

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 237**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.02.2012** **PCT/EP2012/000877**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012** **WO12116810**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2012** **E 12706488 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2680880**

54 Título: **Vacunación de recién nacidos y niños**

30 Prioridad:

02.03.2011 WO PCT/EP2011/001047

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KALLEN, KARL-JOSEF;
KRAMPS, THOMAS;
SCHNEE, MARGIT;
PETSCH, BENJAMIN y
STITZ, LOTHAR

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 634 237 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

Vacunación de recién nacidos y niños

5 La presente invención se refiere a vacunas que comprenden al menos un ARNm codificador de al menos un antígeno para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un recién nacido y/o un niño de una edad de no más de 2 años, preferiblemente de no más de 1 año, en especial de no más de 9 meses o incluso 6 meses, comprendiendo el tratamiento la vacunación del recién nacido o del niño y la provocación de una respuesta inmunitaria en dicho recién nacido o niño.

10 El diagnóstico, la prevención y el tratamiento de infecciones y alergias en recién nacidos y niños tiene gran interés y cada vez más se realizan intensas investigaciones en todo el mundo. En este contexto, es de principal relevancia el profundo conocimiento de los mecanismos del sistema inmune de bebés y niños. Como es bien conocido, el principal papel del Sistema inmunitario es proteger el organismo contra patógenos, pero la respuesta del sistema inmune a tales patógenos no es la misma durante toda la vida. Además, es sabido que las respuestas del sistema inmune subyacen bajo alteraciones asociadas a la edad. Igualmente, las respuestas
15 del sistema inmune de recién nacidos y niños no son las mismas que en los adultos. En particular, la respuesta de las células T y B difiere de hecho en muchos aspectos, lo que contribuye a la necesidad de los cuidados prenatales del sistema inmune fetal y a la transición a las condiciones externas durante el nacimiento.

Como es bien conocido, todos los sistemas orgánicos del cuerpo sufren una dramática transición durante el nacimiento, desde una protegida existencia intra-uterina al ambiente exterior radicalmente distinto. Esta fuerte transición es seguida por una maduración gradual, dependiente de la edad. Como indica Ofer (véase Ofer, NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY VOLUME 7 | MAY 2007 | 379), los sistemas inmunes fetal y neonatal están normalmente asociados con demandas fisiológicas en tres aspectos: protección contra la infección, incluyendo patógenos virales y bacterianos en la interfase maternal-fetal, prevención de las respuestas polarizadas potencialmente perjudiciales de las células pro-inflamatorias/auxiliares T1 (Th1), que pueden
20 inducir reacciones autoinmunes entre la madre y el feto, y mediación de la transición entre el ambiente intra-uterino normalmente estéril al ambiente extraño rico en antígenos del mundo exterior, incluyendo la colonización primero de la piel y del tracto intestinal por microorganismos. Dada la limitada exposición a los antígenos en el útero y los bien descritos defectos en la inmunidad adaptativa neonatal, los recién nacidos deben confiar en sus sistemas inmunes innatos para su protección en un grado significativo. Dado que el sistema inmune innato puede instruir la respuesta inmunitaria adaptativa, la distinta expresión funcional de la inmunidad innata neonatal, incluyendo una influencia contra las citoquinas polarizantes de células Th1, contribuye a un patrón diferenciado de las respuestas inmunes adaptativas neonatales. Evidencias sólidas indican que la producción inducida por la infección de citoquinas polarizantes de células pro-inflamatorias/Th1, incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina-1 β (IL-1 β), está asociada al parto y al nacimiento prematuro. En particular, se piensa que la producción de TNF favorece el aborto debido a la inducción de la apoptosis de células placentarias y fetales. La capacidad de las citoquinas pro-inflamatorias de inducir un aborto espontáneo es también una razón importante para la tendencia de los sistemas inmunes fetal y materno de numerosas especies de mamíferos a las citoquinas polarizantes de células TH2 (véase Levy, 2007, *supra*).

Debido a esta deficiente producción de células Th1 asociadas a citoquinas, inicialmente se pensó que el sistema inmune innato neonatal estaba habitualmente deteriorado o deprimido; sin embargo, la producción estimulada-inducida de ciertas citoquinas (por ejemplo IL-6, IL-10 e IL-23) por monocitos neonatales y células presentadoras de antígenos (APCs) realmente excede la de los adultos (véase Angelone, D. et al., *Pediatr. Res.* 60, 205-209 (2006); Vanden Eijnden, S., Goriely, S., De Wit, D., Goldman, M. & Willems, F. *Eur. J. Immunol.* 36, 21-26, (2006); Chelvarajan, R. L. et al., *J. Leukoc. Biol.* 75, 982-994 (2004)). Sin embargo, todavía
45 parece existir una tendencia contra las citoquinas polarizantes de células Th1, lo que hace que el recién nacido sea susceptible a infecciones microbianas y contribuye a la incapacidad de la respuesta inmune neonatal a la mayoría de las vacunas, frustrando así los esfuerzos por proteger a esta población tan vulnerable. Tras el nacimiento, existe una maduración dependiente de la edad de la respuesta inmune. Es de señalar que exposición prenatal y postnatal a productos microbianos ambientales que pueden activar la inmunidad innata podrían acelerar este proceso de maduración, en particular si la exposición tiene lugar repetidas veces en el tiempo, disminuyendo la polarización de las células TH2 y/o mejorando la polarización de las células Th1 y, por tanto, reduciendo potencialmente alergias y atopías, según la hipótesis de higiene (véase de nuevo Levy, 2007, *supra*).

Marchant y Goldmann (véase Marchant and Goldmann, *Clinical and Experimental Immunology*, 2005, 14: 10-18) han estudiado las respuestas inmunes mediadas por las células T en la vida temprana, en particular en recién nacidos. Como se indica allí, los linfocitos T circulantes neonatales son fundamentalmente diferentes de las células T naive adultas y tienen características de emigrantes tímicas recientes. Contienen altas concentraciones de círculos de escisión de receptor de células T (TRECs), subproductos de AND episomal de reorganización de cadena TCR α que no se replican, sino que se diluyen durante la división celular. Al igual que las células naive adultas, la mayoría de los linfocitos neonatales expresan la isoforma CD45 RA+ y las moléculas co-estimuladoras CD27 y CD28. Al contrario que los linfocitos naive adultos, los linfocitos neonatales

expresan la molécula CD38. Además, una alta proporción de células T circulantes neonatales están en ciclo y muestran una mayor susceptibilidad a la apoptosis, indicando una alta renovación celular. La proliferación de linfocitos T naive también puede detectarse durante la vida fetal y podría durar hasta los cinco años de edad. La alta renovación celular observada en la vida temprana probablemente juega un papel central en el establecimiento del repertorio de células T. A pesar de su alta renovación, las células T mantienen las secuencias teloméricas largas debido a una gran actividad constitutiva de la telomerasa. *In vitro*, la apoptosis de los linfocitos T neonatales puede ser evitada por las citoquinas señalizadoras mediante la cadena γ y del receptor IL-2, esto es IL2, IL-4, IL-7 e IL-15. Entre estas citoquinas, IL-7 e IL-15 también inducen la proliferación de linfocitos T neonatales en ausencia de otros estímulos. La IL-7 está implicada en el desarrollo de timocitos en una etapa previa a la reorganización de los receptores de células T. La IL-15 preferentemente estimula la proliferación de células T CD8 más que de CD4+. Al contrario que IL-7, la IL-15 induce la diferenciación de linfocitos T CD8+ *in vitro* (véase Marchant and Goldmann, 2005, *supra*).

Diversos mecanismos limitan las respuestas de tipo T-auxiliar 1 (Th1) en la vida temprana. En el útero, las respuestas Th1 son tóxicas para la placenta y están inhibidas trofoblastos derivados de IL-10 y la progesterona. En el nacimiento, las respuestas Th1 son todavía de menor magnitud que más tarde en la vida. *In vitro*, las células T CD4+ de los recién nacidos producen menores niveles de IFN γ que las células T naive adultas y están hipermetiladas en sitios CpG y no CpG dentro del promotor IFN γ . En presencia de una co-estimulación de CD28 subóptima, la IL-12 estimula la producción tanto de IL-4 como de IFN γ por los linfocitos T CD4 neonatales, mientras que las células adultas no producen IL-bajo condiciones similares. En respuesta a la activación policlonal o de superantígeno, los timocitos postnatales se desarrollan en citoquinas Th2 productoras de células CD4, aunque es necesaria la IL-12 para estimular la producción de IFN γ . Por el contrario, las células T CD8+ neonatales producen niveles similares de IFN γ y tienen un patrón de metilación del promotor de IFN γ comparable al de las células naive adultas. Además, los linfocitos T CD8 neonatales son altamente dependientes de la presencia de IL-4 en el momento del cebado para diferenciarse en células productoras de IL-4. La capacidad de los linfocitos T CD4 neonatales de expresar el ligando CD40 (CD154), una molécula que juega un papel crítico en la ayuda de los linfocitos B y las células T CD8+, sigue siendo controvertida (véase también Marchant and Goldmann, 2005, *supra*).

Igualmente, los datos disponibles indican que los linfocitos T naive están programados de forma diferente es los neonatos y los adultos. Brevemente, la capacidad de las células T CD4+ neonatales de producir IFN γ y de las DC neonatales de promover respuestas Th1 es menor en comparación con la de los adultos en estudios *in vitro*. Además, las respuestas Th1 a diversas vacunas y patógenos infecciosos *in vivo* son pobres durante la vida temprana. Sin embargo, pueden desarrollarse respuestas Th1 maduras en ciertas condiciones, tales como la vacunación BCG neonatal y la infección por *Bordetella pertussis*, probablemente en relación con una activación más eficiente de los DC. Así, el paradigma clásico de que los recién nacidos tienen linfocitos T incompetentes que se desarrollan sólo débilmente o de que tienen respuestas tolerogénicas debe reconsiderarse. La observación de que pueden desarrollarse respuestas celulares inmunes maduras en la vida temprana sugiere que, bajo condiciones apropiadas de estimulación, los linfocitos T neonatales pueden adaptarse a luchar contra patógenos intracelulares (véase también Marchant and Goldmann, 2005, *supra*).

No solo las diferencias en las respuestas de las células T, sino también en las respuestas de las células B parecen mostrar un fuerte impacto en la inmunoprotección recién nacidos y/o niños en comparación con individuos adultos. Durante mucho tiempo se ha pensado que la vulnerabilidad de los niños menores de 18-24 meses a las bacterias encapsuladas, como pneumococcus, Haemophilus influenzae B (Hib) y meningococcus, reflejan un fallo general para generar respuestas de las células T independientes de las células B a la mayoría de polisacáridos bacterianos (véase Claire-Anne Siegrist y Richard Aspinall, NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY VOLUME 9 | MARCH 2009 | 185). Sin embargo, la inmadurez del sistema inmune de los recién nacidos y/o niños también tiene un efecto directo en la magnitud de las respuestas de las células T dependientes de las proteínas de antígenos. Se investigaron los mecanismos que dan forma a las respuestas de las células B en la vida temprana empleando una inmunización neonatal en modelos de ratón, que se desarrollaron para reproducir las principales limitaciones de las respuestas inmunes a las vacunas administradas a una edad temprana (véase Claire-Anne Siegrist y Richard Aspinall, 2009, *supra*). Existen numerosas diferencias entre las células B esplénicas del ratón neonato y del adulto, aunque se han identificado pocas en comparación con las células B periféricas humanas. Específicamente, las células B neonatales expresan menores niveles de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, lo que disminuye sus respuestas a los ligandos CD40 (CD40L) y a la interleucina-10 (IL-10) expresada por las células T. Las células B esplénicas de la zona marginal de los niños expresan menores niveles de CD21, lo que limita su capacidad de responder a los complejos complemento de polisacáridos. La expresión de TACI (ligando de interacción de ciclofilina, activador transmembrana y calcio modular; también conocidos como TNFRSF13B), un importante receptor de la co-estimulación, también está disminuida tanto en ratones recién nacidos como neonatales y en las células humanas B neonatales, en particular en los nacidos prematuros. Además, las respuestas de las células B en la vida temprana están influenciadas por numerosos factores extrínsecos. Los anticuerpos de origen materno se unen a los antígenos de las vacunas en un epítipo de forma específica y, por tanto, evitan que las células B de los niños accedan a los epítopos inmunodominantes de la vacuna. Igualmente, los ratones y humanos neonatos tienen bajos niveles del componente de complemento sérico C3, lo que limita sus

respuestas a los complejos de antígenos C3d. El bazo humano contiene menos macrófagos en la zona marginal (que tienen un papel crucial en la inducción de una respuesta de anticuerpos mediante la captura de partículas de antígenos) en neonatos que en adultos y las células difieren en su capacidad de producir citoquinas. En el
 5 ratón bebé, las respuestas de las células B están limitadas por un marcado retraso en la maduración de la red de células dendríticas foliculares (FDC), debido al fallo de los precursores de FDC para responder a la señalización de las células B mediada por linfotoxina- α . El centro de las FDC germinales nucleares reacciona atrayendo a las células B específicas de antígeno, retiene los antígenos en forma de complejos inmunes que estimulan en alta medida las células B y proporciona señales que llevan a la hipermutación somática y a la recombinación de la recombinación de clase. Por tanto, la inmadurez de la red FDC retrasa y limita la magnitud
 10 de las respuestas del centro germinal, incluso cuando se emplean potentes adyuvantes que inducen patrones de activación de células B, Células T y DC similares a las adultas. Además de la maduración postnatal de las respuestas de los anticuerpos, la persistencia de los anticuerpos *in vivo* exhibe un importante efecto. El mantenimiento a largo plazo de anticuerpos específicos con una vida media corta requiere la persistencia de las células B productoras de anticuerpos, los cuales pueden ser producidos continuamente a partir de un *pool* de memoria de células B o pueden permanecer como células plasmáticas de larga vida. La depleción de las células de memoria B mediada por anticuerpos, que no afecta a las células en plasma, ha demostrado que la etapa célula-plasma es independiente del *pool* de células B de memoria. También se ha demostrado que la persistencia de los anticuerpos *in vivo* puede estar influida por factores medioambientales. Esto apoya la hipótesis de que la limitada persistencia de las respuestas de los anticuerpos en la vida temprana se debe a la
 15 exposición a una alta carga de antígenos ambientales, lo que resulta en una competición el acceso a un limitado grupo de nichos de supervivencia de células plasmáticas en la médula ósea (véase Claire-Anne Siegrist y Richard Aspinall, 2009, *supra*).

Como es sabido, la administración de una única dosis de una vacuna en el nacimiento puede no conseguir anticuerpos específicos durante el cebado para obtener respuestas secundarias consecuentes, lo que indica
 25 una vía de diferenciación neonatal preferencial hacia las células B de memoria que hacia las células plasmáticas. Al modelo de diferenciación de las células B parecen contribuir diversos factores. El destino de las células B naive específicas de antígeno, y su diferenciación en células plasmáticas de vida corta, de vida larga p de células B de memoria está controlado por las señales de activación tempranas de las células B. Las células B de alta afinidad son reclutadas activamente hacia el *pool* de células plasmáticas, mientras que de afinidad moderada permanecen como células B de memoria en los órganos linfoides secundarios. Así, la menor afinidad del receptor de las células B y/o el retraso en la afinidad de maduración de las células B naive neonatales podría disminuir la fuerza de la señal y favorecer la diferenciación en células B de memoria.

La limitada expresión de CD21 por las células B del niño también se apoya en la generación de células B de memoria y perjudica el desarrollo de células plasmáticas, que podría estar apoyado por la señalización mediada
 35 por CD40, citoquinas como Il-21 e interacciones con ligandos tales como factor de activación de células B (BAFF; también conocido como TNFSF13B) y APRIL. Es de señalar que estos factores de apoyo a las células plasmáticas todos son expresados a bajos niveles en la vida temprana, a pesar de que se proporcionen señales de activación adicionales para mejorar la activación de DC y células T. Además, las células B de la vida temprana podrían tener que competir por recursos limitados dentro del centro germinal, lo que afectaría a la respuesta de los anticuerpos. Así, la diferenciación de las células plasmáticas podría “forzarse” en la vida temprana proporcionando señales de activación de DC adicionales. Por tanto, una combinación de factores parece resultar en una diferenciación preferente de las células B de la vida temprana hacia células B de memoria en vez de hacia células plasmáticas de vida larga en un modelo. Es de señalar que, aunque se ha demostrado que puede formarse un *pool* de células B de memoria en la vida temprana, esto no debería
 45 considerarse como una prueba de que su magnitud o persistencia es similar a aquella proporcionada en huéspedes inmunológicamente maduros. Observaciones recientes del fallo de las vacunas de refuerzo en proporcionar una respuesta de memoria en adolescentes o adultos jóvenes que habían sido vacunados contra el virus de la hepatitis C en la infancia sugieren que las células B de memoria desencadenadas en la infancia podrían no durar mucho. Está por determinar si esto refleja un *pool* más pequeño de células. En resumen, un gran número de factores determinantes intrínsecos y extrínsecos de las células B parecen cooperar para limitar la inducción y la persistencia de células plasmáticas secretoras de anticuerpos en la vida temprana, a la vez que apoyan la inducción preferencia de respuestas de las células B de memoria (véase Claire-Anne Siegrist y Richard Aspinall, 2009, *supra*).

Tal como se ha descrito más arriba, las alteraciones en las respuestas de las células T y también en las
 55 respuestas de las células B muestran un efecto significativo no solo en la inmunoprotección frente a patógenos, sino también en las estrategias de vacunación en recién nacidos y/o niños para combatir enfermedades infecciosas, pero posiblemente también alergias, trastornos autoinmunes y otras enfermedades. Se han llevado a cabo muchos intentos de proporcionar vacunas eficientes que pueda solventar al menos algunas de las limitaciones anteriores.

Una estrategia anterior para superar estas deficiencias en el contexto de las vacunas de la gripe a base de
 60 virus se refiere a la administración de ADN plásmido desnudo (pHA) que expresa la hemaglutinina (HA) de la cepa neurovirulenta AWSN/33 del virus de la gripe para conseguir una respuesta inmune protectora por

inoculación a ratones recién nacidos y adultos (véase Bot et al., 1997, *International Immunology*, Vol. 9, No. 11, pp. 1641-1650). Como demuestran Bot et al. (1997), la exposición continua a pequeñas dosis de antígeno tras la inmunización neonatal con ADN puede llevar a primar las células B específicas y las Th, más que a inducir tolerancia. Sin embargo, sólo la inmunización pHA del ratón adulto llevó a una respuesta de Th1 parcialmente fuerte, mientras que en neonatos inducía una respuesta mixta Th1/Th2. Otra aproximación similar del mismo grupo de trabajo estaba dirigida a la administración combinada de plásmidos que expresan nucleoproteína (NP) o hemagglutina (HA) del virus de la gripe. La inmunización neonatal de ratones BALB/c fue seguida de un cebado de células B, Th y CTL más que de tolerancia (véase Bot et al., *Vaccine*, Vol. 16, No. 17, pp. 1675-1682, 1998). Sin embargo, la protección en términos de supervivencia frente al reto letal con cepas homólogas o heterólogas no fue reportada por ser incompleta. Además, en el caso del plásmido de expresión de NP, la inmunidad protectora proporcionada por la inmunización neonatal requería mucho tiempo para desarrollarse en comparación con la inmunización adulta. Ni Bot et al. (1997, *supra*) ni Bot et al. (1998, *supra*) demostraron una buena respuesta de Th1 en neonatos. Además, incluso aunque se recogió en ambos artículos que la vacunación con AND representa un medio eficiente y Seguro para generar amplias respuestas inmunes humorales y celulares al virus de la gripe durante las etapas tempranas de la vida postnatal, ahora se ha encontrado que el ADN puede ser peligroso debido a su no deseada inserción en el genoma. Estas vacunas basadas en AND pueden llevar incluso a la interrupción de genes funcionales y al cáncer o a la formación de anticuerpos anti-ADN y, por tanto, no son un objetivo hoy en día.

Otros estudios se dirigieron a la mejora de los sistemas de suministro y administración de inmunomoduladores para optimizar las respuestas de las vacunas en la vida temprana. Jiri Kovarik y Claire-Anne Siegrist se centraron en los problemas derivados del intento de vacunar contra patógenos muy pronto en la vida y en el papel de adyuvantes selectivos que podrían emplearse para: (i) inducir rápidamente una fuerte respuesta de los anticuerpos de los isotipos apropiados; (ii) proporcionar una respuesta de los anticuerpos sostenida que se amplíe más allá de la infancia; (iii) inducir respuestas de Th1 y CTL eficientes en vez de polarización preferencial de Th2 en las respuestas de la vida temprana; (iv) escapar de las respuestas a la vacuna mediadas por la inhibición de anticuerpos maternos; (v) mostrar una reactogenicidad aceptable en la vida temprana; y (vi) permitir la incorporación de varios antígenos de vacuna en una única formulación para reducir el número de inyecciones necesarias (véase Jiri Kovarik y Claire-Anne Siegrist, *Immunology and Cell Biology* (1998) 76, 222-236). Kovarik y Siegrist (1998, *supra*) *inter alia* discuten diferentes sistemas de suministro de antígenos, tales como la administración de sustancias particuladas, emulsiones, liposomas, virosomas, microesferas, vacunas vivas, vectores y vacunas de ADN, así como el uso de inmunomoduladores como MPL, QS21, derivados de MDP, citoquinas, interferones y oligodesoxinucleótidos CpG y combinaciones de sistemas de presentación de antígenos e inmunomoduladores. Sin embargo, al igual que en el caso de Kovarik y Siegrist (1998, *supra*) muchas de estas combinaciones son hipotéticas e incluso pueden no proporcionar una respuesta de Th1 eficiente o incluso conllevar efectos secundarios no deseados.

De forma similar, Adrian Bot y Constantin Bona (véase Adrian Bot y Constantin Bona, *Microbes and Infection* 4 (2002) 511-520) sugieren el uso de motivos CpG bacterianos para activar las células presentadoras de antígenos inmaduras y para mejorar la inmunogenicidad neonatal de las vacunas de ADN. Además, Bot y Bona (2002, *supra*) sugieren una combinación de refuerzo subsiguiente con vacunas convencionales. Sin embargo, la estrategia subrayada en este artículo no conduce a una respuesta de Th1 convincente. Además, el estudio está basado en el uso de vacunas de AND, lo cual puede considerarse potencialmente peligroso.

Otra estrategia prometedora pero muy específica recae en el uso del nuevo adyuvante específico IC31. Como es sabido en la técnica, solo hay unos pocos adyuvantes aprobados para su uso en humanos. Uno de los adyuvantes principales aprobados para uso humano es, por ejemplo, el alumbre, un adyuvante a base de sal de aluminio. Sin embargo, aunque están aprobadas para uso en humanos, dichas sales de aluminio no proporcionaron un aumento satisfactorio de las respuestas inmunitarias por las vacunas de la gripe estacional en ensayos clínicos tempranos en humanos, un efecto que puede ser esperado igualmente durante otras estrategias de vacunación. Otras vacunas de la gripe con adyuvantes autorizadas incluyen hasta la fecha Flud® (Novartis Vaccines), que contiene MF59 en combinación con una formulación de vacuna de subunidades, y las vacunas virosomales Inflexal®V (Berna Biotech, una compañía de Crucell) e Invivac® (Solvay). Aunque estudios con animales y ensayos clínicos en humanos han revelado un perfil de inmunogenicidad más alto - definido como respuestas de anticuerpos aumentadas - con la vacuna de la gripe con adyuvante MF59, el MF59 no es un adyuvante potente para la inducción de respuestas inmunitarias celulares dirigidas de tipo 1. A diferencia del Flud®, las vacunas virosomales representan envolturas del virus de la gripe reconstituidas que contienen las proteínas de superficie de la gripe funcionales hemagglutina y neuramidasa en su bicapa fosfolipídica. La inmunogenicidad y la tolerabilidad local de vacunas de la gripe a base de virosomas han sido demostradas en diversos estudios. Sin embargo, el desarrollo de formulaciones virosomales es muy complejo y los costes de los materiales son altos.

En este contexto, Kamath et al. (véase Kamath et al., 2008, *PLoS ONE* 3(11): e3683. doi:10.1371/journal.pone.0003683) reportaron el uso report de un adyuvante específico IC31 con la proteína de fusión Ag85b-ESAT-6 para la inmunización de ratones neonatos y adultos. Al contrario que el alumbre, IC31H inducía fuertes respuestas de Th1 y Th17 en ambos grupos de edad, caracterizadas por células T

- multifuncionales que expresan IL-2 y TNF α con o sin IFN γ . En el drenaje de nódulos linfáticos, similarmente un número pequeño de DC contenían el adyuvante y/o el antígeno tras la inmunización neonatal o adulta. La expresión de la producción de CD40, CD80, CD86 e IL-12p40 se enfocó en el minuto adyuvante-rumbo de la población DC, donde la dirección/activación de DC era similar en adultos y neonatos. Estas respuestas celulares DC/T resultaban en una reducción equivalente del crecimiento bacteriano tras la infección con *M. bovis* BCG, mientras que no se observó una protección cuando se empleó alumbre como adyuvante. Sin embargo, no se indica ningún otro adyuvante en Kamath et al. (2008, *supra*) que permita extender este ejemplo específico a otras vacunas.
- 5 Dado que las vacunas basadas en ARN representan una modalidad de inmunización interesante, Johansson *et al.* (véase Johansson et al., 2012, PLoS ONE 7(1): e29732) investigaron las respuestas inmunitarias provocadas por replicones de ARN desnudo, replicones lanzados por ADN y ARNm desnudo administrado mediante electroporación intradérmica. En su estudio se detectaron respuestas inmunitarias en ratones adultos inmunizados con replicones de ARN desnudo o replicones lanzados por ADN, mientras que en los ratones adultos inmunizados con ARNm i.d. no se logró inducir ninguna respuesta inmunitaria detectable.
- 10 Sin embargo, en otro estudio, el tratamiento de ratones adultos con una vacuna de ARNm de dos componentes que apoya tanto la expresión de antígenos como la estimulación inmunitaria mediada por receptor de tipo Toll 7 (TLR7), medió en una fuerte respuesta antitumoral (Fotin-Mleczeck et al., 2011, J Immunother 34(1): 1-15). En resumen, la vacuna de ARNm de dos componentes, que contenía ARNm libre y complejo con protamina, mostró una actividad autoadyuvante, indujo respuestas inmunitarias adaptativas equilibradas y medió en una actividad antitumoral constante (Fotin-Mleczeck *et al.*, 2011, *supra*). No obstante, estos estudios de vacunación a base de ARNm se referían únicamente a animales adultos, pero no a recién nacidos o crías.
- 15 Resumiendo lo anterior, ninguna de las vacunas del estado actual de la técnica permite provocar una respuesta inmune eficientemente en recién nacidos y/o niños que muestre características al menos similares a una respuesta inmune en adultos. En particular, muchas vacunas no proporcionan una respuesta inmune Th1 eficiente en recién nacidos y/o niños. Así, existe una necesidad urgente de vacunas optimizadas para estos pacientes. Más concretamente se requieren vacunas que no acarreen los problemas mostrados en el estado anterior de la técnica o al menos disminuyan estos problemas en una medida significativa. Además, está previsto proporcionar vacunas que permitan inducir respuestas inmunitarias de Th1 en recién nacidos y/o niños, preferiblemente sin que conduzcan a un cambio de respuestas inmunitarias de Th1 a Th2 después de la administración. Del mismo modo se deberían evitar las vacunas a base de ADN debido a la posible inserción de ADN en el genoma, la posible interrupción de genes y la formación de anticuerpos anti-ADN.
- 20 El objeto que subyace en la presente invención se resuelve mediante la materia de las reivindicaciones adjuntas, de forma especialmente preferente tal como se indica en adelante.
- 25 El objeto que subyace en la presente invención se resuelve mediante una vacuna que comprende al menos un ARNm que codifica al menos un antígeno, para su uso en la profilaxis de una enfermedad infecciosa en recién nacidos y/o niños, con una edad no superior a 2 años, preferentemente no superior a 1 año, en especial no superior a 9 meses o incluso a 6 meses, donde
- 30 – el tratamiento comprende la vacunación del recién nacido o niño y la provocación de una respuesta inmunitaria en dicho recién nacido o niño;
- 35 – el contenido de G/C de la región codificadora del o de los ARNm se incrementa en al menos un 15% en comparación con el contenido de G/C de la región codificadora de la secuencia codificadora de tipo silvestre respectiva; y
- 40 – el o los ARNm se complejan con un compuesto policatiónico.
- 45 Sin apoyarse en ninguna teoría particular, las vacunas de ARN integran elegantemente adyuvanticidad y expresión de antígeno, imitando así aspectos relevantes de las infecciones virales. Esto aumenta su eficacia en comparación con otras vacunas inactivadas (muertas), que requieren el uso de adyuvantes avanzados en recién nacidos o niños, simplificando la manipulación y producción. El ARN se puede dirigir a una serie de receptores de reconocimiento de patrones inmunológicos dedicados, incluyendo receptores de tipo Toll 3, 7 y 8, RIG-I, MDA5, PKR, y otros que pueden actuar de forma sinérgica y servir para mejorar la inducción de respuesta de las células B y T adaptativas específicas de antígeno. En un aspecto importante, mediante síntesis de antígenos en células huésped transfectadas, las vacunas de ARNm introducen directamente antígeno en rutas de procesamiento y presentación de antígenos celulares, otorgando acceso a moléculas MHC y desencadenando la respuesta de las células T, independientemente del haplotipo MHC de los huéspedes. Esto posibilita la inducción de respuestas de células T policlonales que pueden actuar de forma sinérgica con otras respuestas inmunitarias, incluyendo las células B. Además, la presentación del espectro completo de epítomos de unión de MHC puede evitar las limitaciones debidas a un sistema inmune inmaduro en recién nacidos o niños. Además, la producción endógena de antígeno asegura la modificación postraducciona1 fidel (por ejemplo procesamiento proteolítico, glicosilación, etc.), que puede influir positivamente en la inmunogenicidad. Además, las vacunas de ARN presentan características de seguridad que las hace superiores para su uso con recién nacidos y/o niños. Por ejemplo, la reactogenicidad aumentada de las vacunas vivas atenuadas generalmente
- 50
55
60

impide el uso en este grupo objetivo altamente relevante. Sin embargo, teniendo en cuenta la persistencia corta y la descomposición sin rastro del vector de vacuna en cuestión de días, la buena inmunogenicidad observada es inesperada y contrasta con las reivindicaciones de las vacunas de ADN plásmido, que vinculaban de diversas formas la eficacia a la expresión persistente de antígeno.

