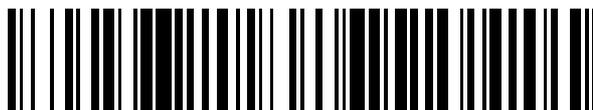


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 380**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2014 PCT/EP2014/074349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2014 E 14799996 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 3068888**

54 Título: **Vector de transcripción de ARN y sus usos**

30 Prioridad:

**12.11.2013 EP 13192555**

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

**04.05.2018**

73 Titular/es:

**VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (100.0%)  
Pleinlaan 2  
1050 Brussel, BE**

72 Inventor/es:

**HEIRMAN, CARLO y  
THIELEMANS, KRISTIAAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 666 380 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

Vector de transcripción de ARN y sus usos

## 5 Campo de la invención

La presente invención en general se refiere a un vector de transcripción de ARN mejorado, que es muy adecuado para la producción de ARNm con fines terapéuticos in vivo. Las mejoras en el vector en particular residen en la presencia de un potenciador de la traducción y un elemento de retención nuclear.

10

## Antecedentes de la invención

Aunque nuestro sistema inmune es capaz de discriminar células sanas de células tumorales y agentes infecciosos, algunas veces falla reconociendo y reaccionando apropiadamente al problema. Por lo tanto, la ciencia médica se ha centrado en el desarrollo de varias estrategias que ayudan al sistema inmune en la vigilancia y eliminación de células tumorales y agentes infecciosos. Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno (APC) que se conocen como jugadores clave en la instigación de respuestas inmunes y se han puesto muchos esfuerzos en el aprovechamiento de las DC en inmunoterapia. En el caso del cáncer, por ejemplo, el objetivo es la inducción y la perpetuación de una respuesta inmune específica para el tumor al provocar células T efectoras que pueden disminuir específicamente la carga tumoral e inducir la memoria inmunológica para controlar la recaída tumoral. Una vez que se han identificado los antígenos identificables asociados a tumores (TAA), se pueden usar para cargar las APC profesionales, es decir, las células dendríticas, ya sea in vivo o ex vivo.

Se han evaluado diferentes formatos de antígeno con respecto a DC para inmunoterapia in vivo o ex vivo, tales como péptidos, proteínas, extractos de células tumorales completas, ADN o ARNm de plásmido. Entre estos enfoques, el ARNm que codifica antígeno está emergiendo como particularmente prometedor. La ventaja sobre la vacunación clásica con péptidos es que el ARNm codifica la información genética para el antígeno completo. El antígeno de longitud completa se procesa y todos los epítomos disponibles se presentan en las moléculas del MHC del paciente, sin la necesidad de determinar los péptidos específicos de HLA. No es necesario excluir a ningún paciente del tratamiento porque los péptidos disponibles no coinciden con su tipo de HLA. Además, el ARNm no presenta el riesgo de una integración genómica que le otorgue un perfil de seguridad favorable en comparación con el ADN o los vectores virales. Debido a su naturaleza transitoria, el ARNm solo se expresa durante un corto período de tiempo y finalmente se degrada en productos naturales. Además, el ARNm actúa como su propio adyuvante, lo que provoca señales coestimuladoras, que es ventajoso en el contexto de la inmunoterapia basada en ARNm. Se han aplicado dos rutas para la administración exógena de ARNm en las DC: o bien ex vivo con la posterior transferencia adoptiva de las DC transfectadas o mediante la administración directa de ARNm y la absorción in vivo.

Un estudio realizado por Diken et al., (2011) destaca que el estímulo de maduración y/o el momento de su administración deben seleccionarse cuidadosamente, ya que la absorción de ARNm depende de la macropinocitosis, una función de las DC inmaduras que se pierde con la maduración de las DC. En consecuencia, la coparticipación de estímulos de maduración clásicos, tales como lipopolisacáridos (LPS), con ARNm de TAA tiene un impacto negativo en la biodisponibilidad del antígeno, un parámetro que determina conjuntamente la inducción de respuestas de células T específicas de antígeno (Van Lint 2012; Diken 2011). Hasta la fecha, se han explorado dos estrategias diferentes para cargar simultáneamente las DC con ARNm de TAA y activarlas in vivo.

Fotin-Mleczek et al., (2011) describieron un sistema de dos componentes que contiene ARNm libre y complejo con protamina, proporcionando una fuente de antígeno para la inmunidad adaptativa junto con un desencadenamiento mejorado del receptor de reconocimiento de patógenos, TLR7. Esta estrategia de inmunización resultó en la inducción de una fuerte respuesta inmune antitumoral y en respuestas de memoria sostenidas, lo cual es importante, ya que las células T de memoria deberían evitar la reaparición del tumor.

Bonehill et al., 2008 evaluaron el uso de combinaciones específicas de ARNm para fines adyuvantes, inicialmente para la activación de DC generadas ex vivo, pero igualmente aplicables para administración directa y absorción in vivo (Bonehill, 2008). Esto ha conducido a una solicitud de patente (WO2009034172) en la que los inventores divulgan que la capacidad estimuladora de células T de células presentadoras de antígenos pulsadas por péptido antigénico o células presentadoras de antígeno electroporadas (conjuntamente) con un ARNm que codifica un TAA puede mejorarse enormemente proporcionándoles diferentes adyuvantes moleculares a través de la electroporación con una mezcla de moléculas de ARNm o ADN que codifican dos o más factores inmunoestimuladores. Se proporciona una prueba de concepto de que tales células presentadoras de antígeno modificadas pulsadas con un péptido específico del objetivo o electroporadas conjuntamente con ARNm que codifica un antígeno específico del objetivo pueden estimular células T específicas del antígeno tanto in vitro como después de la vacunación y así formar un nuevo enfoque prometedor para la inmunoterapia antitumoral, antiviral, antibacteriana o antifúngica. Una combinación preferida de factores inmunoestimuladores usados en la invención es CD40L y caTLR4, o CD40L y CD70. En otras realizaciones preferidas, se usa la combinación de moléculas inmunoestimulantes CD40L, CD70 y caTLR4, que se denomina "TriMix" en lo sucesivo.

65

La presente invención se refiere a un vector de transcripción de ARN que contiene una secuencia potenciadora de la traducción 5' y una secuencia de retención nuclear 3'. El vector de acuerdo con la presente invención muestra una mejora inesperada en la expresión de las proteínas codificadas por el ARNm transcrito in vitro en comparación con un vector pUC vacío, o con vectores que contienen un potenciador de la traducción o una secuencia de retención nuclear. Estas mejoras se deben en particular a la presencia simultánea de los dos componentes: un potenciador de la traducción y una secuencia estabilizadora de ARN en el vector, y la incorporación de los mismos en el producto de expresión así obtenido. Además, la aplicación in vivo del ARNm de TriMix obtenido a partir del vector de la presente invención en un modelo de cáncer de ratón da como resultado un crecimiento más lento de tumores y un aumento de la esperanza de vida de dichos ratones.

Conrad et al., publicó en 2005 el primer artículo relacionado con ENE al describirlo como un elemento de ARN del virus del sarcoma de Kaposi que produjo una mayor abundancia nuclear de transcripciones sin intrón (Conrad, 2005). Las construcciones divulgadas en esta publicación tienen una señal de retención nuclear (ENE), un potenciador de la traducción (poli-A) y una secuencia que puede transcribirse (beta-globina).

Kazimierz et al., 2012 divulga elementos similares al ENE del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) en otros virus. Los elementos similares a ENE divulgados aumentaron la acumulación de un transcrito poliadenilado sin intrón en células humanas. Algunos de estos elementos de ENE aumentaron la estabilidad de los ARN transcritos.

Pawlicki et al., 2008 divulga la retención del transcrito de micro ARN primario (miARN-pri) en los sitios de transcripción que conduce a la producción mejorada de microARN. Algunos de los miARN-pri se clonaron en un vector, que comprendía, al menos, una secuencia transcribible, ENE y una señal de poliadenilación.

Massimelli et al., 2011 divulga que la estabilidad de un ARN no codificante largo depende de un elemento central de 9 nt en el extremo 5' del ARN para interactuar con el ORF57 viral del virus del herpes asociado con el sarcoma de Kaposi (KSHV) y el PABPC1 celular. Divulga construcciones que comprenden un promotor del CMV, el elemento MRE, luciferasa y un elemento de expresión y retención nuclear (ENE).

Jaleco et al., 1999 divulga un vector, LZRS IRES-GFP, que comprende un polienlazador secuencia arriba de la secuencia IRES para insertar los diferentes genes de interés y el marcador de selección GFP secuencia abajo de la secuencia IRES. El vector LZRS contiene un gen de resistencia a puomicina y la secuencia de retención nuclear EBNA-1 fuera de las LTR. Un IRES se considera un potenciador de la traducción.

El documento JP2007295846 divulga un método para producir de forma eficiente proteínas recombinantes usando un sitio interno de unión al ribosoma (IRES) derivado de ARNm que codifica la proteína homeodominio Gtx.

El documento US2004043468 divulga reactivos y composiciones para modular el nivel de traducción de un polipéptido, y más específicamente a la secuencia de nucleótidos del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) sintético a los métodos de identificación de IRES sintético.

El documento WO0155369 divulga elementos reguladores de la traducción sintéticos y aislados que incluyen oligonucleótidos que tienen actividad potenciadora de la traducción, actividad del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o actividad inhibidora de la traducción.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia potenciadora de la traducción (TE) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico transcribible y una secuencia de retención nuclear representada por la SEQ ID NO: 4.

En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico transcribible se selecciona del listado que comprende ARNm que codifica CD40L, CD70, caTLR4 o ARNm específico del antígeno/enfermedad.

En una realización preferida, el potenciador de la traducción está representado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2 o 3, más en particular la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para aumentar la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN transcrito in vitro; dicho método comprende las etapas de:

(i) proporcionar un vector de acuerdo con esta invención, en el que dicha secuencia de ácido nucleico transcribible es una secuencia de ADN transcribible, que corresponde a dicho ARN a transcribir; y  
(ii) transcribir in vitro la secuencia de ADN transcribible;

En aún otra realización, la presente invención proporciona una molécula de ARN que comprende un potenciador de la traducción (TE) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, una secuencia de

ácido nucleico transcribible y una secuencia de retención nuclear representada por la SEQ ID NO: 4.  
Dicha molécula de ARN puede comprender además una cola de poli-A.

5 En el contexto de las moléculas de ARN de la presente invención, dicha secuencia de ácido nucleico traducible se puede seleccionar del listado que comprende ARNm que codifica CD40L, CD70, caTLR4 o ARNm específico del antígeno/enfermedad.

10 En una realización preferida de las moléculas de ARN, el potenciador de la traducción está representado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2 o 3; más en particular la SEQ ID NO: 1.

15 La presente invención proporciona además una composición que comprende una o más moléculas de ARN de acuerdo con esta invención; más en particular, dichas una o más moléculas de ARN representan moléculas de ARNm que codifican CD40L, CD70 y caTLR4.

20 La composición de acuerdo con la presente invención, puede comprender además ARNm que codifica ARNm específico del antígeno/enfermedad.

25 La presente invención proporciona además el uso de la molécula o moléculas de ARN y/o la composición o composiciones que comprenden una o más de dichas moléculas de ARN para múltiples propósitos, tales como por ejemplo para la introducción in vivo o in vitro en una célula huésped in vitro o para su uso como un medicamento. También es un aspecto de la presente invención proporcionar un kit que comprende uno o más vectores; una o más moléculas de ARN; o una composición de acuerdo con la presente invención.

30 La presente divulgación también se refiere a los productos de la invención para uso en un método para tratar a un paciente que lo necesita con una o más moléculas de ARN o una composición de acuerdo con la presente invención; en donde dichas moléculas de ARN pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente con intervalos.

35 Las moléculas de ARN o las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un paciente que lo necesite por cualquier vía de administración adecuada tal como, por ejemplo, intranodal, intradérmica, intralinfática e intratumoral. Además, cuando se tratan, por ejemplo, pacientes con cáncer, la administración de las moléculas o composiciones de ARN de acuerdo con la presente invención se puede usar en combinación con la liberación del ARNm tumoral del tumor en el paciente, tal como, por ejemplo, ablación o sonoporación.

40 Declaraciones numeradas de la invención

1. Un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia potenciadora de la traducción (TE) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico transcribible y una secuencia de retención nuclear representada por la SEQ ID NO: 4.

2. El vector de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico transcribible se selecciona del listado que comprende ARNm que codifica CD40L, CD70, caTLR4 o ARNm específico del antígeno/enfermedad.

3. El vector de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicho potenciador de la traducción está representado por cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2 o 3; más en particular la SEQ ID NO: 1.

4. Un método para aumentar la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN transcrito in vitro; dicho método comprende las etapas de:

(i) proporcionar un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha secuencia de ácido nucleico transcribible es una secuencia de ADN transcribible, que corresponde a dicho ARN a transcribir; y  
(ii) transcribir in vitro dicha secuencia de ADN transcribible.

5. Una molécula de ARN que comprende un potenciador de la traducción (TE) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico transcribible y una secuencia de retención nuclear representada por la SEQ ID NO: 4.

6. Una molécula de ARN de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende adicionalmente una cola de poli-A.

7. Una molécula de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en la que dicha secuencia de ácido nucleico transcribible se selecciona del listado que comprende ARNm que codifica CD40L, CD70, caTLR4 o ARNm específico del antígeno/enfermedad.

8. Una molécula de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que dicho potenciador de

la traducción está representado por la SEQ ID NO: 1.

9. Una composición que comprende una o más moléculas de ARN como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 5-8.

10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dichas una o más moléculas de ARN representan moléculas de ARNm que codifican CD40L, CD70 y caTLR4.

11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende adicionalmente ARNm que codifica ARNm específico del antígeno/enfermedad.

12. El uso de una molécula de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para la introducción en una célula huésped in vitro.

13. Una molécula de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para uso como un medicamento.

14. Un kit que comprende uno o más vectores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3; una o más moléculas de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8; o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11.

Breve descripción de los dibujos

Con referencia específica ahora a las figuras, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las diferentes realizaciones de la presente invención solamente. Se presentan con la finalidad de proporcionar lo que se cree que es la divulgación más útil y fácil de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intenta mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle que el necesario para una comprensión fundamental de la invención. La divulgación tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica cómo las diversas formas de la invención pueden incorporarse en la práctica.

Fig. 1: Las iDC se electroporaron con ARNm TriMix codificado por el vector pUC, el vector pUC-TE, el vector pUC-ENE o el vector pUC TE ENE. Se muestran los valores de MFI (intensidad de fluorescencia media) de la población de DC positiva. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. (Prueba t pareada, \* P <0,05). N pUC = 6; N pUC-TE = 15; N pUC-ENE = 15; N pUC TE ENE = 19.

Fig. 2: Expresión de WT1 en las DC electroporadas con ARNm de WT1. Las iDC se electroporaron con ARNm de WT1 codificado por los diferentes vectores y se analizaron para determinar su expresión de WT1 mediante tinción intracelular 4 h, 24 h y 48 h después de la electroporación. Se muestra una comparación de los valores de MFI después de la electroporación de las iDC con los diferentes vectores que codifican WT1. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. (Prueba t pareada, \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001). N = 6.

Fig. 3: Cinética de expresión de eGFP de las DC. Las iDC se electroporaron conjuntamente con eGFP y ARNm TriMix codificado por el vector pUC o el vector pUC TE ENE. La expresión de eGFP se analizó en varios momentos después de la electroporación. Se analizó el valor de IMF de la población de DC positiva para eGFP. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. (Prueba t pareada, \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001). N = 9.

