = 1 C es citidina o un análogo de la misma, cuando n > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son citidina o un análogo de la misma.

6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizada porque la composición farmacéutica es una vacuna.

7. Molécula ARN según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas, enfermedades autoinmunes, alergias o enfermedades infecciosas,

donde las enfermedades cancerosas o tumorales se seleccionan preferiblemente entre carcinomas de colon, melanomas, carcinomas renales, linfomas, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), tumores gastrointestinales, carcinomas pulmonares, gliomas, tumores tiroideos, carcinomas mamarios, tumores de próstata, hepatomas, varios tumores inducidos por virus tales, por ejemplo carcinomas inducidos por el virus del papiloma (por ejemplo carcinoma 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 (carcinoma hepatocelular), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neuromas/neurinomas acústicos, cáncer cervical, cáncer pulmonar, cáncer de faringe, carcinomas anales, glioblastomas, linfomas, carcinomas rectales, astrocitomas, tumores cerebrales, cáncer de estómago, retinoblastomas, basaliomas, metástasis cerebral, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer pancreático, cáncer testicular, melanomas, carcinomas tiroideos, cáncer de vejiga, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, carcinomas bronquiales, tumor de hipófisis, Micosis fungoides, cáncer esofágico, cáncer de mama, carcinoides, neurinomas, espinaliomas, linfomas de Burkitt, cáncer laríngeo, cáncer renal, timomas, carcinomas corpus, cáncer óseo, linfomas no de Hodgkin, cáncer uretral, síndrome de CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendrogliomas, cáncer vulvar, cáncer intestinal, carcinomas de colon, carcinomas esofágicos, afectación de verrugas, tumores del intestino delgado, craneofaringeomas, carcinomas de ovario, tumores/sarcomas de tejido blando, cáncer ovárico, cáncer de hígado, carcinomas pancreático, carcinomas cervicales, carcinomas endometriales, metástasis del hígado, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de la vesícula biliar, leucemia, plasmocitomas, cáncer uterino, tumor de etapa, cáncer de próstata y

donde las enfermedades infecciosas se seleccionan preferiblemente de entre gripe, malaria, SARS, fiebre amarilla, SIDA, enfermedades de Lyme, Leishmaniasis, ántrax, meningitis, enfermedades infecciosas virales tales como SIDA, Condiloma acuminata, verrugas huecas, Fiebre de dengue, fiebre de tres días, virus del ébola, gripe, meningoencefalitis de verano temprana (FSME), catarro, culebrilla, hepatitis, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, Herpes zoster, influenza, encefalitis Japonesa, fiebre de Lassa, virus Marburg, rubeola, enfermedad de pies y boca, mononucleosis, paperas, infección de virus de Norwalk, fiebre glandular de Pfeiffer, viruela, polio (cojera de la niñez), pseudo-crup ("garrotillo"), quinta enfermedad, rabia, verrugas, fiebre del Nilo del Oeste, varicela, virus citomegálico (CMV), enfermedades infecciosas bacterianas tales como aborto (inflamación de la próstata), ántrax, apendicitis, borreliosis, botulismo, Camfilobacter, Clamidia tracomatis (inflamación de la uretra, conjuntivitis), cólera, difteria, donavanosis, epiglotitis, fiebre de tifus, gangrena gaseosa, gonorrea, fiebre de conejo, Helicobacter pylori, tosferina, linfogranuloma venéreo, osteomielitis, enfermedad del Legionario, lepra, listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, ántrax, otitis media, Micoplasma hominis, sepsis neonatal (Corioamnionitis), noma, paratifus, plaga, síndrome de Reiter, fiebre manchada de las montañas rocosas, paratifus de Salmonela, tifus de Salmonela, escarlatina, sífilis, tétanos, alucinación, enfermedad de tsutsugamushi, tuberculosis, tifus, vaginitis (colpitis), chancro blando y de enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoarios u hongos, tales como amebiasis, bilharziosis, enfermedad de Chagas, pie de atleta, manchas de hongo de levadura, escabiosis, malaria, oncocercosis (ceguera de los ríos), o enfermedades fúngicas, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad de sueño), Leishmaniosis visceral, dermatitis del pañal, esquistosomiasis, envenenamiento del pescado (Ciguatera), candidiasis, Leishmaniosis cutánea, lambliasis (giardiasis), o enfermedad del sueño, o

de enfermedades infecciosas causadas por Echinococcus, tenia de pescado, tenia de zorro, tenia canina, piojos, tenia de bovino, tenia de porcino, tenia miniatura y

donde las enfermedades autoinmunes se seleccionan preferiblemente del grupo consistente en enfermedades autoinmunitarias de tipo I o enfermedades autoinmunitarias de tipo II o enfermedades