- 5 El o los ARNm de la vacuna de la invención tal como se definen más arriba, que codifican al menos un antígeno, se pueden seleccionar entre cualesquiera de los antígenos conocidos por los expertos, preferiblemente adecuados para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un paciente. De acuerdo con la presente invención, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que es reconocida por el sistema
- 10 inmunitario y que es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, por ejemplo mediante la formación de anticuerpos o células T específicas de antígeno como parte de una respuesta inmunitaria adaptativa. En este contexto, la primera etapa de una respuesta inmunitaria adaptativa es la activación de las células T específicas de antígeno naive o diferentes inmunocitos capaces de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno por células presentadoras de antígeno. Esto ocurre en los tejidos
- 15 linfoides y órganos a través de los cuales pasan constantemente células T naive. Los tres tipos de células que pueden servir como células presentadoras de antígeno son células dendríticas, macrófagos y células B. Cada una de estas células tiene una función diferente en la provocación de respuestas inmunitarias. Las células dendríticas tisulares absorben antígenos por fagocitosis y macropinocitosis y son estimuladas por contacto, por ejemplo con un antígeno extraño, para migrar al tejido linfático local, donde se diferencian en células dendríticas maduras. Los macrófagos ingieren antígenos en forma de partículas, tales como bacterias, y son inducidos por
- 20 agentes infecciosos u otros estímulos apropiados para expresar moléculas MHC. La capacidad única de las células B para unirse a antígenos de proteína solubles e internalizar los mismos a través de sus receptores también puede ser importante para inducir células T. La presentación del antígeno sobre moléculas MHC conduce a la activación de las células T, que induce a su proliferación y diferenciación en células T efectoras armadas. La función más importante de las células T efectoras es la destrucción de células infectadas por
- 25 células T citotóxicas CD8+ y la activación de macrófagos por células TH1, que juntos constituyen la inmunidad mediada por células, y la activación de células B por células tanto TH2 como TH1 para producir diferentes clases de anticuerpo, dirigiendo así la respuesta inmunitaria humoral. Las células T reconocen un antígeno por sus receptores de células T, que no reconocen y se unen al antígeno directamente, sino que en lugar de ello reconocen fragmentos peptídicos cortos, por ejemplo de antígenos proteínicos de patógenos, que están unidos a moléculas MHC sobre la superficie de otras células.
- 30

- En el contexto de la presente invención, los antígenos codificados por el o los ARNm de la vacuna de la invención comprenden normalmente cualquier antígeno que entre dentro de la definición arriba dada, de forma especialmente preferente antígenos proteínicos y peptídicos. De acuerdo con la invención, los antígenos codificados por el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden ser antígenos generados fuera de la célula,
- 35 más típicamente antígenos no derivados del propio organismo huésped (por ejemplo un humano) (es decir, antígenos no propios), sino más bien derivados de células huésped fuera del organismo huésped, por ejemplo antígenos patógenos, en particular antígenos virales, bacterianos, fúngicos, antígenos de protozoos, antígenos de animal (preferiblemente seleccionados entre animales u organismos tal como se dan a conocer aquí), antígenos alérgicos, etc. Los antígenos codificados por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí
- 40 pueden ser además antígenos generados dentro de la célula, el tejido o el cuerpo, por ejemplo por secreción de proteínas, su degradación, metabolismo, etc. Estos antígenos incluyen antígenos derivados del propio organismo huésped (por ejemplo un humano), por ejemplo antígenos tumorales, antígenos propios o autoantígenos, tales como antígenos propios autoinmunes, etc., pero también antígenos (no propios) tal como se definen más arriba, que han sido derivados originalmente de células huésped fuera del organismo huésped, pero que están fragmentados o degradados dentro del cuerpo, tejido o célula, por ejemplo por degradación (proteasa), metabolismo, etc.
- 45

- Los antígenos patógenos comprenden en particular por ejemplo antígenos de la gripe, preferiblemente gripe A, gripe B, gripe C o thogotovirus, preferiblemente antígenos de la gripe hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA), preferiblemente antígenos de la gripe derivados de los subtipos de hemaglutinina H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14 o H15, y/o los subtipos de neuraminidasa N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9, o preferiblemente seleccionados entre los subtipos de la gripe A H1N1, H1N2, H2N2, H2N3, H3N1, H3N2, H3N3, H5N1, H5N2, H7N7 o H9N2, o cualquier otra combinación, o de proteína de matriz 1 (M1), proteína de canal iónico M2 (M2), nucleoproteína (NP), etc.; o por ejemplo antígenos del virus sincicial respiratorio (VSR), incluyendo proteína F, proteína G, etc.
- 50
- 55 Otra clase de antígenos codificados por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí comprende antígenos alérgicos. Los antígenos alérgicos son normalmente antígenos que provocan una alergia en humanos y que se pueden derivar de un humano o de otras fuentes. Estos antígenos alérgicos se pueden seleccionar entre antígenos derivados de diferentes fuentes, por ejemplo de animales, plantas, hongos, bacterias, etc. En este contexto, los alérgenos también incluyen antígenos derivados por ejemplo de hierbas, pólenes, mohos, fármacos o numerosos desencadenantes medioambientales, etc. Los antígenos alérgicos pertenecen normalmente a diferentes clases de compuestos, tales como proteínas o péptidos y sus fragmentos, carbohidratos, polisacáridos, azúcares, lípidos, fosfolípidos, etc. Son de especial interés los antígenos
- 60

codificados por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí, es decir, antígenos proteínicos o peptídicos y sus fragmentos o epítomos, o ácidos nucleicos y sus fragmentos, en particular ácidos nucleicos y sus fragmentos, que codifican dichos antígenos proteínicos o peptídicos y sus fragmentos o epítomos.

De forma particularmente preferente, los antígenos derivados de animales que son codificados por el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden incluir antígenos derivados, de forma no limitativa, de insectos, tales como ácaros (por ejemplo ácaros del polvo doméstico), mosquito zancudo, abeja (por ejemplo abeja melífera, abejorro), cucaracha, garrapata, polilla (por ejemplo mariposa de la seda), mosquito, chinche, pulga, avispa, oruga, mosca de la fruta, langosta migratoria, saltamontes, hormiga, áfidos; de crustáceos, tales como camarón, cangrejo, krill, langosta, gamba, cigala, langostino; de aves, tales como pato, ganso, gaviota, pavo, avestruz, pollo; de peces, tales como anguila, arenque, carpa, panga, bacalao, fletán, siluro, beluga, salmón, platija, caballa, sepia, perca; de moluscos, tales como vieira, pulpo, oreja de mar, caracol, bocina, calamar, almeja, mejillón; de arañas; de mamíferos, tales como vaca, conejo, oveja, león, jaguar, leopardo, rata, cerdo, búfalo, perro, lémur, hámster, cobaya, gamo, caballo, gato, ratón, ocelote, serval; de artrópodos, tales como araña o lespisma; de gusanos, tales como nematodos, de especies de triquina, o ascáride; de anfibios, tales como ranas; o de ascidias, etc. Los antígenos derivados de animales también pueden comprender antígenos contenidos en productos animales, preferiblemente contenidos en productos animales derivados de animales tales como los arriba definidos, por ejemplo leche, huevos, carne, etc., pero también de excrementos o precipitados de cualquier tipo, derivados de cualquiera de estos animales.

De forma totalmente preferente, los antígenos derivados de animales que son codificados por el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden incluir antígenos derivados de dichos animales que producen una enfermedad infecciosa tal como se define aquí.

Los antígenos derivados de plantas que son codificados por el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden incluir antígenos derivados, de forma no limitativa, de frutas tales como kiwi, piña, panapén, papaya, limón, naranja, mandarina, melón, caqui, fresa, lichí, manzana, cereza, manzana enana, mango, maracuyá, ciruela, albaricque, nectarina, pera, maracuyá, frambuesa, uva; de hortalizas tales como ajo, cebolla, puerro, soja, apio, coliflor, nabo, pimienta, garbanzo, hinojo, calabacín, pepino, zanahoria, batata, judía, guisante, aceituna, tomate, patata, lenteja, lechuga, aguacate, perejil, rábano picante, chirimoya, remolacha, calabaza, espinaca; de especias tales como mostaza, cilantro, azafrán, pimienta, anís; de cereales tales como avena, alforfón, cebada, arroz, trigo, maíz, colza, sésamo; de frutos de cáscara tales como anacardo, nuez, nuez blanca, pistacho, almendra, avellana, cacahuete, nuez del Brasil, pacana, castaña; de árboles tales como aliso, carpe, cedro, abedul, avellano, haya, fresno, alheña, roble, plátano, ciprés, palmera; de flores tales como ambrosía, clavel, forsitia, girasol, altramuza, camomila, lila, pasionaria; de hierbas tales como grama oficial, agrostis alba, bromo peludo, grada americana, cerrillo, ballico; o de otras plantas tales como adormidera, pelitre, llantén, tabaco, espárrago, artemisa, berro, etc.

Los antígenos derivados de hongos que son codificados por el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden incluir antígenos derivados, de forma no limitativa, por ejemplo de *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Beauveria sp.*, *Candida sp.*, *Cladosporium sp.*, *Endothia sp.*, *Curcularia sp.*, *Embellisia sp.*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium sp.*, *Malassezia sp.*, *Penicillium sp.*, *Pleospora sp.*, *Saccharomyces sp.*, etc.

Los antígenos derivados de bacterias que son codificados por el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden incluir antígenos derivados, de forma no limitativa, por ejemplo de *Bacillus tetani*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces griseus*, etc.

Otra clase de antígenos que son codificados por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí comprende antígenos tumorales. Los "antígenos tumorales" están localizados preferiblemente sobre la superficie de la célula (tumoral). Los antígenos tumorales también se pueden seleccionar entre proteínas que son sobreexpresadas en células tumorales en comparación con una célula normal. Además, los antígenos tumorales también incluyen antígenos expresados en células que no están (estaban) degeneradas en sí (o que originalmente no estaban degeneradas en sí), sino que están asociadas al supuesto tumor. Aquí también se incluyen antígenos que están conectados con vasos que proporcionan riego a tumores o con la (re)formación de los mismos, en particular aquellos antígenos que están asociados con neovascularización, por ejemplo factores de crecimiento, tales como VEGF, bFGF, etc. Los antígenos conectados con un tumor incluyen además antígenos de células o tejidos que normalmente incorporan el tumor. Además, algunas sustancias (normalmente proteínas o péptidos) son expresadas en pacientes que sufren (consciente o inconscientemente) una enfermedad cancerosa, y se encuentran en concentraciones crecientes en los fluidos corporales de dichos pacientes. Estas sustancias también se designan como "antígenos tumorales", sin embargo no son antígenos en el sentido estricto de una sustancia que induce una respuesta inmunitaria. La clase de antígenos tumorales se puede dividir además en antígenos específicos de tumores (AET) y antígenos asociados con tumores (AAT). Los AET solo pueden ser presentados por células tumorales y nunca por células "sanas" normales. Normalmente resultan de una mutación específica de un tumor. Los AAT, que son más comunes, son presentados normalmente tanto por células tumorales como por células sanas. Estos antígenos son reconocidos y la célula presentadora de antígeno puede ser destruida por células T citotóxicas. Adicionalmente, también se pueden encontrar antígenos tumorales sobre la superficie del tumor, por ejemplo en forma de un

receptor mutado. En este caso, éstos pueden ser reconocidos por anticuerpos. Los conceptos "enfermedades cancerosas" y "enfermedades tumorales" se utilizan aquí como sinónimos.

Los ejemplos de antígenos tumorales codificados por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí pueden comprender, por ejemplo, antígenos seleccionados entre el grupo que comprende, de forma no limitativa, 5T4, 707-AP (707 alanina prolina), 9D7, AFP (alfa-fetoproteína), AlbZIP MPG1, alfa5beta1-Integrina, alfa5beta6-Integrina, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4 (antígeno de adenocarcinoma reconocido por células T 4), B7H4, BAGE-1 (antígeno B), BCL-2, BING-4, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA 72-4, CA125, calreticulina, CAMEL (antígeno sobre melanoma reconocido por CTL), CASP-8 (caspasa-8), catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD40, CD52, CD55, CD56, CD80, CEA (antígeno carcinoembrionario), CLCA2 (canal 2 de cloruro activado por calcio), CML28, proteína similar a coactosina, colágeno XXIII, COX-2, CT-9/BRD6 (proteína específica testicular de bromodominio), Cten (proteína similar a tensina C-terminal), ciclina B1, ciclina D1, cyp-B (ciclofilina B), CYPB1 (citocromo P450 1B1), DAM-10/MAGE-B1 (antígeno de diferenciación melanoma 10), DAM-6/MAGE-B2 (antígeno de diferenciación melanoma 6), EGFR/Her1, EMMPRIN (inductor de metaloproteínasa de matriz extracelular asociado con células tumorales/), EpCam (molécula de adhesión de célula epitelial), EphA2 (receptor 2 de tipo A de efrina), EphA3 (receptor 3 de tipo A de efrina), ErbB3, EZH2 (intensificador de homólogo 2 Zeste), FGF-5 (factor de crecimiento fibroblástico-5), FN (fibronectina), Fra-1 (antígeno 1 relacionado con Fos), G250/CAIX (glicoproteína 250), GAGE-1 (G antígeno 1), GAGE-2 (G antígeno 2), GAGE-3 (G antígeno 3), GAGE-4 (G antígeno 4), GAGE-5 (G antígeno 5), GAGE-6 (G antígeno 6), GAGE-7b (G antígeno 7b), GAGE-8 (G antígeno 8), GDEP (gen expresado de forma diferencial en próstata), GnT-V (N-acetilglucosaminiltransferasa V), gp100 (glicoproteína 100 kDa), GPC3 (glicoproteína 3), HAGE (antígeno de helicasa), HAST-2 (tumor-2 en anillo de sello), hepsina, Her2/neu/ErbB2 (receptor-2 epidérmico humano/neurológico), HERV-K-MEL, HNE (elastasa de neutrófilo humano), caja homeótica NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HST-2, hTERT (transcriptasa inversa de telomerasa humana), iCE (carboxil esterasa intestinal), IGF-1R, IL-13Ra2 (cadena alfa 2 de receptor de interleuquina 13), IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmaduro, calicreína 2, calicreína 4, Ki67, KIAA0205, KK-LC-1 (antígeno 1 de cáncer pulmonar Kita-kyushu), KM-HN-1, LAGE-1 (antígeno L), livina, MAGE-A1 (antígeno A1 de melanoma), MAGE-A10 (antígeno A10 de melanoma), MAGE-A12 (antígeno A12 de melanoma), MAGE-A2 (antígeno A2 de melanoma), MAGE-A3 (antígeno A3 de melanoma), MAGE-A4 (antígeno A4 de melanoma), MAGE-A6 (antígeno A6 de melanoma), MAGE-A9 (antígeno A9 de melanoma), MAGE-B1 (antígeno B1 de melanoma), MAGE-B10 (antígeno B10 de melanoma), MAGE-B16 (antígeno B16 de melanoma), MAGE-B17 (antígeno B17 de melanoma), MAGE-B2 (antígeno B2 de melanoma), MAGE-B3 (antígeno B3 de melanoma), MAGE-B4 (antígeno B4 de melanoma), MAGE-B5 (antígeno B5 de melanoma), MAGE-B6 (antígeno B6 de melanoma), MAGE-C1 (antígeno C1 de melanoma), MAGE-C2 (antígeno C2 de melanoma), MAGE-C3 (antígeno C3 de melanoma), MAGE-D1 (antígeno D1 de melanoma), MAGE-D2 (antígeno D2 de melanoma), MAGE-D4 (antígeno D4 de melanoma), MAGE-E1 (antígeno E1 de melanoma), MAGE-E2 (antígeno E2 de melanoma), MAGE-F1 (antígeno F1 de melanoma), MAGE-H1 (antígeno H1 de melanoma), MAGEL2 (similar a MAGE 2), mammaglobina A, MART-1/Melan-A (antígeno de melanoma reconocido por células T-1/antígeno de melanoma A), MART-2 (antígeno de melanoma reconocido por células T-2), proteína de matriz 22, MC1 R (receptor de melanocortina 1), M-CSF (gen de factor de estimulación de colonia de macrófagos), mesotelina, MG50/PXDN, MMP 11 (fosfoproteína 11 de fase M), antígeno IX MN/CA, MRP-3 (proteína 3 asociada con resistencia a múltiples fármacos), MUC1 (mucina 1), MUC2 (mucina 2), NA88-A (clon de ADNc NA de paciente M88), N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP (Neo-poli(A) polimerasa), NGEP, NMP22, NPM/ALK (proteína de fusión de nucleofosmina/quinasa de linfoma anaplásico), NSE (enolasa específica de neuronas), NY-ESO-1 (New York esofágico 1), NY-ESO-B, OA1 (proteína de albinismo ocular de tipo 1), OFA-iLRP (receptor de laminina inmadura de antígeno oncofetal), OGT (gen de N-acetilglucosamina transferasa unido a O), OS-9, osteocalcina, osteopontina, p15 (proteína 15), p15, p190 menor bcr-abl, p53, PAGE-4 (proteína 4 similar a GAGE de próstata), PAI-1 (inhibidor activador de plasminógeno 1), PAI-2 (inhibidor activador de plasminógeno 2), PAP (fosfatasa ácida de próstata), PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-quinasa, Pin1 (propilisomerasa), POTE, PRAME (antígeno de melanoma expresado de forma preferencial) prosteína, proteinasa-3, PSA (antígeno específico de próstata), PSCA, PSGR, PSM, PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), RAGE-1 (antígeno renal), RHAMM/CD168 (receptor para motilidad mediada por ácido hialurónico), RU1 (ubiquo renal 1), RU2 (ubiquo renal 1), S-100, SAGE (antígeno de sarcoma), SART-1 (antígeno escamoso de rechazo de tumor 1), SART-2 (antígeno escamoso de rechazo de tumor 1), SART-3 (antígeno escamoso de rechazo de tumor 1), SCC (antígeno de carcinoma de células escamosas), Sp17 (proteína espermática 17), SSX-1 (sarcoma sinovial X punto de interrupción 1), SSX-2/HOM-MEL-40 (sarcoma sinovial X punto de interrupción), SSX-4 (sarcoma sinovial X punto de interrupción 4), STAMP-1, STEAP (antígeno epitelial transmembrana seis de próstata), survivina, survivina-2B (survivina de retención de intrón 2), TA-90, TAG-72, TARP, TGFb (TGFbeta), TGFbRII (receptor TGFbeta II), TGM-4 (transglutaminasa específica de próstata), TRAG-3 (proteína 3 asociada resistente al taxol), TRG (gen relacionado con la testina), TRP-1 (proteína 1 relacionada con la tirosina), TRP-2/6b (TRP-2/nuevo exón 6b), TRP-2/INT2 (TRP-2/intrón 2), Trp-p8, tirosinasa, UPA (activador de plasminógeno de tipo uroquinasa), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), VEGFR-2/FLK-1 (receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular), WT1 (gen de tumor de Wilms), o puede comprender por ejemplo antígenos mutantes expresados en enfermedades cancerosas seleccionados entre el grupo que comprende, de forma no limitativa, alfa-actinina-4/m, ARTC1/m,

bcr/abl (punto de interrupción proteína de fusión de Abelson-región de agrupamiento), beta-catenina/m (beta-catenina), BRCA1/m, BRCA2/m, CASP-5/m, CASP-8/m, CDC27/m (ciclo de división celular 27), CDK4/m (quiasa 4 dependiente de ciclina), CDKN2A/m, CML66, COA-1/m, DEK-CAN (proteína de fusión), EFTUD2/m, ELF2/m (factor de alargamiento 2), ETV6-AML1 (proteína de fusión gen 6 variante de Ets/gen de leucemia mieloide aguda 1), FN1/m (fibronectina 1), GPN-MB/m, HLA-A*0201-R170I (intercambio de arginina a isoleucina en el residuo 170 de la hélice alfa del dominio alfa 2 en el gen HLA-A2), HLA-A11/m, HLA-A2/m, HSP70-2M (proteína de choque térmico 70-2 mutada), KIAA0205/m, K-Ras/m, LDLR-FUT (proteína de fusión LDR-fucosiltransferasa), MART2/m, ME1/m, MUM-1/m (antígeno ubicuo mutado 1 asociado al melanoma), MUM-2/m (antígeno ubicuo mutado 2 asociado al melanoma), MUM-3/m (antígeno ubicuo mutado 3 asociado al melanoma), miosina clase I/m, neo-PAP/m, NFYC/m, N-Ras/m, OGT/m, OS-9/m, p53/m, Pml/RARa (leucemia promielocítica/receptor alfa con ácido retinoico), PRDX5/m, PTPRK/m (proteína de tipo receptor-tirosina fosfatasa kappa), RBAF600/m, SIRT2/m, SYT-SSX-1 (proteína de fusión sinaptotagmina I/sarcoma sinovial X), SYT-SSX-2 (proteína de fusión sinaptotagmina I/sarcoma sinovial X), TEL-AML1 (proteína de fusión translocación leucemia familiar Ets/leucemia mieloide aguda 1), TGFbRII (receptor TGFbeta II), TPI/m (triofosfato isomerasa). No obstante, de acuerdo con un aspecto específico, los ARNm que codifican de antígenos gp100, MAGE-A1, MAGE-A3, MART-1/melan-A, survivina, y/o tirosinasa, preferiblemente ARNm que codifican antígenos gp100, MAGE-A1, MAGE-A3, MART-1/melan-A, survivina, y/o tirosinasa, en donde los ARNm han sido complejados o estabilizados con protamina (por ejemplo en una relación de aproximadamente 80 µg de ARNm y 128 µg de protamina), pueden ser excluidos del alcance de la invención. En un aspecto preferente, los antígenos tumorales codificados por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí se seleccionan entre el grupo consistente en 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, cathepsina B, cathepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD40, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína similar a coactosina, colágeno XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EF-TUD2/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, caja homeótica 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 inmaduro, calicreína-2, calicreína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mammaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína de matriz 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, MN/CA antígeno 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 menor bcr-abl, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-quinasa, Pin-1, Pml/PARalpha, 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.

De acuerdo con un aspecto particularmente preferente, los antígenos tumorales codificados por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí se seleccionan entre el grupo consistente en MAGE-A1 (por ejemplo MAGE-A1 de acuerdo con el número de acceso M77481), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6 (por ejemplo MAGE-A6 de acuerdo con el número de acceso NM_005363), MAGE-C1, MAGE-C2, melan-A (por ejemplo melan-A de acuerdo con el número de acceso NM_005511), GP100 (por ejemplo GP100 de acuerdo con el número de acceso M77348), tirosinasa (por ejemplo tirosinasa de acuerdo con el número de acceso NM_000372), survivina (por ejemplo survivina de acuerdo con el número de acceso AF077350), CEA (por ejemplo CEA de acuerdo con el número de acceso NM_004363), Her-2/neu (por ejemplo Her-2/neu de acuerdo con el número de acceso M11730), WT1 (por ejemplo WT1 de acuerdo con el número de acceso NM_000378), PRAME (por ejemplo PRAME de acuerdo con el número de acceso NM_006115), EGFR1 (receptor 1 de factor de crecimiento epidérmico) (por ejemplo EGFR1 (receptor 1 de factor de crecimiento epidérmico) de acuerdo con el número de acceso AF288738), MUC1, mucina-1 (por ejemplo mucina-1 de acuerdo con el número de acceso NM_002456), SEC61G (por ejemplo SEC61G de acuerdo con el número de acceso NM_014302), hTERT (por ejemplo hTERT número de acceso NM_198253), 5T4 (por ejemplo 5T4 de acuerdo con el número de acceso NM_006670), NY-Eso-1 (por ejemplo NY-Eso1 de acuerdo con el número de acceso NM_001327), TRP-2 (por ejemplo TRP-2 de acuerdo con el número de acceso NM_001922), STEAP, PCA, PSA, PSMA, etc.

Son particularmente preferentes los antígenos derivados del virus de la gripe A (antígenos HA, NA, NP, M2, M1), virus de la gripe B (antígenos HA, NA), virus sincicial respiratorio (antígenos F, G, M, SH), virus de la parainfluenza (antígenos de glicoproteína), Streptococcus pneumoniae (antígenos Pht, PcsB, StkP),

5 Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani, sarampión, paperas, rubeola, virus de la rabia (antígenos G, N), Staphylococcus aureus (antígeno de toxina), Clostridium difficile (antígeno de toxina), Mycobacterium tuberculosis (antígenos latentes), Candida albicans, Haemophilus influenzae B (HiB), virus de la polio, virus de la hepatitis C (antígenos de superficie y núcleo), papilomavirus humano (L1, L2, E6, E7), virus de la inmunodeficiencia humana (antígenos gp120, gag, env), SARS CoV (proteína espiga), Staphylococcus aureus (antígenos lsdA, lsdB, toxina), toxina pertussis, poliovirus (VP1-4), Plasmodium (antígenos NANP, proteína CSP, ssp2, ama1, msp142), Staphylococcus aureus (lsdA, lsdB, toxina), Bordetella pertussis (toxina), poliovirus VP1-4, Plasmodium (NANP, proteína CSP, antígenos ssp2, ama1, msp142).

10 Los antígenos codificados por el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden comprender además fragmentos de antígenos tales como los aquí mencionados, en particular de antígenos proteínicos o peptídicos. Los fragmentos de estos antígenos en el contexto de la presente invención pueden comprender fragmentos que preferiblemente tienen una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo fragmentos tales como los procesados y presentados por moléculas MHC de clase I, preferiblemente con una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 15 9 o 10 (o incluso 11 o 12 aminoácidos), o fragmentos tales como los procesados y presentados por moléculas MHC de clase II, preferiblemente con una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, pudiendo seleccionarse estos fragmentos de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Normalmente, estos fragmentos son reconocidos por células T en forma de un complejo consistente en el fragmento de péptido y una molécula MHC, es decir, los fragmentos 20 normalmente no son reconocidos en su forma nativa.

Los fragmentos de antígenos tal como se definen aquí también pueden comprender epítomos de dichos antígenos. Los epítomos (también denominados "determinantes antigénicos") son normalmente fragmentos situados sobre la superficie exterior de antígenos peptídicos o proteínicos (nativos) tal como se definen aquí, que preferiblemente tienen de 5 a 15 aminoácidos, de forma especialmente preferible tienen de 5 a 12 25 aminoácidos, de forma todavía más preferible tienen de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por anticuerpos, es decir, en su forma nativa.

De acuerdo con otro aspecto particularmente preferente, los antígenos tumorales codificados por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí pueden formar un cóctel de antígenos, por ejemplo en una composición (inmunoestimuladora) activa o un *kit* de partes (en el que preferiblemente cada antígeno está contenido en una 30 parte del *kit*), preferiblemente para provocar una respuesta inmunitaria (adaptativa) para el tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como se definen aquí. Con este fin, la vacuna de la invención puede comprender al menos un ARNm, pudiendo codificar cada ARNm al menos uno, preferiblemente dos, tres, cuatro o incluso más antígenos (preferiblemente diferentes) tal como se mencionan aquí. Alternativamente, la vacuna de la invención puede contener al menos uno, dos, tres cuatro o incluso más ARNm (preferiblemente diferentes), 35 codificando cada ARNm al menos un antígeno tal como se mencionan aquí.

De acuerdo con una realización no reivindicada de la presente descripción, dicho cóctel de antígenos, codificado por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí, puede ser utilizado por ejemplo en el tratamiento de, por ejemplo, cáncer de próstata (CPa), preferiblemente en el tratamiento de cánceres de 40 próstata refractarios a neoadyuvantes y/u hormonas, y enfermedades o trastornos relacionados con éstos. Con este fin, la vacuna tal como se describe aquí puede comprender al menos un ARNm, codificando cada ARNm al menos uno, preferiblemente dos, tres, cuatro o incluso más antígenos (preferiblemente diferentes) tal como se mencionan aquí. Alternativamente, la vacuna tal como se describe aquí puede contener al menos uno, dos, tres, cuatro o incluso más ARNm (preferiblemente diferentes), codificando cada ARNm al menos un antígeno tal como se mencionan aquí. Preferiblemente, los antígenos se seleccionan entre PSA (antígeno específico de 45 próstata) = KLK3 (calicreína-3), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), PSCA (antígeno de células huésped de próstata, y/o STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata).

De acuerdo con una realización no reivindicada de la presente descripción, dicho cóctel de antígenos, codificado por el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí, puede ser utilizado por ejemplo en el tratamiento de, por ejemplo, cánceres de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), preferiblemente 50 seleccionados entre los tres subtipos principales, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma pulmonar de células grandes, o de trastornos relacionados con éstos. Con este fin, la vacuna tal como se describe aquí puede comprender al menos un ARNm, codificando cada ARNm al menos uno, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce antígenos (preferiblemente diferentes) tal como se mencionan aquí. Alternativamente, la vacuna tal como se describe aquí puede contener 55 al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce ARNm (preferiblemente diferentes), codificando cada ARNm al menos un antígeno tal como se mencionan aquí. Preferiblemente, dichos antígenos se seleccionan entre hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, survivina, MAGE-C1, y/o MAGE-C2.

En los aspectos arriba indicados, cada uno de los antígenos arriba definidos puede ser codificado por un ARNm 60 (monocistrónico). Dicho de otro modo, en este caso el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden comprender al menos dos (tres, cuatro, etc.) ARNm (monocistrónicos), pudiendo codificar cada uno de estos

al menos dos (tres, cuatro, etc.) ARNm (monocistrónicos) por ejemplo solo un antígeno (preferiblemente diferente), preferiblemente seleccionado entre una de las combinaciones de antígenos arriba mencionadas.