Fig. 4: Fenotipo de DC inmaduras y maduras. Los valores de MFI de las moléculas indicadas se investigaron 24 horas después de la electroporación de las iDC. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. (Prueba t pareada, \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001). CD40 N = 9; CD70 N = 19; CD80 N = 12; DC 83 N = 12; CCR7 N = 12.

Fig. 5: Modelo tumoral bilateral con P815: tratamiento único de un tumor con tNGFR como control o con pUC TE ENE TriMix. El tumor contralateral no tratado se usó para evaluar la respuesta inmune antitumoral sistémica. Se mostró crecimiento tumoral para cada ratón individual por grupo (n = 6) seguido de una visión general del volumen tumoral medio. La supervivencia se visualizó en un gráfico de Kaplan-Meier. Las diferencias en la supervivencia se analizaron mediante la prueba de orden logarítmico.

Fig. 6: Modelo tumoral bilateral con P815: tratamiento único de un tumor, con tNGFR o 0,8 volúmenes de solución de Hartman como control. El tumor contralateral no tratado se usó para evaluar la respuesta inmune antitumoral sistémica. Se mostró crecimiento tumoral para cada ratón individual por grupo (n = 6) seguido de una visión general del volumen tumoral medio. La supervivencia se visualizó en un gráfico de Kaplan-Meier. Las diferencias en la supervivencia se analizaron mediante la prueba de orden logarítmico.

Fig. 7: El vector pUC TE ENE con sus elementos más importantes.

Fig. 8: Muestra una comparación de secuencia de 3 secuencias de TE variables (SEQ ID NOs: 1, 2 y 3) como la

creada por Clustal 2.1 de EMBL.

Fig. 9: (A) expresión de WT1 en las DC electroporadas con ARNm de WT1. Las iDC se electroporaron con 10 µg de ARNm de WT1 codificado por los diferentes vectores y se analizaron para determinar su expresión de WT1 mediante tinción intracelular 4 h, 24 h y 48 h después de la electroporación. Se muestra una comparación de los valores de MFI después de la electroporación de las iDC con los diferentes vectores que codifican WT1. N = 3 (B) expresión de eGFP en las DC electroporadas con ARNm de eGFP. Las iDC se electroporaron con 10 µg de ARNm de eGFP codificado por los diferentes vectores y se analizaron para determinar su expresión de eGFP mediante tinción intracelular 4 h, 24 h y 48 h después de la electroporación. Se muestra una comparación de los valores de MFI después de la electroporación de las iDC con los diferentes vectores que codifican WT1. N = 3

#### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un potenciador de la traducción (TE) y una secuencia de retención nuclear. Más en particular, dicho vector de ácido nucleico comprende una secuencia potenciadora de la traducción (TE) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico transcribible y una secuencia de retención nuclear representada por la SEQ ID NO: 4.

El término "vector" se usa aquí en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermedio para un ácido nucleico, que, por ejemplo, permite que dicho ácido nucleico se introduzca en células hospedadoras procariontas y/o eucariotas y, cuando sea apropiado, se integre en un genoma. Dichos vectores preferiblemente se replican y/o expresan en la célula. Los vectores comprenden genomas de plásmidos, fagémidos o de virus. El término "plásmido", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a una construcción de material genético extracromosómico, habitualmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

De acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico se refiere a un ácido nucleico que es preferiblemente ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). De acuerdo con la invención, los ácidos nucleicos comprenden ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas preparadas en forma recombinante y químicamente sintetizadas. De acuerdo con la invención, un ácido nucleico puede estar en forma de una molécula de cadena sencilla o de cadena doble y lineal o circular covalentemente cerrada. El término "ácido nucleico" comprende también además la formación de un derivado químico de un ácido nucleico con base en nucleótidos, en azúcar o en el fosfato, y ácidos nucleicos que contienen nucleótidos no naturales y análogos de nucleótidos.

Los ácidos nucleicos descritos de acuerdo con la invención se aíslan preferiblemente. El término "ácido nucleico aislado" significa de acuerdo con la invención que el ácido nucleico ha sido 1/ amplificado in vitro, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 2/ producido en forma recombinante por clonación; 3/ purificado, por ejemplo, por escisión y fraccionamiento electroforético en gel, o 4/ sintetizado, por ejemplo, por síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico disponible para manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

#### Potenciador de traducción 5' (TE)

La regulación postranscripcional de la traducción se controla principalmente en la fase de iniciación de la traducción. Un complejo de factores de iniciación se une a la estructura 5'CAP y recluta las subunidades ribosómicas. Este complejo comienza entonces un movimiento de exploración a lo largo del ARNm hasta que se encuentra un codón AUG en un contexto adecuado. La eficacia de este proceso puede controlarse mediante numerosas características estructurales tanto en las UTR 5' como 3' (regiones no traducidas) del ARNm. Estas características incluyen las regiones TOP (tracto terminal de oligopirimidina), IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) y ORF secuencia arriba (marcos de lectura abierta) en la UTR 5'. En la UTR 3' se han descrito motivos CITE (potenciadores de traducción independiente CAP). También se ha demostrado que la longitud de la cola de poli-A juega un papel importante en la iniciación de la traducción, ya que la PABP (proteína de unión a Poli-A) necesita asociarse tanto con la cola de poli-A como con el complejo eIF4 en el sitio CAP.

IRES es un motivo que es capaz de reclutar ribosomas independientemente de la interacción con la estructura 5'CAP. Los primeros elementos de IRES se describieron en picornavirus (por ejemplo, EMCV, virus de encefalomiocarditis). Durante la infección, la traducción dependiente de CAP se desactiva, dando una ventaja a la traducción independiente de CAP de las proteínas virales. Se han descrito varias secuencias de IRES eucariotas en los últimos años. En situaciones de estrés, la traducción dependiente de CAP está subregulada, mientras que la traducción independiente de CAP de algunos genes esenciales puede continuar. Más específicamente, las células dendríticas que se activan, por ejemplo, por ligación de LPS en el receptor 4 similar a Toll también desactiva la traducción dependiente de CAP, mientras que la traducción independiente de CAP de algunos genes protege las células de la apoptosis.

Hu et al. estudiaron una secuencia en el líder 5' del ARNm que codifica la proteína homeodominio Gtx de ratón.

Describieron una secuencia que es complementaria a las secuencias en el ARN ribosómico 18S. Descubrieron que este motivo tenía una profunda influencia en la eficiencia de la traducción (Hu et al., 1999).

Más tarde, se demostró que este motivo funciona como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y se demostró que los segmentos no superpuestos más cortos de este líder 5' podrían potenciar la traducción de un segundo cistron en un ARNm dicistrónico. Uno de estos segmentos tenía 9 nucleótidos de longitud y cuando se unieron varias copias de este módulo IRES, la actividad de IRES se mejoró enormemente. Una repetición en tándem del mismo segmento 9n, intercalada por 9n fragmentos de la beta-globina UTR 5' humana, se demostró que funciona como un potenciador de la traducción (TE) en un ARNm monocistrónico cuando se coloca en el extremo 5' del ARNm, en frente del ORF.

Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, puede usarse cualquier secuencia que funcione como potenciador de la traducción para ARNm, por ejemplo, aquellos elementos descritos anteriormente en la presente memoria. En particular, un potenciador de la traducción es una secuencia en el ARN transcrito que facilita la traducción. Un posible modo de acción es mediante la potenciación de la unión del ribosoma al extremo 5' del ARNm.

En un ejemplo particular, el vector de acuerdo con esta invención puede producir ARN que contiene una repetición en tándem 10x de la secuencia 9n de tipo silvestre de la secuencia líder Gtx: CCGGCGGGT. Estos motivos están unidos por una secuencia 9n derivada de la UTR 5' de beta globina humana: TTCTGACAT. Este fragmento de ADN se puede clonar en el plásmido entre la secuencia promotora del bacteriófago y el ORF (marco de lectura abierto).

En una realización particular, el potenciador de la traducción de acuerdo con la presente invención tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. Como es evidente a partir de la Figura8, las SEQ ID NOs: 2 y 3 tienen una identidad de secuencia de al menos 80% en comparación con la SEQ ID NO: 1, y por lo tanto son adecuadas para usarse en conexión con la presente invención. Más preferiblemente, el potenciador de la traducción de acuerdo con la presente invención tiene al menos un 85%, 86%, 87%, 88% o 89% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. Como es evidente a partir de la Figura8, las SEQ ID NOs: 2 y 3 tienen una identidad de secuencia de al menos el 85% en comparación con la SEQ ID NO: 1. Incluso más preferiblemente, el potenciador de la traducción de acuerdo con la presente invención tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. Como es evidente a partir de la Figura8, la SEQ ID NO: 3 tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% en comparación con la SEQ ID NO: 1. Incluso más preferiblemente, el potenciador de la traducción está representado por cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3; lo más preferiblemente la SEQ ID NO: 1.

#### Secuencia de retención nuclear

La importancia de los procesos de control genético postranscripcional se ha vuelto cada vez más evidente en los últimos años. Entre estos procesos, uno que comenzó a recibir considerable atención es el control de la estabilidad del ARNm. Con el creciente reconocimiento de que la degradación del ARNm tiene un profundo impacto en la expresión génica y que las tasas de degradación del ARNm pueden modularse en respuesta a señales ambientales y de desarrollo, ahora se está llevando a cabo un esfuerzo de investigación vigoroso para comprender este proceso. Se ha logrado un progreso significativo y los estudios en los últimos 20 años han dilucidado una serie de características generales de la degradación del ARNm.

Tanto los ARNm celulares como los virales están sujetos a rutas robustas de degradación del ARN. Los virus han desarrollado diferentes métodos para proteger su ARNm de los mecanismos de desadenilación del huésped. El ARN poliadenilado no traducido (PAN) del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) es muy abundante en el núcleo de las células infectadas. Este ARN es resistente a la desadenilación y a la degradación. La acumulación de PAN depende de la actividad de un elemento de RNA de 79 nucleótidos en la región 3', llamado ENE (elemento de expresión y retención nuclear). Conrad et al. publicó en 2005 el primer artículo relacionado con ENE al describirlo como un elemento de ARN del virus del sarcoma de Kaposi que produjo una mayor abundancia nuclear de transcripciones sin intrón (Conrad, 2005). El fragmento ENE contiene una estructura de horquilla específica rica en U que interactúa con la cola de poli-A. Como tal, se obtiene una estructura secundaria que da como resultado la retención del ARN en el núcleo y de ahí el nombre de elemento de retención nuclear. Un efecto secundario es la interacción de la estructura de horquilla rica en U con la cola de poli-A del ARNm, que produce un efecto de "blindaje" de la degradación por el huésped, un rasgo que es de particular interés en la producción de ARNm con fines inmunoterapéuticos.

El ARN nuclear poliadenilado (PAN) (también conocido como ARN T1.1 o nut-1) es un lncARN producido por el virus gamma del herpes oncogénico, virus del herpes asociado con el sarcoma de Kaposi (KSHV) (Sun et al., 1996). El ARN PAN se acumula hasta niveles extraordinariamente altos (~500.000 copias/célula) durante la infección lítica y se requiere para la producción de proteínas virales tardías y virus infeccioso (Sun et al., 1996). El elemento de expresión y retención nuclear (ENE), localizado -120 nt secuencia arriba del sitio de poliadenilación del ARN PAN, es esencial para esta alta acumulación en el núcleo (Conrad y Steitz, 2005). El ENE inhibe la rápida descomposición del ARN PAN bloqueando la desadenilación (Conrad et al., 2006). El ARN PAN no produce expresión de proteína.

La retención nuclear mantiene al ARN alejado de la maquinaria de traducción en el citoplasma, mientras que el blindaje de la cola de poli-A impide la unión a la PABP (proteína de unión a poli-A) que es esencial para una traducción eficiente. Por lo tanto, el uso de esta secuencia en la transfección no es obvio.

5 El ENE de KSHV es un elemento de ARN de 79 nt de longitud, compuesto por una estructura de bucle de tallo con un bucle asimétrico interno rico en U, que junto con pares de bases adyacentes constituye el núcleo funcional de ENE. La estructura cristalina del núcleo de ENE ligada al oligo(A)<sub>9</sub> reveló 5 triples de bases U-A-U consecutivos formados entre el bucle rico en U y el oligo(A)<sub>9</sub> (Mitton-Fry et al., 2010), que se extienden por interacciones menores de A con tres pares de bases G-C del tallo inferior. Los análisis genéticos y bioquímicos indican interacciones  
10 similares entre la cola de poli(A) del ARN PAN y el ENE in vivo (Mitton-Fry et al., 2010).

Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, puede usarse cualquier secuencia que funcione como un elemento de retención nuclear para ARNm, por ejemplo, aquellos elementos descritos anteriormente en la presente memoria. En particular, un elemento de retención nuclear es una secuencia que actúa en forma cis que tiene la  
15 capacidad de proteger el ARNm de la descomposición citoplásmica. En una realización particular, el elemento de retención nuclear también funciona como una secuencia de estabilización de ARN.

En un ejemplo particular, el elemento de retención nuclear es el elemento de expresión y retención nuclear de KSHV. Se coloca una secuencia de 79 pb aislada del ARN PAN (poliadenilado no traducido) secuencia arriba del tramo A124 en el plásmido de producción de ARN. El ENE forma un bucle rico en U que se asocia con la cola de poli-A y la protege de la degradación.

En una realización particular, el elemento de retención nuclear de acuerdo con la presente invención está representado por la SEQ ID NO: 4.

#### Elementos adicionales en el vector de la presente invención

En una realización adicional, el vector de ácido nucleico de la presente invención puede contener otros elementos seleccionados del listado que comprende un promotor de bacteriófago, una secuencia de ácido nucleico transcribible y una cola de poli-A.

El ARN o ácido ribonucleico mensajero (ARNm) consiste en un polímero de cadena sencilla de 4 nucleótidos (monofosfato de adenosina, guanósina, citidina y uridina). Se necesita una modificación en el extremo 5' o 5'CAP para el reconocimiento del ARNm por el complejo de inicio de la traducción, la unión apropiada del ARNm a los ribosomas, así como la protección de las exonucleasas 5'. Esta modificación consiste en un nucleótido de 7-metilguanósina agregado al primer nucleótido transcrito. La región de codificación comienza con un codón de inicio (generalmente AUG) y termina con un codón de parada (generalmente UAA, UAG o UGA). Antes del codón de inicio y después del codón de parada, el ARNm maduro contiene una región 5' no traducida (UTR) y una UTR 3'. Estas regiones contribuyen a la estabilidad o inestabilidad del ARNm y a la eficacia traduccional.

Una secuencia de ácido nucleico transcribible, en particular un ácido nucleico que codifica un péptido o proteína, y una secuencia de control de la expresión están "funcionalmente" unidas entre sí, si están unidas covalentemente entre sí de tal forma que la transcripción o la expresión del ácido nucleico que se puede transcribir y en particular la codificación está bajo el control o bajo la influencia de la secuencia de control de la expresión.

Los ácidos nucleicos especificados en la presente memoria, en particular ácidos nucleicos transcribibles y codificantes, pueden combinarse con cualquier secuencia de control de la expresión, en particular promotores, que pueden ser homólogos o heterólogos a dichos ácidos nucleicos, con el término "homólogo" que se refiere al hecho de que un ácido nucleico también está unido funcionalmente de forma natural a la secuencia de control de la expresión, y el término "heterólogo" se refiere al hecho de que un ácido nucleico no está unido funcionalmente de forma natural a la secuencia de control de la expresión.