5 autoinmunitarias de tipo III o enfermedades autoinmunitarias de tipo IV, tal como, por ejemplo, esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes, diabetes tipo I (Diabetes mellitus), lupus eritematoso sistémico (SLE), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunitarias 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, pérdida de cabello, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, Miastenia gravis, neurodermitis, Polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (PSS), psoriasis, síndrome de Reiter, artritis reumática, psoriasis, vasculitis, etc., o diabetes tipo II, y

10 donde las alergias se seleccionan preferiblemente del grupo consistente en asma alérgica (que conduce al hinchamiento de la mucosa nasal), conjuntivitis alérgica (que conduce a la rojez y comezón de la conjuntiva), rinitis alérgica ("fiebre del heno"), anafilaxis, angiodema, dermatitis atópica (eczema), urticaria (comezón), eosinofilia, respiratorias, alergias a las picaduras de insectos, alergias de la piel (que conducen a e incluyen varios sarpullidos, tales como eczema, comezón (urticaria) y dermatitis (contacto)), alergias a los alimentos, alergias a medicamentos.

15

Figura 1

Secreción TNFalfa en hPBMCs

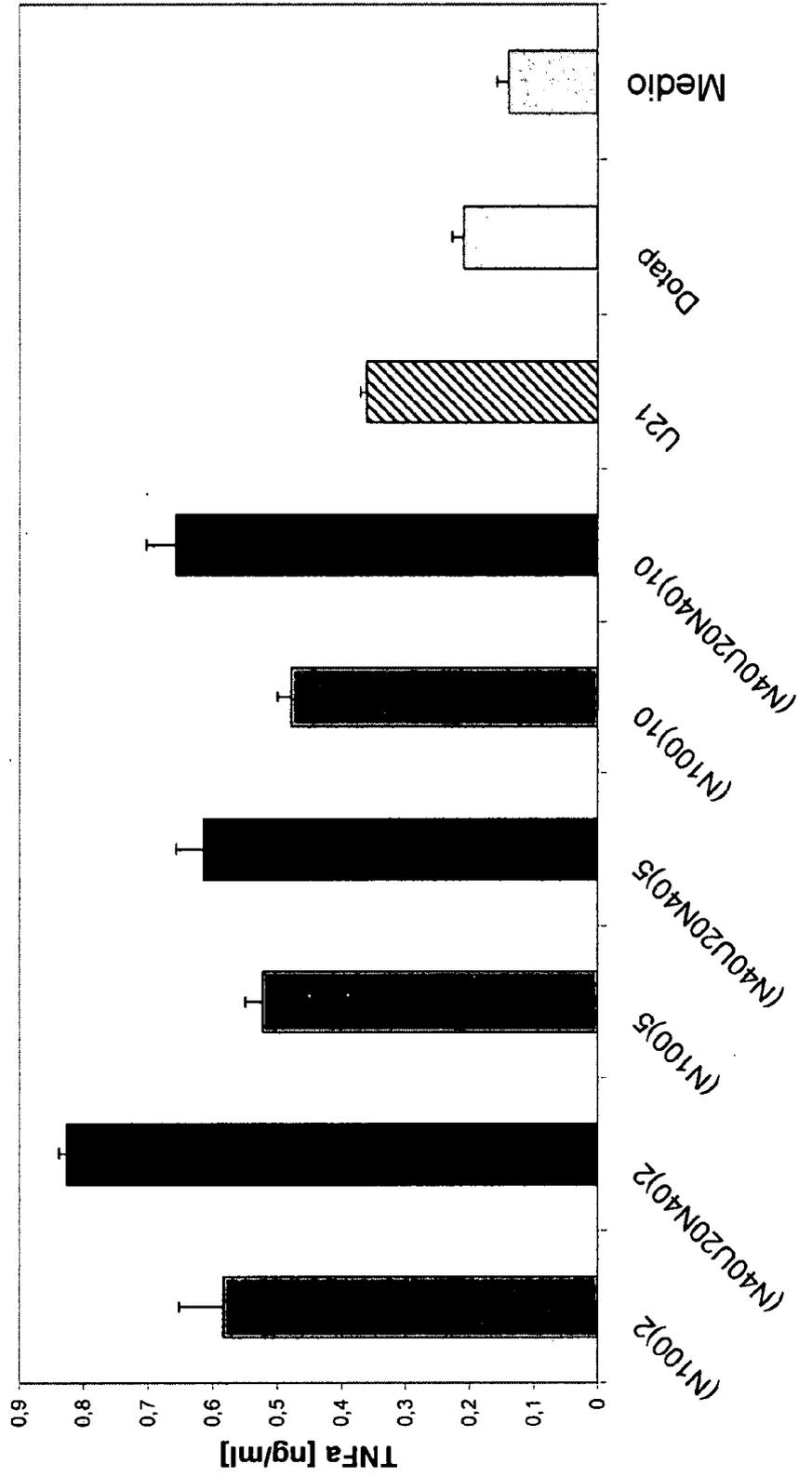


Figura 2

Secreción INFalfa en hPBMCs