De acuerdo con un aspecto particularmente preferente, el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden comprender (al menos) un ARNm bicistrónico o incluso multicistrónico, preferiblemente ARNm, es decir, (al menos) un ARNm que porta por ejemplo dos o incluso más secuencias que codifican al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes), preferiblemente seleccionados entre una de las combinaciones de antígenos arriba mencionadas. Dichas secuencias codificadoras, por ejemplo de los al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes), del (al menos) un ARNm bicistrónico o incluso multicistrónico pueden estar separadas por al menos una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), tal como se define más abajo. Por tanto, el concepto "que codifican al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes)" puede significar, de forma no limitativa, que el (al menos uno) ARNm (bicistrónico o incluso multicistrónico) puede codificar por ejemplo al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más antígenos (preferiblemente diferentes) del grupo o los grupos de antígenos arriba mencionados, o de sus fragmentos o variantes, etc. En este contexto, una, así llamada, secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) tal como se define aquí puede actuar como un único sitio de unión de ribosoma, pero también puede servir para proporcionar un ARN bicistrónico o incluso multicistrónico tal como se define aquí que codifica varias proteínas, que han de ser traducidas por los ribosomas independientemente entre sí. Algunos ejemplos de secuencias IRES que pueden ser utilizadas de acuerdo con la invención son las de picornavirus (por ejemplo FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia murcha (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

De acuerdo con otro aspecto particularmente preferible, el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden comprender una mezcla de al menos un ARNm monocistrónico tal como se define aquí y al menos un ARN, preferiblemente ARNm, bicistrónico o incluso multicistrónico tal como se define aquí. El o los ARN monocistrónicos y/o el o los ARN bicistrónicos o incluso multicistrónicos codifican preferiblemente antígenos diferentes, o sus fragmentos o variantes, seleccionándose los antígenos preferiblemente entre los antígenos arriba mencionados, de forma especialmente preferible entre las combinaciones arriba mencionadas. No obstante, el o los ARN monocistrónicos y el o los ARN bicistrónicos o incluso multicistrónicos preferiblemente también pueden codificar (en parte) antígenos idénticos seleccionados entre los antígenos arriba mencionados, preferiblemente entre las combinaciones arriba mencionadas, siempre que el o los ARNm de la vacuna de la invención en su totalidad proporcionen al menos dos antígenos (preferiblemente diferentes) tal como se definen aquí. Este aspecto puede resultar ventajoso por ejemplo para una administración escalonada, por ejemplo en función del tiempo, de uno o más del o de los ARNm de la vacuna de la invención a un paciente que lo requiera. Los componentes de dicha vacuna se pueden administrar por ejemplo por separado como componentes de la misma vacuna de la invención tal como se define de acuerdo con la presente invención.

En otra realización preferente, el o los ARNm de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico tal como se define aquí) también se pueden encontrar en forma de un ácido nucleico modificado.

De acuerdo con un primer aspecto, el o los ARNm de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico tal como se define aquí) se pueden proporcionar en forma de un "ácido nucleico estabilizado" que es esencialmente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo por una exonucleasa o una endonucleasa).

En este contexto, el o los ARNm de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico tal como se define aquí) pueden contener modificaciones de esqueleto, modificaciones de azúcar o modificaciones de base. Una modificación de esqueleto en relación con la presente invención es una modificación en la que los fosfatos del esqueleto de los nucleótidos contenidos en el o los ARNm de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico tal como se define aquí) están modificados químicamente. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos del o de los ARNm de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico tal como se define aquí). Además, una modificación de base en relación con la presente invención es una modificación química de la fracción de base de los nucleótidos del o de los ARNm de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico tal como se define aquí).

De acuerdo con otro aspecto, el o los ARNm de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico tal como se define aquí) pueden contener una modificación de lípido. Un ácido nucleico con modificación de lípido de este tipo comprende normalmente un ácido nucleico tal como se define aquí, por ejemplo un ARNm u otro ácido nucleico. Este ARNm con modificación de lípido de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico con modificación de lípido tal como se define aquí) normalmente comprende además al menos un enlazador enlazado de forma covalente con esta molécula de ácido nucleico y al menos un lípido enlazado de forma covalente con el enlazador respectivo. Alternativamente, el ARNm con modificación de lípido de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico con modificación de lípido tal como se define aquí) comprende al menos una molécula de ácido nucleico tal como se define aquí, por ejemplo un ARNm o cualquier otro ácido nucleico y al menos un lípido (bifuncional) enlazado de forma covalente (sin enlazador) con esta molécula de ácido nucleico. De acuerdo con una tercera alternativa, el ARNm con modificación de lípido de la

- vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico con modificación de lípido tal como se define aquí) comprende una molécula de ácido nucleico tal como se define aquí, por ejemplo un ARNm o cualquier otro ácido nucleico, al menos un enlazador enlazado de forma covalente con esta molécula de ácido nucleico y al menos un lípido enlazado de forma covalente con el enlazador respectivo y también al menos un lípido (bifuncional) enlazado de forma covalente (sin enlazador) con esta molécula de ácido nucleico.
- Igualmente, el o los ARNm de la vacuna de la invención (o cualquier otro ácido nucleico tal como se define aquí) se pueden estabilizar para prevenir la degradación del ARNm (o cualquier otra molécula de ácido nucleico) mediante diversas estrategias. En la técnica es sabido que, en general, la inestabilidad y la degradación (rápida) del ARN pueden representar un problema grave en la aplicación de composiciones basadas en ARN. Esta inestabilidad del ARN se debe normalmente a enzimas degradadoras de ARN, "ARNasas" (ribonucleasas), pudiendo a veces la contaminación con estas ribonucleasas degradar por completo el ARN en solución. Por consiguiente, la degradación natural del ARN en el citoplasma celular está regulada muy finamente y las contaminaciones con RNasas pueden ser eliminadas normalmente mediante un tratamiento especial antes del uso de dichas composiciones, en particular con pirocarbonato de dietilo (PCDE). En este contexto, en la técnica anterior se conoce una serie de mecanismos de degradación que también pueden emplearse. Por ejemplo, la estructura terminal tiene normalmente una importancia crítica, en particular para un ARNm. Por ejemplo, el extremo 5' de los ARNm naturales presentan normalmente una llamada "estructura de casquete" (un nucleótido de guanosina modificado) y el extremo 3' presenta normalmente una secuencia de hasta 200 nucleótidos de adenosina (la llamada cola de poli-A).
- El o los ARNm de la vacuna de la invención se modifican y así se estabilizan modificando el contenido de G/C de la región codificadora del ARNm.
- Por consiguiente, el contenido de G/C de la región codificadora del o de los ARNm de la vacuna de la invención se incrementa en comparación con el contenido de G/C de la región codificadora de su secuencia codificadora de tipo silvestre particular, es decir del ARNm no modificado. La secuencia de aminoácidos codificadora del ARNm preferiblemente no está modificada en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo silvestre particular.
- La modificación del contenido de G/C del o de los ARNm de la vacuna de la invención se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región de ARNm que debe traducirse es importante para una traducción eficiente de dicho ARNm. Por tanto, la composición y la secuencia de los diversos nucleótidos son importantes. En particular, las secuencias que tienen un contenido aumentado de G (guanosa)/C (citidina) son más estables que las secuencias que tienen un contenido aumentado de A (adenosina)/U (uridina). De acuerdo con la invención, los codones de la secuencia codificadora o el ARNm varían en comparación con su secuencia codificadora de tipo silvestre o ARNm, mientras se conserva la secuencia de aminoácidos traducida, de modo que incluyen un mayor número de nucleótidos de G/C. Con respecto al hecho de que varios codones codifican un mismo aminoácido (la llamada degeneración del código genético), es posible determinar los codones más favorables para la estabilidad (el llamado uso de codones alternativo).
- El contenido de G/C de la región codificadora del o de los ARNm de la vacuna de la invención se incrementa al menos en un 15%, de forma particularmente preferente al menos en un 20%, en comparación con el contenido de G/C de la región codificadora del ARNm de tipo silvestre. De acuerdo con un aspecto específico, al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, de forma especialmente preferible al menos un 70%, de forma incluso más preferible al menos un 80% y de forma totalmente preferente al menos un 90%, un 95% o incluso un 100% de los codones sustituidos en la región codificadora de una proteína o péptido tal como se definen aquí o su fragmento o variante del mismo o la secuencia completa de la secuencia de ARNm de tipo silvestre o secuencia codificadora están sustituidos, aumentando así el contenido de G/C de dicha secuencia.
- En este contexto, es particularmente preferible aumentar el contenido de G/C del o de los ARNm de la vacuna de la invención al máximo (es decir, un 100% de los codones sustituibles), en particular en la región que codifica una proteína, en comparación con la secuencia de tipo silvestre.
- De acuerdo con la invención, otra modificación preferente del o de los ARNm de la vacuna de la invención se basa en el descubrimiento de que la eficacia de traducción también está determinada por una frecuencia diferente en la presencia de ARNt en las células. Por tanto, si el o los ARNm de la vacuna de la invención presentan una mayor cantidad de los llamados "codones raros", el ARNm modificado correspondiente se traduce en un grado considerablemente peor que en el caso en que están presentes codones que codifican ARNt relativamente "frecuentes".
- Preferiblemente, la región codificadora del o de los ARNm de la vacuna de la invención se modifica en comparación con la región correspondiente del ARNm de tipo silvestre o la secuencia codificadora, de modo que al menos un codón de la secuencia de tipo silvestre que codifica un ARNt que es relativamente raro en la célula es sustituido por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y que porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Mediante esta modificación, las secuencias del o de los ARNm de la vacuna de la invención, en especial si el ácido nucleico está en forma de un ARNm o codifica un ARNm, son modificadas de modo que se insertan codones para los que están disponibles ARNt frecuentemente

presentes. Dicho de otro modo, de acuerdo con la invención, mediante esta modificación todos los codones de la secuencia de tipo silvestre que codifican un ARNt que es relativamente raro en la célula puede ser intercambiado en cada caso por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y que, en cada caso, porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.

- 5 Los expertos en la técnica saben qué ARNt están presentes de forma relativamente frecuente en la célula y cuáles, en cambio, están presentes de forma relativamente rara; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11 (6): 660-666. Los codones que utilizan para el aminoácido particular el ARNt que está presente con mayor frecuencia, por ejemplo el codón Gly, que utiliza el ARNt que está presente con mayor frecuencia en la célula (humana), son particularmente preferentes.
- 10 De acuerdo con la invención, es particularmente preferente vincular el contenido de G/C secuencial, que está aumentado en al menos un 15%, en particular maximizado, en el o los ARNm modificados de la vacuna de la invención con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región codificadora del ARNm. Este aspecto preferente posibilita la provisión de al menos un ARNm de la vacuna de la invención traducido y estabilizado (modificado) de forma particularmente eficaz.
- 15 De acuerdo con otro aspecto preferente de la invención, el o los ARNm de la vacuna de la invención tal como se define aquí o cualquier otra molécula de ácido nucleico tal como se define aquí tienen preferiblemente al menos una secuencia estabilizadora en 5' y/o en 3'. Estas secuencias estabilizadoras en las regiones no traducidas 5' y/o 3' tienen el efecto de aumentar la vida media del ácido nucleico en el citosol. Estas secuencias estabilizadoras pueden tener un 100% de identidad de secuencia con secuencias naturales presentes en virus,
- 20 bacterias y eucariotas, pero también pueden ser parcial o totalmente sintéticas. Como ejemplos de secuencias estabilizadoras que pueden emplearse en la presente invención para un ácido nucleico estabilizado se pueden mencionar las secuencias no traducidas (UTR) del gen de (alfa)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 N°: 383), que está contenida en la 3'UTR del ARN muy estable que codifica (alfa)globina, colágeno de tipo (I), 15-lipoxigenasa o tirosina hidroxilasa (véase Holcik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 1997, 94: 2410 a 2414). Evidentemente, estas secuencias estabilizadoras pueden ser utilizadas individualmente o en combinación entre sí y también en combinación con otras secuencias estabilizadoras conocidas por los expertos en la técnica.

- 30 No obstante, preferiblemente se llevan a cabo sustituciones, adiciones o eliminaciones de bases con el o los ARNm de la vacuna de la invención o cualquier otra molécula de ácido nucleico tal como se define aquí, en especial si el ácido nucleico está en forma de ARNm, utilizando una matriz de ADN para preparar la molécula de ácido nucleico mediante técnicas de la bien conocida mutagénesis dirigida o con una estrategia de ligación de oligonucleótidos (véase, por ejemplo, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed., Cold Spring Harbor, NY, 2001). En dicho proceso, para la preparación del o de los ARNm de la vacuna de la invención tal como se define aquí, se puede transcribir *in vitro* una molécula de ADN correspondiente. Esta matriz de ADN comprende preferiblemente un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, al que le siguen la secuencia de nucleótidos deseada para el o los ARNm a preparar y una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN que forma la matriz del o de los ARNm de interés se puede preparar por proliferación fermentativa y aislamiento
- 40 subsiguiente como parte de un plásmido que puede ser replicado en bacterias. Los plásmidos que pueden mencionarse como adecuados para la presente invención son, por ejemplo, los plásmidos pT7Ts (número de acceso de GenBank U26404; Lai et al., Development 1995, 121: 2349 a 2360), serie pGEM®, por ejemplo pGEMq-1 (número de acceso de GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso de GenBank X65327); véase también Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin and Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.
- 45

Las moléculas de ácido nucleico utilizadas de acuerdo con la invención y tal como se definen aquí, por ejemplo el o los ARNm de la vacuna de la invención o cualquier otra molécula de ácido nucleico tal como se define aquí, se pueden modificar tal como se bosqueja más arriba para el o los ARNm de la vacuna de la invención.

- 50 Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico utilizadas de acuerdo con la invención y tal como se definen aquí, por ejemplo el o los ARNm de la vacuna de la invención o cualquier otra molécula de ácido nucleico tal como se define aquí, se pueden preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos de síntesis, por ejemplo síntesis en fase sólida, así como métodos *in vitro*, como reacciones de transcripción *in vitro*.

- 55 De acuerdo con un aspecto no reivindicado de la presente invención, el o los ARNm de la vacuna de la invención pueden ser administrados desnudos, sin asociarse a cualquier otro vehículo, agente de transfección o complejación para aumentar la eficiencia de transfección del o de los ARNm.

- 60 El o los ARNm de la vacuna de la invención se asocian con un agente de complejación para aumentar la eficiencia de transfección del o de los ARNm, y agentes adecuados en este contexto para aumentar la eficiencia de transfección son agentes policatiónicos, incluyendo protamina, nucleolina, espermina o espermidina, u otros péptidos o proteínas policatiónicos, tales como poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos

penetrantes de células (CPP), incluyendo péptidos de unión de VIH, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, penetratina, péptidos derivados de VP22 o análogos, HSV VP22 (herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD), 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 Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, FGF, lactoferrina, transportano, buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, o histonas. Adicionalmente, péptidos o proteínas policatiónicos preferentes se pueden seleccionar entre los siguientes péptidos o proteínas de la siguiente fórmula general: (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 pueden ser, independientemente entre sí, cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, a condición de que el contenido global de Arg, Lys, His y Orn represente al menos un 50% de todos los aminoácidos de los oligopéptidos; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado entre aminoácidos nativos (= naturales) o no nativos, excepto Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3 o 4, a condición de que el contenido global de Xaa no sobrepase el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido. En este contexto, péptidos policatiónicos particularmente preferentes son, por ejemplo, Arg₇, Arg₈, Arg₉, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R, etc. Otros compuestos catiónicos o policatiónicos preferentes que pueden emplearse como agentes de transfección de acuerdo con la presente descripción que comprende la presente invención pueden incluir polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenoimina (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 fosfatidiletanolamina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioctadecilamidoglicilispermina, DIMRI: bromuro de dimiristo-oxipropildimetilhidroxietilamonio, DOTAP: dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano, DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-(α-trimetilamonioacetil)dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadecil-oxipropil)(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 policatiónicos, por ejemplo poliaminoácidos modificados, tales como polímeros de β-aminoácido o poliamidas inversas, etc., polietilenos modificados, tales como PVP (bromuro de (poli)N-etil-4-vinilpiridinio), etc., acrilatos modificados, tales como pDMAEMA (metacrilato de (poli)dimetilaminoetilo), etc., amidoaminas modificadas, tales como pAMAM ((poli)amidoamina), etc., polibetaaminoésteres modificados (PBAE), tales como polímeros de 1,4 butanodiol-diacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificados en el extremo con diamina, dendrímeros, tales como dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros basados en pAMAM, etc., poliimina(s), tales como PEI: poli(etilenoimina), poli(propilenoimina), etc., polialilamina, polímeros basados en esqueleto de azúcar, tales como polímeros basados en ciclodextrina, polímeros basados en dextrano, quitosano, etc., polímeros basados en esqueleto de silano, tales como copolímeros de PMOXA-PDMS, etc., copolímeros en bloque consistentes en una combinación de uno o más bloques catiónicos (por ejemplo seleccionados entre un polímero catiónico tal como se menciona más arriba) y de uno o más bloques hidrófilos o hidrófobos (por ejemplo polietilenglicol); etc.

El o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí, que codifican al menos un antígeno, también se pueden complejar con un soporte polimérico formado por componentes catiónicos reticulados con disulfuro. El concepto "componente catiónico" se refiere normalmente a una molécula cargada, que está cargada positivamente (catión) a un pH de aproximadamente 1 a 9, preferiblemente un pH inferior a 9, o inferior a 8 o inferior a 7, de forma totalmente preferible a pH fisiológico, por ejemplo de aproximadamente 7,3 a 7,4. Por consiguiente, un péptido, proteína o polímero catiónico está cargado positivamente bajo condiciones fisiológicas, en particular bajo condiciones salinas fisiológicas de la célula *in vivo*. La definición "catiónico" también se puede referir a componentes "policatiónicos".

En este contexto, los componentes catiónicos que forman la base para el soporte polimérico de la vacuna tal como se describe aquí mediante reticulación con disulfuro normalmente consisten en cualquier péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico adecuado para ello, en particular cualquier péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico capaz de complejar un ácido nucleico tal como se define aquí y así preferiblemente condensar el ácido nucleico. El péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico preferiblemente es una molécula lineal, no obstante también se pueden utilizar péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos ramificados.

Cada péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico del soporte polimérico que puede utilizarse para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí contiene al menos una fracción -SH, de forma totalmente preferible al menos un residuo cisteína o de cualquier otro grupo químico que tenga una fracción -SH capaz de formar un enlace disulfuro tras condensación con al menos otro péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico como componente catiónico del soporte polimérico tal como se menciona aquí.

Cada péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico o cualquier otro componente del soporte polimérico que puede emplearse para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí está unido preferiblemente con su(s) componente(s) adyacente(s) (péptidos, proteínas o polímeros catiónicos u otros componentes) a través de una reticulación con disulfuro. Preferiblemente, la reticulación con disulfuro es un enlace de disulfuro (-S-S-) (reversible) entre al menos un péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico

y al menos otro péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico u otro componente del soporte polimérico. La reticulación con disulfuro se forma normalmente por condensación de fracciones -SH de los componentes del soporte polimérico, en particular de los componentes catiónicos. Dicha fracción -SH puede formar parte de la estructura del péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico o de cualquier otro componente del soporte polimérico antes de la reticulación con disulfuro, o se puede añadir antes de la reticulación con disulfuro mediante una modificación tal como se define más abajo. En este contexto, los azufres adyacentes a un componente del soporte polimérico, necesarios para proporcionar un enlace disulfuro, pueden ser proporcionados por el propio componente, por ejemplo mediante una fracción -SH tal como se define aquí, o pueden ser proporcionados modificando el componente correspondientemente para que presente una fracción -SH. Normalmente, estas fracciones -SH son proporcionadas por cada uno de los componentes, por ejemplo a través de una cisteína o cualquier otro aminoácido (modificado) del componente que porta una fracción -SH. En el caso en el que el componente catiónico o cualquier otro componente del soporte polimérico es un péptido o proteína, es preferible que la fracción -SH sea proporcionada por al menos un residuo cisteína. Alternativamente, el componente del soporte polimérico puede ser modificado correspondientemente con una fracción -SH, preferiblemente por una reacción química con un compuesto que porta una fracción -SH, de modo que cada uno de los componentes del soporte polimérico porte al menos una de dichas fracciones -SH. Dicho compuesto que porta una fracción -SH puede ser, por ejemplo, una cisteína (adicional) o cualquier otro aminoácido (modificado) o compuesto del componente del soporte polimérico que porta una fracción -SH. Dicho compuesto también puede ser cualquier compuesto o fracción no amino que contiene o permite introducir una fracción -SH en el componente tal como se define aquí. Estos compuestos no amino se pueden unir al componente del soporte polimérico por reacciones químicas o unión de compuestos, por ejemplo mediante unión de un ácido 3-tiopropiónico o 2-iminotiolano (reactivo de Traut), mediante formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), mediante adición de Michael (por ejemplo fracciones de maleinimida, carbonilos α , β insaturados, etc.), mediante química "click" (por ejemplo azidas o alquinos), mediante metátesis de alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de complejación (avidina, biotina, proteína G) o componentes que posibilitan reacciones de sustitución de tipo S_N (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras fracciones químicas que pueden emplearse en la unión de componentes adicionales. En algunos casos, la fracción -SH se puede enmascarar con grupos protectores durante la unión química al componente. Estos grupos protectores son conocidos en la técnica y pueden ser eliminados después del acoplamiento químico. En cada caso, la fracción -SH, por ejemplo de una cisteína o de cualquier otro aminoácido (modificado) o compuesto, puede estar presente en los extremos terminales o internamente en cualquier posición del componente del soporte polimérico. Tal como se define aquí, cada uno de los componentes del soporte polimérico presenta normalmente al menos una fracción -SH, pero también puede contener dos, tres, cuatro, cinco o incluso más fracciones -SH. Adicionalmente a la unión de componentes catiónicos, puede utilizarse una fracción -SH para unir otros componentes del soporte polimérico de la vacuna tal como se define aquí, en particular un componente aminoácido, por ejemplo epítopos de antígeno, antígenos, anticuerpos, péptidos penetrantes de células (por ejemplo TAT), ligandos, etc.

Tal como se define más arriba, el soporte polimérico que puede ser utilizado para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí puede estar formado por componentes catiónicos (o policatiónicos) reticulados con disulfuro.

De acuerdo con una primera alternativa, al menos un componente catiónico (o policatiónico) del soporte polimérico que puede ser utilizado para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí se puede seleccionar de entre péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos. Estos péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos preferiblemente tienen una longitud de aproximadamente 3 a 100 aminoácidos, en especial de aproximadamente 3 a 50 aminoácidos, de forma especialmente preferente de aproximadamente 3 a 25 aminoácidos, por ejemplo una longitud de aproximadamente 3 a 10, 5 a 15, 10 a 20 o 15 a 25 aminoácidos. Alternativa o adicionalmente, dichos péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos pueden tener un peso molecular de aproximadamente 0,01 kDa a aproximadamente 100 kDa, incluyendo un peso molecular de aproximadamente 0,5 kDa a aproximadamente 100 kDa, preferiblemente de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, de forma todavía más preferible de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 30 kDa.

En el caso específico en que el componente catiónico del soporte polimérico que puede emplearse para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí comprenda un péptido o proteína catiónico o policatiónico, las propiedades catiónicas del péptido o proteína catiónico o policatiónico o de todo el soporte polimérico, si el soporte polimérico está compuesto en su totalidad por péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos, se pueden determinar en base a su contenido en aminoácidos catiónicos. Preferiblemente, el contenido en aminoácidos catiónicos en el péptido o proteína catiónico o policatiónico y/o el soporte polimérico es de al menos un 10%, 20%, o 30%, preferiblemente al menos un 40%, de forma especialmente preferible al menos un 50%, 60% o 70%, pero también preferiblemente al menos un 80%, 90%, o incluso un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, de forma totalmente preferible al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el intervalo de aproximadamente un 10% a un 90%, de

forma especialmente preferible en el intervalo de aproximadamente un 15% a un 75%, de forma incluso más preferible en el intervalo de aproximadamente un 20% a un 50%, por ejemplo un 20, 30, 40 o 50%, o en un intervalo formado por dos cualesquiera de los valores arriba mencionados, a condición de que el contenido de todos los aminoácidos, por ejemplo aminoácidos catiónicos, lipófilos, hidrófilos, aromáticos y otros, en el péptido o proteína catiónico o policatiónico o en todo el soporte polimérico, si el soporte polimérico está compuesto en su totalidad por péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos, sea del 100%.

Preferiblemente, estos péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del soporte polimérico, que comprenden o que están modificados adicionalmente para comprender al menos una fracción -SH, se seleccionan, de forma no limitativa, entre péptidos o proteínas catiónicos tales como protamina, nucleolina, espermina o espermidina, oligo- o poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, oligo- o poli-arginina, péptidos penetrantes de células (CPP), CPP quiméricos tales como transportano, o péptidos de MPG, péptidos de unión de VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, miembros de la familia de la penetratina, por ejemplo penetratina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPP derivados antimicrobianos, por ejemplo buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, PpTG20, oligómeros, FGF, lactoferrina, histonas, péptidos derivados de VP22 o análogos, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, etc.

Alternativa o adicionalmente, estos péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del soporte polimérico que comprenden o que están modificados adicionalmente para comprender al menos una fracción -SH se seleccionan, de forma no limitativa, entre los siguientes péptidos catiónicos de la siguiente fórmula general (I):

$$\{(Arg)_l;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x\};$$

donde $l + m + n + o + x = 3-100$, y l, m, n u o son, independientemente entre sí, cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 y 91-100, con la condición de que el contenido global de Arg (arginina), Lys (lisina), His (histidina) y Orn (ornitina) represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa es cualquier aminoácido seleccionado entre aminoácidos nativos (= naturales) o no nativos, excepto Arg, Lys, His u Orn; y x es cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, a condición de que el contenido global de Xaa no sobrepase el 90% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Cualquiera de los aminoácidos Arg, Lys, His, Orn y Xaa puede estar situado en cualquier lugar del péptido. En este contexto son particularmente preferentes los péptidos o proteínas catiónicos en el intervalo de 7-30 aminoácidos. Péptidos todavía más preferentes de esta fórmula son oligoargininas, por ejemplo Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₁₂, His₃Arg₉, Arg₉His₃, His₃Arg₉His₃, His₆Arg₉His₆, His₃Arg₄His₃, His₆Arg₄His₆, TyrSer₂Arg₉Ser₂Tyr, (ArgHis)₄, Tyr(ArgHis)₂Arg, etc.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, dichos péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del soporte polimérico de la fórmula empírica (I) arriba mostrada pueden comprender, de forma no limitativa, al menos uno de los siguientes subgrupos de fórmulas:

Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₁₀, Arg₁₁, Arg₁₂, Arg₁₃, Arg₁₄, Arg₁₅₋₃₀;

Lys₇, Lys₈, Lys₉, Lys₁₀, Lys₁₁, Lys₁₂, Lys₁₃, Lys₁₄, Lys₁₅₋₃₀;

His₇, His₈, His₉, His₁₀, His₁₁, His₁₂, His₁₃, His₁₄, His₁₅₋₃₀;

Orn₇, Orn₈, Orn₉, Orn₁₀, Orn₁₁, Orn₁₂, Orn₁₃, Orn₁₄, Orn₁₅₋₃₀.

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, los péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del soporte polimérico de la fórmula empírica (I) arriba mostrada y que comprenden o están modificados adicionalmente para comprender al menos una fracción -SH se pueden seleccionar preferiblemente, de forma no limitativa, entre al menos uno de los siguientes subgrupos de fórmulas. Las siguientes fórmulas (como en el caso de la fórmula empírica (I)) no especifican ningún orden de aminoácidos, sino que están concebidas para reflejar fórmulas empíricas especificando exclusivamente el (número de) aminoácidos como componentes de péptido respectivo. Por consiguiente, a modo de ejemplo, la fórmula empírica Arg₍₇₋₂₉₎Lys₁ significa que los péptidos que entran dentro de esta fórmula contienen de 7 a 19 residuos Arg y 1 residuo Lys en cualquier orden. Si los péptidos contienen 7 residuos Arg y 1 residuo Lys, están incluidas todas las variantes que tienen 7 residuos Arg y 1 residuo Lys. Por tanto, el residuo Lys puede estar situado en cualquier lugar de la secuencia de por ejemplo 8 aminoácidos de longitud compuesta por 7 residuos Arg y 1 residuo Lys. El subgrupo comprende preferiblemente:

Arg₍₄₋₂₉₎Lys₁, Arg₍₄₋₂₉₎His₁, Arg₍₄₋₂₉₎Orn₁, Lys₍₄₋₂₉₎His₁, Lys₍₄₋₂₉₎Orn₁, His₍₄₋₂₉₎Orn₁,

Arg₍₃₋₂₈₎Lys₂, Arg₍₃₋₂₈₎His₂, Arg₍₃₋₂₈₎Orn₂, Lys₍₃₋₂₈₎His₂, Lys₍₃₋₂₈₎Orn₂, His₍₃₋₂₈₎Orn₂,

$\text{Arg}_{(2-27)}\text{Lys}_3, \text{Arg}_{(2-27)}\text{His}_3, \text{Arg}_{(2-27)}\text{Orn}_3, \text{Lys}_{(2-27)}\text{His}_3, \text{Lys}_{(2-27)}\text{Orn}_3, \text{His}_{(2-27)}\text{Orn}_3,$

$\text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_4, \text{Arg}_{(1-26)}\text{His}_4, \text{Arg}_{(1-26)}\text{Orn}_4, \text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_4, \text{Lys}_{(1-26)}\text{Orn}_4, \text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_4,$

$\text{Arg}_{(3-28)}\text{Lys}_1\text{His}_1, \text{Arg}_{(3-28)}\text{Lys}_1\text{Orn}_1, \text{Arg}_{(3-28)}\text{His}_1\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_{(3-28)}\text{His}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_{(3-28)}\text{Orn}_1, \text{Lys}_{(3-28)}\text{His}_1\text{Orn}_1,$
 $\text{Arg}_1\text{Lys}_1\text{His}_{(3-28)}, \text{Arg}_1\text{His}_{(3-28)}\text{Orn}_1, \text{Lys}_1\text{His}_{(3-28)}\text{Orn}_1;$

$\text{Arg}_{(2-27)}\text{Lys}_2\text{His}_1, \text{Arg}_{(2-27)}\text{Lys}_1\text{His}_2, \text{Arg}_{(2-27)}\text{Lys}_2\text{Orn}_1, \text{Arg}_{(2-27)}\text{Lys}_1\text{Orn}_2, \text{Arg}_{(2-27)}\text{His}_2\text{Orn}_1, \text{Arg}_{(2-27)}\text{His}_1\text{Orn}_2,$
 $\text{Arg}_2\text{Lys}_{(2-27)}\text{His}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_{(2-27)}\text{His}_2, \text{Arg}_2\text{Lys}_{(2-27)}\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_{(2-27)}\text{Orn}_2, \text{Lys}_{(2-27)}\text{His}_2\text{Orn}_1, \text{Lys}_{(2-27)}\text{His}_1\text{Orn}_2,$
 $\text{Arg}_2\text{Lys}_1\text{His}_{(2-27)}, \text{Arg}_1\text{Lys}_2\text{His}_{(2-27)}, \text{Arg}_2\text{His}_{(2-27)}\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{His}_{(2-27)}\text{Orn}_2, \text{Lys}_2\text{His}_{(2-27)}\text{Orn}_1, \text{Lys}_1\text{His}_{(2-27)}\text{Orn}_2;$

$\text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_3\text{His}_1, \text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_2\text{His}_2, \text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_1\text{His}_3, \text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_3\text{Orn}_1, \text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_2\text{Orn}_2, \text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_1\text{Orn}_3,$
 $\text{Arg}_{(1-26)}\text{His}_3\text{Orn}_1, \text{Arg}_{(1-26)}\text{His}_2\text{Orn}_2, \text{Arg}_{(1-26)}\text{His}_1\text{Orn}_3, \text{Arg}_3\text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_1, \text{Arg}_2\text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_2, \text{Arg}_1\text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_3,$
 $\text{Arg}_3\text{Lys}_{(1-26)}\text{Orn}_1, \text{Arg}_2\text{Lys}_{(1-26)}\text{Orn}_2, \text{Arg}_1\text{Lys}_{(1-26)}\text{Orn}_3, \text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_3\text{Orn}_1, \text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_2\text{Orn}_2, \text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_1\text{Orn}_3,$
 $\text{Arg}_3\text{Lys}_1\text{His}_{(1-26)}, \text{Arg}_2\text{Lys}_2\text{His}_{(1-26)}, \text{Arg}_1\text{Lys}_3\text{His}_{(1-26)}, \text{Arg}_3\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_1, \text{Arg}_2\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_2, \text{Arg}_1\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_3,$
 $\text{Lys}_3\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_1, \text{Lys}_2\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_2, \text{Lys}_1\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_3;$

$\text{Arg}_{(2-27)}\text{Lys}_1\text{His}_1\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_{(2-27)}\text{His}_1\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_1\text{His}_{(2-27)}\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_1\text{His}_1\text{Orn}_{(2-27)};$

$\text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_2\text{His}_1\text{Orn}_1, \text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_1\text{His}_2\text{Orn}_1, \text{Arg}_{(1-26)}\text{Lys}_1\text{His}_1\text{Orn}_2, \text{Arg}_2\text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_1\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_2\text{Orn}_1,$
 $\text{Arg}_1\text{Lys}_{(1-26)}\text{His}_1\text{Orn}_2, \text{Arg}_2\text{Lys}_1\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_2\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_1, \text{Arg}_1\text{Lys}_1\text{His}_{(1-26)}\text{Orn}_2, \text{Arg}_2\text{Lys}_1\text{His}_1\text{Orn}_{(1-26)},$
 $\text{Arg}_1\text{Lys}_2\text{His}_1\text{Orn}_{(1-26)}, \text{Arg}_1\text{Lys}_1\text{His}_2\text{Orn}_{(1-26)};$

- 5 De acuerdo con otra realización particularmente preferente, los péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del soporte polimérico que tienen la fórmula empírica (I) arriba mostrada y que comprenden o están modificados adicionalmente para comprender al menos una fracción -SH se pueden seleccionar, de forma no limitativa, entre el subgrupo consistente en las fórmulas genéricas Arg₇ (también designada como R₇), Arg₉ (también designada como R₉), Arg₁₂ (también designada como R₁₂).