El término "secuencias de control de la expresión" comprende de acuerdo con la invención promotores, secuencias de unión a ribosomas y otros elementos de control, que controlan la transcripción de un gen o la traducción del ARN derivado. En realizaciones particulares de la invención, las secuencias de control de la expresión se pueden regular. La estructura precisa de las secuencias de control de la expresión puede variar dependiendo de la especie o del tipo de célula, pero normalmente incluye secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas implicadas en iniciar la transcripción y la traducción, respectivamente, como una caja TATA, secuencia de protección, secuencia CAAT y similares. Más específicamente, las secuencias de control de la expresión no transcritas 5' incluyen una región promotora que abarca una secuencia promotora para el control de la transcripción del gen funcionalmente unido. Las secuencias de control de expresión también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras secuencia arriba.

En realizaciones particulares, un ácido nucleico está unido funcionalmente de acuerdo con la invención a secuencias de control de la expresión, que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto al ácido nucleico.

El término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ADN secuencia arriba (5') de la secuencia codificante de un gen, que controla la expresión de dicha secuencia codificante proporcionando un sitio de reconocimiento y unión para la ARN polimerasa. La región promotora puede incluir sitios de unión o reconocimiento adicionales para otros factores implicados en la regulación de la transcripción de dicho gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procarionota o eucarionota. Un promotor puede ser "inducible" e iniciar la transcripción en respuesta a un inductor, o puede ser "constitutivo" si la transcripción no está controlada por un inductor. Un promotor inducible se expresa solo en muy pequeña medida o no se expresa en absoluto, si falta un inductor. En presencia del inductor, el gen se "activa" o se aumenta el nivel de transcripción. Esto generalmente está mediado por la unión de un factor de transcripción específico.

En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico transcribible se selecciona del listado que comprende ARNm que codifica CD40L (NM\_000074), CD70 (NM\_001252), caTLR4 ((una versión truncada del gen TLR4 humano, que contiene solo la región transmembrana y citoplasmática del gen, precedida por el péptido señal de LAMP1 (proteína de membrana asociada a lisosomas) o ARNm específico del antígeno/enfermedad.

El promotor de bacteriófago de acuerdo con esta invención, puede ser cualquier promotor adecuado para la transcripción de ARN y preferiblemente se selecciona del listado que comprende el promotor T7, el promotor SP6 y el promotor T3; más en particular el promotor T7.

La cola de poli-A como se usa en el contexto de esta invención, preferiblemente consiste en entre y aproximadamente 100-150 adenosinas, más en particular 120-125 adenosinas, preferiblemente aproximadamente 124 adenosinas.

Los términos "casete de poliadenilo" o "secuencia de poli-A" se refieren a una secuencia de residuos de adenilo que típicamente se localiza en el extremo 3' de una molécula de ARN. La invención prevé que dicha secuencia esté unida durante la transcripción de ARN por medio de una plantilla de ADN con base en residuos de timidilo repetidos en la cadena complementaria a la cadena codificante, mientras que dicha secuencia normalmente no es codificada en el ADN, sino que está unida al extremo 3' libre del ARN mediante una ARN polimerasa independiente de la plantilla después de la transcripción en el núcleo. De acuerdo con la invención, una secuencia de poli(A) de este tipo se entiende que significa una secuencia de nucleótidos de al menos 20, preferiblemente al menos 40, preferiblemente al menos 80, preferiblemente al menos 100 y preferiblemente hasta 500, preferiblemente hasta 400, preferiblemente hasta 300, preferiblemente hasta 200, y en particular hasta 150 nucleótidos A consecutivos, y en particular aproximadamente 120 nucleótidos A consecutivos, en donde el término "nucleótidos A" se refiere a residuos de adenilo.

La invención proporciona además una molécula de ARN que puede obtenerse por transcripción del vector de ácido nucleico de acuerdo con esta invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para aumentar la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN transcrito in vitro; dicho método comprende las etapas de:

(i) proporcionar un vector de acuerdo con esta invención en el que dicha secuencia de ácido nucleico transcribible es una secuencia de ADN transcribible, que corresponde a dicho ARN a transcribir; y

(ii) transcribir in vitro la secuencia de ADN transcribible,

así como una molécula de ARN que puede obtenerse mediante dicho método.

De acuerdo con la invención, el término "transcripción" comprende "transcripción in vitro" en el que el término "transcripción in vitro" se refiere a un método en el que ARN, en particular ARNm, se sintetiza in vitro de una manera libre de células. La preparación de transcripciones preferiblemente hace uso de vectores de clonación que generalmente se denominan vectores de transcripción y que están incluidos de acuerdo con la invención bajo el término "vector".

El término "secuencia de ácido nucleico transcrita a partir de una secuencia de ácido nucleico" se refiere a ARN, cuando sea apropiado como parte de una molécula de ARN completa, que es un producto de transcripción de la última secuencia de ácido nucleico.

El término "ácidos nucleicos que pueden transcribirse para producir un transcrito común" significa que dichos ácidos nucleicos están funcionalmente unidos entre sí de tal manera que, cuando sea apropiado después de la linealización tal como la escisión por enzimas de restricción de la molécula de ácido nucleico que comprende dichos ácidos nucleicos, en particular de una molécula de ácido nucleico circular cerrada, la transcripción bajo el control de un promotor da como resultado una molécula de ARN que comprende los transcritos de dichos ácidos nucleicos unidos covalentemente entre sí, separados cuando sea apropiado por secuencias localizadas en medio.

De acuerdo con la invención, el término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción

de ARN y/o proteína. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas.

5 El término "secuencia de ácido nucleico que es activa para aumentar la eficacia y/o estabilidad de traducción de una  
 secuencia de ácido nucleico" significa que el primer ácido nucleico es capaz de modificar, en una transcripción  
 común con el segundo ácido nucleico, la eficacia y/o estabilidad de la traducción de dicho segundo ácido nucleico de  
 tal manera que dicha eficacia y/o estabilidad de traducción se incrementa en comparación con la eficacia y/o  
 10 estabilidad de traducción de dicho segundo ácido nucleico sin dicho primer ácido nucleico. En este contexto, el  
 término "eficacia de traducción" se refiere a la cantidad de producto de traducción proporcionada por una molécula  
 de ARN dentro de un período de tiempo particular y el término "estabilidad" se refiere a la vida media de una  
 molécula de ARN.

15 En una realización particular, la presente invención proporciona una molécula de ARN que comprende un  
 potenciador de la traducción (TE) y un elemento de retención nuclear (ENE); o una composición que comprende una  
 o más de dichas moléculas de ARN. Más en particular, la presente invención proporciona una molécula de ARN que  
 comprende un potenciador de la traducción (TE) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ  
 ID NO: 1, una secuencia de ácido nucleico transcribible y una secuencia de retención nuclear representada por la  
 20 SEQ ID NO: 4; o una composición que comprende dicha molécula de ARN.

Dicha molécula de ARN puede comprender adicionalmente uno o más elementos seleccionados del listado que  
 comprende una secuencia de ácido nucleico traducible, y una cola de poli-A; en el que dicha secuencia de ácido  
 nucleico traducible puede seleccionarse del listado que comprende ARNm que codifica CD40L, CD70, caTLR4 o  
 25 ARNm específico del antígeno/enfermedad.

En el contexto de la presente invención, el elemento TE se coloca preferiblemente en el extremo 5' de la molécula de  
 ARN transcribible/traducible y la secuencia de retención nuclear (ENE) preferiblemente en el extremo 3'.

30 El "extremo 3' de un ácido nucleico" se refiere de acuerdo con la invención a ese extremo que tiene un grupo  
 hidroxilo libre. El "extremo 5' de un ácido nucleico" se refiere de acuerdo con la invención a ese extremo que tiene un  
 grupo fosfato libre.

En el contexto de la presente invención, "ARNm" significa "ARN mensajero" y se refiere a un transcrito que se  
 produce usando ADN como plantilla y que a su vez codifica un péptido o proteína. Un ARNm típicamente comprende  
 35 una región 5' no traducida, una región que codifica proteína y una región 3' no traducida. El ARNm tiene un tiempo  
 medio limitado en las células. De acuerdo con la invención, el ARNm se puede preparar a partir de una plantilla de  
 ADN mediante transcripción in vitro. Se puede modificar mediante estabilización de modificaciones y protección  
 adicionales, además de las modificaciones de acuerdo con la invención.

40 En una realización particular, la composición de acuerdo con esta invención comprende ARNm que codifica CD40L,  
 CD70 y caTLR4, ya sea en combinación o no con ARNm que codifica ARNm específico del antígeno/enfermedad.

El ARNm específico del antígeno/enfermedad de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar del listado  
 no limitante que comprende antígenos tumorales, antígenos derivados de patógenos, alérgenos ...

45 La presente invención proporciona adicionalmente el uso de la molécula o moléculas de ARN y/o de la composición  
 o composiciones que comprenden una o más de dichas moléculas de ARN para múltiples propósitos, tales como por  
 ejemplo para la introducción in vivo o in vitro en una célula huésped in vitro; o para usar como un medicamento.  
 También es un aspecto de la presente invención proporcionar un kit que comprende uno o más vectores; una o más  
 50 moléculas de ARN o una composición de acuerdo con la presente invención.

La presente divulgación también se refiere a los productos de la invención para uso en un método para tratar a un  
 paciente que lo necesita con una o más moléculas de ARN o una composición de acuerdo con la invención; en  
 donde, dichas moléculas de ARN pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente con intervalos.

55 La invención proporciona ácidos nucleicos en particular ARN para administrar a un paciente. Los ácidos nucleicos se  
 pueden administrar mediante métodos ex vivo, es decir, removiendo células de un paciente, modificando  
 genéticamente dichas células (por ejemplo, mediante transfección) y reintroduciendo las células modificadas en el  
 paciente. Los métodos de transfección y transducción son conocidos por el trabajador experto. La invención también  
 60 proporciona ácidos nucleicos para ser administrados in vivo.

De acuerdo con la invención, el término "transfección" se refiere a la introducción de uno o más ácidos nucleicos en  
 un organismo o en una célula huésped. Se pueden emplear diversos métodos para introducir de acuerdo con la  
 invención ácidos nucleicos en células in vitro o in vivo. Tales métodos incluyen la transfección de precipitados de  
 65 ácido nucleico-CaP04, la transfección de ácidos nucleicos asociados con DEAE, la transfección de infección con  
 virus que portan los ácidos nucleicos de interés, transfección mediada por liposomas y similares. En realizaciones

particulares, se da preferencia a dirigir el ácido nucleico a células particulares. En dichas realizaciones, un vehículo usado para administrar un ácido nucleico a una célula (por ejemplo, un retrovirus o un liposoma) puede tener una molécula de direccionamiento unida. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie en la célula diana, o un ligando para un receptor en la célula diana puede incorporarse o unirse al portador de ácido nucleico. Si se desea la administración de un ácido nucleico por liposomas, las proteínas que se unen a una membrana superficial asociada con endocitosis se pueden incorporar en la formulación de liposomas con el fin de permitir el direccionamiento y/o absorción. Dichas proteínas incluyen proteínas de la cápside o fragmentos de la mismas que son específicas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que se internalizan, proteínas dirigidas a un sitio intracelular, y similares.

Las moléculas de ARN o las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un paciente que lo necesite por cualquier vía de administración adecuada tal como, por ejemplo, intranodal, intradérmica, intralinfática e intratumoral. Además, cuando se tratan por ejemplo pacientes con cáncer, la administración de las moléculas o composiciones de ARN de acuerdo con esta invención, puede usarse en combinación con métodos para liberar ARNm tumoral del tumor en el paciente, tal como por ejemplo ablación o sonoporación.

De acuerdo con la invención, pueden usarse métodos estándar para preparar ácidos nucleicos recombinantes, cultivando células, en particular electroporación y lipofección. Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante o de una manera ya conocida.

De acuerdo con la invención, una "secuencia de ácido nucleico que se deriva de una secuencia de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico que contiene, en comparación con el ácido nucleico del que deriva, sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de nucleótidos únicos o múltiples y que es preferiblemente complementaria al ácido nucleico del que se deriva, es decir, existe un cierto grado de homología entre dichos ácidos nucleicos y las secuencias de nucleótidos de dichos ácidos nucleicos se corresponden de una manera directa o complementaria significativa.

De acuerdo con la invención, un ácido nucleico derivado de un ácido nucleico tiene una propiedad funcional del ácido nucleico del que se deriva. Tales propiedades funcionales incluyen en particular la capacidad de aumentar, en un enlace funcional con un ácido nucleico que puede transcribirse en ARN (secuencia de ácido nucleico transcribible), la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN producido a partir de este ácido nucleico en la molécula competa de ARN.

Un ácido nucleico es "complementario" a otro ácido nucleico si las dos secuencias pueden hibridarse entre sí y formar un dúplex estable, llevándose a cabo dicha hibridación preferiblemente en condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones rigurosas). Se describen condiciones rigurosas, por ejemplo, en Molecular Cloning: A laboratory manual, J Sambrook et al.

De acuerdo con la invención, los ácidos nucleicos complementarios tienen nucleótidos que son al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y preferiblemente al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idénticos.

De acuerdo con la invención, se considera que una primera región polinucleotídica está localizada aguas abajo de una segunda región polinucleotídica, si el extremo 5' de dicha primera región polinucleotídica es la parte de dicha primera región polinucleotídica más próxima al extremo 3' de dicha segunda región polinucleotídica.

La región 3' no traducida típicamente se extiende desde el codón de terminación para un producto de traducción hasta la secuencia poli-A que habitualmente se une después del proceso de transcripción. Las regiones 3' no traducidas de ARNm de mamífero tienen típicamente una región de homología conocida como la secuencia de hexanucleótidos AAUAAA. Esta secuencia es presumiblemente la señal de unión de poli-A y se localiza frecuentemente entre 10 y 30 bases secuencia arriba del sitio de unión de poli-A.

Las regiones 3' no traducidas pueden contener una o más repeticiones invertidas que pueden plegarse para proporcionar estructuras de tallo-bucle, que actúan como barreras para exorribonucleasas o interactúan con proteínas que se sabe que aumentan la estabilidad del ARN (por ejemplo, proteínas de unión a ARN).

Las regiones 5' y/o 3' no traducidas pueden, de acuerdo con la invención, estar unidas funcionalmente a un ácido nucleico transcribible y en particular a un ácido nucleico codificante, de modo que estas regiones se asocien con el ácido nucleico de tal manera que la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN que se transcribe a partir de dicho ácido nucleico transcribible se incrementan.

De acuerdo con la invención, el término "gen" se refiere a una secuencia particular de ácido nucleico, que es responsable de producir uno o más productos celulares y/o por lograr uno o más productos celulares y/o por lograr uno o más productos intercelulares o funciones intracelulares. Más específicamente, dicho término se refiere a una sección de ADN, que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína específica o una molécula de ARN funcional o estructural.

De acuerdo con la invención, el término "célula huésped" se refiere a cualquier célula que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término "célula huésped" comprende, de acuerdo con la invención, células procariotas (por ejemplo, E. coli) o eucariotas (por ejemplo, células de levadura y células de insecto). Se da preferencia particular a células de mamífero tales como células de humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células se pueden derivar de una multiplicidad de tipos de tejidos y comprenden células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos incluyen queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de médula ósea y células madre embrionarias. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula huésped en una sola o en varias copias y, en una realización, se expresa en la célula huésped.

De acuerdo con la invención, un péptido o proteína codificada por un ácido nucleico puede ser un péptido o proteína que se localiza en el citoplasma, en el núcleo, en la membrana, en los orgánulos o en forma secretada. Incluyen proteínas estructurales, proteínas reguladoras, hormonas, neurotransmisores, factores reguladores del crecimiento, factores de diferenciación, factores reguladores de la expresión génica, proteínas asociadas al ADN, enzimas, proteínas séricas, receptores, medicamentos, inmunomoduladores, oncogenes, toxinas, antígenos tumorales o antígenos. Dichos péptidos o proteínas pueden tener una secuencia natural o una secuencia mutada con el fin de potenciar, inhibir, regular o eliminar su actividad biológica.

El término "péptido" se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferiblemente 3 o más, preferiblemente 4 o más, preferiblemente 6 o más, preferiblemente 8 o más, preferiblemente 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 o más, preferiblemente 100 o preferiblemente 150 aminoácidos consecutivos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferiblemente péptidos que tienen al menos 151 aminoácidos, pero los términos "péptido" y "proteína" se usan aquí habitualmente como sinónimos. Los términos "péptido" y "proteína" comprenden de acuerdo con la invención sustancias que contienen no solo componentes de aminoácidos sino también componentes no aminoácidos tales como azúcares y estructuras de fosfato, y también comprenden sustancias que contienen enlaces tales como enlaces éster, tioéter o disulfuro.

El "informador" se refiere a una molécula, típicamente un péptido o proteína, que es codificada por un gen indicador y medida en un ensayo informador. Los sistemas convencionales usualmente emplean un informador enzimático y miden la actividad de dicho informador.

De acuerdo con la invención, dos elementos, tales como nucleótidos o aminoácidos son consecutivos, si están directamente adyacentes entre sí, sin ninguna interrupción.

"Endonucleasas de restricción" o "enzimas de restricción" se refieren a una clase de enzimas que escinden enlaces fosfodiéster en ambas cadenas de una molécula de ADN dentro de secuencias de bases específicas. Reconocen sitios de unión específicos, conocidos como secuencias de reconocimiento, en una molécula de ADN de doble cadena. Los sitios en los que dichos enlaces fosfodiéster en el ADN se escinden mediante dichas enzimas se denominan sitios de escisión. En el caso de las enzimas tipo IIS, el sitio de escisión se localiza a una distancia definida del sitio de unión al ADN.

#### Áreas de aplicación

Un área de aplicación de la presente invención es la vacunación, es decir, el uso de ARNm modificado para inoculación o el uso de una composición farmacéutica que comprende el ARNm modificado como agente inoculante, o el uso de ARNm modificado en la preparación de una composición farmacéutica para fines de inoculación. La vacunación se basa en la introducción de un antígeno en un organismo o sujeto, en particular en una célula del organismo o sujeto. En el contexto de la presente invención, la información genética que codifica el antígeno se introduce en el organismo o sujeto en forma de un ARNm modificado que codifica el antígeno y/o las diferentes cadenas de ARNm TriMix. El ARNm modificado 'antígeno' contenido en la composición farmacéutica se traduce en un antígeno, es decir, el polipéptido o péptido antigénico codificado por el ARNm modificado se expresa y se estimula una respuesta inmune dirigida contra el polipéptido o péptido antigénico. Para la vacunación contra un organismo patógeno, por ejemplo, un virus, una bacteria o un protozoo, se puede usar un antígeno de superficie de dicho organismo como un antígeno contra el cual se provoca una respuesta inmune. En el contexto de la presente invención, se puede usar como vacuna una composición farmacéutica que comprende el ARNm modificado que codifica dicho antígeno de superficie. En aplicaciones en las que se usa una vacuna genética para tratar el cáncer, la respuesta inmune se dirige contra antígenos tumorales generando un ARNm modificado que codifica un antígeno o antígenos tumorales, en particular una proteína que se expresa exclusivamente en células cancerosas. Dicho ARNm modificado que codifica un antígeno tumoral puede usarse solo o como un componente de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en donde la administración del ARNm modificado o una composición del mismo da como resultado la expresión del antígeno o antígenos cancerígenos en el organismo. Una respuesta inmune a tal vacuna, por lo tanto, conferiría al sujeto vacunado un grado de inmunidad protectora contra cánceres asociados con el antígeno cancerígeno inmunizante. Alternativamente, tales medidas podrían usarse para vacunar a un paciente con cáncer con un ARNm modificado que codifica un antígeno o antígenos tumorales expresados en las células cancerosas del paciente para estimular la respuesta inmune del paciente con cáncer para atacar a cualquier célula cancerosa que exprese el antígeno codificado.

Para aplicaciones de terapia génica, por ejemplo, donde se usa una composición farmacéutica de la invención, el ARNm modificado allí dentro codifica para al menos un péptido o polipéptido biológicamente activo que no se forma o que se forma de manera insuficiente o defectuosa en el paciente a tratar. La administración de un ARNm modificado que codifica al menos un péptido o polipéptido biológicamente activo o una composición del mismo a dicho paciente, por lo tanto, restaura al menos parcialmente la expresión y/o actividad de al menos un péptido o polipéptido biológicamente activo en el paciente y, por lo tanto, complementa el defecto genético del paciente. La introducción directa de un gen funcional normal en un animal vivo se ha estudiado como un medio para reemplazar la información genética defectuosa. En tales estudios, las secuencias de ácido nucleico se introducen directamente en las células de un animal vivo. Por consiguiente, ejemplos de polipéptidos codificados por un ARNm modificado de la invención incluyen, sin limitación, distrofina, el canal de cloruro, que está alterado de forma defectuosa en la fibrosis quística, enzimas que carecen o son defectuosas en trastornos metabólicos tales como fenilcetonuria, galactosemia, homocistinuria, deficiencia de adenosina desaminasa, etc.; así como enzimas que están implicadas en la síntesis de neurotransmisores tales como dopamina, norepinefrina y GABA, en particular tirosina hidroxilasa y DOPA descarboxilasa, y alfa-1-antitripsina etc. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden usar para afectar la expresión de receptores de superficie celular y/o los compañeros de unión de los receptores de superficie celular del ARNm modificado contenido en ellos codifican para tales proteínas o péptidos biológicamente activos. Ejemplos de tales proteínas que de forma extracelular o que se unen a receptores de superficie celular incluyen, por ejemplo, activador de plasminógeno tisular (TPA), hormonas de crecimiento, insulina, interferones, factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y eritropoyetina (EPO), etc.

Al elegir factores de crecimiento adecuados, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse, por ejemplo, para la regeneración tisular o para interactuar con células madre. De este modo, se pueden tratar enfermedades que se caracterizan, por ejemplo, por degeneración tisular, entre las que se pueden tratar enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, etc. y otras afecciones degenerativas, tales como la artrosis. En estos casos, el ARNm modificado, en particular el contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, preferiblemente codifica, sin limitación, un miembro de la familia TGF-Beta, factores neurotróficos tales como NGF, neurotrofinas, etc.

#### Método de tratamiento

La presente divulgación también se refiere a los productos de la invención para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno seleccionado del listado no limitante que comprende cáncer, alergia y enfermedades infecciosas tales como bacterianas, infecciones virales o fúngicas, por ejemplo, infección por VIH o hepatitis

Los términos "cáncer" y/o "tumor" usados a lo largo de la descripción no pretenden limitarse a los tipos de cáncer o tumores que pueden haberse ejemplificado. Por lo tanto, el término abarca todos los trastornos proliferativos tales como neoplasma, displasia, lesiones premalignas o precancerosas, crecimientos anormales de células, tumores benignos, tumores malignos, cáncer o metástasis, en los que el cáncer se selecciona del grupo de: leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioma, cáncer de colon, cáncer de vejiga, sarcoma, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de médula ósea, cáncer de estómago, cáncer de duodeno, cáncer de esófago, cáncer de tiroides, cáncer hematológico y linfoma. Los antígenos específicos para el cáncer pueden ser, por ejemplo, MelanA/MART1, antígenos de cáncer de línea germinal, gp100, tirosinasa, CEA, PSA, Her-2/neu, survivina, telomerasa.

El término "enfermedad infecciosa" o "infección" usado a lo largo de la descripción no pretende limitarse a los tipos de infecciones que pueden haberse ejemplificado en este documento. Por lo tanto, el término abarca todos los agentes infecciosos para los que la vacunación sería beneficiosa para el sujeto. Ejemplos no limitantes son las siguientes infecciones o trastornos causados por virus: síndrome de inmunodeficiencia adquirida - infecciones por adenovirus - infecciones por alfavirus - infecciones por arbovirus - parálisis de Bell - enfermedad de Borna - infecciones por Bunyaviridae - infecciones por Caliciviridae - varicela - resfriado común - Condiloma acuminado - infecciones por Coronaviridae - infecciones por virus Cocksackie - infecciones por Citomegalovirus - dengue - infecciones por virus de ADN - ectima contagioso - encefalitis, arbovirus - encefalitis, herpes simple - infecciones por el virus de Epstein-Barr - eritema infeccioso - roséola - síndrome de fatiga, infecciones crónicas - por hantavirus - fiebres hemorrágicas - hepatitis viral - herpes labial humano viral - herpes simple - herpes zoster - herpes zoster ótico - infecciones por virus del herpes - infecciones por VIH - mononucleosis infecciosa - influenza en aves - influenza, humano - fiebre de Lassa, humana - sarampión - meningitis, viral - molusco contagioso - viruela del mono - paperas - mielitis - infecciones por virus del papiloma - infecciones por Paramyxoviridae - fiebre por flebotomos - poliomielitis - infecciones por virus del papiloma - síndrome de posterior a poliomielitis - rabia - infecciones por virus sincitial respiratorio - fiebre del valle del Rift - infecciones por virus de ARN - rubéola - síndrome respiratorio agudo severo - enfermedades por virus lentos - viruela - panencefalitis esclerosante subaguda - enfermedades transmitidas por garrapatas - infecciones por virus tumorales - verrugas - fiebre del Nilo Occidental - enfermedades virales - fiebre amarilla - zoonosis - etc. Los antígenos específicos para virus pueden ser VIH-gag, VIH-tat, VIH-rev o VIH-nef, o antígenos de hepatitis C.

Otros ejemplos no limitantes son las siguientes infecciones o trastornos causados por bacterias u hongos: absceso -

actinomicosis - anaplasmosis - ántrax - artritis, reactiva - aspergilosis - bacteriemia - infecciones bacterianas y micosis - infecciones por Bartonella - botulismo - absceso cerebral - brucelosis - infecciones por Burkholderia - infecciones por Campylobacter - candidiasis - candidiasis, vulvovaginal - enfermedad por arañazo de gato - celulitis - infecciones por el sistema nervioso central - cancroide - infecciones por chlamydia - infecciones por clamidia - cólera - infecciones por Clostridium - Coccidioidomicosis - úlcera corneal - infección cruzada - criptococosis - dermatomicosis - difteria - ehrlichiosis - empiema, pleural - endocarditis, bacteriana - endoftalmítis - enterocolitis, pseudomembranosa - erisipela - infecciones por Escherichia coli - fascitis, necrotizante - gangrena de Fournier - forunculosis - infecciones por Fusobacterium - gangrena gaseosa - gonorrea - infecciones bacterianas Gram - negativas - infecciones bacterianas Gram - positivas - granuloma inguinal - Hidradenitis supurativa - histoplasmosis - orzuelo - impétigo - infecciones por Klebsiella - legionelosis - lepra - leptospirosis - infecciones por listeria - angina de Ludwig - absceso pulmonar - enfermedad de Lyme - linfogranuloma venéreo - maduromicosis - melioidosis - meningitis, bacteriana - infecciones por micobacteriana - infecciones por micoplasma - micosis - infecciones por Nocardia - onicomosis - osteomielitis - paroniquia - enfermedad inflamatoria pélvica - peste - infecciones neumocócicas - infecciones por Pseudomonas - psitacosis - infección puerperal - fiebre Q - fiebre por mordida de rata - fiebre recurrente - infecciones de las vías respiratorias - absceso retrofaringeo - fiebre reumática - rinoescleroma - infecciones por Rickettsia - fiebre maculosa de las Montañas Rocosas - infecciones por salmonella - fiebre escarlatina - tífus del matorral - sepsis - enfermedades de transmisión sexual, enfermedades bacterianas de transmisión sexual, choque séptico - enfermedades bacterianas de la piel - enfermedades infecciosas de la piel - infecciones estafilocócicas - infecciones por estreptococos - sífilis - sífilis congénita - tétanos - enfermedades transmitidas por garrapatas - tiña - tiña Versicolor - tracoma - tuberculosis - tuberculosis espinal - tularemia - fiebre tifoidea - tífus, epidemia causada por piojos - infecciones del tracto urinario - enfermedad de Whipple - tos ferina - infecciones por Vibrio - guijas - infecciones por Yersinia - zoonosis - zigomicosis - etc.

Como se usa en este documento y salvo que se indique lo contrario, el término "solvato" incluye cualquier combinación que pueda formarse mediante la molécula o moléculas de ARN de esta invención con un disolvente inorgánico adecuado (por ejemplo, hidratos) o disolvente orgánico, tal como, pero sin limitarse a, agua para inyección, solución de Hartmann, PBS, NaCl al 0,9%, medio de cultivo sin suero.

Generalmente, para uso farmacéutico, la molécula o moléculas de ARN de la invención se pueden formular como una preparación farmacéutica o composición farmacéutica que comprende al menos una molécula de ARN de la invención y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y/o adyuvante, y opcionalmente uno o más productos farmacéuticamente activos adicionales.

Por medio de ejemplos no limitativos, dicha formulación puede estar en una forma adecuada para administración oral, para administración parenteral (tal como mediante inyección intralinfática, intratumoral, intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para administración tópica (incluido la ocular), para administración por inhalación, mediante un parche para la piel, mediante un implante, mediante un supositorio, etc. Tales formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, de acuerdo con la forma de administración, así como los métodos y los portadores, diluyentes y excipientes para usar en la preparación de los mismos, serán claras para el experto en la materia; se hace referencia nuevamente, por ejemplo, a los documentos US-A-6.372.778, US-A-6.369.086, US-A-6.369.087 y US-A-6.372.733, así como a los manuales estándar, tal como la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales preparaciones incluyen comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, bolsitas, cápsulas lisas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles, ungüentos, cremas, lociones, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, gotas oftálmicas, soluciones inyectables estériles y polvos estériles empacados (que usualmente se reconstituyen antes del uso) para administración en bolo y/o para administración continua, que pueden formularse con vehículos, excipientes y diluyentes que son por sí mismos adecuados para tales formulaciones, tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, celulosa, agua (estéril), metilcelulosa, metil y propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, aceites comestibles, aceites vegetales y aceites minerales o mezclas adecuadas de los mismos. Las formulaciones pueden contener opcionalmente otras sustancias farmacéuticamente activas (que pueden o no conducir a un efecto sinérgico con los productos de la invención) y otras sustancias que se usan comúnmente en formulaciones farmacéuticas, tales como agentes lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, agentes dispersantes, desintegrantes, agentes de carga, rellenos, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, reguladores de flujo, agentes de liberación, etc. Las composiciones también pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del producto o productos activos contenidos en las mismas, por ejemplo, usando liposomas o matrices poliméricas hidrofílicas basadas en geles naturales o polímeros sintéticos. Para mejorar la solubilidad y/o la estabilidad de los productos de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, puede ser ventajoso emplear  $\alpha$ -ciclodextrinas,  $\beta$ -ciclodextrinas o  $\gamma$ -ciclodextrinas o sus derivados.