- 10 De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el péptido o proteína catiónico o policatiónico del soporte polimérico, cuando está definido de acuerdo con la fórmula {(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x} (fórmula (I)) arriba mostrada y que comprende o está modificado adicionalmente para comprender al menos una fracción -SH, se puede seleccionar, de forma no limitativa, entre la subfórmula (Ia):

$$\{(\text{Arg})_i; (\text{Lys})_m; (\text{His})_n; (\text{Orn})_o; (\text{Xaa}')_x (\text{Cys})_y\} \quad \text{fórmula (Ia)}$$

- 15 donde (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o; y x son tal como se han definido aquí, Xaa' es un aminoácido seleccionado entre aminoácidos nativos (= naturales) o no nativos, excepto Arg, Lys, His, Orn o Cys; e y es cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80 y 81-90, a condición de que el contenido global de Arg (arginina), Lys (lisina), His (histidina) y Orn (ornitina) represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido.

- 20 Esta realización puede ser aplicable a situaciones en las que el péptido o proteína catiónico o policatiónico del soporte polimérico, por ejemplo cuando está definido de acuerdo con la fórmula (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x (fórmula (I)) arriba mostrada, comprende o ha sido modificado con al menos una cisteína como fracción -SH en el sentido arriba indicado, de modo que el péptido catiónico o policatiónico como componente catiónico porta al menos una cisteína que es capaz de formar un enlace disulfuro con otros componentes del soporte polimérico.

- 25 De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el péptido o proteína catiónico o policatiónico del soporte polimérico, cuando está definido de acuerdo con la fórmula {(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x} (fórmula (I)) arriba mostrada, se puede seleccionar, de forma no limitativa, entre la subfórmula (Ib):

$$\text{Cys}^1 \{(\text{Arg})_i; (\text{Lys})_m; (\text{His})_n; (\text{Orn})_o; (\text{Xaa})_x\} \text{Cys}^2 \quad \text{(fórmula (Ib))}$$

- 30 donde la fórmula empírica {(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x} (fórmula (I)) es tal como se ha definido aquí y forma un núcleo de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula (semiempírica) (I), y en donde Cys¹ y Cys² son cisteínas proximales o terminales con respecto a (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x. Ejemplos pueden comprender cualquiera de las secuencias arriba indicadas flanqueadas por dos Cys y las siguientes secuencias:

CysArg₇Cys Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 1)
 CysArg₈Cys Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 2)
 CysArg₉Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 3)
 CysArg₁₀Cys Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 4)
 CysArg₁₁Cys Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 5)
 CysArg₁₂Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 6)
 CysArg₁₃Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 7)
 CysArg₁₄Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 8)
 CysArg₁₅Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 9)
 CysArg₁₆Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 10)

CysArg₁₇Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 11)

CysArg₁₈Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 12)

CysArg₁₉Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 13)

CysArg₂₀Cys: Cys-Arg-Cys (SEQ ID NO. 14)

- 5 Esta realización puede ser aplicable a situaciones en las que el péptido o proteína catiónico o policatiónico del soporte polimérico que puede ser utilizado para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí, por ejemplo cuando está definido de acuerdo con la fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x (fórmula (I)) arriba mostrada, ha sido modificado con al menos dos cisteínas como fracciones -SH en el sentido arriba indicado, de modo que el péptido catiónico o policatiónico del soporte polimérico porta al menos dos cisteínas (terminales) que son capaces de formar un enlace disulfuro con otros componentes del soporte polimérico.

- 10 De acuerdo con una segunda alternativa, al menos un componente catiónico (o policatiónico) del soporte polimérico se puede seleccionar por ejemplo entre cualquier polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) adecuado en este contexto, a condición de que este polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) presente o esté modificado para presentar al menos una fracción -SH, que proporciona un enlace disulfuro que une el
- 15 polímero catiónico o policatiónico con otro componente del soporte polimérico tal como se define aquí. Por tanto, de modo similar al aquí definido, el soporte polimérico puede comprender polímeros catiónicos o policatiónicos iguales o diferentes.

- 20 En el caso específico en que el componente catiónico del soporte polimérico comprenda un polímero catiónico o policatiónico (no peptídico), las propiedades catiónicas del polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) se pueden determinar en base a su contenido de cargas catiónicas en comparación con las cargas globales de los componentes del polímero catiónico. Preferiblemente, el contenido de cargas catiónicas en el polímero catiónico a un pH (fisiológico) tal como se define aquí es de al menos un 10%, 20% o 30%, preferiblemente al menos un 40%, de forma especialmente preferible al menos un 50%, 60% o 70%, pero también preferiblemente al menos un 80%, 90% o incluso 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, de forma totalmente preferible al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el intervalo de aproximadamente un 10% a un 90%, de forma especialmente preferible en el intervalo de aproximadamente un 30% a un 100%, de forma incluso más preferible en el intervalo de aproximadamente un 50% a un 100%, por ejemplo un 50, 60, 70, 80%, 90% o 100%, o en un intervalo formado por dos cualesquiera de los valores arriba mencionados, a condición de que el contenido de todas las cargas, por ejemplo cargas positivas y
- 30 negativas a pH (fisiológico) tal como se define aquí, en todo el polímero catiónico sea del 100%.

- Preferiblemente, el componente catiónico (no peptídico) del soporte polimérico representa un polímero catiónico o policatiónico que normalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 0,1 o 0,5 kDa a aproximadamente 100 kDa, preferiblemente de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 75 kDa, de forma especialmente preferible de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, de forma incluso más preferible de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 30 kDa, o un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, de forma incluso más preferible de aproximadamente 10 kDa a
- 35

aproximadamente 30 kDa. Adicionalmente, el polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) presenta normalmente al menos una fracción -SH capaz de formar un enlace disulfuro tras condensación bien con otros componentes catiónicos, bien con otros componentes del soporte polimérico tal como se define aquí.

- 5 En el contexto arriba indicado, el componente catiónico (no peptídico) del soporte polimérico que puede ser utilizado para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí, se puede seleccionar entre acrilatos, acrilatos modificados, tales como pDMAEMA (metilacrilato de (poli)dimetilaminoetilo), quitosanos, aziridinas o 2-etil-2-oxazolina (que forman oligoetileniminas u oligoetileniminas modificadas), polímeros obtenidos por reacción de bisacrilatos con aminas que forman oligo-beta-aminoésteres o poliamidoaminas, u otros polímeros como poliésteres, policarbonatos, etc. Cada molécula de estos polímeros catiónicos o
- 10 policatiónicos (no peptídicos) normalmente tiene al menos una fracción -SH, pudiendo introducirse dicha al menos una fracción -SH en el polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) por modificaciones químicas, por ejemplo utilizando iminotiolano, ácido 3-tiopropiónico o introduciendo aminoácidos que contienen fracciones -SH, tales como cisteína o cualquier otro aminoácido (modificado). Estas fracciones -SH son preferiblemente tal como ya se han definido más arriba.
- 15 En el contexto del soporte polimérico, los componentes catiónicos que forman la base para el soporte polimérico pueden utilizarse para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí mediante reticulación de disulfuro pueden ser iguales o diferentes entre sí. También es particularmente preferente que el soporte polimérico comprenda mezclas de péptidos, proteínas o polímeros catiónicos y opcionalmente otros componentes tal como se definen aquí, que están reticulados por enlaces disulfuro tal como se describen aquí.
- 20 En este contexto, el soporte polimérico que puede ser utilizado para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí permite combinar propiedades deseadas de los diferentes péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos (cortos) u otros componentes. El soporte polimérico, por ejemplo, permite compactar eficientemente los ácidos nucleicos para lograr una transfección eficiente de los mismos, para la terapia adyuvante, para la terapia genética, para el *knockdown* de genes u otras estrategias, sin pérdida de actividad, en particular permite una transfección eficiente de un ácido nucleico en diferentes líneas celulares *in vitro*, pero en particular la transfección *in vivo*. Además, el soporte polimérico no es tóxico para las células, proporciona una liberación eficiente de su carga de ácido nucleico, es estable durante la liofilización y es aplicable como agente o adyuvante inmunoestimulador. En este contexto, los componentes del soporte polimérico pueden variar de modo que se puede determinar el patrón de citoquina inducido.
- 25 En particular, el soporte polimérico formado por componentes catiónicos unidos por disulfuro permite variar considerablemente su contenido peptídico o polimérico y, por tanto, modular sus propiedades biofísicas/bioquímicas, en particular las propiedades catiónicas del soporte polimérico, de forma bastante sencilla y rápida, por ejemplo incorporando como componentes catiónicos péptido(s) o polímero(s) igual(es) o diferente(s) y opcionalmente añadiendo otros componentes al soporte polimérico. Aunque consiste en unidades
- 30 monoméricas no tóxicas bastantes pequeñas, el soporte polimérico forma una secuencia de unión catiónica larga que proporciona una fuerte condensación del ARNm y su carga de ácidos nucleicos y estabilidad de los complejos. Bajo las condiciones reductoras del citosol (por ejemplo GSH citosólico), el complejo se degrada rápidamente en sus componentes (catiónicos), que también se degradan a su vez (por ejemplo oligopéptidos). Esto apoya el suministro de la carga de ácidos nucleicos en el citosol. Debido a la degradación en pequeños
- 35 oligopéptidos o polímeros en el citosol, no se observa la toxicidad conocida de los oligopéptidos o polímeros de alto peso molecular, por ejemplo de la poliarginina de alto peso molecular.

- 40 Por consiguiente, el soporte polimérico que puede ser utilizado para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí puede comprender diferentes péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos (cortos), seleccionados entre péptidos, proteínas o polímeros (no peptídicos) catiónicos o policatiónicos tal como se definen más arriba, opcionalmente junto con otros componentes tal como se definen aquí.
- 45

- Adicionalmente, el soporte polimérico que puede ser utilizado para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí, de forma especialmente preferible al menos uno de los diferentes péptidos o polímeros (no peptídicos) catiónicos o policatiónicos (cortos) que forman la base del soporte polimérico por reticulación con disulfuro, puede modificarse con al menos un componente adicional, preferiblemente antes de la reticulación con disulfuro. Alternativamente, el soporte polimérico como tal puede modificarse con al menos un
- 50 componente adicional. Opcionalmente también puede comprender al menos un componente adicional que normalmente forma el disulfuro del soporte polimérico junto con los otros péptidos catiónicos o policatiónicos (cortos) tal como se definen más arriba mediante reticulación con disulfuro.

- Para posibilitar la modificación de un péptido o un polímero (no peptídico) catiónico o policatiónico tal como se define más arriba, cada uno de los componentes del soporte polimérico también puede contener (preferiblemente ya antes de la reticulación con disulfuro) al menos una fracción funcional adicional que permite unir dichos componentes adicionales tal como se definen aquí. Estas fracciones funcionales se pueden seleccionar entre funcionalidades que posibilitan la unión de otros componentes, por ejemplo funcionalidades tal como se definen aquí, por ejemplo por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos
- 55 sulfónicos, aminas, etc.), mediante adición de Michael (por ejemplo fracciones de maleinimida, carbonilos α , β insaturados, etc.), mediante química "click" (por ejemplo azidas o alquinos), mediante metátesis de
- 60

alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de complejación (avidina, biotina, proteína G) o componentes que posibilitan reacciones de sustitución de tipo S_n (por ejemplo halogalcenos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras fracciones químicas que pueden emplearse en la unión de componentes adicionales.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, el componente adicional que puede estar contenido en el soporte polimérico y que puede ser utilizado para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí o que puede ser utilizado para modificar los diferentes péptidos o polímeros (no peptídicos) catiónicos o policatiónicos (cortos) que forman la base para el soporte polimérico o las propiedades biofísicas/bioquímicas del soporte polimérico tal como se definen aquí es un componente de aminoácidos (AA). El componente de aminoácidos (AA) comprende un número de aminoácidos preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 1 a 100, preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 1 a 50, de forma especialmente preferible un número seleccionado de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15-20, o en un intervalo formado por dos cualesquiera de los valores anteriormente mencionados. En este contexto, los aminoácidos del componente de aminoácidos (AA) se pueden seleccionar independientemente entre sí. Por ejemplo, si el soporte polimérico presenta dos o más componentes (AA), estos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

El componente de aminoácidos (AA) puede contener o puede estar flanqueado (por ejemplo en posición terminal) por una fracción -SH, que permite introducir este componente (AA) mediante un enlace disulfuro en el soporte polimérico tal como se define aquí. En el caso específico en el que la fracción que contiene -SH represente una cisteína, el componente de aminoácidos (AA) también puede ser leído como -Cys-(AA)-Cys-, donde Cys representa cisteína y proporciona la fracción -SH necesaria para un enlace disulfuro. La fracción que contiene -SH también se puede introducir en el componente de aminoácidos (AA) utilizando cualquiera de las modificaciones o reacciones arriba mostradas para el componente catiónico o cualquiera de sus componentes.

Además, el componente de aminoácidos (AA) puede estar provisto de dos fracciones -SH (o incluso más), por ejemplo en una forma representada por la fórmula HS-(AA)-SH, para permitir la unión con dos funcionalidades a través de enlaces disulfuro, por ejemplo si el componente de aminoácidos (AA) se utiliza como un enlazador entre otros dos componentes (por ejemplo, como un enlazador entre dos polímeros catiónicos). En este caso, una fracción -SH se protege preferiblemente en una primera etapa utilizando un grupo protector, tal como se conoce en la técnica, lo que conduce a un componente de aminoácidos (AA) de fórmula HS-(AA)-S-grupo protector. Después, el componente de aminoácidos (AA) se puede unir a otro componente del soporte polimérico para formar un primer enlace disulfuro a través de la fracción -SH no protegida. Después, la fracción -SH protegida normalmente se desprotege y se une a otra fracción -SH libre de otro componente del soporte polimérico para formar un segundo enlace disulfuro.

Alternativamente, el componente de aminoácidos (AA) puede estar provisto de otras funcionalidades, tal como ya se ha descrito más arriba para los otros componentes del soporte polimérico, que permiten la unión del componente de aminoácidos (AA) con cualquiera de los componentes del soporte polimérico.

Por tanto, el componente de aminoácidos (AA) se puede unir con otros componentes del soporte polimérico que pueden ser utilizados para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí con o sin utilización de un enlace disulfuro. La unión sin utilizar un enlace disulfuro se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones arriba descritas, preferiblemente uniendo el componente de aminoácidos (AA) con el otro componente del soporte polimérico utilizando una química de amida tal como se define aquí. En caso deseable o necesario, el otro extremo del componente de aminoácidos (AA), por ejemplo el extremo N o C, puede ser utilizado para acoplar otro componente, por ejemplo un ligando L. Con este fin, el otro extremo del componente de aminoácidos (AA) preferiblemente comprende o está modificado para comprender otra funcionalidad, por ejemplo una especie alquino (véase más arriba), que puede ser utilizada para añadir el otro componente, por ejemplo a través de química "click". Si el ligando está unido a través de un enlace lábil en medio ácido, el enlace preferiblemente se divide en el endosoma y el soporte polimérico incluye el componente de aminoácidos (AA) en su superficie.

El componente de aminoácidos (AA) puede estar presente como otro componente del soporte polimérico que puede utilizarse para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se define más arriba, por ejemplo como un enlazador entre componentes catiónicos, por ejemplo como un enlazador entre un péptido catiónico y otro péptido catiónico, como un enlazador entre un polímero catiónico y otro polímero catiónico, como un enlazador entre un péptido catiónico y un polímero catiónico, todos ellos preferiblemente tal como se definen aquí, o como un componente adicional del soporte polimérico, por ejemplo uniendo el componente de aminoácidos (AA) con el soporte polimérico o con un componente del mismo, por ejemplo mediante cadenas laterales, fracciones SH o a través de otras fracciones tal como se definen aquí, preferiblemente estando el componente de aminoácidos (AA) correspondientemente modificado.

De acuerdo con una alternativa adicional y particularmente preferente, el componente de aminoácidos (AA) puede emplearse para modificar el soporte polimérico, en particular el contenido de componentes catiónicos del soporte polimérico tal como se define más arriba.

- 5 En este contexto es preferible que el contenido de componentes catiónicos en el soporte polimérico sea de al menos un 10%, 20%, o 30%, preferiblemente al menos un 40%, de forma especialmente preferible al menos un 50%, 60% o 70%, pero también preferiblemente al menos un 80%, 90%, o incluso 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, de forma totalmente preferible al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el intervalo de aproximadamente un 30% a un 100%, de forma especialmente preferible de aproximadamente un 50% a un 100%, de forma incluso más preferible de aproximadamente un 70% a un 100%, por ejemplo un 70, 80, 90 o 100%, o en un intervalo formado por dos cualesquiera de los valores arriba mencionados, a condición de que el contenido de todos los componentes del soporte polimérico sea del 100%.

El componente de aminoácidos (AA) se puede seleccionar entre las siguientes alternativas.

- 15 De acuerdo con una primera alternativa, el componente de aminoácidos (AA) puede ser un componente de aminoácidos (AA) aromáticos. La incorporación de aminoácidos aromáticos o de secuencias aromáticas como componente de aminoácidos (AA) en el soporte polimérico permite una (segunda) unión diferente del soporte polimérico al ácido nucleico debido a interacciones de los aminoácidos aromáticos con las bases de la carga de los ácidos nucleicos, a diferencia de la unión del mismo mediante secuencias con carga catiónica de la molécula de soporte polimérico al esqueleto fosfato. Esta interacción puede tener lugar por ejemplo mediante intercalaciones o mediante unión de ranura menor o mayor. Este tipo de interacción no tiene tendencia a la descompactación por los partícipes de complejación aniónica (por ejemplo heparina, ácidos hialurónicos) que se encuentran principalmente en la matriz extracelular *in vivo*, y además es menos susceptible a los efectos de las sales.

- 20 Con este fin, los aminoácidos del componente de aminoácidos (AA) aromáticos se pueden seleccionar de entre aminoácidos aromáticos iguales o diferentes, por ejemplo se puede seleccionar entre Trp, Tyr o Phe. Alternativamente, los aminoácidos (o todo el componente de aminoácidos aromáticos (AA)) se pueden seleccionar entre las siguientes combinaciones de péptidos Trp-Tyr, Tyr-Trp, Trp-Trp, Tyr-Tyr, Trp-Tyr-Trp, Tyr-Trp-Tyr, Trp-Trp-Trp, Tyr-Tyr-Tyr, Trp-Tyr-Trp-Tyr, Tyr-Trp-Trp-Tyr, Trp-Trp-Trp-Trp, Phe-Tyr, Tyr-Phe, Phe-Phe, Phe-Tyr-Phe, Tyr-Phe-Tyr, Phe-Phe-Phe, Phe-Tyr-Phe, Tyr-Phe-Tyr-Phe, Phe-Phe-Phe-Phe, Phe-Trp, Trp-Phe, Phe-Phe, Phe-Trp-Phe, Trp-Phe-Trp, Phe-Trp-Phe-Trp, Trp-Phe-Trp-Phe, o Tyr-Tyr-Tyr-Tyr, etc. (SEQ ID NO: 15 - 42). Estas combinaciones de péptidos se pueden repetir, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o incluso más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar entre sí de forma adecuada.

- 35 Adicionalmente, el componente de aminoácidos (AA) aromáticos puede contener o puede estar flanqueado por una fracción que contiene -SH, que permite la introducción de este componente a través de un enlace disulfuro como parte adicional del soporte polimérico tal como se define más arriba, por ejemplo como un enlazador. Dicha fracción que contiene -SH puede ser cualquier fracción tal como se define aquí adecuada para acoplar un componente tal como se define aquí con otro componente tal como se define aquí. Por ejemplo, dicha fracción que contiene -SH puede ser una cisteína. Entonces, por ejemplo el componente de aminoácidos (AA) aromáticos se puede seleccionar entre combinaciones peptídicas Cys-Tyr-Cys, Cys-Trp-Cys, Cys-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Cys, Cys-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Trp-Tyr-Trp-Cys, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Cys, Cys-Trp-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Trp-Tyr-Cys, Cys-Trp-Trp-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Cys, Cys-Phe-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Phe-Cys, Cys-Phe-Phe-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Tyr-Phe-Cys, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Cys, Cys-Phe-Phe-Phe-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Tyr-Phe-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Phe-Cys, o Cys-Phe-Phe-Phe-Phe-Cys, Cys-Phe-Trp-Cys, Cys-Trp-Phe-Cys, Cys-Phe-Phe-Cys, Cys-Phe-Trp-Phe-Cys, Cys-Trp-Phe-Trp-Cys, Cys-Phe-Trp-Phe-Trp-Cys, Cys-Trp-Phe-Trp-Phe-Cys, etc. Cada Cys puede ser sustituido también por cualquier péptido modificado o compuesto químico que porte una fracción -SH libre tal como se define aquí. (SEQ ID NO: 43-75). Dichas combinaciones peptídicas se pueden repetir por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o incluso más veces. Estas combinaciones peptídicas también se pueden combinar entre sí de forma adecuada.

Adicionalmente, el componente de aminoácidos (AA) aromáticos puede contener o representar al menos una prolina, que puede servir como desintegrador de estructuras de secuencia más largas de Trp, Tyr y Phe en el componente de aminoácidos (AA) aromáticos, preferiblemente dos, tres o más prolinas.

- 55 De acuerdo con una segunda alternativa, el componente de aminoácidos (AA) puede ser un componente de aminoácidos (AA) hidrófilo (y preferiblemente polar no cargado). La incorporación de aminoácidos o secuencias hidrófilas (y preferiblemente polares no cargados) como componente de aminoácidos (AA) hidrófilo (y preferiblemente polar no cargado) en el soporte polimérico permite una unión más flexible a la carga de ácido nucleico. Esto conduce a una compactación más eficaz de la carga de ácidos nucleicos y, por tanto, a una mejor protección contra nucleasas y descompactación no deseada. Además, posibilita la provisión de un soporte polimérico (largo) que tiene una carga catiónica reducida en todo el soporte y, en este contexto, unas propiedades de unión mejor ajustadas si así se desea o se requiere.

Con este fin, los aminoácidos del componente de aminoácidos (AA) hidrófilo (y preferiblemente polar no cargado) se puede seleccionar entre aminoácidos hidrófilos (y preferiblemente polares no cargados), por ejemplo se pueden seleccionar entre Thr, Ser, Asn o Gln. Alternativamente, los aminoácidos (o todo el componente de aminoácidos (AA) hidrófilo (y preferiblemente polar no cargado)) se pueden seleccionar entre las siguientes combinaciones peptídicas Ser-Thr, Thr-Ser, Ser-Ser, Thr-Thr, Ser-Thr-Ser, Thr-Ser-Thr, Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr, Ser-Thr-Ser-Thr, Thr-Ser-Thr-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr-Thr, Gln-Asn, Asn-Gln, Gln-Gln, Asn-Asn, Gln-Asn-Gln, Asn-Gln-Asn, Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn, Ser-Ser, Asn-Asn, Ser-Asn-Ser, Asn-Ser-Asn, Ser-Ser-Ser, Asn-Asn-Asn, Ser-Asn-Ser-Asn, Asn-Ser-Asn-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser, o Asn-Asn-Asn-Asn, etc. (SEQ ID NO 76 - 111). Dichas combinaciones peptídicas se pueden repetir por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o incluso más veces. Estas combinaciones peptídicas también se pueden combinar entre sí de forma adecuada.

Adicionalmente, el componente de aminoácidos (AA) hidrófilo (y preferiblemente polar no cargado) puede contener o puede estar flanqueado por una fracción que contiene -SH, que permite introducir este componente por un enlace disulfuro como parte adicional del soporte polimérico tal como se define más arriba, por ejemplo como un enlazador. Dicha fracción que contiene -SH puede ser cualquier fracción tal como se define aquí adecuada para acoplar un componente tal como se define aquí con otro componente tal como se define aquí. Por ejemplo, dicha fracción que contiene -SH puede ser una cisteína. Entonces, por ejemplo el componente de aminoácidos (AA) hidrófilo (y preferiblemente polar no cargado) se puede seleccionar por ejemplo entre las combinaciones peptídicas Cys-Thr-Cys, Cys-Ser-Cys, Cys-Ser-Thr-Cys, Cys-Thr-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Cys, Cys-Ser-Thr-Ser-Cys, Cys-Thr-Ser-Thr-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Thr-Cys, Cys-Ser-Thr-Ser-Thr-Cys, Cys-Thr-Ser-Thr-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Thr-Thr-Cys, Cys-Asn-Cys, Cys-Gln-Cys, Cys-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Cys, Cys-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Cys, Cys-Gln-Asn-Gln-Cys, Cys-Asn-Gln-Asn-Cys, Cys-Gln-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Gln-Asn-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Asn-Gln-Cys, Cys-Gln-Gln-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Asn-Cys, Cys-Ser-Cys, Cys-Ser-Asn-Cys, Cys-Asn-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Cys, Cys-Ser-Asn-Ser-Cys, Cys-Asn-Ser-Asn-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Ser-Asn-Ser-Asn-Cys, Cys-Asn-Ser-Asn-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys, o Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys, etc. Cada Cys puede ser sustituido también por cualquier péptido modificado o compuesto químico que porte una fracción -SH libre tal como se define aquí. (SEQ ID NO: 112-153). Dichas combinaciones peptídicas se pueden repetir por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o incluso más veces. Estas combinaciones peptídicas también se pueden combinar entre sí de forma adecuada.

Adicionalmente, el componente de aminoácidos (AA) hidrófilo (y preferiblemente polar no cargado) puede contener al menos una prolina, que puede servir como desintegrador de estructuras de las secuencias más largas de Ser, Thr y Asn en el componente de aminoácidos (AA) hidrófilo (y preferiblemente polar no cargado), preferiblemente dos, tres o más prolinas.

De acuerdo con una tercera alternativa, el componente de aminoácidos (AA) puede ser un componente de aminoácidos (AA) lipófilo. La incorporación de aminoácidos o secuencias lipófilos como componente de aminoácidos (AA) lipófilo en el soporte polimérico posibilita una compactación más fuerte de la carga de ácidos nucleicos y/o del soporte polimérico y su carga de ácidos nucleicos cuando forma un complejo. Esto se debe en particular a interacciones de una o más cadenas poliméricas del soporte polimérico, en particular de secciones lipófilas del componente de aminoácidos (AA) lipófilo, y la carga de ácido nucleico. Preferiblemente, esta interacción añadirá una estabilidad adicional al complejo entre el soporte polimérico y su carga de ácidos nucleicos. Esta estabilización se puede comparar de algún modo con una especie de reticulación no covalente entre diferentes cadenas poliméricas. En especial en un entorno acuoso, esta interacción normalmente es fuerte y tiene un efecto significativo.

Con este fin, los aminoácidos del componente de aminoácidos (AA) lipófilo se pueden seleccionar entre aminoácidos lipófilos iguales o diferentes, por ejemplo se pueden seleccionar entre Leu, Val, Ile, Ala, Met. Alternativamente, el aminoácido AA (o todo el componente de aminoácidos (AA) lipófilo) se puede seleccionar entre las siguientes combinaciones peptídicas Leu-Val, Val-Leu, Leu-Leu, Val-Val, Leu-Val-Leu, Val-Leu-Val, Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val, Leu-Val-Leu-Val, Val-Leu-Val-Leu, Leu-Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val-Val, Ile-Ala, Ala-Ile, Ile-Ile, Ala-Ala, Ile-Ala-Ile, Ala-Ile-Ala, Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala, Ile-Ala-Ile-Ala, Ala-Ile-Ala-Ile, Ile-Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala-Ala, Met-Ala, Ala-Met, Met-Met, Ala-Ala, Met-Ala-Met, Ala-Met-Ala, Met-Met-Met, Ala-Ala-Ala, Met-Ala-Met-Ala, Ala-Met-Ala-Met, o Met-Met-Met-Met etc. (SEQ ID NO: 154 - 188). Dichas combinaciones peptídicas se pueden repetir por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o incluso más veces. Estas combinaciones peptídicas también se pueden combinar entre sí de forma adecuada.