Más en particular, las composiciones se pueden formular en una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de partículas que consisten en una dispersión sólida de los productos de la invención y uno o más polímeros solubles en agua farmacéuticamente aceptables.

El término "una dispersión sólida" define un sistema en un estado sólido (en oposición a un estado líquido o gaseoso) que comprende al menos dos componentes, en el que un componente se dispersa más o menos uniformemente a través del otro componente o componentes. Cuando dicha dispersión de los componentes es tal que el sistema es química y físicamente completamente uniforme u homogéneo o consiste en una fase tal como se define en termodinámica, dicha dispersión sólida se denomina "solución sólida". Las soluciones sólidas son sistemas físicos preferidos debido a que los componentes en los mismos suelen estar fácilmente biodisponibles para los organismos a los que se les administra.

También puede ser conveniente formular los productos en forma de nanopartículas que tienen un modificador de superficie adsorbido sobre su superficie en una cantidad suficiente para mantener un tamaño de partícula promedio eficaz de menos de 1.000 nm. Los modificadores de superficie adecuados se pueden seleccionar preferiblemente de excipientes farmacéuticos orgánicos e inorgánicos conocidos. Tales excipientes incluyen diversos polímeros, oligómeros de bajo peso molecular, productos naturales y tensioactivos. Los modificadores de superficie preferidos incluyen tensioactivos no iónicos y aniónicos.

Otra forma más interesante de formular los productos de acuerdo con la invención implica una composición farmacéutica por medio de la cual los productos se incorporan en polímeros hidrofílicos y aplicando esta mezcla como una película de recubrimiento sobre muchas perlas pequeñas, produciendo así una composición con buena biodisponibilidad que se puede fabricar convenientemente y que es adecuado para preparar formas de dosificación farmacéutica para administración oral. Los materiales adecuados para uso como núcleos en las perlas son múltiples, con la condición de que dichos materiales sean farmacéuticamente aceptables y tengan dimensiones y firmeza apropiadas. Ejemplos de tales materiales son polímeros, sustancias inorgánicas, sustancias orgánicas y sacáridos y derivados de los mismos.

Las preparaciones se pueden preparar de una forma ya conocida, que usualmente implica mezclar al menos un producto de acuerdo con la invención con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, y, si se desea, en combinación con otros productos farmacéuticos activos, cuando sea necesario, bajo condiciones asépticas. Se hace referencia nuevamente a los documentos US-A-6.372.778, US-A-6.369.086, US-A-6.369.087 y US-A-6.372.733 y la técnica anterior adicional mencionada anteriormente, así como a los manuales estándar, tal como la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences.

Las preparaciones farmacéuticas de la invención están preferiblemente en una forma de dosificación unitaria, y pueden estar adecuadamente empacadas, por ejemplo, en una caja, blíster, vial, botella, sobrecito, ampolla o en cualquier otro recipiente o contenedor adecuado de dosis única o múltiples dosis (que puede estar debidamente etiquetado); opcionalmente con uno o más folletos que contienen información del producto y/o instrucciones de uso. Generalmente, tales dosificaciones unitarias contendrán entre 0,1 y 1.000 mg.

Los productos se pueden administrar por una variedad de rutas que incluyen las rutas intralinfática, intratumoral, oral, rectal, ocular, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal, dependiendo principalmente de la preparación específica utilizada y la afección a tratar o prevenir. Al menos un producto de la invención generalmente se administrará en una "cantidad efectiva", lo que significa cualquier cantidad de un producto que, con una administración adecuada, es suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en el individuo al que es administrado. Por lo general, dependiendo de la afección que se esté previniendo o tratando y la vía de administración, dicha cantidad efectiva generalmente estará entre 0,01 y 1.000 mg por kilogramo de peso corporal del paciente por día, que se puede administrar como una única dosis diaria, dividida en una o más dosis diarias, o esencialmente de manera continua, por ejemplo, usando una infusión de goteo. El médico tratante puede determinar la cantidad o cantidades a administrar, la vía de administración y el régimen de tratamiento adicional, dependiendo de factores tales como la edad, el sexo y el estado general del paciente y la naturaleza y gravedad de la enfermedad/síntomas a tratar. Se hace referencia nuevamente a los documentos US-A-6.372.778, US-A-6.369.086, US-A-6.369.087 y US-A-6.372.733 y la técnica anterior adicional mencionada anteriormente, así como a los manuales estándar, tal como la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences.

De acuerdo con la presente divulgación, dicha composición farmacéutica puede administrarse por separado en diferentes momentos durante el curso de la terapia o al mismo tiempo en formas de combinación divididas o únicas. Por lo tanto, debe entenderse que la presente divulgación abarca todos los regímenes de tratamiento simultáneo o alternante y el término "administrar" debe interpretarse en consecuencia.

Para una forma de administración oral, las composiciones de la presente invención se pueden mezclar con aditivos adecuados, tales como excipientes, estabilizadores o diluyentes inertes, y convertirlos por medio de los métodos habituales a las formas de administración adecuadas, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas duras, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas. Ejemplos de portadores inertes adecuados son goma arábiga, magnesia, carbonato de magnesio, fosfato de potasio, lactosa, glucosa o almidón, en particular almidón de maíz. En este caso, la preparación se puede llevar a cabo tanto en forma de gránulos secos como húmedos. Los excipientes o disolventes oleosos adecuados son aceites vegetales o animales, tales como aceite de girasol o aceite de hígado de bacalao. Los disolventes adecuados para soluciones acuosas o alcohólicas son agua, etanol, soluciones azucaradas o mezclas de los mismos. Los polietilenglicoles y polipropilenglicoles son también útiles como auxiliares adicionales para otras formas de administración. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones

pueden contener celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, diluyentes, disgregantes y lubricantes conocidos en la técnica.

5 Cuando se administran mediante aerosol nasal o inhalación, estas composiciones se pueden preparar de acuerdo con técnicas bien conocidas en el arte de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración en forma de aerosoles o atomizadores son, por ejemplo, soluciones, suspensiones o emulsiones de los productos de la invención o sus sales fisiológicamente tolerables en un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como etanol o agua, o una mezcla de tales solventes. Si es necesario, la formulación también puede contener adicionalmente otros auxiliares farmacéuticos tales como tensioactivos, emulsionantes y estabilizantes, así como un propelente.

15 Para la administración subcutánea, el producto de acuerdo con la invención, si se desea con las sustancias habituales, tales como solubilizantes, emulsionantes u otros auxiliares, se llevan a la solución, suspensión o emulsión. Los productos de la invención también se pueden liofilizar y los liofilizados obtenidos se usan, por ejemplo, para la producción de preparaciones de inyección o infusión. Los disolventes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina fisiológica además de soluciones azucaradas tales como soluciones de glucosa o manitol, o alternativamente mezclas de los diversos disolventes mencionados. Las soluciones o suspensiones inyectables pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida, usando diluyentes o disolventes no tóxicos, parenteralmente aceptables, tales como manitol, agua, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro de sodio, o agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados, tales como como aceites fijos, insípidos y estériles, incluidos los mono o diglicéridos sintéticos y los ácidos grasos, incluido el ácido oleico.

25 Cuando se administran por vía rectal en forma de supositorios, estas formulaciones se pueden preparar mezclando los productos de acuerdo con la invención con un excipiente no irritante adecuado, como manteca de cacao, ésteres de glicéridos sintéticos o polietilenglicoles, que son sólidos en condiciones normales de temperatura, pero se licuan y/o disuelven en la cavidad rectal para liberar el medicamento.

30 En realizaciones preferidas, los productos y composiciones de la invención se usan localmente, por ejemplo, tópicos o tanto en aplicaciones absorbidas como no adsorbidas.

35 Las composiciones son valiosas en el campo veterinario, que para los fines del presente documento no solo incluyen la prevención y/o tratamiento de enfermedades en animales, sino también - para animales económicamente importantes tales como ganado, cerdos, ovejas, pollos, peces, etc. - potenciando el crecimiento y/o el peso del animal y/o la cantidad y/o la calidad de la carne u otros productos obtenidos del animal. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición para uso veterinario que contiene al menos un producto de la invención y al menos un vehículo adecuado (es decir, un vehículo adecuado para uso veterinario). La invención también se refiere al uso de un producto de la invención en la preparación de dicha composición.

#### 40 Ejemplos

##### Material y métodos generales

#### 45 Experimentos in vitro: generación de DC derivadas de monocitos

Se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como fuente de precursores de DC y se aislaron de productos de leucoféresis. Se generaron DC de grado clínico in vitro de la fracción adherente plástica de la siguiente manera. El día 0, las PBMC se sembraron en placa a una densidad de  $10 \times 10^6$  células/mL en un medio adecuado para el cultivo de células hematopoyéticas suplementado con un 2% de plasma autólogo (AP). Las células se dejaron durante 2 h para permitir la adherencia plástica de los monocitos a 37°C. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavado, y las células adherentes se cultivaron en medio suplementado con 1% de AP, 1.000 U/mL de GM-CSF y 500 U/mL de IL-4 en el Cell Factory. El día 2 y 4, se añadió medio que contenía la cantidad de citoquina del día 0 al cultivo de DC. El día 6 de cultivo de DC, las células se cosecharon y se crioconservaron.

#### 55 Experimentos in vitro: electroporación de DC

El día 6, se electroporaron  $4 - 8 \times 10^6$  DC con ARNm como se indica. Antes de la electroporación, las DC se lavaron dos veces, primero con PBS sin complementos y en segundo lugar con medio reducido en suero sin rojo de fenol. Después de la segunda etapa de lavado, las DC se resuspendieron en un volumen final de 200  $\mu$ L de medio reducido en suero que contiene el ARNm. La electroporación se realizó en una cubeta de electroporación con ranura de 4 mm. Se utilizó un pulso de decaimiento exponencial con las siguientes condiciones: voltaje, 300 V; capacitancia, 150  $\mu$ F y resistencia,  $\infty\Omega$ , lo que resulta en un tiempo de pulso de  $\approx 11$  ms. Inmediatamente después de la electroporación, las DC se diluyeron en medio complementado con 1% de suero huAB y PS/L-GLU y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. No se agregaron citoquinas adicionales a las DC después de la electroporación.

Experimentos in vivo: ratones

Ratones DBA/2 hembra de 6 a 12 semanas de edad.

5 Experimentos in vivo: líneas celulares de ratón

La línea celular de mastocitoma P815 se obtuvo de C. Uyttenhove (Universidad Católica de Lovaina, Lovaina-La-Neuve, Bélgica).

10 Experimentos in vivo: inoculación de células tumorales y administración in situ de ARNm

Para hacer crecer tumores palpables, a los ratones se les inyectaron  $5 \times 10^5$  células tumorales P815 por vía subcutánea en ambos flancos, como se indicó en el experimento. Para la administración intratumoral de ARNm, los ratones se anestesiaron con isoflurano (Abbott). Los tumores se inyectaron con una mezcla que contenía 10  $\mu\text{g}$  de cada componente de ARNm TriMix en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Se inyectó el tumor con solución de Hartman 0,8x cuando alcanzó un volumen de aproximadamente 100  $\text{mm}^3$ . Se usó la misma cantidad de ARNm entre los diferentes grupos. El ARNm que codifica tNGFR producido a partir de un vector pGEM sirvió como control.

20 Ejemplo 1

Material y métodos específicos

La generación de iDC y las condiciones de electroporación se realizan como se describe en material y métodos generales más arriba. Las iDC se electroporaron con 5  $\mu\text{g}$  de cada componente de TriMix para permitir la maduración de las DC. Todas las tinciones citométricas de flujo se realizaron en PBS/BSA/azida. Para analizar la expresión de CD70, se usó anti CD70-isotiocianato de fluoresceína (FITC). La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACSFortessa (BD) y se analizó mediante el software FACS Diva.

30 Resultado:

Veinticuatro horas después de la electroporación, las DC se tiñeron para su expresión en superficie de CD70. Estos resultados muestran que después de la electroporación de las iDC con TriMix, la intensidad de la expresión de CD70 - intensidad de fluorescencia media (MFI) - es significativamente mayor después de la electroporación con TriMix codificada por el plásmido pUC TE ENE (SEQ ID NO: 5) que contiene ambos elementos reguladores (TE + ENE), cuando se compara con el vector pUC (base del plásmido pUC TE ENE), el vector pUC TE y el vector pUC ENE. La expresión de CD70 después de electroporación con TriMix codificada por el plásmido pUC TE ENE es significativamente mayor, mientras que tanto el uso de pUC TE como de pUC ENE da como resultado niveles reducidos o a lo sumo iguales de expresión de CD70 en comparación con pUC que carece de estos elementos (Figura1). Por lo tanto, la presencia de ambos elementos (TE y ENE) en el vector parece tener un efecto sinérgico inesperado en términos de aumentar la expresión de CD70 después de la electroporación con TriMix codificada por el plásmido pUC TE ENE.

45 Ejemplo 2

Material y métodos específicos:

Las condiciones de generación y electroporación de iDC se realizan como se describe en material y métodos generales más arriba. Las iDC se electroporaron con 20  $\mu\text{g}$  de ARNm que codifica WT1 para permitir la carga de antígeno. Para analizar la expresión de WT1 intracelular, las células se fijaron y se permeabilizaron, y se tiñeron intracelularmente con un anticuerpo monoclonal anti-WT1 (clon 6F-H2, Dako Cytomation, Carpinteria, CA). Se utilizó un anticuerpo antirratón marcado con PE con el mismo isotipo de IgG como Ab secundario (Becton y Dickinson, Erembodegem, Bélgica). El anticuerpo no reactivo del mismo isotipo (eBioscience, Viena, Austria) se utilizó como control. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACSFortessa (BD) y se analizó mediante el software FACS Diva.

55 Resultado:

Estos resultados muestran que después de la electroporación de iDC con WT1 codificado por el vector pUC TE ENE, se observa una expresión de WT1 más prolongada cuando se compara con los otros vectores que codifican el ARNm de WT1 (Figura 2). Estos datos muestran muy bien las diferentes formas de acción de los segmentos 5'TE y 3'ENE. Si bien la expresión del ARNm del vector pUC-TE es alta después de 4 horas, se deteriora rápidamente. La traducción del ARN que contiene ENE es más baja que todas las demás durante todo el período. El vector PUC TE ENE tiene la más alta traducibilidad del TE y el efecto más prolongado de la secuencia de ENE. El nivel de expresión de WT1 disminuye a una velocidad significativamente más lenta que en los otros vectores.

65 Ejemplo 3

Material y métodos específicos:

5 Las condiciones de generación y electroporación de las iDC se llevan a cabo como se divulga en material y métodos general más arriba. Las iDC se electroporaron conjuntamente con 5 µg de ARNm que codifica eGFP y TriMix (5 µg de cada componente) para permitir la carga de antígeno y la maduración de las DC. La expresión de eGFP se evaluó mediante citometría de flujo en varios momentos.

Resultado:

10 Se siguió la expresión de eGFP en varios puntos de tiempo después de la electroporación (Figura 3). Estos resultados muestran que el nivel de expresión de eGFP de ambos vectores es comparable 4 horas después de la electroporación. Sin embargo, en puntos temporales posteriores está claro que la expresión del ARNm derivado de pUC TE ENE es significativamente mayor. De nuevo, esto apunta a una expresión más estable y prolongada del transgén.

Ejemplo 4

Material y métodos específicos:

20 Las condiciones de generación y electroporación de las iDC se realizan como se describió anteriormente. Las iDC se electroporaron con 5 µg de cada componente de TriMix para permitir la maduración de las DC. Todas las tinciones citométricas de flujo se realizaron en PBS/BSA/azida. Para analizar la expresión de moléculas de superficie en la superficie celular de las DC, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD40-APC (Alofocianina),  
25 CD70-FITC, CD80-PE, CD83-PE (ficoeritrina), CD86-PE y CCR7- APC. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACSFortessa (BD) y se analizó mediante el software FACS Diva.

Resultado:

30 La electroporación de las iDC con ARNm de TriMix codificado por el vector pUC TE EEN es capaz de inducir la maduración de las DC (Figura 4).

Ejemplo 5: modelo tumoral bilateral con P815: tratamiento único de un tumor

Material y métodos específicos:

35 Para hacer crecer tumores palpables, se inocularon ratones con  $5 \times 10^5$  células tumorales P815 por vía subcutánea en ambos flancos. La terapia se inició cuando ambos tumores alcanzaron un volumen inyectable de aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ . Mediante el uso de un modelo de tumor de dos lados en el que solo se trató un tumor,  
40 se intentó evaluar el efecto sistémico de la estrategia de vacunación. Por lo tanto, solo el tumor izquierdo se inyectó con ARNm de control o ARNm TriMix de pUC TE ENE (10 µg de cada componente de ARNm) disuelto en solución de Hartmann 0,8 x. La respuesta inmune antitumoral sistémica se evaluó midiendo el tamaño de tumor contralateral tratado y no tratado y por supervivencia.

Resultado:

45 Mediante el uso de un modelo de tumor de dos lados, se podría evaluar el efecto sistémico de la estrategia de inmunización. La administración intratumoral individual de ARNm TriMix de pUC TE ENE dio como resultado un crecimiento tumoral significativamente reducido del tumor contralateral tratado y no tratado (Figura 5). El efecto de la  
50 vacunación en el tumor distante podría ser una indicación de que una sola inyección intratumoral de TriMix podría usarse para tratar múltiples lesiones tumorales.

Ejemplo 6: Modelo de tumor de dos lados con P815: tratamiento único de un tumor, solución Hartmann y tNGFR como control

Material y métodos específicos:

55 Para hacer crecer tumores palpables, se inocularon ratones con  $5 \times 10^5$  células tumorales P815 por vía subcutánea en ambos flancos. La terapia se inició cuando ambos tumores alcanzaron un volumen inyectable de  
60 aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ . Mediante el uso de un modelo de tumor de dos lados por el cual solo se trató un tumor, se intentó evaluar el efecto sistémico de la estrategia de vacunación. Por lo tanto, sólo el tumor izquierdo se inyectó con vehículo (0,8 solución de Hartmann), ARNm de control o ARNm TriMix de pUC TE ENE (10 µg de cada componente de ARNm) disuelto en solución de Hartmann 0,8x, todo en un volumen total de 50 µL/tumor inyectado.  
65 La respuesta inmune antitumoral sistémica se evaluó midiendo el tamaño de tumor contralateral tratado y no tratado y por supervivencia.

Resultado:

Mediante el uso de un modelo de tumor de dos lados, se podría evaluar el efecto sistémico de la estrategia de inmunización. Este experimento confirma las observaciones anteriores, es decir

- 5 1. La administración intratumoral individual de ARNm TriMix de pUC TE ENE dio como resultado un crecimiento tumoral significativamente reducido del tumor contralateral tratado y no tratado.
2. La administración intratumoral individual de ARNm TriMix de pUC TE ENE dio como resultado una supervivencia prolongada de los ratones con tumor
- 10 3. El efecto de la vacunación fue más pronunciado en los tumores tratados.

Además, tomando un grupo cuyos tumores fueron tratados con vehículo, se podría demostrar el efecto adyuvante del propio ARNm.

15 Ejemplo 7: Comparación de diferentes secuencias de TE

Material y métodos específicos:

20 Los detalles con respecto a los métodos de ensayo específicos en relación con esto se pueden encontrar en los ejemplos 2 y 3 como se describió anteriormente.

Resultado: electroporación de iDC con WT1 o eGFP

25 La electroporación de iDC con WT1 (Fig. 9A) o eGFP (Fig. 9B) codificada por los vectores pUC TE ENE ya sea que comprendan un elemento TE representado por la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 no dio como resultado una diferencia significativa de expresión de WT1 o eGFP, respectivamente. Estos datos indican claramente que las secuencias que tienen al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, tal como por ejemplo la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, podrían usarse indistintamente como el elemento potenciador de la traducción en los vectores de acuerdo con esta invención.

30 REFERENCES

35 Bonehill A, Tuyraerts S, Van Nuffel AM, Heirman C, Bos TJ, Fostier K, Neyns B, Thielemans K - Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding ARNm. - Mol Ther. Junio de 2008; 16(6): 1170-80.

Conrad NK, Steitz JA - A Kaposi's sarcoma virus RNA element that increases the nuclear abundance of intronless transcripts. - EMBO J. 2005, 18 de mayo; 24(10): 1831-41.

40 Conrad NK, Mili S, Marshall EL, Shu MD, Steitz JA - Identification of a rapid mammalian deadenylation-dependent decay pathway and its inhibition by a viral RNA element. Mol Cell. 2006; 24: 943-953.

45 Diken M, Kreiter S, Selmi A, Britten CM, Huber C, Türeci Ö, Sahin U - Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation. - Gene Ther. Julio de 2011; 18(7): 702-8.

50 Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, Pfeiffer R, Ojkić-Zrna S, Probst J, Kallen KJ - Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. - J Immunother. Enero de 2011; 34(1): 1-15.

Hu MC, Tranque P, Edelman GM, Mauro VP. - rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of ARNm specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base-pairing to 18S rRNA affects translational efficiency. - Proc Natl Acad Sci USA. Febrero de 1999, 16; 96(4): 1339-44.

55 Jaleco et al. - Genetic modification of human B-cell development: B-cell development is inhibited by the dominant negative helix loop helix factor Id3. - Blood, American Society of Hematology. Octubre de 1999, 15; Vol 94, No. 8, páginas 2637-2646.

60 Kazimierz et al., - Conservation of a Triple-Helix-Forming RNA stability Element in Noncoding and Genomic RNAs of Diverse Viruses. - Cell Reports. Julio de 2012, 05; Vol 2, No. 1 páginas 26-32.

65 Massimelli et al. - Stability of a Long Noncoding Viral RNA depends on a 9-nt Core Element at the RNA 5' End to Interact with Viral ORF57 and Cellular PABPC1. - International Journal of Biological Sciences. Octubre de 2011, 16; Vol. 7 No. 8 páginas 1145-1160.

Mitton-Fry R.M., DeGregorio S.J., Wang J, Steitz TA, Steitz J.A. - Poly(A) tail recognition by a viral RNA element

through assembly of a triple helix. - Science. 2010; 330: 1244-1247.

Pawlicki et al. - Primary microRNA transcript retention at sites of transcription leads to enhanced microRNA production. - Microbiology and Molecular Biology Reviews. Julio de 2008, 07; Vo. 63, N° 2 páginas 61-76.

5 Sun R, Lin SF, Gradoville L, Miller G. -Polyadenylylated nuclear RNA encoded by Kaposi sarcoma-associated virus del herpes. - Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 11883-11888.

10 Van Lint Sandra, Goyvaerts Cleo, Maenhout Sarah, et al., - Preclinical Evaluation of TriMix and Antigen ARNm-Based Antitumor Therapy - Cancer Res. 2012; 72: 1661-1671.

Listado de secuencias

15 <110> Vrije Universiteit Brussel

<120> VECTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE ARN Y SUS USOS

20 <130> ETR-003

<150> EP EP13192555.4

<151> 2013-11-12

25 <160> 5

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 204

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

35 <222> 1..204

<223> /organismo = "Secuencia artificial" /nota = "Potenciador de Traducción" /tipo de molécula = "ADN no asignado"

<400> 1

40           ggccggcgggg tttctgacat ccggcggggtt tctgacatcc ggcggggttc tgacatccgg           60  
               cgggtttctg acatccggcg ggtgaattct tctgacatcc ggcggggttc tgacatccgg           120  
               cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcggggtg           180  
               actcacaacc aggcctccac aacc   204

<210> 2

<211> 238

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

50 <222> 1..238

<223> /organismo = "Secuencia artificial" /nota = "Potenciador de Traducción" /tipo de molécula = "ADN no asignado"

<400> 2

55

ES 2 666 380 T3

aagctttaat acgactcact atagggccgg cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac 60  
 atccggcggg tttctgacat ccggcgggtt tctgacatcc ggcgggttcc tgacatccgg 120  
 cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcgggtt 180  
 tctgacatcc ggcgggttcc tgacattcac aaccaggcct ccacaacat ggctcgag 238

<210> 3  
 <211> 238  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..238  
 <223> /organismo = "Secuencia artificial" /nota = "Potenciador de Traducción" /tipo de molécula = "ADN no asignado"

<400> 3

aagctttaat acgactcact atagggccgg cgggaattctg acatccggcg gaattctgac 60  
 atccggcggg attctgacat ccggcgggaat tctgacatcc ggcgggaattc tgacatccgg 120  
 cgggaattctg acatccggcg gaattctgac atccggcggg attctgacat ccggcgggaat 180  
 tctgacatcc ggcgggaattc tgacattcac aaccaggcct ccacaacat ggctcgag 238

<210> 4  
 <211> 85  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..85  
 <223> /organismo = "Secuencia artificial" /nota = "Elemento de Retención Nuclear"/tipo de molécula = "ADN no asignado"

<400> 4

tcgagtgttt tggctgggtt tttccttggt cgcaccggac acctccagtg accagacggc 60  
 aaggttttta tcccagtgta tattg 85

<210> 5  
 <211> 3102  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..3102  
 <223> /organismo = "Secuencia artificial" /nota = "Vector pUC TE ENE vacío" /tipo de molécula = "ADN no asignado"

<400> 5

ES 2 666 380 T3

```
taatacgact cactataggg ccggcggggtt tctgacatcc ggcggggttc tgacatccgg      60
cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcggggtt      120
tctgacatcc ggcggggttc tgacatccgg cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac      180
atccggcggg tttctgacat tcacaaccag gcctccacaa ccctcgagtg ttttggctgg      240
gttttccctt gttcgcaccg gacacctcca gtgaccagac ggcaagggtt ttatcccagt      300
gtatattgtc gacaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      360
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      420
```

ES 2 666 380 T3

aaaaaaaaaa aaaaaaagca ggtgtgtctc tctccacctg cgaattcact ggccgtcggt 480  
 ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttaccacaac ttaatcgctc tgcagcacat 540  
 ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag 600  
 ttgctgagcc tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc 660  
 ggtatttcac accgcatatg gtgcaactct agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta 720  
 agccagcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg 780  
 gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca 840  
 ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggctcgtga tacgcctatt tttataggtt 900  
 aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc 960  
 ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 1020  
 taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 1080  
 cgtgtcgccc ttattccctt ttttgccgca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa 1140  
 acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa 1200  
 ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg 1260  
 atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgcggggcaa 1320  
 gagcaactcg gtcgccgat acaactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc 1380  
 acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc 1440  
 atgagtgata acaactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta 1500  
 accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag 1560  
 ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc aatggcaaca 1620  
 acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata 1680  
 gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc 1740  
 tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca 1800  
 ctggggccag atggttaagc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca 1860  
 actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg 1920  
 taactgtcag accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa 1980  
 tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt 2040  
 gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat 2100  
 cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg 2160  
 gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga 2220  
 gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac 2280  
 tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt 2340

ES 2 666 380 T3

ggcgataagt	cgtgtcttac	cgggttggac	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgag	2400
cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	tggagcgaac	gacctacacc	2460
gaactgagat	acctacagcg	tgagctatga	gaaagcgcca	cgcttcccga	agggagaaag	2520
gcgacaggt	atccggtaa	cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	2580
gggggaaacg	cctggtatct	ttatagtcct	gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	2640
cgatTTTTgt	gatgctcgtc	agggggggcg	agcctatgga	aaaacgccag	caacggggcc	2700
TTTTtacggt	tcctggcctt	ttgctggcct	tttgctcaca	tgttctttcc	tgcggtatcc	2760
cctgattctg	tggataaccg	tattaccgcc	tttgagtgag	ctgataccgc	tcgccgcagc	2820
cgaacgaccg	agcgcagcga	gtcagtgagc	gaggaagcgg	aagagcggcc	aatacgcaaa	2880
ccgcctctcc	ccgcgcggtg	gccgattcat	taatgcagct	ggcacgacag	gtttcccgcg	2940
tggaaagcgg	gcagtgagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	agctcactca	ttaggcaccc	3000
caggctttac	actttatgct	tccggctcgt	atgttgtgtg	gaattgtgag	cggataaaaa	3060
ttcacacag	gaaacagcta	tgaccatgat	tacgccaagc	tt		3102

Reivindicaciones

- 5 1. Un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia potenciadora de la traducción (TE) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1, una secuencia de ácido nucleico transcribible y una secuencia de retención nuclear representada por la SEQ ID NO. 4.
- 10 2. El vector de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico transcribible se selecciona del listado que comprende ARNm que codifica CD40L, CD70, caTLR4 o ARNm específico del antígeno/enfermedad.
- 15 3. El vector de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicho potenciador de la traducción está representado por la SEQ ID NO: 1.
- 20 4. Un método para aumentar la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN transcrito in vitro; comprendiendo dicho método las etapas de:  
(i) proporcionar un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha secuencia de ácido nucleico transcribible es una secuencia de ADN transcribible, que corresponde a dicho ARN a transcribir; y  
(ii) transcribir in vitro dicha secuencia de ADN transcribible.
- 25 5. Una molécula de ARN que comprende un potenciador de la traducción (TE) que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1, una secuencia de ácido nucleico transcribible y una secuencia de retención nuclear representada por la SEQ ID NO. 4.
- 30 6. Una molécula de ARN de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende adicionalmente una cola de poli-A.
- 35 7. Una molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en la que dicha secuencia de ácido nucleico transcribible se selecciona del listado que comprende ARNm que codifica CD40L, CD70, caTLR4 o ARNm específico del antígeno/enfermedad.
- 40 8. Una molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que dicho potenciador de la traducción está representado por la SEQ ID NO: 1.
- 45 9. Una composición que comprende una o más moléculas de ARN como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 5-8.
- 50 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha una o más moléculas de ARN representan moléculas de ARNm que codifican CD40L, CD70 y caTLR4.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende adicionalmente ARNm que codifica ARNm específico del antígeno/enfermedad.
12. El uso de una molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8, o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para la introducción en una célula huésped in vitro.
13. Una molécula de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8 o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para uso como medicamento.
14. Un kit que comprende uno o más vectores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3; una o más moléculas de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8; o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11.