Adicionalmente, el componente de aminoácidos (AA) lipófilo puede contener o puede estar flanqueado por una fracción que contiene -SH, que permite la introducción de este componente a través de un enlace disulfuro como parte adicional del soporte polimérico arriba indicado, por ejemplo como un enlazador. Dicha fracción que contiene -SH puede ser cualquier fracción tal como se define aquí adecuada para acoplar un componente tal como se define aquí con otro componente tal como se define aquí. Por ejemplo, dicha fracción que contiene -SH puede ser una cisteína. Entonces, por ejemplo el componente de aminoácidos (AA) lipófilo se puede

seleccionar por ejemplo entre combinaciones peptídicas Cys-Val- Cys, Cys-Leu-Cys, Cys-Leu-Val-Cys, Cys-Val-Leu-Cys, Cys-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Cys, Cys-Leu-Val-Leu-Cys, Cys-Val-Leu-Val-Cys, Cys-Leu-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Val-Cys, Cys-Leu-Val-Leu-Val-Cys, Cys-Val-Leu-Val-Leu-Cys, Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Val-Val-Cys, Cys-Ala-Cys, Cys-Ile-Cys, Cys-Ile-Ala-Cys, Cys-Ala-Ile-Cys, Cys-Ile-Ile-Cys, Cys-Ala-Ala-Cys, Cys-Ile-Ala-Ile-Cys, Cys-Ala-Ile-Ala-Cys, Cys-Ile-Ile-Ile-Cys, Cys-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Ile-Ala-Ile-Ala-Cys, Cys-Ala-Ile-Ala-Ile-Cys, Cys-Ile-Ile-Ile-Ile-Cys, o Cys-Ala-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Cys, Cys-Met-Ala-Cys, Cys-Ala-Met-Cys, Cys-Met-Met-Cys, Cys-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Ala-Met-Cys, Cys-Ala-Met-Ala-Cys, Cys-Met-Met-Met-Cys, Cys-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Ala-Met-Ala-Cys, Cys-Ala-Met-Ala-Met-Cys, Cys-Met-Met-Met-Met-Cys, o Cys-Ala-Ala-Ala-Ala-Cys, etc. Cada Cys puede ser sustituido también por cualquier péptido modificado o compuesto químico que porte una fracción -SH libre tal como se define aquí. (SEQ ID NO: 189-229). Dichas combinaciones peptídicas se pueden repetir por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o incluso más veces. Estas combinaciones peptídicas también se pueden combinar entre sí de forma adecuada.

Adicionalmente, el componente de aminoácidos (AA) lipófilo puede contener al menos una prolina, que puede servir como desintegrador de estructuras de las secuencias más largas de Leu, Val, Ile, Ala y Met en el componente de aminoácidos (AA) lipófilo, preferiblemente dos, tres o más prolinas.

Finalmente, de acuerdo con una cuarta alternativa, el componente de aminoácidos (AA) puede ser un componente de aminoácidos (AA) básico débil. La incorporación de aminoácidos básicos débiles como componente de aminoácidos (AA) básico débil en el soporte polimérico puede servir como esponja protónica y facilita el escape endosomal (también denominado liberación endosomal) (efecto de esponja protónica). La incorporación de dicho componente de aminoácidos (AA) básico débil preferiblemente mejora la eficiencia de transfección.

Con este fin, los aminoácidos del componente de aminoácidos (AA) básico débil se pueden seleccionar entre aminoácidos débiles iguales o diferentes, por ejemplo se pueden seleccionar entre histidina y aspartato (ácido aspártico). Alternativamente, los aminoácidos básicos débiles (o todo el componente de aminoácidos (AA) básicos débiles) se pueden seleccionar entre las siguientes combinaciones peptídicas Asp-His, His-Asp, Asp-Asp, His-His, Asp-His-Asp, His-Asp-His, Asp-Asp-Asp, His-His-His, Asp-His-Asp-His, His-Asp-His-Asp, Asp-Asp-Asp-Asp, o His-His-His-His, etc. (SEQ ID NO: 230 - 241). Dichas combinaciones peptídicas se pueden repetir por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o incluso más veces. Estas combinaciones peptídicas también se pueden combinar entre sí de forma adecuada.

Adicionalmente, el componente de aminoácidos (AA) básico débil puede contener o puede estar flanqueado por una fracción que contiene -SH, que permite la introducción de este componente a través de un enlace disulfuro como parte adicional del soporte polimérico tal como se define más arriba, por ejemplo como un enlazador. Dicha fracción que contiene -SH puede ser cualquier fracción tal como se define aquí adecuada para acoplar un componente tal como se define aquí con otro componente tal como se define aquí. Por ejemplo, dicha fracción que contiene -SH puede ser una cisteína. Entonces, por ejemplo el componente de aminoácidos (AA) básico débil se puede seleccionar por ejemplo entre combinaciones peptídicas Cys-His-Cys, Cys-Asp-Cys, Cys-Asp-His-Cys, Cys-His-Asp-Cys, Cys-Asp-Asp-Cys, Cys-His-His-Cys, Cys-Asp-His-Asp-Cys, Cys-His-Asp-His-Cys, Cys-Asp-Asp-Asp-Cys, Cys-His-His-His-Cys, Cys-Asp-His-Asp-His-Cys, Cys-His-Asp-His-Asp-Cys, Cys-Asp-Asp-Asp-Asp-Cys, o Cys-His-His-His-His-Cys, etc. Cada Cys puede ser sustituido también por cualquier péptido modificado o compuesto químico que porte una fracción -SH libre tal como se define aquí. (SEQ ID NO: 242-255). Dichas combinaciones peptídicas se pueden repetir por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o incluso más veces. Estas combinaciones peptídicas también se pueden combinar entre sí de forma adecuada.

Adicionalmente, el componente de aminoácidos (AA) básico débil puede contener al menos una prolina, que puede servir como desintegrador de estructuras de las secuencias más largas de histidina o aspartato (ácido aspártico) en el componente de aminoácidos (AA) básico débil, preferiblemente dos, tres o más prolinas.

De acuerdo con una quinta alternativa, el componente de aminoácidos (AA) puede ser un péptido señal o una secuencia señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido penetrante de células (por ejemplo TAT), etc. Preferiblemente, dicho componente de aminoácidos (AA) se une al soporte polimérico o a otro componente del soporte polimérico por un enlace disulfuro (reversible). En este contexto, el péptido señal o secuencia señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido penetrante de células (por ejemplo TAT), etc. comprende adicionalmente al menos una fracción -SH. En este contexto se puede utilizar un péptido señal, una señal o secuencia de localización o una señal o secuencia de localización nuclear (NLS) para dirigir el complejo de carga del soporte polimérico a células diana específicas (por ejemplo hepatocitos o células presentadoras de antígeno) y preferiblemente posibilita una translocalización del soporte polimérico a una diana específica, por ejemplo al interior de la célula, al interior del núcleo, al interior del compartimento endosomal, secuencias para la matriz mitocondrial, secuencias de localización para la membrana plasmática, secuencias de localización para el aparato de Golgi, el núcleo, el citoplasma y el citoesqueleto, etc. Dicho péptido señal, señal o secuencia de localización o una señal de localización nuclear

pueden emplearse para el transporte de cualquiera de los ácidos nucleicos aquí definidos, preferiblemente un ARN o un ADN, de forma especialmente preferible un ARNsh o un ADNp, por ejemplo al interior del núcleo. De forma no limitativa, dicho péptido señal, señal o secuencia de localización o señal de localización nuclear pueden comprender, por ejemplo, secuencias de localización para el retículo endoplasmático. Señales o secuencias de localización o señales de localización nuclear particulares pueden incluir, por ejemplo, KDEL (SEQ ID NO: 256), DDEL (SEQ ID NO: 257), DEEL (SEQ ID NO: 258), QEDL (SEQ ID NO: 259), RDEL (SEQ ID NO: 260), y GQNLSTSN (SEQ ID NO: 261), secuencias de localización nuclear, incluyendo PKKKRKV (SEQ ID NO: 262), PQKKIKS (SEQ ID NO: 263), QPKKP (SEQ ID NO: 264), RKKR (SEQ ID NO: 265), RKKRRQRRRAHQ (SEQ ID NO: 266), RQARRNRWRERQR (SEQ ID NO: 267), MPLTRRRPAASQALAPPTP (SEQ ID NO: 268), GAALTILV (SEQ ID NO: 269), y GAALTLLG (SEQ ID NO: 270), secuencias de localización para el compartimento endosomal, incluyendo MD-DQRDLISNNEQLP (SEQ ID NO: 271), secuencias de localización para la matriz mitocondrial, incluyendo MLFNLRXXLN-NAAFRHGHNFMRNFRGQPLX (SEQ ID NO: 272), secuencias de localización para la membrana plasmática: GVCSSNP (SEQ ID NO: 273), GQTVTTPL (SEQ ID NO: 274), GQELSQHE (SEQ ID NO: 275), GNPSYNP (SEQ ID NO: 276), GVSGSKGQ (SEQ ID NO: 277), GQTTITPL (SEQ ID NO: 278), GQTLTTPL (SEQ ID NO: 279), GQIFSRSA (SEQ ID NO: 280), GQIHGLSP (SEQ ID NO: 281), GARASVLS (SEQ ID NO: 282), y GCTLSAEE (SEQ ID NO: 283), secuencias de localización para el retículo endoplasmático y el núcleo, incluyendo GAQVSSQK (SEQ ID NO: 284), y GAQLSRNT (SEQ ID NO: 285), secuencias de localización para el aparato de Golgi, el núcleo, el citoplasma y el citoesqueleto, incluyendo GNAAAkk (SEQ ID NO: 286), secuencias de localización para el citoplasma y el citoesqueleto, incluyendo GSSKSKPK (SEQ ID NO: 288), etc. Ejemplos de secuencias peptídicas señal secretoras tal como se definen aquí incluyen, de forma no limitativa, secuencias señal de moléculas MHC clásicas o no clásicas (por ejemplo secuencias señal de moléculas MHC I y II, por ejemplo de la molécula MHC de clase I HLA-A*0201), secuencias señal de citoquinas o inmunoglobulinas tal como se definen aquí, secuencias señal de la cadena invariable de inmunoglobulinas o anticuerpos tal como se definen aquí, secuencias señal de Lamp1, tapasina, Erp57, calreticulina, calnexina, y otras proteínas asociadas a membrana, o de proteínas asociadas al retículo endoplasmático (RE) o el compartimento endosomal-lisosomal. De forma particularmente preferible se pueden utilizar secuencias señal de la molécula MHC de clase I HLA-A*0201. Dicho componente adicional se puede unir por ejemplo a un polímero catiónico o a cualquier otro componente del soporte polimérico tal como se define aquí. Preferiblemente, este péptido señal, señal o secuencia de localización o señal o secuencia de localización nuclear (NLS) se une al soporte polimérico o a otro componente del soporte polimérico por un enlace disulfuro (reversible). Con este fin, el componente (AA) comprende adicionalmente al menos una fracción -SH tal como se define aquí. La unión de cualquiera de los componentes del soporte polimérico también se puede llevar a cabo utilizando un enlace lábil en medio ácido, preferiblemente a través de una cadena lateral de cualquiera de los componentes del soporte polimérico, que permite separar o liberar el componente adicional a valores de pH más bajos, por ejemplo a pH fisiológico tal como se define aquí.

Adicionalmente, de acuerdo con otra alternativa, el componente de aminoácidos (AA) puede ser un péptido o proteína funcional que puede modular la funcionalidad del soporte polimérico correspondientemente. Dichos péptidos o proteínas funcionales como componente de aminoácidos (AA) comprenden preferiblemente cualquier péptido o proteína tal como se definen aquí, por ejemplo tal como se definen más abajo como proteínas terapéuticamente activas. De acuerdo con una alternativa, dichos péptidos o proteínas funcionales adicionales pueden comprender los llamados péptidos penetrantes de células (CPP) o péptidos catiónicos de transporte. Son particularmente preferentes los CPP que inducen un cambio de conformación mediado por pH en el endosoma y conducen a una mejor liberación del soporte polimérico (complejado con un ácido nucleico) desde el endosoma mediante inserción en la capa lipídica del liposoma. Estos péptidos penetrantes de células (CPP) o péptidos catiónicos de transporte pueden incluir, de forma no limitativa, protamina, nucleolina, espermina o espermidina, oligo- o poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, oligo- o poli-arginina, CPP quiméricos tales como transportano, o péptidos de MPG, péptidos de unión de VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, miembros de la familia de la penetratina, por ejemplo penetratina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPP derivados antimicrobianos, por ejemplo buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, PpTG20, loligómeros, FGF, lactoferrina, histonas, péptidos derivados de VP22 o análogos, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, etc. Dicho componente de aminoácidos (AA) también puede estar unido a cualquier componente del soporte polimérico tal como se define aquí. Preferiblemente se une al soporte polimérico o a otro componente del soporte polimérico por un enlace disulfuro (reversible). Para el objetivo arriba indicado, el componente de aminoácidos (AA) preferiblemente comprende al menos una fracción -SH tal como se define aquí. La unión con cualquiera de los componentes del soporte polimérico también se puede llevar a cabo utilizando una fracción SH o un enlace lábil en medio ácido, preferiblemente a través de una cadena lateral de cualquiera de los componentes del soporte polimérico, que permite separar o liberar el componente adicional a valores pH más bajos, por ejemplo a valores de pH fisiológicos tal como se definen aquí.

De acuerdo con una última alternativa, el componente de aminoácidos (AA) puede consistir en cualquier péptido o proteína que pueda desempeñar cualquier función favorable en la célula. Son particularmente preferentes los péptidos o proteínas seleccionados entre péptidos o proteínas terapéuticamente activos, entre antígenos, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos patógenos (antígenos de animal, antígenos virales, antígenos de protozoos, antígenos bacterianos, antígenos alérgicos), antígenos autoinmunes, u otros antígenos, entre alérgenos, entre anticuerpos, entre proteínas o péptidos inmunoestimuladores, entre receptores de células T específicos de antígeno, o entre cualesquiera otros péptidos o proteínas adecuados para una aplicación (terapéutica) específica tal como se define más abajo para codificar ácidos nucleicos. Son particularmente preferentes los epítomos peptídicos de antígenos tal como se definen aquí.

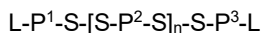
El soporte polimérico que puede emplearse para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí puede comprender al menos uno de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos arriba mencionados u otros componentes, por ejemplo (AA), pudiendo combinarse entre sí cualesquiera de las alternativas arriba mencionadas, y se puede formar por polimerización en una reacción de condensación de polimerización a través de sus fracciones -SH.

De acuerdo con otro aspecto, el soporte polimérico que puede utilizarse para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí o componentes individuales de los mismos, por ejemplo los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos arriba mencionados u otros componentes, por ejemplo (AA), se pueden modificar adicionalmente con un ligando, preferiblemente un carbohidrato, de forma especialmente preferible un azúcar, de forma incluso más preferible manosa. Preferiblemente, este ligando se une al soporte polimérico o a un componente del soporte polimérico por un enlace disulfuro (reversible) o mediante una adición de Michael. En el caso en que el ligando se una por un enlace disulfuro, el ligando comprende adicionalmente al menos una fracción -SH. Estos ligandos pueden emplearse para dirigir el complejo de carga de soporte polimérico a células diana específicas (por ejemplo hepatocitos o células presentadoras de antígeno). En este contexto, la manosa es particularmente preferente como ligando si la diana son células dendríticas, en especial con fines de vacunación o como adyuvante.

De acuerdo con un aspecto específico, el soporte polimérico en su totalidad se puede formar mediante una condensación de polimerización (de al menos uno) de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos arriba mencionados u otros componentes, por ejemplo (AA), a través de sus fracciones -SH en una primera etapa, y complejando el ácido nucleico con dicho soporte polimérico en una segunda etapa. Por tanto, el soporte polimérico puede contener una serie de al menos uno o incluso más de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos arriba definidos u otros componentes, por ejemplo (AA), iguales o diferentes, estando determinada la cantidad preferiblemente por el intervalo arriba indicado.

De acuerdo con un aspecto específico alternativo, el soporte polimérico que puede utilizarse para complejar el o los ARNm de la vacuna tal como se describe aquí se forma por polimerización de condensación de al menos uno de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos arriba mencionados u otros componentes, por ejemplo (AA), a través de sus fracciones -SH simultáneamente con complejación del o de los ARNm que codifican el o los antígenos con el soporte polimérico (preparado *in situ*). Por tanto, del mismo modo, el soporte polimérico también puede contener aquí una serie de al menos uno o incluso más de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos arriba definidos u otros componentes, por ejemplo (AA), iguales o diferentes, estando determinada la cantidad preferiblemente por el intervalo arriba indicado.

De acuerdo con otro aspecto alternativo, el soporte polimérico se puede seleccionar entre moléculas de soporte polimérico de acuerdo con la fórmula general (VI):



donde

P^1 y P^3 son diferentes o idénticos entre sí y representan una cadena polimérica hidrófila lineal o ramificada, presentando cada P^1 y P^3 al menos una fracción -SH capaz de formar un enlace disulfuro tras condensación con el componente P^2 , o alternativamente con (AA), $(AA)_x$, o $[(AA)_x]_z$ si dichos componentes se utilizan como enlazador entre P^1 y P^2 o P^3 y P^2 y/o con otros componentes (por ejemplo (AA), $(AA)_x$, $[(AA)_x]_z$ o L), seleccionándose la cadena polimérica hidrófila lineal o ramificada independientemente entre sí entre polietilenglicol (PEG), poli-N-(2-hidroxipropil)metacrilamida, poli-2-(metacrililoilo)etil fosforilcolinas, poli(hidroxiálquil-L-asparagina), poli(2-(metacrililoilo)etilfosforilcolina), hidroxietil-almidón o poli(hidroxiálquil-L-glutamina), presentando la cadena polimérica hidrófila un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa, preferiblemente de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 25 kDa; o de forma especialmente preferible de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 10 kDa, por ejemplo de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 25 kDa o de 5 kDa a aproximadamente 10 kDa;

P^2 es un péptido o proteína catiónico o policatiónico, por ejemplo tal como se define aquí, que preferiblemente tiene una longitud de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos, de forma especialmente preferible de aproximadamente 3 a aproximadamente 50 aminoácidos, de forma incluso más preferible de aproximadamente 3 a aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo una longitud de aproximadamente 3 a 10, 5 a 15, 10 a 20 o 15 a 25 aminoácidos, de forma especialmente preferible una longitud

de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 y de forma incluso más preferible una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 20;

o es un polímero catiónico o policatiónico, por ejemplo tal como se define aquí, que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 0,5 kDa a aproximadamente 30 kDa, incluyendo un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 20 kDa, de forma incluso más preferible de aproximadamente 1,5 kDa a aproximadamente 10 kDa, o que tiene un peso molecular de aproximadamente 0,5 kDa a aproximadamente 100 kDa, incluyendo un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, de forma incluso más preferible de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 30 kDa; presentando cada P² al menos dos fracciones -SH capaces de formar un enlace disulfuro tras condensación con otros componentes P² o componente(s) P¹ y/o P³, o alternativamente con otros componentes (por ejemplo (AA)_x, o [(AA)_x]_z);

-S-S- es un enlace disulfuro (reversible) (los paréntesis están suprimidos para mejor legibilidad), representando S preferiblemente azufre o una fracción que porta -SH que ha formado un enlace disulfuro (reversible). El enlace disulfuro (reversible) se forma preferiblemente mediante condensación de fracciones -SH de cualquiera de los dos componentes P¹ y P², P² y P², o P² y P³, u opcionalmente de otros componentes tal como se describen aquí (por ejemplo L, (AA), (AA)_x, o [(AA)_x]_z, etc.); la fracción -SH puede formar parte de la estructura de estos componentes o se puede añadir mediante una modificación tal como se define más abajo;

L es un ligando opcional, que puede estar presente o no, y que se puede seleccionar independientemente entre sí entre RGD, transferrina, folato, un péptido o secuencia señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido penetrante de células (por ejemplo TAT o KALA), un ligando de receptor (por ejemplo citoquinas, hormonas, factores de crecimiento, etc.), moléculas pequeñas (por ejemplo carbohidratos como manosa o galactosa o ligandos sintéticos), agonistas de moléculas pequeñas, inhibidores o antagonistas de receptores (por ejemplo análogos peptidomiméticos de RGD), o cualquier otra proteína tal como se define aquí, etc.;

n es un número entero, normalmente seleccionado entre un intervalo de aproximadamente 1 a 50, preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 1, 2 o 3 a 30, de forma especialmente preferible de aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 a 25, o de aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 a 20, o un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 a 15, o un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de aproximadamente 4 a 9, 4 a 10, 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20, o 10 a 20, o un intervalo de aproximadamente 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15, o 10 a 15, o un intervalo de aproximadamente 6 a 11 o 7 a 10. De forma totalmente preferible, n está en un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 a 10, de forma especialmente preferible de aproximadamente 1, 2, 3, o 4 a 9, de aproximadamente 1, 2, 3, o 4 a 8, o de aproximadamente 1, 2, o 3 a 7.

Tal como se define más arriba, opcionalmente los ligandos (L) se pueden utilizar en la molécula de soporte polimérico de acuerdo con la fórmula genérica (VI), por ejemplo para dirigir el polímero de soporte y toda su "carga" (el componente adyuvante y/o el antígeno de la composición o la composición de vacuna tal como se describe aquí) al interior de células específicas. Se pueden seleccionar independientemente entre sí entre RGD, transferrina, folato, un péptido señal o secuencia señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido penetrante de células (CPP) (por ejemplo TAT, KALA), un ligando de un receptor (por ejemplo citoquinas, hormonas, factores de crecimiento, etc.), moléculas pequeñas (por ejemplo carbohidratos como manosa o galactosa o ligandos sintéticos), agonistas de moléculas pequeñas, inhibidores o antagonistas de receptores (por ejemplo análogos peptidomiméticos de RGD), o cualquier molécula de este tipo tal como se define aquí, etc. Son particularmente preferentes los péptidos penetrantes de células (CPP) que inducen un cambio de conformación mediado por el pH en el endosoma y conducen a una mejor liberación del soporte polimérico (en complejo con un ácido nucleico) desde el endosoma mediante inserción en la capa lipídica del liposoma. Estos denominados CPP o péptidos catiónicos de transporte pueden incluir, de forma no limitativa, protamina, nucleolina, espermina o espermidina, poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, poli-arginina, CPP quiméricos tales como transportano, o péptidos de MPG, péptidos de unión de VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, oligoargininas, miembros de la familia de la penetratina, por ejemplo penetratina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPP derivados antimicrobianos, por ejemplo buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, PpTG20, péptidos ricos en prolina, oligómeros, péptidos ricos en arginina, péptidos de calcitonina, FGF, lactoferrina, poli-L-lisina, poli-arginina, histonas, péptidos derivados de VP22 o análogos, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, etc. En este contexto, la manosa es particularmente preferente como ligando para dirigirse a células presentadoras de antígeno, que portan en su membrana celular receptores de manosa. En otro aspecto preferente se puede utilizar galactosa como ligando opcional para dirigirse a hepatocitos. Estos ligandos se pueden unir al componente P¹ y/o P³ mediante enlaces disulfuro reversibles tal como se definen más abajo o mediante cualquier otra unión química posible, por ejemplo por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), mediante

adición de Michael (por ejemplo fracciones de maleinimida, carbonilos α , β insaturados, etc.), mediante química "click" (por ejemplo azidas o alquinos), mediante metátesis de alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de complejación (avidina, biotina, proteína G) o componentes que posibilitan reacciones de sustitución de tipo S_n (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras fracciones químicas que pueden emplearse en la unión de componentes adicionales.

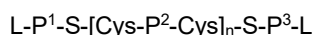
En el contexto de la fórmula (VI), los componentes P^1 y P^3 representan una cadena polimérica lineal o ramificada que contiene al menos una fracción -SH, seleccionándose cada P^1 y P^3 independientemente entre sí entre polietilenglicol (PEG), poli-*N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida, poli-2-(metacrililoiloxi)etil-fosforilcolinas, poli(hidroxiálquil-L-asparagina) o poli(hidroxiálquil-L-glutamina). P^1 y P^3 pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Preferiblemente, cada uno de los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa, preferiblemente de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 75 kDa, de forma especialmente preferible de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, de forma incluso más preferible de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 25 kDa. Adicionalmente, cada uno de los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 presenta normalmente al menos una fracción -SH, siendo capaces la o las fracciones -SH de formar un enlace disulfuro tras la reacción con el componente P^2 o con el componente (AA) o (AA)_x, si se utiliza como un enlazador entre P^1 y P^2 o P^3 y P^2 tal como se definen más abajo, y opcionalmente con otro componente, por ejemplo L y/o (AA) o (AA)_x, por ejemplo si contiene dos o más fracciones -SH. Las siguientes subfórmulas " P^1 -S-S- P^2 " y " P^2 -S-S- P^3 " dentro de la fórmula genérica (VI) arriba mostrada (los paréntesis se han suprimido para mejor legibilidad), siendo cualquiera de S, P^1 y P^3 tal como se ha definido aquí, representan normalmente una situación en la que una fracción -SH de polímeros hidrófilos P^1 y P^3 se ha condensado con una fracción -SH del componente P^2 de la fórmula genérica (VI) arriba mostrada, formando los dos azufres de estas fracciones -SH un enlace disulfuro -S-S- tal como se define aquí en la fórmula (VI). Estas fracciones -SH son proporcionadas normalmente por cada uno de los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 , por ejemplo mediante una cisteína interna o cualquier otro aminoácido (modificado) o compuesto que porta una fracción -SH. Por consiguiente, las subfórmulas " P^1 -S-S- P^2 " y " P^2 -S-S- P^3 " también se pueden escribir como " P^1 -Cys-Cys- P^2 " y " P^2 -Cys-Cys- P^3 " si la fracción -SH es proporcionada por una cisteína, representando el término Cys-Cys dos cisteínas acopladas por un enlace disulfuro, no a través de un enlace peptídico. En este caso, el término "-S-S-" en estas fórmulas también se puede escribir como "-S-Cys", como "-Cys-S" o como "-Cys-Cys-". En este contexto, el término "-Cys-Cys-" no representa un enlace peptídico, sino una unión de dos cisteínas a través de sus fracciones -SH para formar un enlace disulfuro. Por consiguiente, el término "-Cys-Cys-" también se puede entender en general como "-(Cys-S)-(S-Cys)-", indicando S en este caso específico el azufre de la fracción -SH de cisteína. Del mismo modo, los términos "-S-Cys" y "-Cys-S" indican un enlace disulfuro entre una fracción que contiene -SH y una cisteína, que también se puede escribir como "-S-(S-Cys)" y "-(Cys-S)-S". Alternativamente, los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 se pueden modificar con una fracción -SH, preferiblemente por una reacción química con un compuesto que porta una fracción -SH, de modo que cada uno de los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 porta al menos una de dichas fracciones -SH. Este compuesto que porta una fracción -SH puede ser, por ejemplo, una cisteína (adicional) o cualquier otro aminoácido (modificado) que porta una fracción -SH. Dicho compuesto también puede ser cualquier compuesto o fracción no amino que contiene una fracción -SH o permite introducir una fracción -SH en los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 tal como se definen aquí. Estos compuestos no amino se pueden unir a los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 de la fórmula (VI) del soporte polimérico mediante reacciones químicas o unión de compuestos, por ejemplo mediante unión de un ácido 3-tiopropiónico o tioimolano, mediante formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), mediante adición de Michael (por ejemplo fracciones de maleinimida, carbonilos α , β insaturados, etc.), mediante química "click" (por ejemplo azidas o alquinos), mediante metátesis de alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), mediante metátesis de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de complejación (avidina, biotina, proteína G) o componentes que posibilitan reacciones de sustitución de tipo S_n (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras fracciones químicas que pueden utilizarse en la unión de componentes adicionales. En este contexto, un derivado de PEG particularmente preferente es el alfa-metoxi-omega-mercapto-(poli)etilenglicol. En cada caso, la fracción SH, por ejemplo de una cisteína o de cualquier otro aminoácido (modificado) o compuesto, puede estar presente en los extremos terminales o internamente en cualquier posición de los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 . Tal como se define aquí, cada uno de los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 presenta normalmente al menos una fracción -SH, preferiblemente en un extremo terminal, pero también puede contener dos o incluso más fracciones -SH que pueden ser utilizadas para unir adicionalmente otros componentes tal como se definen aquí, preferiblemente otros péptidos o proteínas funcionales, por ejemplo un ligando, un componente de aminoácidos (AA) o (AA)_x, anticuerpos, péptidos penetrantes de células o péptidos potenciadores (por ejemplo TAT, KALA), etc.

De acuerdo con una alternativa preferente, dichos péptidos o proteínas funcionales adicionales pueden comprender los llamados péptidos penetrantes de células (CPP) o péptidos catiónicos de transporte. Son particularmente preferentes los CPP que inducen un cambio de conformación mediado por el pH en el endosoma y conducen a una mejor liberación del soporte polimérico (en complejo con un ácido nucleico) desde

el endosoma mediante inserción en la capa lipídica del liposoma. Estos llamados péptidos penetrantes de células (CPP) o péptidos catiónicos de transporte pueden incluir, de forma no limitativa, protamina, nucleolina, espermina o espermidina, poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, poli-arginina, CPP quiméricos tales como transportano, o péptidos de MPG, péptidos de unión de VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, oligoargininas, miembros de la familia de la penetratina, por ejemplo penetratina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPP derivados antimicrobianos, por ejemplo buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, PpTG20, péptidos ricos en prolina, L-oligómeros, péptidos ricos en arginina, péptidos de calcitonina, FGF, lactoferrina, poli-L-lisina, poli-arginina, histonas, péptidos derivados de VP22 o análogos, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD, PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, etc.