Fig. 1

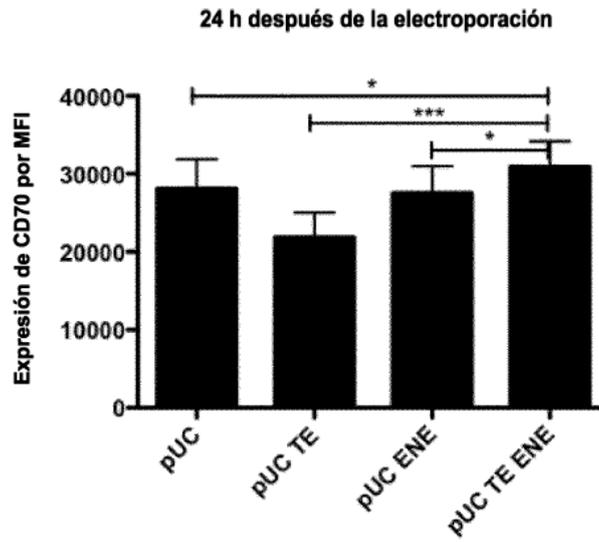
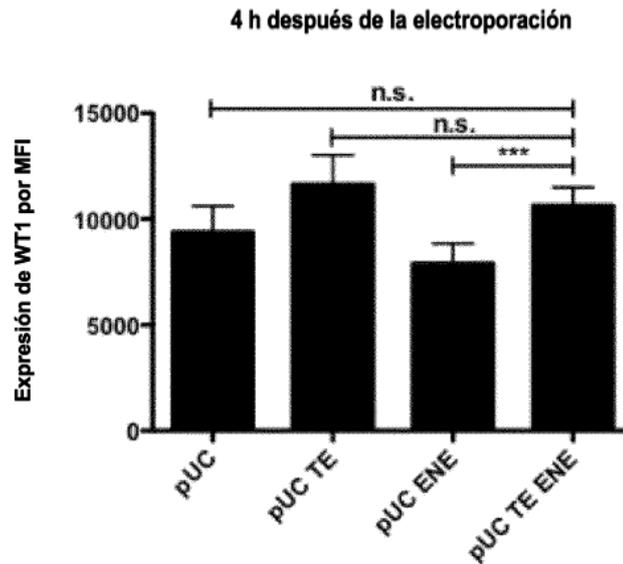
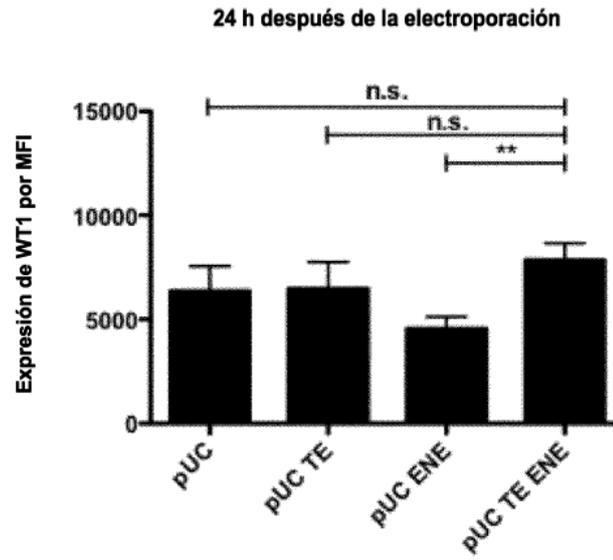


Fig. 2

A



B



C

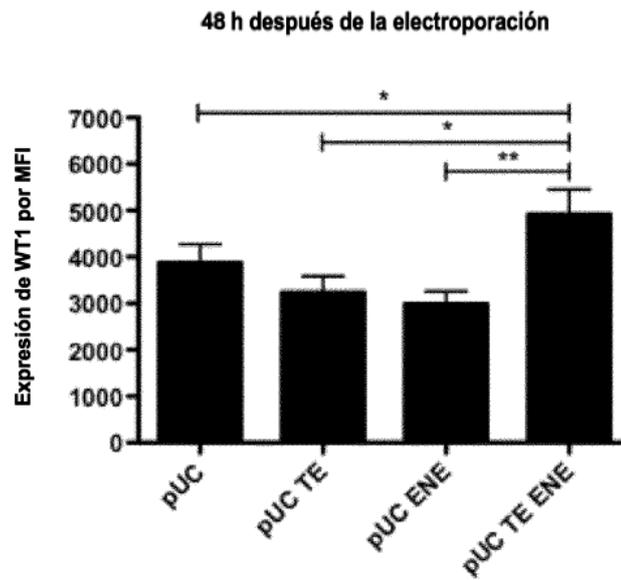


Fig. 3

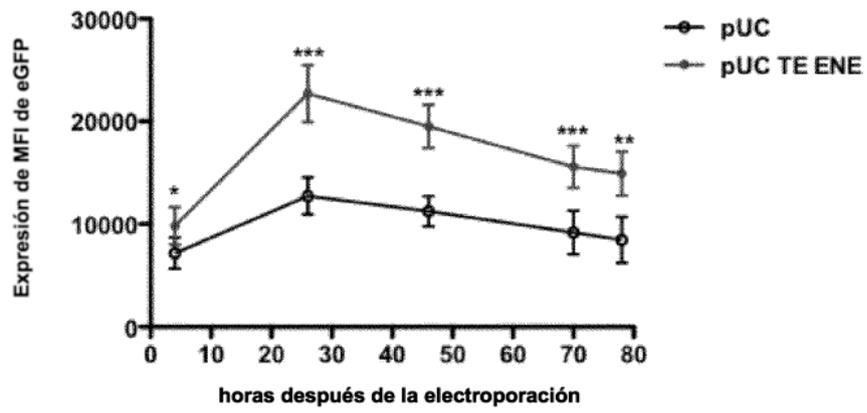
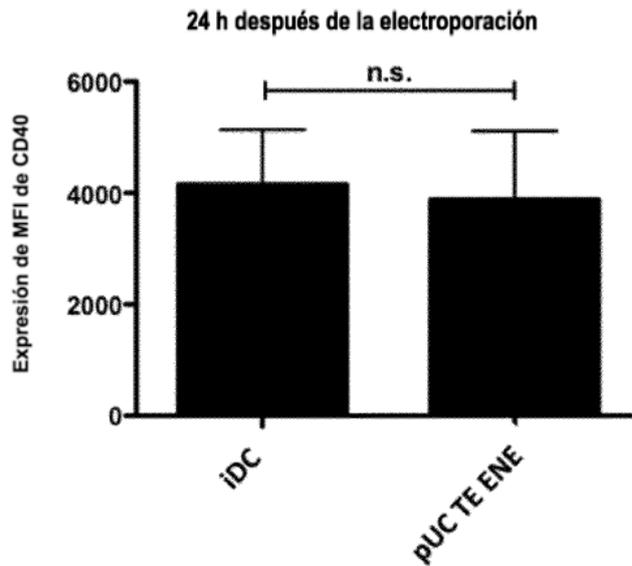
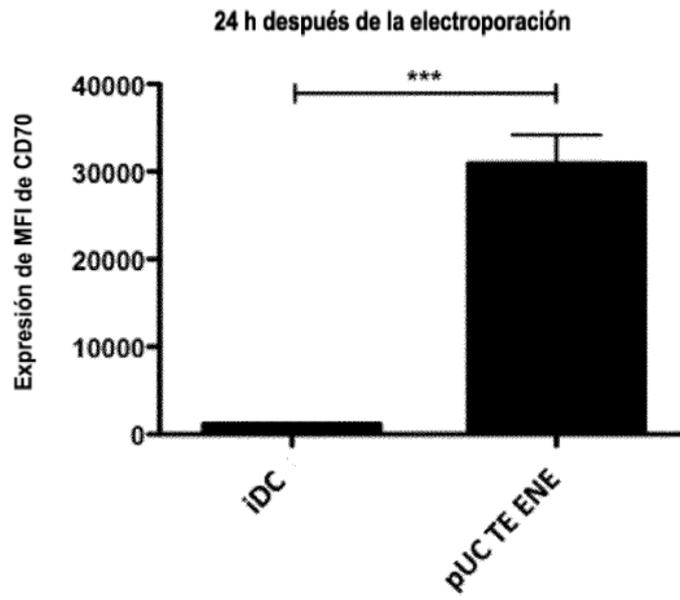


Fig. 4

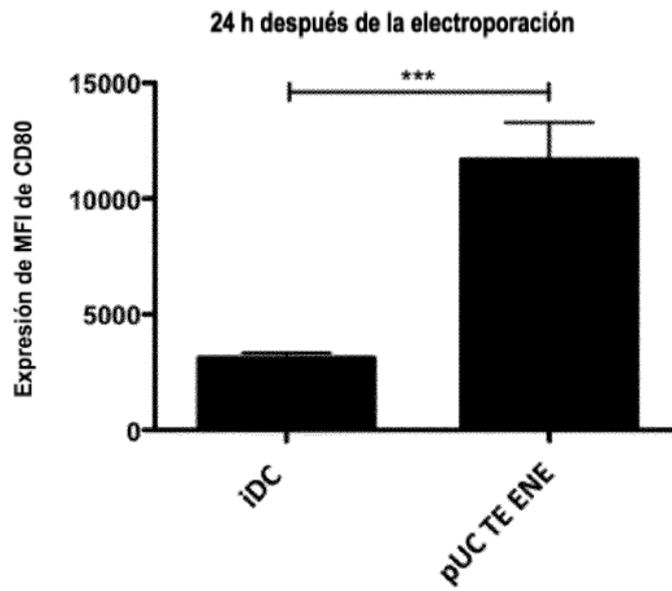
A



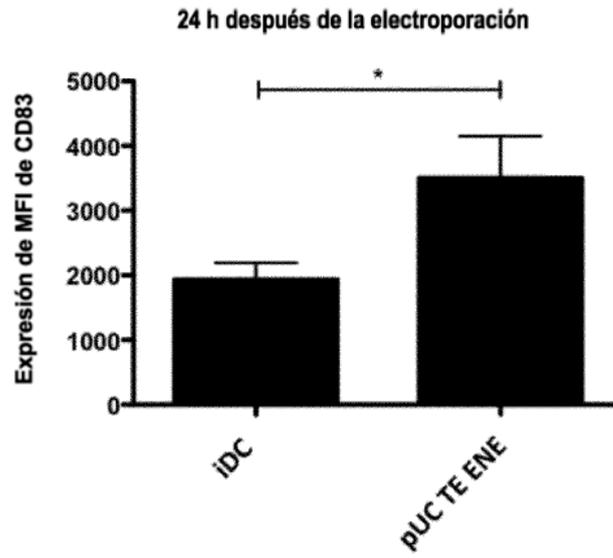
B



C



D



E

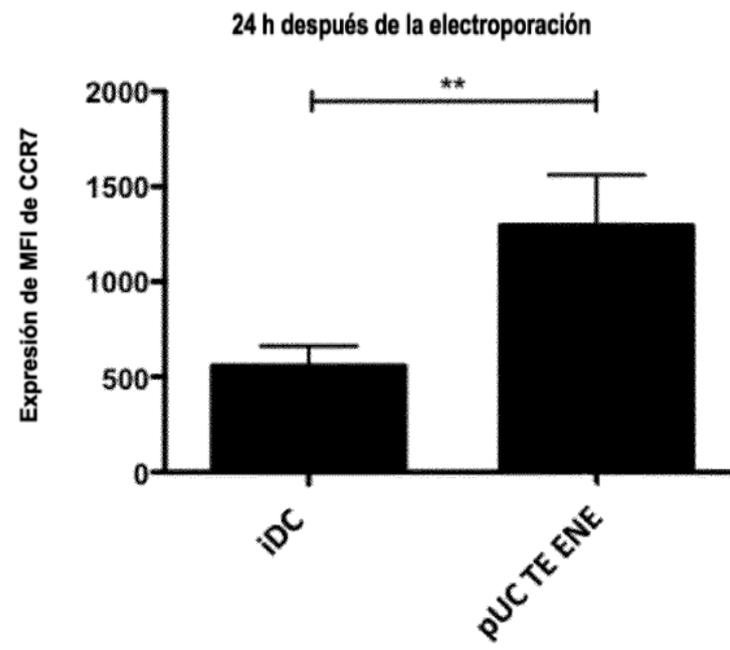
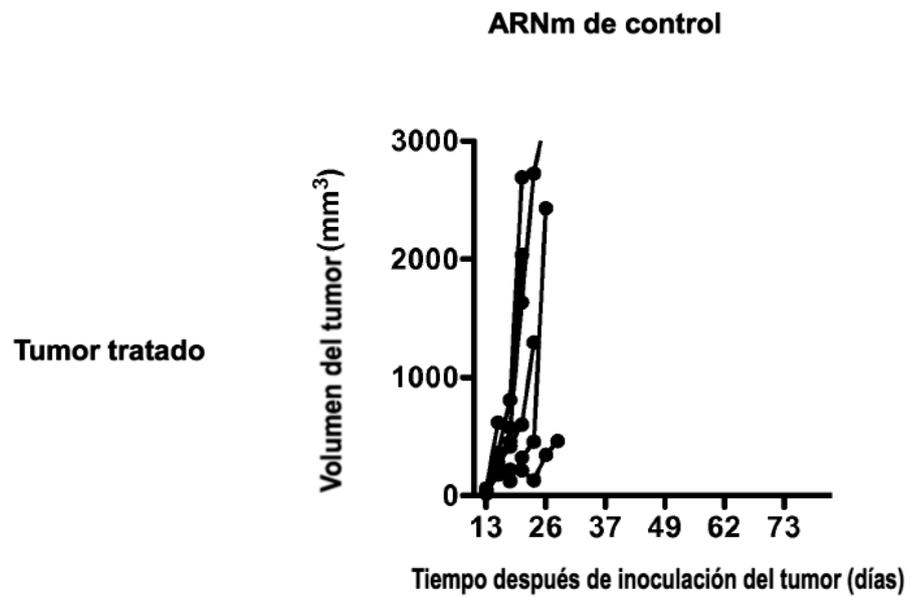
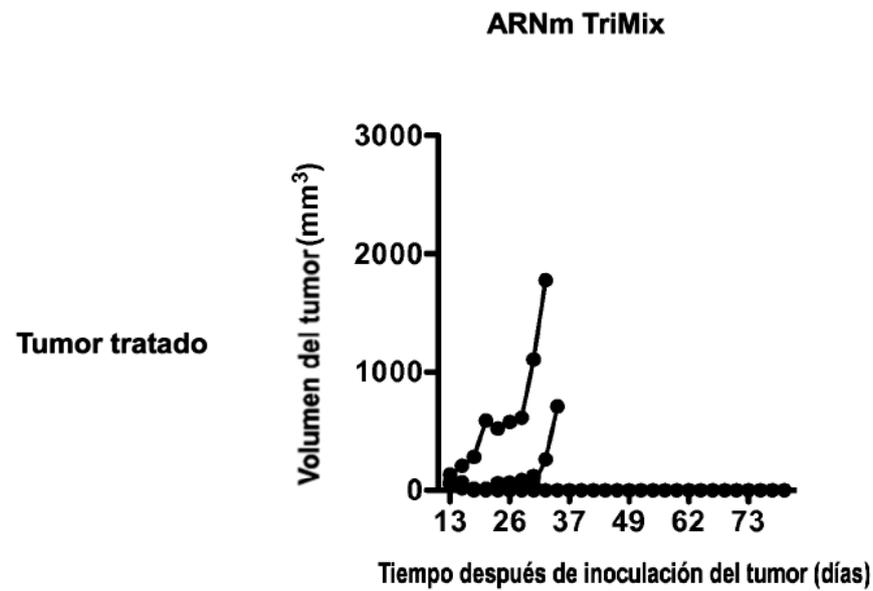