De acuerdo con otro aspecto preferente, cada uno de los polímeros hidrófilos P^1 y P^3 de la fórmula (VI) del soporte polimérico utilizado tal como se describe aquí también puede contener al menos una fracción funcional adicional que permite unir otros componentes tal como se definen aquí, por ejemplo un ligando tal como se define más arriba, o funcionalidades que permiten la unión de componentes adicionales, por ejemplo por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), mediante adición de Michael (por ejemplo fracciones de maleinimida, carbonilos α , β insaturados, etc.), mediante química "click" (por ejemplo azidas o alquinos), mediante metátesis de alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de complejación (avidina, biotina, proteína G) o componentes que posibilitan reacciones de sustitución de tipo S_n (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras fracciones químicas que pueden ser utilizadas en la unión de componentes adicionales. Las fracciones funcionales adicionales pueden comprender un componente de aminoácido (AA) tal como se define aquí o $(AA)_x$, siendo (AA) preferiblemente un componente amino tal como se define más arriba. En el contexto arriba indicado, x es preferiblemente un número entero y se puede seleccionar de un intervalo de aproximadamente 1 a 100, preferiblemente dentro de un intervalo de aproximadamente 1 a 50, de forma especialmente preferible de 1 a 30 y de forma incluso más preferible se puede seleccionar entre un número que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15-30, por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 1 a 30, de aproximadamente 1 a 15, o entre un número que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o se puede seleccionar dentro de un intervalo formado por dos cualesquiera de los valores arriba mencionados. De forma totalmente preferible, x es 1. Dicho componente de aminoácidos (AA) o $(AA)_x$ puede estar contenido en cada una de las partes del soporte polimérico de acuerdo con la fórmula (VI) arriba indicada y, por tanto, se puede unir a todos los componentes del soporte polimérico de acuerdo con la fórmula (VI). De forma particularmente preferente, el componente de aminoácidos (AA) o $(AA)_x$ está presente como un ligando o como parte del componente repetitivo $[S-P^2-S]_n$ dentro de la fórmula (VI) del soporte polimérico.

En el contexto de la fórmula completa (VI) del soporte polimérico, se puede definir preferiblemente de la siguiente manera:



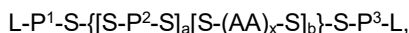
donde L, P^1 , P^2 , P^3 y n son tal como se define aquí, S es azufre y cada Cys proporciona una fracción -SH para el enlace disulfuro.

De acuerdo con un aspecto particular, el soporte polimérico de acuerdo con la fórmula (VI) tal como se define más arriba puede comprender al menos un componente de aminoácidos (AA) o $(AA)_x$ tal como se define más arriba. Dicho componente de aminoácidos (AA) o $(AA)_x$ puede estar contenido en cada una de las partes del soporte polimérico de acuerdo con la fórmula (VI) arriba indicada y, por tanto, se puede unir a todos los componentes del soporte polimérico de acuerdo con la fórmula (VI). De forma particularmente preferente, el componente de aminoácidos (AA) o $(AA)_x$ está presente como ligando o como parte del componente repetitivo $[S-P^2-S]_n$ dentro de la fórmula (VI) del soporte polimérico. Preferiblemente, el componente de aminoácidos (AA) o $(AA)_x$ contiene o está flanqueado (por ejemplo en posición terminal) por al menos una fracción que contiene -SH, que permite introducir este componente (AA) o $(AA)_x$ a través de un enlace disulfuro en el soporte polimérico de acuerdo con la fórmula (VI) tal como se define aquí. Dicha fracción que contiene -SH puede ser cualquier fracción que contenga -SH (o, evidentemente, un azufre de un enlace disulfuro), por ejemplo un residuo de cisteína. En el caso específico en que la fracción que contiene -SH representa un cisteína, el componente de aminoácidos $(AA)_x$ también puede leerse como -Cys- $(AA)_x$ - o -Cys- $(AA)_x$ -Cys-, donde Cys representa cisteína y proporciona la fracción -SH necesaria para un enlace disulfuro. La fracción que contiene -SH también se puede introducir en el componente de aminoácidos $(AA)_x$ utilizando cualquiera de las modificaciones o reacciones arriba mostradas para los componentes P^1 , P^2 o P^3 . En el caso específico en que el componente de aminoácidos $(AA)_x$ está unido a dos componentes del soporte polimérico de acuerdo con la fórmula (VI), es preferible que (AA) o $(AA)_x$ contenga al menos dos fracciones -SH, por ejemplo al menos dos cisteínas, preferiblemente en sus extremos terminales. Esto es particularmente preferente si (AA) o $(AA)_x$ forma parte del componente repetitivo $[S-P^2-S]_n$. Alternativamente, el componente de aminoácidos (AA) o $(AA)_x$ se introduce en el soporte polimérico de acuerdo con la fórmula (VI) tal como se define aquí a través de cualquier

reacción de adición química posible. Por tanto, el componente de aminoácidos (AA) o (AA)_x contiene al menos una fracción funcional adicional que permite unir el mismo a un componente adicional tal como se define aquí, por ejemplo el componente P¹ o P³, P², L, o un componente de aminoácidos (AA) o (AA)_x adicional, etc. Estas fracciones funcionales se pueden seleccionar entre funcionalidades que permiten la unión de componentes adicionales, por ejemplo funcionalidades tal como se definen aquí, por ejemplo por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), mediante adición de Michael (por ejemplo fracciones de maleinimida, carbonilos α, β insaturados, etc.), mediante química "click" (por ejemplo azidas o alquinos), mediante metátesis de alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de complejación (avidina, biotina, proteína G) o componentes que posibilitan reacciones de sustitución de tipo S_n (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras fracciones químicas que pueden ser utilizadas en la unión de componentes adicionales.

El componente de aminoácidos (AA) o (AA)_x también puede estar presente en el soporte polimérico de la fórmula (VI) como un componente de aminoácidos repetitivo mixto [(AA)_x]_z, estando definida la cantidad de componentes de aminoácidos (AA) o (AA)_x adicionalmente por el número entero z. En este contexto, z se puede seleccionar de un intervalo de aproximadamente 1 a 30, preferiblemente dentro de un intervalo de aproximadamente 1 a 15, de forma especialmente preferible de 1 a 10 o de 1 a 5, y de forma incluso más preferible se puede seleccionar entre un número seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o se puede seleccionar de un intervalo formado por dos cualesquiera de los valores arriba mencionados.

De acuerdo con una alternativa específica y particularmente preferente, el componente de aminoácidos (AA) o (AA)_x, preferiblemente escrito como S-(AA)_x-S o [S-(AA)_x-S], puede emplearse para modificar el componente P², en particular el contenido del componente S-P²-S en el componente repetitivo [S-P²-S]_n del soporte polimérico de la fórmula (VI) arriba indicada. En el contexto del soporte polimérico completo de acuerdo con la fórmula (VI), esto se puede representar por ejemplo mediante la siguiente fórmula (VIa):



donde x, S, L, AA, P¹, P² y P³ son preferiblemente tal como se define aquí. En la fórmula (VIa) arriba mostrada, cualquiera de los componentes individuales [S-P²-S] y [S-(AA)_x-S] puede estar presente en cualquier orden en la subfórmula {[S-P²-S]_a[S-(AA)_x-S]_b}. La cantidad de los componentes individuales [S-P²-S] y [S-(AA)_x-S] en la subfórmula {[S-P²-S]_a[S-(AA)_x-S]_b} está determinada por los números enteros a y b, siendo a + b = n. Aquí, n es un número entero tal como se define más arriba para la fórmula (VI);

a es un número entero, normalmente seleccionado, independientemente del número entero b, de un intervalo de aproximadamente 1 a 50, preferiblemente de un intervalo de aproximadamente 1, 2 o 3 a 30, de forma especialmente preferible de un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 a 25, o un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 a 20, o un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 a 15, o un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de aproximadamente 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20, o 10 a 20, o un intervalo de aproximadamente 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15, o 10 a 15, o un intervalo de aproximadamente 6 a 11 o 7 a 10. De forma totalmente preferible, a está dentro de un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, de forma especialmente preferible dentro de un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3 o 4 a 9, dentro de un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3 o 4 a 8, o dentro de un intervalo de aproximadamente 1, 2 o 3 a 7;

b es un número entero, normalmente seleccionado, independientemente del número entero a, de un intervalo de aproximadamente 0, 1, 2 o 3 a 30, de forma especialmente preferible de un intervalo de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 a 25, o un intervalo de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 a 20, o un intervalo de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 a 15, o un intervalo de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de aproximadamente 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20, o 10 a 20, o un intervalo de aproximadamente 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15, o 10 a 15, o un intervalo de aproximadamente 6 a 11 o 7 a 10. De forma totalmente preferible, b está dentro de un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, de forma especialmente preferible dentro de un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3 o 4 a 9, dentro de un intervalo de aproximadamente 1, 2, 3 o 4 a 8, o dentro de un intervalo de aproximadamente 1, 2 o 3 a 7.

De acuerdo con un aspecto preferente, el ARNm de la vacuna tal como se describe aquí que codifica al menos un antígeno tal como se define más arriba se puede formular junto con un compuesto catiónico o policationico y/o con un soporte polimérico, preferiblemente tal como se define aquí.

De acuerdo con otro aspecto preferente, el ARNm de la vacuna de la invención que codifica al menos un antígeno tal como se define más arriba se puede formular junto con un componente (adyuvante). De acuerdo con un aspecto particularmente preferente, el ARNm de la vacuna tal como se describe aquí que codifica al menos un antígeno tal como se define más arriba se puede formular de modo que comprenda a) un componente (adyuvante) que incluye o consiste en al menos un ácido nucleico inmunoestimulador, complejoado con un compuesto catiónico o policationico y/o con un soporte polimérico, preferiblemente tal como se define aquí, y b) al menos un ARNm libre que codifica un antígeno, preferiblemente tal como se define aquí para la vacuna tal como se describe aquí.

En el contexto anterior, un compuesto catiónico o policationico y/o un soporte polimérico utilizado para complejar el o los ácidos nucleicos del componente adyuvante se pueden seleccionar entre un compuesto catiónico o policationico y/o un soporte polimérico tal como se define más arriba.

5 Además, un ácido nucleico inmunoestimulador tal como se define más arriba para el componente adyuvante se puede seleccionar preferiblemente entre los ARNm tal como se definen aquí para la vacuna de la invención, que codifican al menos un antígeno. Alternativamente, dicho ácido nucleico inmunoestimulador se puede seleccionar entre ácidos nucleicos inmunoestimuladores tal como se definen aquí, preferiblemente ARN inmunoestimuladores (ARNis) tal como se definen aquí.

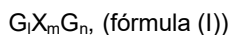
10 En este contexto, un ácido nucleico inmunoestimulador, tal como se utiliza aquí, se selecciona preferiblemente entre ácidos nucleicos inmunoestimuladores de los que se sabe que se unen a receptores TLR. Dicho ácido nucleico inmunoestimulador puede estar en forma de un ácido nucleico CpG (inmunoestimulador), en particular CpG-ARN o CpG-ADN, que preferiblemente induce una respuesta inmunitaria innata. Un CpG-ARN o CpG-ADN utilizado de acuerdo con la invención puede ser un CpG-ADN monocatenario (CpG-ADN ss), un CpG-ADN bicatenario (ADNs), un CpG-ARN monocatenario (CpG-ARN ss) o un CpG-ARN bicatenario (CpG-ARN ds). El ácido nucleico CpG utilizado de acuerdo con la invención está preferiblemente en forma de CpG-ARN, de forma especialmente preferible en forma de CpG-ARN monocatenario (CpG-ARN ss). También preferiblemente, estos ácidos nucleicos CpG tiene una longitud tal como se describe más arriba. Preferiblemente, los motivos CpG no están metilados.

20 Además, un ácido nucleico inmunoestimulador, tal como se utiliza aquí, se selecciona preferiblemente entre un ARN inmunoestimulador (ARNis) que preferiblemente provoca una respuesta inmunitaria innata. Preferiblemente, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN monocatenario, bicatenario o parcialmente bicatenario, de forma especialmente preferible un ARN monocatenario, y/o un ARN circular o lineal, de forma especialmente preferible un ARN lineal. Más preferiblemente, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN monocatenario (lineal). De forma incluso más preferible, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN no codificador (monocatenario) (lineal) (largo). En este contexto, es particularmente preferente que el ARNis porte un trifosfato en su extremo 5', que es el caso para ARN transcrito *in vitro*. Un ARN inmunoestimulador también puede estar presente como un oligonucleótido de ARN corto tal como se define aquí. Un ARN inmunoestimulador tal como se utiliza aquí se puede seleccionar además entre cualquier clase de moléculas de ARN, halladas en la naturaleza o preparadas por síntesis, que pueda inducir una respuesta inmunitaria innata y pueda apoyar una respuesta inmunitaria adaptativa inducida por antígeno. En este contexto, una respuesta inmunitaria se puede producir de diversos modos. Un factor esencial para una respuesta inmunitaria (adaptativa) adecuada es la situación de diferentes subpoblaciones de células T. Los linfocitos T se dividen normalmente en dos subpoblaciones, las células T auxiliares 1 (Th1) y las células T auxiliares 2 (Th2), con las que el sistema inmunitario puede destruir patógenos (por ejemplo antígenos) intracelulares (Th1) y extracelulares (Th2). Las dos poblaciones de células Th se diferencian en el patrón de las proteínas efectoras (citoquinas) producidas por las mismas. Por tanto, las células Th1 ayudan a la respuesta inmunitaria celular mediante activación de macrófagos y células T citotóxicas. Por otro lado, las células Th2 promueven la respuesta inmunitaria humoral mediante estimulación de células B para conversión en células plasmáticas y mediante formación de anticuerpos (por ejemplo contra antígenos). Por consiguiente, la relación Th1/Th2 tiene gran importancia en la inducción y el mantenimiento de una respuesta inmunitaria adaptativa. En relación con la presente invención, la relación Th1/Th2 de la respuesta inmunitaria (adaptativa) se desplaza preferiblemente hacia la respuesta celular (respuesta Th1) e induce así una respuesta inmunitaria celular. De acuerdo con un ejemplo, el sistema inmunitario innato que puede apoyar una respuesta inmunitaria adaptativa se puede activar mediante ligandos de receptores de tipo Toll (TLR). Los TLR son una familia de polipéptidos de receptor de reconocimiento de patrón (PRR) altamente conservados que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y desempeñan una función crítica en la inmunidad innata en mamíferos. Actualmente se han identificado al menos trece miembros de esta familia, denominados TLR1 - TLR13 (receptores de tipo Toll: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13). Además, se ha identificado una serie de ligandos de TLR específicos. Por ejemplo, se ha descubierto que un ADN bacteriano no metilado y análogos sintéticos del mismo (CpG ADN) son ligandos para TLR9 (Hemmi H et al. (2000) Nature 408:740-5; Bauer S et al. (2001) Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98, 9237-42). Además, se ha informado de que algunos ligandos para determinados TLR incluyen determinadas moléculas de ácido nucleico y que determinados tipos de ARN son inmunoestimuladores de forma independiente o dependiente de la secuencia, pudiendo estimular estos diversos ARN inmunoestimuladores por ejemplo TLR3, TLR7 o TLR8, o receptores intracelulares tales como RIG-I, MDA-5, etc.

60 Preferiblemente, un ácido nucleico inmunoestimulador, preferiblemente un ARN inmunoestimulador (ARNis), tal como se utiliza aquí, puede comprender cualquier secuencia de ARN de la que se sepa que es inmunoestimuladora, incluso, de forma no limitativa, secuencias de ARN que representan y/o codifican ligandos de TLR, preferiblemente seleccionados entre miembros de la familia humana TLR1 - TLR10 o miembros de la familia murina TLR1 - TLR13, de forma especialmente preferible seleccionados entre miembros de la familia (humana) TLR1 - TLR10, de forma incluso más preferible entre ligandos TLR7 y TLR8, para receptores intracelulares para ARN (tales como RIG-I o MDA-5, etc.) (véase por ejemplo Meylan, E., Tschoopp,

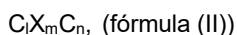
J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. Mol. Cell 22, 561-569), o cualquier otra secuencia de ARN inmunoestimulador. Además, algunas (clases de) moléculas de ARN inmunoestimulador utilizadas como componente adicional de la vacuna de la invención pueden incluir cualquier otro ARN que pueda provocar una respuesta inmunitaria. De forma no limitativa, dicho ARN inmunoestimulador puede incluir ARN ribosómico (ARNr), de transferencia (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y ARN viral (ARNv). Dicho ARN inmunoestimulador puede tener una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 5000, de 5 a 5000, o de 5 a 1000, de 5 a 500, de 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, una secuencia de ácidos nucleicos inmunoestimuladores, en particular un ARNis, tal como se utiliza aquí, puede comprender o consistir en un ácido nucleico de fórmula (I) o (II):



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 arriba mencionados;
- I es un número entero de 1 a 40, donde cuando I = 1, G es guanosina o un análogo de la misma, cuando I > 1, al menos un 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 o análogos de uridina sucesivos;
- 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 un 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma;



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 arriba mencionados;
- I es un número entero de 1 a 40, donde cuando I = 1, C es citidina o un análogo de la misma, cuando I > 1, al menos un 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 o análogos de uridina sucesivos;
- 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 un 50% de los nucleótidos son citidina o un análogo de la misma.

Los ácidos nucleicos de fórmulas (I) o (II), que pueden ser utilizados como una secuencia de ácidos nucleicos inmunoestimuladores, en particular un ARNis, pueden ser moléculas de ácido nucleico relativamente cortas, con una longitud típica de aproximadamente 5 a 100 (pero también puede tener una longitud mayor de 100 nucleótidos para realizaciones específicas, por ejemplo hasta 200 nucleótidos), de 5 a 900 o de 5 a 80 nucleótidos, preferiblemente una longitud de aproximadamente 5 a 70, de forma especialmente preferible una longitud de aproximadamente 8 a 60 y, más preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a 60 nucleótidos, más preferiblemente de 20 a 60, de forma totalmente preferible de 30 a 60 nucleótidos. Si el ácido nucleico de fórmula (I) o (II) tiene una longitud máxima de por ejemplo 100 nucleótidos, m será normalmente ≤ 98 . La cantidad de nucleótidos G en el ácido nucleico de fórmula (I) está determinada por I o n. En este contexto, I y n son en cada caso, independientemente entre sí, un número entero de 1 a 40, en donde, cuando I o n = 1, G es guanosina o un análogo de la misma, y cuando I o n > 1, al menos un 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, de forma no limitativa, cuando I o n = 4, G_l o G_n pueden ser, por ejemplo, GUGU, GGUU, UGUG, UUGG, GUUG, GGGU, GGUG, GUGG, UGGG o GGGG, etc.; cuando I o n = 5, G_l o G_n pueden ser, por ejemplo, GGGUU, GGUGU, GUGGU, UGGGU, UGGUG, UUGUG, UUGGG, GUGUG, GGGGU, GGGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG, o GGGGG, etc. Un nucleótido adyacente a X_m en el ácido nucleico de fórmula (I) preferiblemente no es una uridina. De modo similar, la cantidad de nucleótidos C en el ácido nucleico de fórmula (II) está determinada por I o n. En este contexto, I y n son en cada caso, independientemente entre sí, un número entero de 1 a 40, donde, cuando I o n = 1, C es citidina o un análogo de la misma, y cuando I o n > 1, al menos un 50% de los nucleótidos son citidina o un análogo de la misma. Por ejemplo, de forma no limitativa, cuando I o n = 4, C_l o C_n pueden ser, por ejemplo, CUCU, CCUU, UCUC, UUCC, CUUC, CCCU, CCUC, CUCC, UCCC o CCCC, etc.; cuando I o n = 5, C_l o C_n pueden ser, por ejemplo, CCCUU, CCUCU, CUCCU, UCCCU, UCCUC, UCUCU, UUCCC, CUCUC, CCCC, CCCUC, CCUC, CUCCC, UCCCC, o CCCCC, etc. Un nucleótido adyacente a X_m en el ácido nucleico de fórmula (II)

- preferiblemente no es una uridina. Preferiblemente, en relación con la fórmula (I), cuando l o $n > 1$, al menos un 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 100% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma, tal como se define más arriba. Los nucleótidos restantes hasta el 100% (cuando la guanosina constituye menos del 100% de los nucleótidos) en las secuencias flanqueadoras G y/o G_n son uridina o un análogo de la misma, tal como define más arriba. También preferiblemente, l y n son en cada caso, independientemente entre sí, un número entero de 2 a 30, de forma especialmente preferible de 2 a 20 y de forma incluso más preferible de 2 a 15. El límite inferior de l o n puede variar en caso necesario y es al menos 1, preferiblemente al menos 2, de forma especialmente preferible al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Esta definición es aplicable correspondientemente a la fórmula (II).
- 10 De acuerdo con una realización particularmente preferente, un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las fórmulas (I) o (II) arriba mostradas, que puede ser utilizado como una secuencia de ácidos nucleicos inmunoestimuladores, en particular un ARNis, se puede seleccionar entre una secuencia que comprende o consiste en cualquiera de las siguientes secuencias:
- 5 GGUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 289);
 15 GGGGGUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 290);
 GGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 291);
 GUGUGUGUGUGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO: 292);
 GGUUGGUUGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGUUGGUUGGUU (SEQ ID NO: 293);
 GGGGGGGGGUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 294);
 20 GGGGGGGGUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 295);
 GGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 296);
 GGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 297);
 GGGGGGUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 298);
 GGGGGGUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 299);
 25 GGGGGGUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 300);
 GGGGGUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 301);
 GGGGGUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 302);
 GGGGUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 303);
 GGGUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 304);
 30 GGUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 305);
 GUUUUUUUUUUUUUUUUUUG (SEQ ID NO: 306);
 GGGGGGGGGGUUUGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 307);
 GGGGGGGGGUUUUGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 308);
 GGGGGGGGUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 309);
 35 GGGGGGGGUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 310);
 GGGGGGGUUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 311);
 GGGGGGGUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 312);
 GGGGGGGUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 313);
 GGGGGGUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 314);
 40 GGGGGGUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 315);
 GGGGGUUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 316);
 GGGGGUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 317);
 GGGUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 318);
 GGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 319);
 45 GGGGGGGGGGUUUGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 320);
 GGGGGGGGGGUUUUGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 321);
 GGGGGGGGGUUUUUUUGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 322);
 GGGGGGGGGUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 323);
 GGGGGGGGUUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 324);
 50 GGGGGGGGUUUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 325);
 GGGGGGGGUUUUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 326);
 GGGGGGGUUUUUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 327);
 GGGGGGGUUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 328);
 GGGGGGUUUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 329);
 55 GGGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 330);
 GGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 331);
 GGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 332);
 GUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUG (SEQ ID NO: 333);
 GGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 334);
 60 GGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 335);
 GGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 336);
 GGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 337);
 GGGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 338);
 GGGGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 339);

GGGGGGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 340);
GGGGGGGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 341);
GGUUUUGG (SEQ ID NO: 342);
GGUUUUGG (SEQ ID NO: 343);
5 GGUUUUUGG (SEQ ID NO: 344);
GGUUUUUUGG (SEQ ID NO: 345);
GGUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 346);
GGUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 347);
GGUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 348);
10 GGUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 349);
GGUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 350);
GGUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 351);
GGUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 352);
GGUUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 353);
15 GGUUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 354);
GGGUUUUGGG (SEQ ID NO: 355);
GGGUUUUUGGG (SEQ ID NO: 356);
GGGUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 357);
GGGUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 358);
20 GGGUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 359);
GGGUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 360);
GGGUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 361);
GGGUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 362);
GGGUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 363);
25 GGGUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 364);
GGGUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 365);
GGGUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUUUUUUUUUU UUUUUUGGG (SEQ ID NO:
366);
GGGUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 367);
30 GGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUUGGGUUU GGG (SEQ ID NO: 368);
GGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (short GU-rich, SEQ ID NO: 369)
o
CCCUUUUUUUUUUUUUUUUCCCuuuuuuuuuuuuuuuucccuuuuuuuuuuu uuuuccc (SEQ ID NO:
370)
35 CCCUUUCCCCUUCCCCUUCCCCUUCCCCUUCCCCUUCCCCUUCCCCUUCCCC (SEQ ID NO: 371)
CCCUUUUUUUUUUUUUUUUCCCCCuuuuuuuuuuuuuuuuccc (SEQ ID NO: 372)
o una secuencia que tenga al menos un 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 95% de identidad de secuencia con
cualquiera de estas secuencias.

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, una secuencia de ácidos nucleicos
40 inmunoestimuladores, en particular un ARNis, tal como se utiliza aquí, puede comprender o consistir en un
ácido nucleico de fórmula (III) o (IV):



donde:

- | | | |
|----|---|---|
| 45 | G | es guanósina (guanina), uridina (uracilo) o un análogo de guanósina (guanina) o uridina (uracilo), preferiblemente guanósina (guanina) o un análogo de la misma; |
| | X | es guanósina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos), preferiblemente uridina (uracilo) o un análogo de la misma; |
| 50 | N | es una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una longitud de aproximadamente 4 a 50, preferiblemente de aproximadamente 4 a 40, de forma especialmente preferible de aproximadamente 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, seleccionándose cada N independientemente entre guanósina (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, de forma totalmente preferible de 1 a 10; |
| 55 | 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 un 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanósina (guanina) o un análogo de la misma; |
| 60 | 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 $m > 3$, están presentes al menos 3 uridinas (uracilos) o análogos de uridina (uracilo) sucesivos; |

- 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 un 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma;
- 5 u, v pueden ser, independientemente entre sí, un número entero de 0 a 50, donde, preferiblemente, cuando $u = 0$, $v \geq 1$, o cuando $v = 0$, $u \geq 1$;
- teniendo la molécula de ácido nucleico de fórmula (III) una longitud de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente al menos 100 nucleótidos, de forma especialmente preferible al menos 150 nucleótidos, de forma incluso más preferible al menos 200 nucleótidos y de forma totalmente preferible al menos 250 nucleótidos.
- $$(N_u C_l X_m C_n N_v)_a \quad (\text{fórmula (IV)})$$
- 10 donde:
- C es citidina (citiosina), uridina (uracilo) o un análogo de citidina (citiosina) o uridina (uracilo), preferiblemente citidina (citiosina) o un análogo de la misma;
- X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citiosina) o un análogo de los nucleótidos (nucleósidos) arriba mencionados, preferiblemente uridina (uracilo) o un análogo de la misma;
- 15 N es en cada caso una secuencia de ácidos nucleicos que tienen, independientemente entre sí, una longitud de aproximadamente 4 a 50, preferiblemente de aproximadamente 4 a 40, de forma especialmente preferible de aproximadamente 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, siendo seleccionada cada N independientemente entre guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citiosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);
- 20 a es un número entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 15, de forma totalmente preferible de 1 a 10;
- l es un número entero de 1 a 40, donde cuando $l = 1$, C es citidina (citiosina) o un análogo de la misma, cuando $l > 1$, al menos un 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son citidina (citiosina) o un análogo de la misma;
- 25 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 $m > 3$, están presentes al menos 3 uridinas (uracilos) o análogos de uridina (uracilo) sucesivos;
- n es un número entero de 1 a 40, donde cuando $n = 1$, C es citidina (citiosina) o un análogo de la misma, cuando $n > 1$, al menos un 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son citidina (citiosina) o un análogo de la misma;
- 30 u, v pueden ser, independientemente entre sí, un número entero de 0 a 50, donde, preferiblemente, cuando $u = 0$, $v \geq 1$, o cuando $v = 0$, $u \geq 1$;
- teniendo la molécula de ácido nucleico de fórmula (IV) una longitud de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente al menos 100 nucleótidos, de forma especialmente preferible al menos 150 nucleótidos, de forma incluso más preferible al menos 200 nucleótidos y de forma totalmente preferible al menos 250 nucleótidos.
- 35 Cualquiera de las definiciones dadas más arriba de las fórmulas (I) y (II), por ejemplo para los elementos N (es decir, N_u y N_v) y X (X_m), en particular la estructura de núcleo tal como se define más arriba, así como para los números enteros a, l, m, n, u y v, son aplicables de modo similar a elementos de fórmulas (III) y (IV) correspondientemente. La definición de elementos adyacentes N_u y N_v en la fórmula (IV) es idéntica a las definiciones arriba indicadas para N_u y N_v en la fórmula (IV).
- 40 De acuerdo con una realización muy particularmente preferente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV), que puede ser utilizada como una secuencia de ácido nucleico inmunoestimuladora, en particular un ARNis, se puede seleccionar por ejemplo de entre cualquiera de las siguientes secuencias:
- UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUCCUA-
GAAGUACACG (SEQ ID NO: 373)
- UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUCCUA-
GAAGUACACG AUCGCUUCGA GAACCUGGAUCCAAAAAACCAC-
45 GCAAGGAUCUUC AUGUGC (SEQ ID NO: 374)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUG-
CAUAUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUG-
GAGCUUAUUCACUCCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGAC-
CUAGGUCGUCAGUUGACAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUA-
GAUGUUAACACUCUAUUAAGAUC (SEQ ID NO: 375)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUG-
CAUAUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUG-
GAGCUUAUUCACUCCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGAC-
CUAGGUCGUCAGUUGACAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUA-
GAUGUUAACACUCUAUUAAGAUCUCGGAUUAACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUG-
UUCUUGCUCUAAGUACCGAGUGUGCCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAAC-
GGCUCCUCCUCUUAAGACUGCAGCGUAAGUGCGGAAUCUGGGGAUCAAUUAUCU-
GACUGCCUGGAUUAACCCUCGGACAUUAUAACCUUGUAGCAC-
GCUGUUGCUGUAUAGGUGACCAACGCCACUCGAGUAGACCAGCUCU-
CUUAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGGUCAAUCUACUUCUGGCUAGUU-
AAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAG (SEQ ID NO: 376)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUG-
CAUAUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUG-
GAGCUUAUUCACUCCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGAC-
CUAGGUCGUCAGUUGACAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUA-
GAUGUUAACACUCUAUUAAGAUCUCGGAUUAACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUG-
UUCUUGCUCUAAGUACCGAGUGUGCCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAAC-
GGCUCCUCCUCUUAAGACUGCAGCGUAAGUGCGGAAUCUGGGGAUCAAUUAUCU-
GACUGCCUGGAUUAACCCUCGGACAUUAUAACCUUGUAGCAC-
GCUGUUGCUGUAUAGGUGACCAACGCCACUCGAGUAGACCAGCUCU-
CUUAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGGUCAAUCUACUUCUGGCUAGUU-
AAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAGAGCUAC-
GCAGGUUCGCAUAAAAGCGUUGAUUAGUGUGCAUAGAACAGACCU-
CUUAUUCGGUGAAACGCCAGAAUGCUAAAUCCAAUAACUCUCCCCAAAAC-
GCGUACGGCCGAAGACGCGCGCUUAUCUUGUGUACGUUCUCGCACAUUGGAA-
GAAUCAGCGGGCAUGGUGGUAGGGCAUAGGGGAGCUGGGUAG-
CAGCGAAAAAGGGCCCCUGCGCAC-
GUAGCUUCGCUGUUCGUCUGAAACAACCCGG-
CAUCCGUUGUAGCGAUCCCGUUAUCAGUGUUAUUCUUGUGCGCACUAAGAU-
UCAUGGUGUAGUCGACAAUAACAGCGUCUUGGCAGAUUCUGGUCACGUG-
CCCUAUGCCCCGGGCUUGUGCCUCUCAGGUGCACAGCGAUACUUAUA-
GCCUUAAGGUACUCGACGUGGGUACCGAUUCGUGACACUCCUAAGAU-
UAUCCACUGUGUUAAGCCCCGCACCGCCGACCUAAACUGGUCCAUGUAUAC-
GCAUUCGCUGAGCGGAUCGAUAAUAAAAGCUUGAAUU (SEQ ID NO: 377)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAAC-
GUAGCCGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAA-
GUUAGUCUGCCUAUAAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUG-
CGGUACGGUUAUUCUCCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGU-
AAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCCCAGAUC (SEQ ID NO: 378)

5

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAAC-
 GUAGCCGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAA-
 GUUAGUCUGCCUAUAAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUG-
 CGGUACGGUUAUUCUCCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGU-
 AAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCCCAGAUCUUCGACCACAA-
 GUGCAUAUAGUAGUCAU-
 CGAGGGUGCGCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGCCCAGUUCUGAGACU-
 UCGCUAGAGACUACAGUUAACAGCUGCAGUAGUAACCACUGCGGCCUAUUGCAG-
 GAAAUCCCGUUCAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGCUCACUAUGAU-
 UAAGAACCAGGUGGAGUGUCACUGCUCUCGAGGUCUCACGA-
 GAGCGCUCGAUACAGUCCUUGGAA-
 GAAUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACGAUCACAGAGAACU-
 UCUAUUCAUGCAGGUCUGCUCUA (R 722 SEQ ID NO: 379)

5 GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAAC-
 GUAGCCGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAA-
 GUUAGUCUGCCUAUAAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUG-
 CGGUACGGUUAUUCUCCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGU-
 AAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCCCAGAUCUUCGACCACAA-
 GUGCAUAUAGUAGUCAU-
 CGAGGGUGCGCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGCCCAGUUCUGAGACU-
 UCGCUAGAGACUACAGUUAACAGCUGCAGUAGUAACCACUGCGGCCUAUUGCAG-
 GAAAUCCCGUUCAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGCUCACUAUGAU-
 UAAGAACCAGGUGGAGUGUCACUGCUCUCGAGGUCUCACGA-
 GAGCGCUCGAUACAGUCCUUGGAA-
 GAAUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACGAUCACAGAGAACU-
 UCUAUUCAUGCAGGUCUGCUCUAGAACGAACUGACCUGACGCCUGAACU-
 UAUGAGCGUGCGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCUCCCAACAAAU-
 GUCGAUCAAUAGCUGGGCUGUUGGAGACGCGUCAGCAAUUGCCGUG-
 GCUCCAUAGGACGUGUAGACUUCUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCCGG-
 GACCACAAUAAUUAUUCUUGCUUGGUUGGGCG-
 CAAGGGCCCCGUUACAGGUCAUAAACGGGUACAUGUUG-
 CACAGGCUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGUGAGUUAUUCGGGUCUC
 AAAAGACGGCAGACGUCAGUCGACAACACGGUCUAAAGCAGUG-
 CUACAAUCUGCCGUGUUCGUGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGAAC-
 CUACACGGCGUGCACUGUAGUUCGCAU-
 UCAUAGGGUACCGGCUCAGAGUUAUGCCUUGGUUGAAAACUGCCCAGCAUACU-
 UUCCCGG-
 AAGCAAGGGAUGCCGCGAGUCAUGUUAAGCUUGAAUU (SEQ ID NO: 380)

De acuerdo con otra realización muy particularmente preferente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (V) se puede seleccionar por ejemplo entre cualquiera de las siguientes secuencias:

UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUAGAA-
 GUACACG (SEQ ID NO: 381)

10 o UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUA
 GAAGUACACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGAC-
 GCAAGGAUCUUCUUGUGC (SEQ ID NO: 382)

o una secuencia que tenga al menos un 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 95% de identidad de secuencia con cualquiera de estas secuencias.

Finalmente, el denominado "componente (adyuvante)", que puede ser utilizado junto con el ARNm en la vacuna tal como se describe aquí, se prepara preferiblemente de acuerdo con una primera etapa complejando el o los ARN(m) del componente (adyuvante) con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un soporte polimérico, preferiblemente tal como se define aquí, en una relación específica, para formar un complejo estable. En este contexto es sumamente preferible que, después de complejar el ARN(m), en el componente (adyuvante) no quede nada del compuesto catiónico o policatiónico o del soporte polimérico libre o solo quede una cantidad insignificamente pequeña del mismo. Por consiguiente, la relación del ARN(m) y el compuesto catiónico o policatiónico y/o el soporte polimérico en el componente (adyuvante) se selecciona normalmente dentro de un intervalo en el que ARN(m) esté complejado por completo y en la composición no quede nada del compuesto catiónico o policatiónico o del soporte polimérico libre o solo quede una cantidad insignificamente pequeña del mismo. Preferiblemente, la relación del componente (adyuvante), es decir, la relación del ARN(m) con respecto al compuesto catiónico o policatiónico y/o el soporte polimérico, preferiblemente tal como se define aquí, se selecciona en un intervalo de aproximadamente 6:1 (p/p) a aproximadamente 0,25:1 (p/p), de forma especialmente preferible de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 0,5:1 (p/p), de forma incluso más preferible de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p), o de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p), y de forma totalmente preferible una relación de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 2:1 (p/p). Alternativamente, la relación del ARN(m) con respecto al compuesto catiónico o policatiónico y/o el soporte polimérico, preferiblemente tal como se define aquí, en el componente (adyuvante) también se puede calcular en base a la relación nitrógeno/fosfato (relación N/P) de todo el complejo del componente (adyuvante). Una relación N/P está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,1-10, preferiblemente de aproximadamente 0,3-4 y de forma totalmente preferible de 0,5-2 o 0,7-2 con respecto a la relación ARN(m):compuesto catiónico o policatiónico y/o el soporte polimérico, preferiblemente tal como se define aquí, en el complejo, y de forma totalmente preferible dentro del intervalo de aproximadamente 0,7-1,5, preferiblemente a condición de que el compuesto catiónico o policatiónico en el complejo sea un péptido o proteína catiónico o policatiónico y/o que el soporte polimérico sea tal como se define más arriba. Estas relaciones, en particular las relaciones en peso y/o N/P, también se pueden aplicar a relaciones del o de los ARNm que codifican al menos un antígeno tal como se define aquí con respecto a un polímero catiónico, policatiónico o un soporte polimérico tal como se define aquí utilizado para complejar el o los ARNm.

De acuerdo con otro aspecto preferente, el ARNm de la vacuna tal como se describe aquí que codifica al menos un antígeno tal como se define aquí se puede formular junto con un componente (adyuvante) tal como se define más arriba, pudiendo la vacuna tal como se describe aquí comprender a) un componente (adyuvante), que comprende o consiste en al menos un ARN(m) complejado con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un soporte polimérico, preferiblemente tal como se define aquí, y b) al menos un ARNm libre, que codifica un antígeno, preferiblemente tal como se define aquí. Esta formulación es preferiblemente tal como se define más arriba. Además, la formulación completa de a) y b) se puede envasar adicionalmente con una molécula de soporte para posibilitar el envasado combinado del componente (adyuvante) y el antígeno. Dicha molécula de soporte se puede seleccionar entre cualquier polímero adecuado para envasar y preferiblemente transportar la formulación completa de a) y b) al interior de células, tejido, etc., de un paciente tal como se define aquí, por ejemplo de un polímero catiónico o policatiónico tal como se define aquí o de cualquier polímero adicional adecuado para este fin, por ejemplo un soporte polimérico tal como se define más arriba.

La relación de todos los componentes de la composición de vacuna completa, tal como se define más arriba, preferiblemente un componente adyuvante que comprende o consiste en al menos una secuencia de ácidos nucleicos inmunoestimuladores, complejada con un compuesto catiónico o policatiónico, el o los ARNm que codifican al menos un antígeno, y/o una molécula de soporte, formulados en la vacuna tal como se describe aquí, se puede calcular en base a la relación nitrógeno/fosfato (relación N/P) de todos estos componentes. Una relación N/P de este tipo está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,01-4, 0,01-2, 0,1-2 o 0,1-1,5 con respecto a la relación ácidos nucleicos:péptido catiónico o policatiónico contenidos en la vacuna tal como se describe aquí, y de forma totalmente preferible en el intervalo de aproximadamente 0,1-1. Dicha relación N/P está concebida preferiblemente para proporcionar buenas propiedades de transfección *in vivo* y el transporte al interior de membranas celulares y a través de las mismas. Preferiblemente, con este fin, el compuesto catiónico o policatiónico y/o los soportes poliméricos tal como se utilizan aquí se basan en secuencias peptídicas.

En otro aspecto preferente de la presente invención, la vacuna de la invención puede comprender un soporte y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un soporte farmacéuticamente aceptable incluye normalmente la base líquida o no líquida de una composición que comprende los componentes de la vacuna de la invención. Si la composición se proporciona en forma líquida, el soporte consistirá normalmente en agua libre de pirógenos; soluciones (acuosas) salinas isotónicas o tamponadas, por ejemplo soluciones tamponadas con fosfato, citrato, etc. El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico con referencia al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener un contenido de sal mayor, idéntico o menor con referencia al medio de referencia específico, pudiendo

utilizarse preferiblemente concentraciones de las sales arriba mencionadas que no conduzcan a un deterioro celular debido a ósmosis u otros efectos de la concentración. Medios de referencia son por ejemplo líquidos presentes en métodos "*in vivo*", tales como sangre, linfa, líquidos citosólicos, u otros líquidos corporales, o por ejemplo líquidos que pueden emplearse como medios de referencia en métodos "*in vitro*", tales como tampones o líquidos comunes. Estos tampones o líquidos comunes son conocidos por los expertos en la técnica. Una solución Ringer Lactato es particularmente preferente como base líquida.

No obstante, para la vacuna de la invención también se pueden utilizar uno o más materiales de carga o diluyentes sólidos o líquidos o materiales de encapsulación compatibles, que sean adecuados para ser administrados a un paciente a tratar. El término "compatible", tal como se utiliza aquí, significa que estos constituyentes de la vacuna de la invención pueden ser mezclados con los componentes de la vacuna de la invención de modo que no se produce ninguna interacción que pudiera reducir sustancialmente la eficacia farmacéutica de la vacuna de la invención bajo las condiciones de uso normales.

De acuerdo con un aspecto específico, la vacuna de la invención puede comprender un adyuvante. En este contexto, un adyuvante se puede entender como cualquier compuesto que sea adecuado para iniciar o aumentar una respuesta inmunitaria del sistema inmunitario innato, es decir, una respuesta inmunitaria no específica. Dicho de otro modo, cuando es administrada, la vacuna preferiblemente provoca una respuesta inmunitaria innata debido al adyuvante opcionalmente contenido dentro de la misma. Preferiblemente, dicho adyuvante se puede seleccionar entre adyuvantes conocidos por los expertos y adecuados para el presente caso, es decir, que apoyan la inducción de una respuesta inmunitaria innata en un mamífero, por ejemplo una proteína adyuvante tal como se define más arriba o un adyuvante tal como se define más adelante.

De acuerdo con un aspecto, dicho adyuvante se puede seleccionar entre los componentes (adyuvantes) tal como se definen más arriba.

De acuerdo con otro aspecto, dicho adyuvante se puede seleccionar entre adyuvantes conocidos por los expertos y adecuados para el presente caso, es decir, que apoyen la inducción de una respuesta inmunitaria innata en un mamífero y/o que sean adecuados para el depósito y suministro de los componentes de la vacuna de la invención. Los compuestos catiónicos o policationicos tal como se definen más arriba son preferentes como adyuvantes adecuados para el depósito y suministro. Del mismo modo, el adyuvante se puede seleccionar entre el grupo consistente en, de forma no limitativa, compuestos catiónicos o policationicos tal como se definen más arriba, quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, pluronics, solución de alumbre, hidróxido de aluminio, ADJUMERTM (polifosfaceno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alumbre); gel de hidróxido de aluminio altamente adsorbente de proteínas; gel de hidróxido de aluminio de baja viscosidad; AF o SPT (emulsión de escualano (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%), solución salina tampón de fosfato, pH 7,4); AVRIDINETM (propanodiamina); BAY R1005TM (hidroacetato de (N-(2-desoxi-2-L-leucilaminob-D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoil-amida); CALCITRIOLTm (1-alfa,25-dihidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de calcio); holotoxina colérica, proteína de fusión toxina colérica-A1-proteína-A-D-fragmento, subunidad B de la toxina colérica; CRL 1005 (copolímero en bloque P1205); liposomas que contienen citoquinas; DDA (bromuro de dimetildioctadecil-amonio); 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-D35 glutamina (GMDP), ii) cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA), iii) complejo de sal zinc-L-prolina (ZnPro-8); GM-CSF); GMDP (N-acetilglucosaminil-(b1-4)-N-acetilmuramil-L47 alanil-D-isoglutamina); imiquimod (1-(2-metipropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-4-amina); ImmTher™ (dipalmitato de N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRVs (immunoliposomas preparados a partir de vesículas de deshidratación); interferón gamma; interleuquina-1 beta; interleuquina-2; interleuquina-7; interleuquina-12; ISCOMSTM; ISCOPREP 7.0.3. TM; liposomas; LOXORIBINETM (7-alil-8-oxoguanosina); adyuvante oral LT 5 (enterotoxina-protoxina lábil de *E. coli*); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59TM; (emulsión de escualeno en agua); MONTANIDE ISA 51TM (adyuvante incompleto de Freund purificado); MONTANIDE ISA 720TM (adyuvante de aceite metabolizable); MPLTM (3-Q-desacil-4'-monofosforil lípido A); liposomas MTP-PE y MTP-PE ((N-acetil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosforiloxi))-etilamida, sal monosódica); MURAMETIDETM (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH3); MU-RAPALMITINETM y DMURAPALMITINETM (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoil); NAGO (neuraminidasa-galactosa oxidasa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISVs (vesículas tensioactivas no iónicas); PLEURANTM (-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico; microesferas/nanoesferas); PLURONIC L121TM; PMMA (polimetilmetacrilato); PDDSTM (microesferas de proteinoide); 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); STIMULONTM (QS-21); Quil-A (Quil- A saponina); S-28463 (4-amino-otec-dimetil-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol); SAF-1TM ("formulación adyuvante Syntex"); proteoliposomas de Sendai y matrices lipídicas que contienen lípidos; Span-85 (trioleato de sorbitano); Specol (emulsión de Marcol 52, Span 85 y Tween 85); escaleno o Robane® (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetra-cosano y 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano); esteariltirosina (clorhidrato de octadeciltirosina);

- Theramid® (N-acetil-glucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Aladipalmitoxipropilamida); teronil-MDP (TermurtidaTM 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 sobre hidróxido de aluminio), y lipopéptidos, incluyendo Pam3Cys, en particular sales de aluminio, tales como Adju-phos, Alhydrogel, Rehydralgel; emulsiones, incluyendo CFA, SAF, IFA, MF59, Provax, TiterMax, Montanide, Vaxfectin; copolímeros, incluyendo Optivax (CRL1005), L121, Poloaxmer4010), etc.; liposomas, incluyendo Stealth, cocleatos, incluyendo BIORAL; adyuvantes derivados de plantas, incluyendo QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; adyuvantes adecuados para la coestimulación, incluyendo Tomatina, biopolímeros, incluyendo PLG, PMM, Inulina, adyuvantes derivados de microbios, incluyendo Romurtide, DETOX, MPL, CWS, Manosa, secuencias de ácido nucleico CpG, CpG7909, ligandos de TLR 1-10 humano, ligandos de murino TLR 1-13, ISS-1018, 35 IC31, imidazoquinolinas, Ampligen, Ribi529, IMOxine, IRIVs, VLPs, toxina colérica, toxina lábil al calor, Pam3Cys, flagelina, anclaje GPI, LNFP III/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP; y adyuvantes adecuados como antagonistas incluyendo neuropéptidos CGRP.
- De forma particularmente preferente, un adyuvante se puede seleccionar entre adyuvantes que apoyan la inducción de una respuesta inmunitaria Th1 o la maduración de células T naive, tales como GM-CSF, IL-12, IFN γ , cualquier ARN tal como se define aquí, preferiblemente un ARN inmunoestimulador, CpG ADN, etc.
- La vacuna de la invención puede contener adicionalmente un agente inmunoterapéutico adicional seleccionado de entre inmunoglobulinas, preferiblemente IgG, anticuerpos monoclonales o policlonales, suero o sueros policlonales, etc. Preferiblemente, dicho agente terapéutico adicional se puede proporcionar como un péptido/proteína o puede ser codificado por un ácido nucleico, preferiblemente mediante un ADN o un ARN, de forma especialmente preferible un ARNm. Este agente inmunoestimulador permite proporcionar vacunación pasiva adicional a la vacunación activa provocada por el antígeno codificado con ARNm de la composición de la invención o la composición de la vacuna.
- La vacuna de la invención puede contener adicionalmente una o más sustancias auxiliares para aumentar su inmunogenicidad o capacidad inmunoestimuladora, si así se desea. De este modo se logra preferiblemente una acción sinérgica de la vacuna de la invención y una sustancia auxiliar que puede estar contenida opcionalmente en la vacuna o se puede formular con el inhibidor. A este respecto, dependiendo de los diversos tipos de sustancias auxiliares, pueden entrar en consideración diversos mecanismos. Por ejemplo, una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas está formada por compuestos que permiten la maduración de células dendríticas (DC), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF- α o ligando CD40. En general, como sustancia auxiliar se puede utilizar cualquier agente que influya en el sistema inmunitario a modo de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, tal como GM-CSF, que permite mejorar una respuesta inmunitaria y/o influir de forma dirigida en la misma. Sustancias auxiliares particularmente preferentes son citoquinas, tales como monoquinas, linfocinas, interleucinas o quimioquinas, que adicionalmente promueven la respuesta inmunitaria innata, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT- β o TNF- α , factores de crecimiento tales como hGH.
- La vacuna de la invención también puede contener adicionalmente cualquier otro compuesto conocido por ser inmunomodulador debido a su afinidad de unión (como ligando) con receptores de tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o debido a su afinidad de unión (como ligandos) con receptores de tipo Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13, un ligando de un receptor de tipo NOD, o un ligando de un receptor de tipo RIG-I.
- En este contexto, la vacuna de la invención también puede contener adicionalmente un ácido nucleico inmunoestimulador, preferiblemente un ARN inmunoestimulador (ARNis), tal como se define más arriba.
- La vacuna de la invención tal como se define de acuerdo con la presente invención puede comprender además otros aditivos o compuestos adicionales. Otros aditivos que pueden incluirse en la vacuna de la invención son emulsionantes, por ejemplo, Tween®, agentes humectantes, por ejemplo, laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, soportes farmacéuticos; agentes formadores de comprimidos; estabilizadores; antioxidantes; conservantes.
- Otro aditivo que puede estar contenido en la vacuna de la invención puede ser un agente antibacteriano. En este contexto, cualquier agente antibacteriano conocido por los expertos puede emplearse en combinación con los componentes de la vacuna de la invención tal como se define aquí. Ejemplos no limitativos de agentes antibacterianos incluyen amikacina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, anfotericina-B, ampicilina, ampicilina-sulbactam, apramicina, azitromicina, aztreonam, bacitracina, bencilpenicilina, caspofungina, cefaclor, cefadroxilo, cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefdinir, cefepima, cefixima, cefmenoxima, cefoperazona, cefoperazona-sulbactam, cefotaxima, cefoxitina, cefbirome, cefpodoxima, cefpodoxima-ácido clavulánico, cefpodoxima-sulbactam, cefbrozil, cefquinoma, ceftazidima, ceftibutina, ceftiofur, ceftobiprol, ceftriaxona, cefuroxima, cloranfenicol, florfenicol, ciprofloxacina, claritromicina, clinafloxacina, clindamicina, cloxacilina, colistina, cotrimoxazol (trimtoprim/sulfamethoxazol), dalbavancin, dalfopristina/quinopristina, daptomicina, dibekacina, dicloxacilina, doripenem, doxiciclina, enrofloxacin, ertapenem, eritromicina, flucloxacilina, fluconazol, flucitosina, fosfomicina, ácido fusídico, garenoxacina, gatifloxacina, gemifloxacina,

gentamicina, imipenem, itraconazol, kanamicina, ketoconazol, levofloxacina, lincomicina, linezolid, loracarbef, mecilinam (amdinocilina), meropenem, metronidazol, meziocilina, mezlocilina-sulbactam, minociclina, moxifloxacina, mupirocina, ácido nalidíxico, neomicina, netilmicina, nitrofurantoína, norfloxacina, ofloxacina, oxacilina, pefloxacina, penicilina V, piperacilina, piperacilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, rifampicina, roxitromicina, esparfloxacino, espectinomicina, espiramicina, estreptomicina, sulbactam, sulfametoxazol, teicoplanina, telavancina, telitromicina, temocilina, tetraciclina, ticarcilina, ticarcilina-ácido clavulánico, tigeciclina, tobramicina, trimetoprima, trovafloxacina, tilosina, vancomicina, virginiamicina, y voriconazol.

Otro aditivo más que puede estar contenido en la vacuna de la invención puede ser un agente antiviral, preferiblemente, pero no de forma limitativa, análogos de nucleósido (por ejemplo zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina), foscarnet, amantadina, peramivir, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, interferones alfa y otros interferones, AZT, t-705, zanamivir (Relenza®) y oseltamivir (Tamiflu®). Otros agentes antivirales incluyen vacunas del virus de la gripe, por ejemplo Fluarix® (Glaxo SmithKline), FluMist® (MedImmune Vaccines), Fluvirin® (Chiron Corporation), Flulaval® (GlaxoSmithKline), Afluria® (CSL Bio-therapies Inc.), Agriflu® (Novartis) o Fluzone® (Aventis Pasteur).

La vacuna de la invención normalmente comprende una "cantidad segura y eficaz" de los componentes de la vacuna de la invención tal como se define aquí. Tal como se utiliza aquí, una "cantidad segura y eficaz" significa preferiblemente una cantidad de los componentes, preferiblemente del o de los ARNm, que es suficiente para inducir de forma significativa una modificación positiva de una enfermedad o trastorno tal como se define aquí. Sin embargo, al mismo tiempo, una "cantidad segura y eficaz" es suficientemente pequeña para evitar efectos secundarios graves y para permitir una relación razonable entre ventajas y riesgos. La determinación de estos límites está normalmente dentro del alcance del criterio médico.

Tal como se define aquí, la vacuna de la invención que comprende al menos un ARNm que codifica al menos un antígeno se utiliza en la profilaxis de una enfermedad infecciosa en un recién nacido o un niño de una edad no superior a 2 años, preferentemente no superior a 1 año (12 meses), en particular no superior a 9, 6 o 3 meses. El tratamiento preferentemente comprende la vacunación del recién nacido o del niño y provocar una respuesta inmune en dicho recién nacido o niño. Preferentemente, un recién nacido o niño es un mamífero (paciente), preferiblemente humano, que típicamente tiene una edad no superior a 3 o normalmente 2 años, preferentemente no superior a años y medio, en especial no superior a un año (12 meses), incluso más preferentemente no superior a 9 meses, 6 meses o incluso 3 meses. Así, un recién nacido o niño puede comprender una edad de aproximadamente 0 a 3 o normalmente de 0 a 2 años, preferentemente de 0 a año y medio, en especial de 0 a 1 año (0 a 12 meses), incluso más preferentemente de no más de 0 a 9 meses, 0 a 6 meses o incluso 0 a 3 meses. Además, un recién nacido o niño puede distinguirse en un recién nacido, típicamente con una edad inferior a 1 año (12 meses), preferentemente no más de 9 meses, 6 meses o incluso 3 meses. Por tanto, un recién nacido o niño puede tener una edad de aproximadamente 0 a 1 año (0 a 12 meses), preferentemente no más de 0 a 9 meses, 0 a 6 meses o incluso 0 a 3 meses. Un recién nacido o niño se puede distinguir además como un niño, típicamente con una edad superior a 3 meses, preferentemente con una edad de 6 meses, en especial con una edad de más de 9 meses, pero también con una edad de no más de 3 o normalmente 2 años, preferentemente no más de 1,5 años, en especial no más de 1 año (12 meses), incluso más preferentemente no más de 9 meses o incluso 6 meses. Por tanto, un recién nacido o un niño puede comprender una edad de aproximadamente 3 meses a aproximadamente 3 años, aproximadamente 3 meses a aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 meses a aproximadamente 1,5 años, o aproximadamente 3 meses a aproximadamente 1 año (12 meses), aproximadamente 6 meses a aproximadamente 3 años, aproximadamente 6 meses a aproximadamente 2 años, aproximadamente 6 meses a aproximadamente 1,5 años, o aproximadamente 6 meses a aproximadamente 1 año (12 meses), aproximadamente 9 meses a aproximadamente 3 años, aproximadamente 9 meses a aproximadamente 2 años, o aproximadamente 9 meses a aproximadamente 1,5 años, aproximadamente 12 meses a aproximadamente 3 años, aproximadamente 12 meses a aproximadamente 2 años, o aproximadamente 12 meses a aproximadamente 1,5 años. Los recién nacidos o niños pueden ser varones o mujeres.

Tal como se define además en la presente invención, el tratamiento comprende la vacunación del paciente y la provocación de una respuesta inmunitaria en dicho paciente. En este contexto, la vacunación tiene lugar normalmente a través de la administración de la vacuna de la invención. La administración puede realizarse vía parenteral, oral, nasal, pulmonar, por inhalación (por ejemplo mediante un aerosol o spray), tópica, rectal, bucal, vaginal, o a través de un depósito implantado. Tal como se utiliza aquí, el término "parenteral" incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intra-arterial y sublingual, o técnicas de infusión. Preferiblemente, la vacuna de la invención se puede administrar vía intradérmica para alcanzar APC en la dermis. De modo igualmente preferible, la vacuna de la invención tal como se define aquí puede ser administrada vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable, incluyendo, de forma no limitativa, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. De modo igualmente preferible, la vacuna de la invención puede ser administrada vía tópica, en especial cuando el objetivo de tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica, incluyendo por ejemplo enfermedades de la piel o de cualquier otro tejido epitelial accesible. Las

formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, la vacuna de la invención se puede formular en un ungüento adecuado que contiene la vacuna de la invención y opcionalmente otros componentes tal como se definen aquí suspendidos o disueltos en uno o más soportes. También se puede emplear una administración vía pulmonar, por ejemplo mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de pulverización para una utilización a modo de spray.

La vacuna de la invención puede emplearse en combinación con otras terapias, preferiblemente con una terapia para una enfermedad tal como se define aquí, o terapias adicionales. Tal como se utiliza aquí, el concepto "en combinación", en el contexto de la administración de dos o más terapias a un recién nacido o niño tal como se define aquí, se refiere al uso de más de una terapia, preferiblemente dos terapias o incluso más. El uso del concepto "en combinación" no restringe el orden en el que las terapias son administradas al recién nacido o niño tal como se define aquí. Por ejemplo, una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) puede ser administrada en cualquier momento antes (por ejemplo 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), al mismo tiempo o después (por ejemplo 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia a un recién nacido o niño tal como se define aquí. En algunos aspectos, la o las terapias adicionales son terapias tumorales convencionales, cirugía, quimioterapias, inmunoterapias, terapias genéticas, tratamientos contra el dolor, medicaciones antipiréticas, terapias que alivian o ayudan a respirar, otras vacunas/inmunizaciones (activas o pasivas), terapias antivirales, terapias antibacterianas, terapias antifúngicas, terapias antiparasitarias, terapias antialérgicas, terapias tumorales convencionales, quimioterapias, o pueden incluir una profilaxis post-exposición a o para cualquiera de las enfermedades aquí citadas, preferentemente para la rabia, la infección viral RSV, etc.

En determinados aspectos, las terapias son administradas con una diferencia de menos de 5 minutos, con una diferencia de menos de 30 minutos, con una diferencia de 1 hora, con una diferencia de aproximadamente 1 hora, con una diferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas, con una diferencia de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, con una diferencia de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, con una diferencia de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, con una diferencia de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, con una diferencia de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, con una diferencia de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, con una diferencia de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, con una diferencia de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, con una diferencia de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, con una diferencia de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, con una diferencia de aproximadamente 12 horas a 18 horas, con una diferencia de 18 horas a 24 horas, con una diferencia de 24 horas a 36 horas, con una diferencia de 36 horas a 48 horas, con una diferencia de 48 horas a 52 horas, con una diferencia de 52 horas a 60 horas, con una diferencia de 60 horas a 72 horas, con una diferencia de 72 horas a 84 horas, con una diferencia de 84 horas a 96 horas, o con una diferencia de 96 horas a 120 horas. En aspectos específicos, dentro de la misma visita del paciente se administran dos o más terapias.

Ejemplos de dosis para ARNm que codifican al menos un antígeno tal como se define aquí pueden estar, de forma no limitativa, dentro del intervalo de aproximadamente 10 ng a 1 g, de 100 ng a 100 mg, de 1 µg a 10 µg, o de 30-300 µg de ARNm por paciente. Preferiblemente, la vacuna de la invención se formula correspondientemente para que comprenda una dosis, dos dosis, tres o incluso más dosis.

De acuerdo con un aspecto específico, la vacuna de la invención puede ser administrada a un recién nacido o niño en forma de una dosis individual. En determinados aspectos, la vacuna de la invención puede ser administrada a un recién nacido o niño en forma de una dosis individual seguida por una segunda dosis más adelante y opcionalmente después incluso una tercera, cuarta (o más) dosis, etc. De acuerdo con este aspecto, a un recién nacido o niño se le pueden administrar inoculaciones de refuerzo con la vacuna de la invención a intervalos de tiempo específicos, preferiblemente tal como se define más abajo, después de la segunda (o tercera, cuarta, etc.) inoculación. En determinados aspectos, estas inoculaciones de refuerzo con la vacuna de la invención pueden utilizar un compuesto o componente adicional tal como se define para la vacuna de la invención tal como se define aquí. En algunos aspectos, la administración de la misma vacuna de la invención y/o las administraciones de refuerzo se pueden repetir y dichas administraciones pueden estar separadas por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, por ejemplo de 1 a 5 días, de 1 a 10 días, de 5 a 15 días, de 10 a 20 días, de 15 a 25 días, de 20 a 30 días, de 25 a 35 días, de 30 a 50 días, de 40 a 60 días, de 50 a 70 días, de 1 a 75 días, o 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, o al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, 36 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 5 años, 10 años, 15 años, 20 años, 30 años, 40 años, 50 años, 60 años o incluso más. En determinados aspectos, la vacuna de la invención puede ser administrada a un sujeto como una dosis individual una vez al año.

En aspectos particulares, la vacuna de la invención puede ser administrada a un paciente recién nacido o niño en otoño o invierno, es decir, antes de la estación de la gripe o durante la misma en cada hemisferio. En un aspecto, a un recién nacido o niño se le administra su primera dosis en la estación, por ejemplo a finales de septiembre o principios de octubre, de modo que la segunda dosis (si es necesaria) puede ser administrada antes del pico de la estación de la gripe.

En aspectos particulares, la vacuna de la invención puede ser administrada al menos una vez, preferiblemente dos o más veces, a un recién nacido o niño antes de un tratamiento de una enfermedad tal como se define aquí, preferiblemente al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, por ejemplo de 1 a 5 días, de 1 a 10 días, de 5 a 15 días, de 10 a 20 días, de 15 a 25 días, de 20 a 30 días, de 25 a 35 días, de 30 a 50 días, de 40 a 60 días, de 50 a 70 días, de 1 a 75 días, o 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, o al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses antes de un tratamiento de una enfermedad tal como se define aquí. Una segunda dosis o dosis adicional puede ser administrada después directamente antes del tratamiento, al mismo tiempo o después del tratamiento.

Además, una enfermedad tal como se define de acuerdo con la presente invención se selecciona de entre enfermedades infecciosas, preferiblemente enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o por protozoos).

De acuerdo con un aspecto no reivindicado de la presente descripción, las enfermedades incluyen enfermedades cancerosas o tumorales seleccionadas preferiblemente entre melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas de riñón, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinomas de mama (= cáncer de mama), cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus, por ejemplo carcinomas inducidos por el virus del papiloma (por ejemplo carcinoma de cuello uterino = cáncer de cuello uterino), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus herpes (por ejemplo linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV), tumores inducidos por la hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neurinoma del acústico, carcinomas de pulmón (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas de pulmón de células pequeñas, cáncer de garganta, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma del recto, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebrales, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer de páncreas, cáncer de testículo, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, tumor de la pituitaria, micosis fungoides, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer de riñón, timoma, carcinoma del cuerpo uterino, cáncer de hueso, linfomas no Hodgkin, cáncer de uretra, síndrome de CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer vulvar, cáncer intestinal, carcinoma de colon, carcinoma esofágico (= cáncer esofágico), condiciones verrugosas, tumores del intestino delgado, craneofaringiomas, carcinoma de ovario, tumores genitales, cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma de páncreas (= cáncer de páncreas), carcinoma endometrial, metástasis de hígado, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumor palpebral, cáncer de próstata (= tumores de próstata) etc.

De acuerdo con un aspecto específico, las enfermedades tal como se definen aquí comprenden enfermedades infecciosas, preferiblemente enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o por protozoos). Estas enfermedades infecciosas, preferiblemente enfermedades infecciosas virales, bacterianas o por protozoos, se seleccionan normalmente entre enfermedades infecciosas virales tales como gripe, preferiblemente gripe A, gripe B, gripe C o thogotovirus, de forma especialmente preferible gripe A incluyendo por ejemplo los subtipos de hemaglutinina H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14 o H15, y/o los subtipos de neuraminidasa N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9, o preferiblemente los subtipos de la gripe A H1N1, H1N2, H2N2, H2N3, H3N1, H3N2, H3N3, H5N1, H5N2, H7N7 o H9N2, etc., o cualquier otra combinación, malaria, síndrome respiratorio agudo grave (SRAG), fiebre amarilla, SIDA, borreliosis de Lyme, leishmaniasis, ántrax, meningitis, condiloma acuminado, verrugas huecas, dengue, fiebre de los tres días, virus del Ébola, resfriado, meningoencefalitis de verano temprana (FSME), herpes, hepatitis, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, herpes zóster, virus herpes humano 8 (HHV-8; herpesvirus de Sarcoma de Kaposi (KSHV)); infección por virus de los papilomas humanos, encefalitis japonesa, enfermedades asociadas a arenavirus (infección por fiebre de Lassa), virus Marburg, sarampión, fiebre aftosa, mononucleosis infecciosa (fiebre glandular de Pfeiffer), paperas, infección por virus Norwalk, viruela, poliomielitis (cojera infantil), pseudocrup, eritema infeccioso (quinta enfermedad), rabia, verrugas, fiebre del Nilo occidental, varicela, citomegalovirus (CMV), enfermedades por infecciones bacterianas tales como aborto natural (inflamación de próstata), ántrax, apendicitis, borreliosis, botulismo, Campylobacter, Chlamydia trachomatis (inflamación de la uretra, conjuntivitis), cólera, difteria, donavanosis, epiglotitis, tifus, gangrena gaseosa, gonorrea, tularemia, Helicobacter pylori, tos ferina, bubón climático, osteomielitis, legionelosis, lepra, listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, ántrax, otitis media, Mycoplasma hominis, sepsis neonatal (corioamnionitis), noma, paratífus, peste, síndrome de Reiter, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, Salmonella paratyphus, Salmonella typhus, escarlatina, sífilis, tétanos, gonorrea, fiebre Tsutsugamushi, tuberculosis, tifus, vaginitis (colpitis), chancro blando, y enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoos u hongos, tales como amebiasis, bilharziosis, enfermedad de Chagas, Echinococcus, tenia de los peces, envenenamiento por peces (ciguatera), tenia vulpina, pie de atleta,

tenia canina, candidiasis, manchas por hongos de levadura, sarna, leishmaniasis cutánea, lamblisis (giardiasis), piojos, malaria, microscopía, oncocercosis (ceguera de los ríos), enfermedades fúngicas, tenia bovina, esquistosomiasis, tenia porcina, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), leishmaniasis visceral, dermatitis del área del pañal o tenia diminuta.

- 5 De acuerdo con otro aspecto no reivindicado, las enfermedades tal como se definen aquí comprenden enfermedades autoinmunes tal como se definen a continuación. Las enfermedades autoinmunes se pueden dividir en líneas generales en trastornos autoinmunes sistémicos y trastornos autoinmunes órgano-específicos o localizados, dependiendo de las principales características clínico-patológicas de cada enfermedad. Las enfermedades autoinmunes se pueden dividir en las categorías de síndromes sistémicos, incluyendo lupus
- 10 eritomatoso sistémico (SLE), síndrome de Sjögren, escleroderma, artritis reumatoidea y polimiositis o síndromes locales que pueden ser endocrinológicos (diabetes de tipo I (diabetes mellitus de tipo 1), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, etc.), dermatológicos (pénfigo vulgar), hematológicos (anemia hemolítica autoinmune), neurales (esclerosis múltiple), o pueden implicar prácticamente cualquier masa circunscrita de tejido corporal. Las enfermedades autoinmunes que se han de tratar se pueden seleccionar entre el grupo
- 15 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, por ejemplo esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes, diabetes de tipo 1 (diabetes mellitus de tipo 1), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades alérgicas de tipo I, enfermedades alérgicas de tipo II, enfermedades alérgicas de tipo III, enfermedades alérgicas de tipo IV,
- 20 fibromialgia, caída del cabello, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, Myasthenia gravis, neurodermitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (PSS), síndrome de Reiter, artritis reumática, psoriasis, vasculitis, etc., o diabetes de tipo II. Si bien hasta ahora no se ha aclarado el modo exacto en el que el sistema inmunológico induce una reacción alérgica contra antígenos, existen diversos descubrimientos con respecto la etiología. Por consiguiente, la autorreacción se puede deber a una derivación de células T. Un sistema inmunológico normal requiere la activación de células B por células T antes de que las primeras puedan producir anticuerpos en grandes cantidades. Esta necesidad de una célula T puede ser evitada en casos raros, como infección por organismos que producen superantígenos que son capaces de iniciar la activación policlonal de células B, o incluso de células T, mediante unión directa con la subunidad β de receptores de células T de un modo no específico. Otra explicación deduce enfermedades autoinmunes de
- 30 un "Mimetismo Molecular": un antígeno exógeno puede compartir similitudes estructurales con determinados antígenos huésped; por tanto, cualquier anticuerpo producido contra este antígeno (que imita los autoantígenos) también puede, en teoría, unirse a los antígenos huésped y amplificar la respuesta inmunitaria. Las enfermedades autoinmunes basadas en mimetismo molecular son conocidas del experto en diversos antígenos virales y bacterianos. La forma más sorprendente de mimetismo molecular se observa en estreptococos beta-hemolíticos del Grupo A, que comparten antígenos con el miocardio humano, y son responsables de las manifestaciones cardíacas de fiebre reumática.
- 35

- Adicionalmente, de acuerdo con otro aspecto no reivindicado, las enfermedades tal como se definen aquí comprenden alergias o enfermedades alérgicas, es decir, enfermedades relacionadas con alergias. La alergia es un estado que normalmente implica una hipersensibilidad inmunológica adquirida anómala a determinados
- 40 antígenos o alérgenos extraños, tales como los antígenos alérgicos tal como se definen aquí. Estos antígenos alérgicos o alérgenos se pueden seleccionar entre antígenos alérgicos tal como se definen aquí, antígenos derivados de diferentes fuentes, por ejemplo de animales, plantas, hongos, bacterias, etc. En este contexto, los alérgenos incluyen, por ejemplo, caspa, hierbas, pólenes, mohos, fármacos o numerosos desencadenantes medioambientales, etc. Las alergias normalmente conducen a una respuesta inflamatoria local o sistémica a estos antígenos o alérgenos y conducen a inmunidad en el cuerpo contra dichos alérgenos. Sin ánimo de apoyar ninguna teoría, se supone que en el desarrollo de alergias intervienen varios mecanismos patológicos diferentes. De acuerdo con un esquema de clasificación de P. Gell y R. Coombs, la palabra "alergia" se restringió a hipersensibilidades de tipo I, que están causadas por el mecanismo de IgE clásico. La hipersensibilidad de tipo I se caracteriza por una activación excesiva de mastocitos y basófilos por IgE, que resulta en una respuesta inflamatoria sistémica que puede resultar en síntomas tan benignos como hidrorrea nasal, choque anafiláctico con peligro para la vida, y muerte. Algunos tipos de alergias bien conocidas incluyen, de forma no limitativa, asma, asma alérgica (que conduce a un hinchamiento de la mucosa nasal), conjuntivitis alérgica (que conduce a enrojecimiento y picor en la conjuntiva), rinitis alérgica ("fiebre del heno"), anafilaxis, angioedema, atopia, dermatitis atópica (eccema), urticaria, eosinofilia, respiratoria, alergias a picaduras de
- 55 insectos, alergias de la piel (que incluyen y conducen a diversas erupciones, tales como eccema, urticaria y dermatitis (de contacto)), alergias alimentarias, alergias a medicina, etc. El tratamiento de estas enfermedades o trastornos alérgicos puede tener lugar preferiblemente desensibilizando la reacción inmunitaria que desencadena una repuesta inmunitaria específica. Dicha desensibilización se puede llevar a cabo administrando una cantidad eficaz del alérgeno o antígeno alérgico codificado por el ácido nucleico tal como se define aquí, preferiblemente, cuando se formula como una composición farmacéutica, para inducir una ligera
- 60 reacción inmunitaria. La cantidad del alérgeno o antígeno alérgico se puede aumentar después paso a paso en administraciones posteriores hasta que el sistema inmunitario del paciente a tratar tolere una cantidad específica de alérgeno o antígeno alérgico.

Las enfermedades en el contexto de la presente descripción también pueden incluir reacciones de hipersensibilidad de tipo II (citotóxicas, dependientes de anticuerpo), incluyendo por ejemplo anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia, eritroblastosis fetal, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, miastenia gravis, etc.; reacciones de hipersensibilidad de tipo III (enfermedad por complejos inmunes), incluyendo, por ejemplo, enfermedad del suero, reacción de Arthus, lupus eritmatoso sistémico (SLE), etc.; reacciones de hipersensibilidad de tipo IV (hipersensibilidad retardada (DTH), respuesta de memoria inmunitaria mediada por células, independiente de anticuerpos), incluyendo, por ejemplo, dermatitis de contacto, test de Mantoux, rechazo de trasplante crónico, esclerosis múltiple, etc.; y reacciones de hipersensibilidad de tipo V (enfermedad autoinmune mediada por receptores), incluyendo, por ejemplo, enfermedad de Graves, miastenia gravis, etc.

En otra realización preferente, la vacuna de la invención se puede formular como un *kit*, preferiblemente como un *kit* de partes. Por consiguiente, la presente descripción también proporciona *kits*, en particular *kits* de partes, que comprenden los componentes de la vacuna de la invención solos o en combinación con otros ingredientes tal como se definen más arriba, y opcionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y la posología de la vacuna de la invención. Los componentes de la vacuna de la invención, solos o en combinación con otros ingredientes tal como se definen más arriba, pueden estar contenidos en el *kit* en cualquiera de las partes del *kit* o en partes diferentes del *kit*, por ejemplo cada uno del o de los ARNm que codifica al menos un antígeno tal como se define más arriba en una parte del *kit*, y preferiblemente otros componentes mezclados con cada uno del o de los ARNm que codifican al menos un antígeno o por separado en otra parte del *kit*. Dichos *kits*, preferiblemente *kits* de partes, se pueden aplicar, por ejemplo, para cualquiera de los usos o aplicaciones arriba mencionados.

Figuras:

Figura 1 A: muestra la evolución del peso del ratón del experimento. Como resultado, un ratón recién nacido vacunado con ARNm que codifica PR8 H1 Hemaglutinina tenía una supervivencia significativamente mejor (todos los ratones sobrevivieron) contra la infección desafío de gripe que con un ARNm control (todos los ratones murieron 5 días después de la vacunación con un ARNm codificador de ovoalbúmina de pollo cuando se vacunaron con el ARN de control el primer día con 8 semanas y murieron aproximadamente 6 días después de la vacunación con una ARNm de control cuando se vacunaron con 8 semanas). Lo más sorprendente, la tasa de supervivencia era comparable a la de ratones adultos.

Figuras 1 B, C: muestran la secuencia de codificación de los ARNm utilizados para la vacunación de ratones recién nacidos y de 8 semanas de edad (véase la Figura 1A) que codifican PR8 H1 HA (hemaglutinina del virus de la gripe A/Puerto Rico/8/1934) (SEQ ID N°: 384) (Figura 1B) u ovoalbúmina de *Gallus gallus* como control (ARNm de control) (SEQ ID N°: 385) (Figura 1C).

Ejemplos

35 Ejemplo 1 - Preparación de constructos de ARNm

Para los presentes ejemplos se prepararon secuencias de ADN codificadoras de PR8 H1 HA (hemaglutinina de A/Puerto Rico/8/1934) (SEQ ID NO: 384), y ovoalbúmina de *Gallus gallus*, respectivamente, como control (ARNm de control) (SEQ ID NO: 385), y se utilizaron para reacciones posteriores de transcripción *in vitro*.

De acuerdo con una primera preparación, la secuencia de ADN denominada PR8 H1 HA (hemaglutinina de A/Puerto Rico/8/1934) (SEQ ID NO: 384) (véase la Figura 1 C) se preparó modificando la secuencia de ADN codificadora de hemaglutinina de tipo silvestre introduciendo una secuencia optimizada de GC para un mejor uso y estabilización de codones. En la SEQ ID NO: 384 (véase la Figura 1 C) se muestra la secuencia del ARNm correspondiente. La secuencia se introdujo además en un vector pCV19 y se modificó para incluir secuencias estabilizadoras derivadas de alfa-globina-3'-UTR (muag (alfa-globina-3'-UTR mutada)), un tramo de 70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-A) y un tramo de 30 x citosina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-C). La secuencia del constructo de ADN final se denominó "PR8 H1 HA".

De acuerdo con una segunda preparación, la secuencia de ADN denominada ovoalbúmina de *Gallus gallus*, respectivamente, como control (ARNm de control) (SEQ ID NO: 385) (véase la Figura 1 D) se preparó modificando la secuencia de ADN codificadora de ovoalbúmina de *Gallus gallus* de tipo silvestre introduciendo una secuencia optimizada de GC para un mejor uso y estabilización de codones. En la SEQ ID NO: 385 (véase la Figura 1 D) se muestra la secuencia del ARNm correspondiente. La secuencia se introdujo además en un vector pCV19 y se modificó para comprender secuencias estabilizadoras derivadas de alfa-globina-3'-UTR (muag (alfa-globina-3'-UTR mutada)), un tramo de 70 x adenosina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-A) y un tramo de 30 x citosina en el extremo 3'-terminal (cola de poli-C). La secuencia del constructo de ADN final se denominó "ovoalbúmina de *Gallus gallus*".

En otra etapa, los plásmidos de ADN respectivos arriba preparados se transcribieron en ARNm *in vitro* utilizando T7-polimerasa. A continuación, el ARNm obtenido se purificó utilizando Pure-Messenger® (CureVac, Tübingen, Alemania).

5 Todos los ARNm obtenidos aquí utilizados se complejaron además con protamina antes de su uso. La complejación de ARN consistía en una mezcla de un 50% de ARNm libre y un 50% de ARNm complejado con protamina en una relación en peso 2:1. En primer lugar, el ARNm se complejó con protamina mediante adición lenta de protamina-solución de lactato de Ringer a ARNm. En cuanto se generaron establemente los complejos, se añadió ARNm libre, la mezcla se agitó brevemente y la concentración final de la vacuna se ajustó con solución de lactato de Ringer.

Ejemplo 2 - Vacunación de ratones recién nacidos o de 8 semanas de edad

10 En este experimento, ratones recién nacidos o de 8 semanas de edad fueron vacunados dos veces vía intradérmica con 80 pg de ARNm codificador de PR8 H1 HA (hemaglutinina de A/Puerto Rico/8/1934; Figura 1 B) o con ARNm codificador de ovoalbúmina de Gallus gallus como control (ARNm de control; Figura 1 C). La primer inyección se realizó el primer día de vida (24 horas) y con 8 semanas respectivamente. Cinco semanas después de la última vacunación, los ratones fueron retados con una dosis letal 10 veces mayor de virus PR8 (10 LD₅₀). El peso de los ratones se controló a lo largo de 2 semanas y los ratones fueron sacrificados cuando habían perdido más de un 25% de su peso original. Los resultados se muestran en la Figura 1 A. La Figura 1A muestra la evolución del peso de los ratones en el experimento. Como resultado, los ratones vacunados con ARNm codificador de hemaglutinina PR8 H1 presentaban una supervivencia considerablemente mejor (todos los ratones sobrevivieron) frente a la infección reto con gripe únicamente con el ARNm de control (todos los ratones del control murieron aproximadamente 5 días después de la vacunación con el ARNm de control codificador de ovoalbúmina de pollo, cuando se vacunaron con el control de ARNm en primer día y murieron aproximadamente 6 días después de la vacunación con ARNm de control cuando se vacunaron con 8 semanas). Todos los ratones recién nacidos vacunados sobrevivieron al reto con el antígeno PR8H1 Hemaglutinina, por contraste con el control.

Reivindicaciones

1. Vacuna que comprende al menos un ARNm codificador de al menos un antígeno para su uso en la profilaxis de una enfermedad infecciosa en un recién nacido y/o niño, con una edad no superior a años, donde
 - 5 – el tratamiento comprende la vacunación del recién nacido o niño y la provocación de una respuesta inmunitaria en dicho recién nacido o niño;
 - el contenido de G/C de la región codificadora de o de los ARNm se incrementa en al menos un 15% en comparación con el contenido de G/C la región codificadora de la secuencia codificadora de tipo silvestre respectiva; y
 - 10 – el o los ARNm se complejan con un compuesto policatiónico.
2. Vacuna para su uso en la profilaxis de una enfermedad infecciosa de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la provocación de una respuesta inmunitaria en un paciente comprende la provocación de una respuesta inmunitaria de Th1.
3. Vacuna para su uso en la profilaxis de una enfermedad infecciosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque el recién nacido o niño es varón o hembra, un mamífero, un humano y/o tiene una edad no superior a 2 años, no superior a 1,5 años, no superior a 1 año (12 meses), no superior a 9 meses, 6 meses o 3 meses.
4. Vacuna para su uso en la profilaxis de una enfermedad infecciosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la enfermedad infecciosa se selecciona de entre enfermedades infecciosas virales, enfermedades infecciosas bacterianas o enfermedades infecciosas por protozoos.
5. Vacuna para su uso en la profilaxis de una enfermedad infecciosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el antígeno se selecciona de entre antígenos de proteína y de péptido, antígenos patógenos, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y antígenos de animales.
6. Vacuna su uso utilizarla en la profilaxis de una enfermedad infecciosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la vacuna se formula para incluir
 - a) un componente adyuvante que comprende o consiste en al menos un ARNm complejo con un compuesto policatiónico; y
 - 30 b) al menos un ARNm libre que codifica un antígeno.

Cinética de peso de ratones infectados por PR8

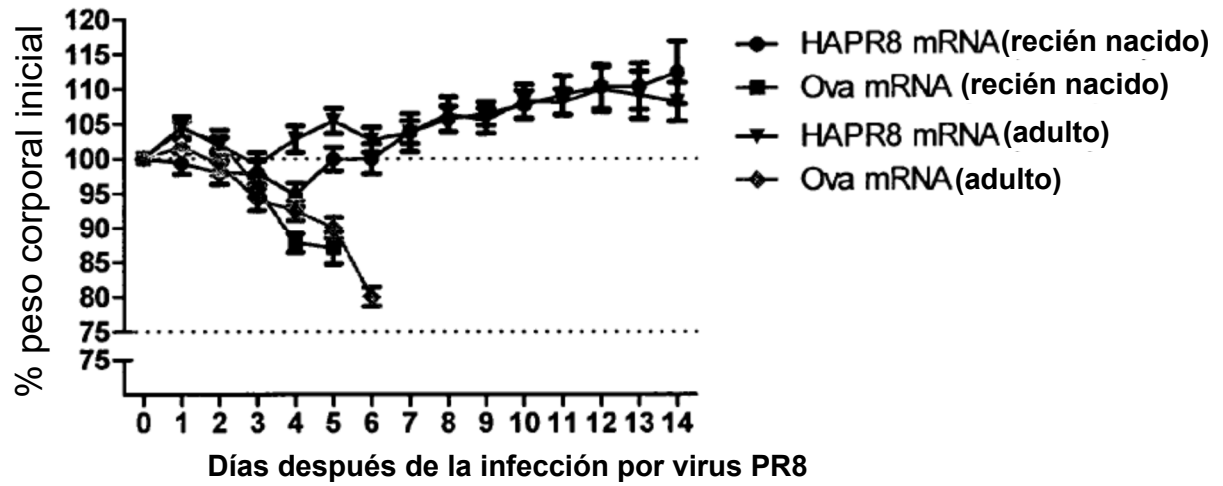


Figura 1A

ARNm PR8 H1

AUGAAGGCCAACCUGCUCGUGCUGCUGUGCGCCUCGCGGGCCGCCGACGCCGA
 CACCAUCUGCAUCGGCUACCACGCCAACACAGCACCGACACGGUCGACACCG
 UGCUGGAGAAGAACGUGACCGUCACCCACUCCGUGAACCUGCUCGAGGACAGC
 CACAACGGGAAGCUGUGCCGGCUGAAGGGCAUCGCGCCCCUCCAGCUGGGGAA
 GUGCAACAUCGCCGGCUGGCUGCUCGGGAACCCGGAGUGCGACCCCCUGCUGC
 CCGUGCGCUCCUGGAGCUACAUCGUCGAGACGCCAACUCCGAGAACGGCAUC
 UGCUACCCGGGGCGACUUAUCGACUACGAGGAGCUCCGGGAGCAGCUGAGCUC
 CGUGAGCUCCUUCGAGCGCUUCGAGAUCUUCCTCAAGGAGAGCUCCUGGCCCA
 ACCACAACACCAACGGGGUGACCGCCGCCUGCAGCCACGAGGGCAAGUCCAGC
 UUCUACCGGAACCUGCUCUGGCUGACCGAGAAGGAGGGGUCCUACCTCAAGCU
 GAAGAACAGCUACGUAACAAGAAGGGCAAGGAGGUGCUCGUGCUGUGGGGGA
 UCCACCACCCGCCAACUCCAAGGAGCAGCAGAACCUGUACCAGAACGAGAAC
 GCGUACGUCAGCGUGGUGACGUCCAACUACAACCGCCGGUUCACCTCCGAGAU
 CGCCGAGCGCCCCAAGGUCCGGGACCAGGCCGGCCGCAUGAACUACUACUGGA
 CCCUCCUGAAGCCGGGCGACACCAUCAUCUUCGAGGCCAACGGGAACCUGAUC
 GCCCCGAUGUACGCGUUCGCCUCAGCCGGGGCUUCGGGAGCGGCAUCAUCAC
 GUCCAACGCCAGCAUGCACGAGUGCAACACCAAGUGCCAGACCTCCUGGGCG
 CCAUCAACUCCAGCCUGCCCUACCAGAACAUCACCTCCGGUGACCAUCGGGGAG
 UGCCCCAAGUACGUGCGCUCCGCCAAGCUCCGGAUGGUCACGGGGCCUGCGCAA
 CAACCCAGCAUCCAGUCCCGGGGGCUGUUCGGCGCGAUCGCCGGGUUCAUCG
 AGGGCGGCUGGACCGGGAUGAUCGACGGCUGGUACGGGUACCACCACCAGAAC
 GAGCAGGGCAGCGGGUACGCCGCCGACCAGAAGUCCACCCAGAACGCCAUCAA
 CGGCAUCACCAACAAGGUGAACACGGUGAUCGAGAAGAUGAACAUCCAGUUA
 CCGCGGUCGGCAAGGAGUUAACAAGCUCGAGAAGCGCAUGGAGAACCUGAAC
 AAGAAGGUGGACGACGGGUUCCUGGACAUCUGGACCUACAACGCCGAGCUCCU
 GGUGCUGCUCGAGAACGAGCGGACCCUGGACUCCACGACAGCAACGUCAAGA
 ACCUGUACGAGAAGGUGAAGUCCAGCUCAAGAACAACGCCAAGGAGAUCCGC
 AACGGGUGCUUCGAGUUCUACCACAAGUGCGACAACGAGUGCAUGGAGAGCGU
 CCGCAACGGCACGUACGACUACCTCAAGUACUCCGAGGAGAGCAAGCUGAACC
 GGGAGAAGGUGGACGGGGUGAAGCUGGAGUCCAUGGGCAUCUACCAGAUCUC
 GCAUCUACAGCACCGUCGCCUCCAGCCUGGUGCUGCUGGUGUCCUCCGGCGC
 GAUCAGCUUCUGGAUGUGCAGCAACGGGUCCUGCAGUGCCGCAUCUGCAUCU
 GA

Elementos en 3'UTR de ARNm: alfa globina 3'UTR, poli A, poli C
 Vector utilizado: pCV19

Figura 1 B

ARNm ovoalbúmina (control)

AUGGGCAGCAUCGGGGCCGCGUCGAUGGAGUUCUGCUUCGACGUGUUCAAGGA
GCUGAAGGUCCACCACGCCAACGAGAACUUCUACUGCCCGAUCGCCAUC
UGAGCGCGCUCGCCAUGGUGUACCUGGGCGCCAAGGACAGCACCCGGACGCAG
AUCAACAAGGUGGUCCGCUUCGACAAGCUGCCCGGCUUCGGGGACUCGAUCGA
GGCGCAGUGCGGCACCAGCGUGAACGUGCACAGCUCGCUCCGGGACAUCUGA
ACCAGAUCAACCAAGCCGAACGACGUCUACAGCUUCAGCCUGGCCUCGCGGCUC
UACGCCGAGGAGCGCUACCCGAUCCUGCCCGAGUACCUGCAGUGCGUGAAGGA
GCUCUACCGGGGCGGGCUGGAGCCGAUCAACUUCAGACGGCGGGCCGACCAGG
CCCGGGAGCUGAUCAACAGCUGGGUGGAGAGCCAGACCAACGGCAUCAUCCGC
AACGUCCUCCAGCCGUCGAGCGUGGACAGCCAGACCGCGAUGGUGCUGGUCAA
CGCCAUCGUGUUCAAGGGCCUGUGGGAGAAGACGUUCAAGGACGAGGACACCC
AGGCCAUGCCCUUCCGGGUGACCAGCAGGAGUCGAAGCCGGUCCAGAUGAUG
UACCAGAUCCGGGCUUUCGGGUGGCGAGCAUGGCCAGCGAGAAGAUGAAGAU
CCUGGAGCUGCCGUUCGCCUCGGGCACGAUGAGCAUGCUCGUGCUGCUGCCCG
ACGAGGUCAGCGGCCUCGAGCAGCUGGAGUCGAUCAUCAACUUCGAGAAGCUG
ACCGAGUGGACCAGCAGCAACGUGAUGGAGGAGCGCAAGAUCAAGGUGUACCU
CCCGCGGAUGAAGAUGGAGGAGAAGUACAACCUAGACGUCGGUCCUGAUGGCGA
UGGGGAUCACCGACGUGUUCAGCAGCUCGGCCAACCUCAGCGGCAUCAGCUCG
GCCGAGAGCCUGAAGAUCAAGCCAGGCGGUGCACGCCGCCACGCGGAGAUCAA
CGAGGCCGGCCGGGAGGUCGUGGGGUCGGCCGAGGCGGGCGUGGACGCCGCCA
GCGUCAGCGAGGAGUUCGCGCGGACCACCGUCCUGUUCUGCAUCAAGCAC
AUCGCCACCAACGCCGUGCUCUUCUUCGGCCGGUGCGUGUCGCCCUGA

Elementos en 3'UTR de ARNm: alfa globina 3'UTR, poli A, poli C

Vector utilizado: pCV19

Figura 1 C