Fig. 5

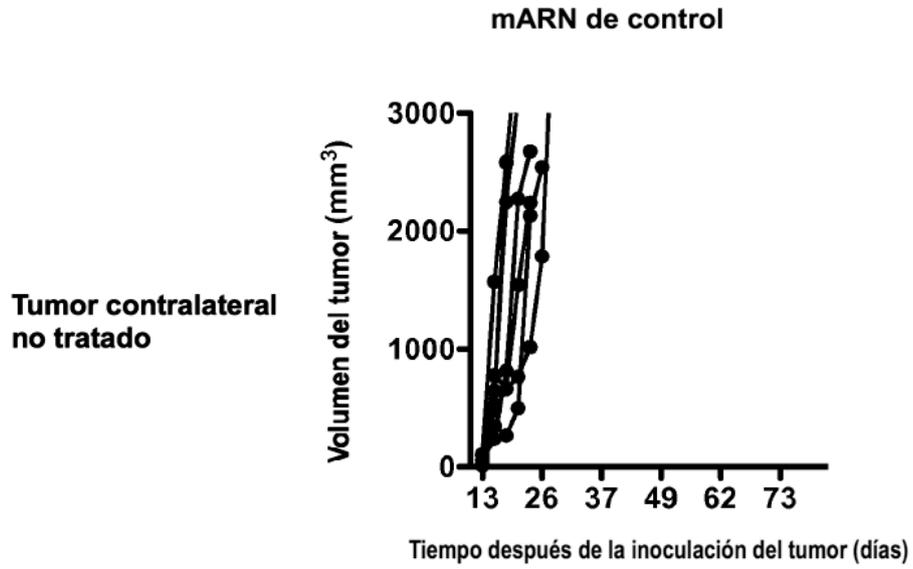
A



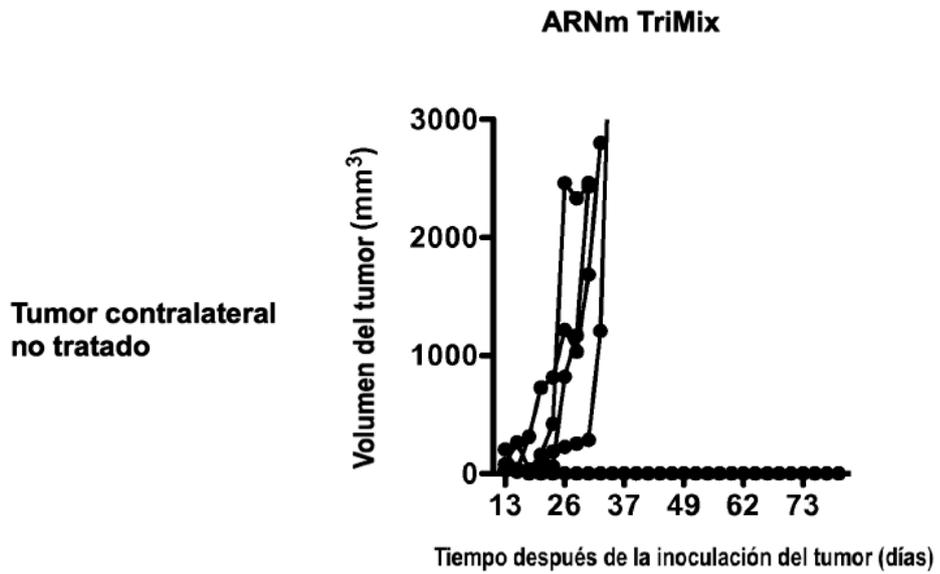
B



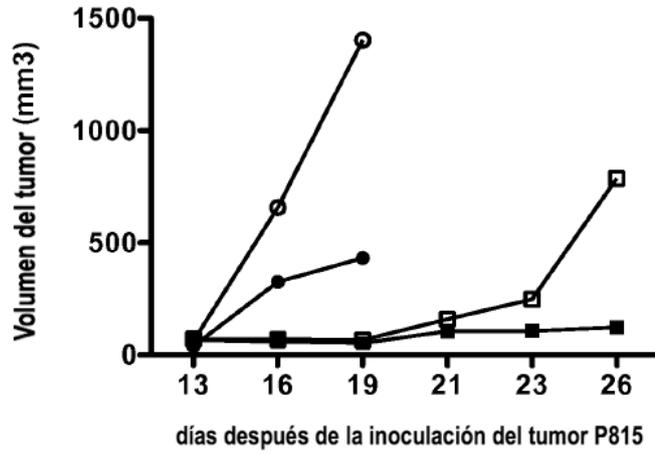
C



D



E



- Tumor tratado con ARNm de control
- Tumor no tratado con ARNm de control
- Tumor tratado con ARNm TriMix
- Tumor no tratado con ARNm TriMix

F

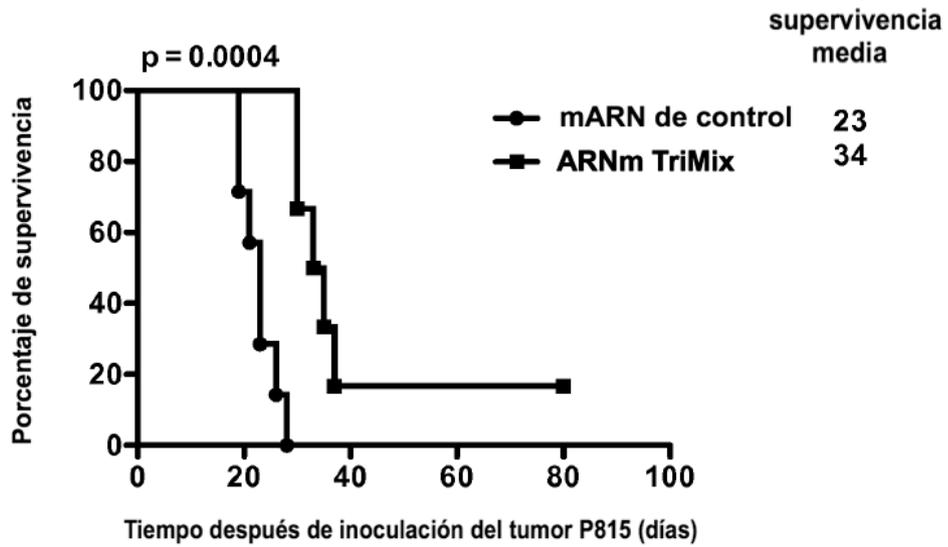
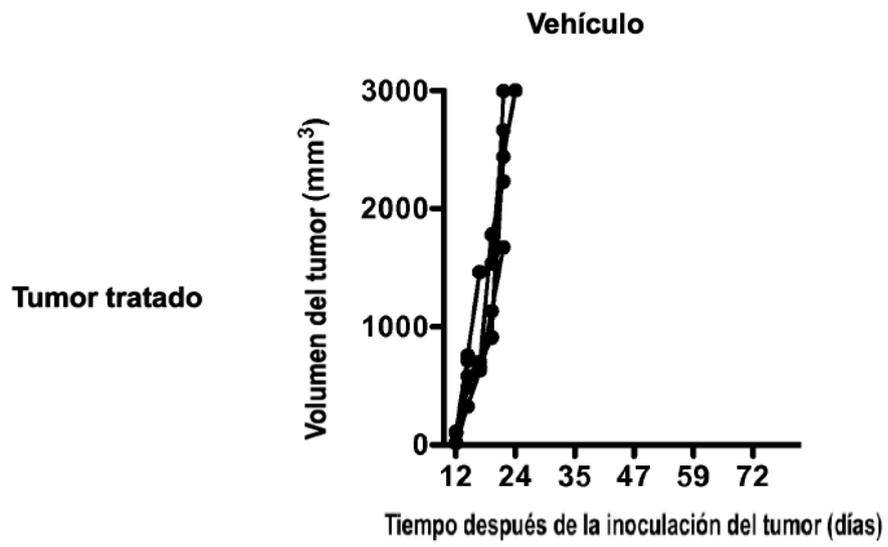
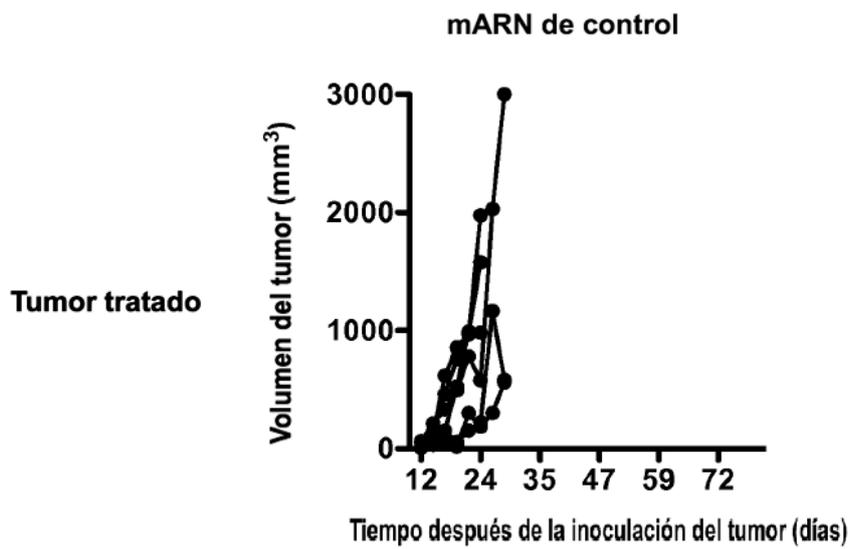


Fig. 6

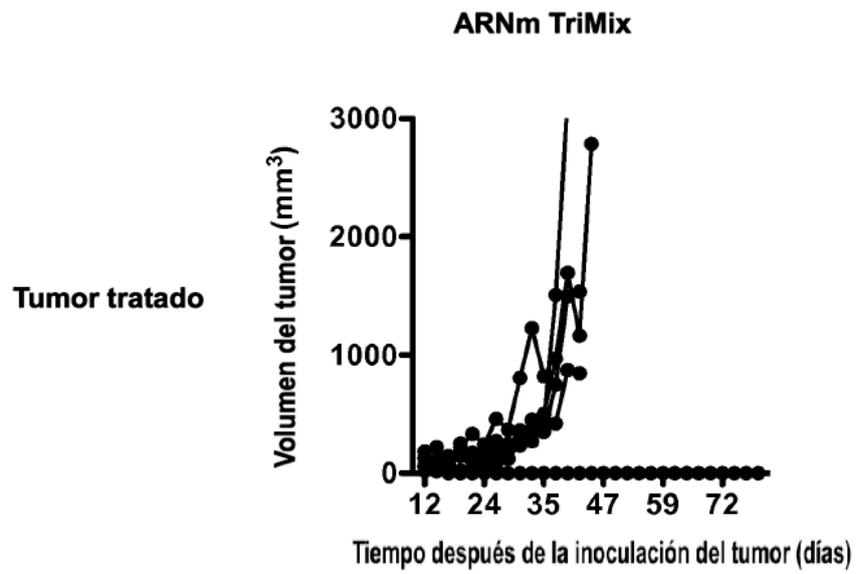
A



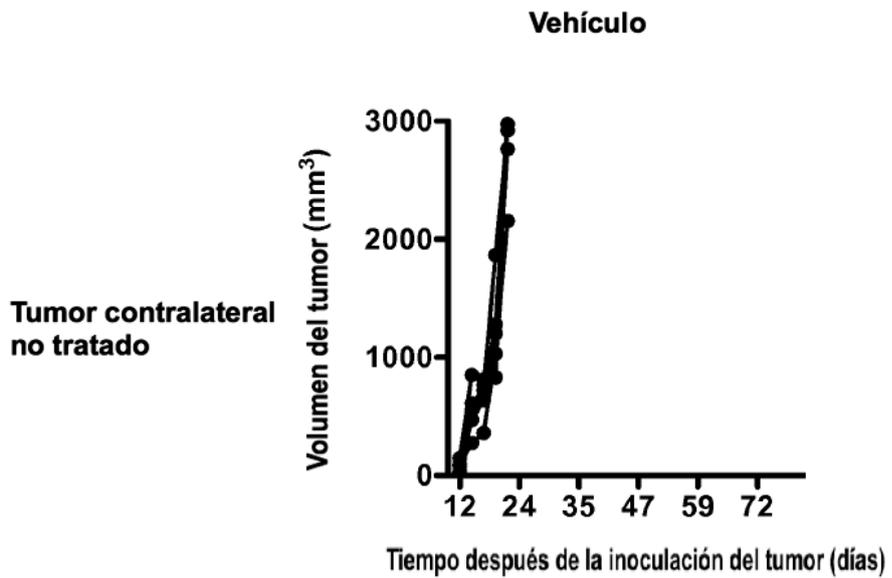
B



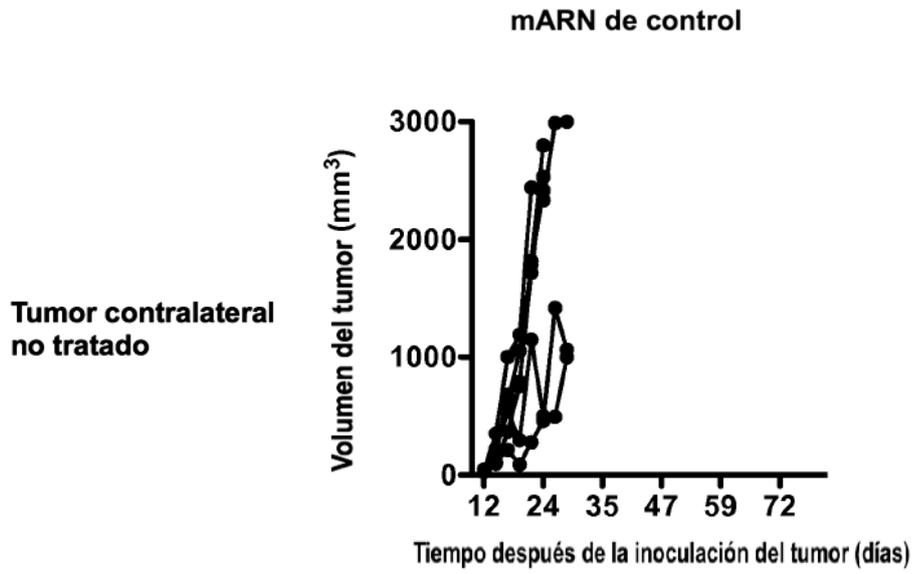
C



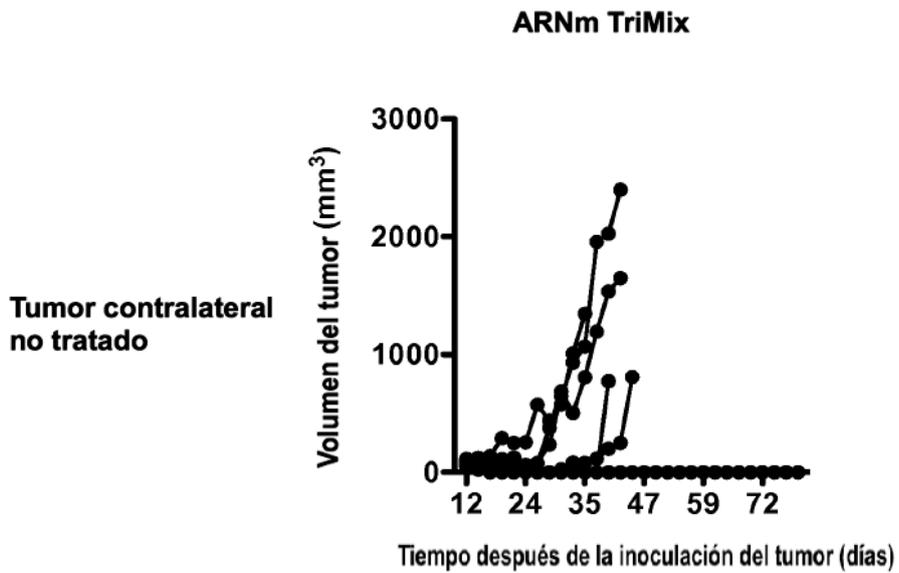
D



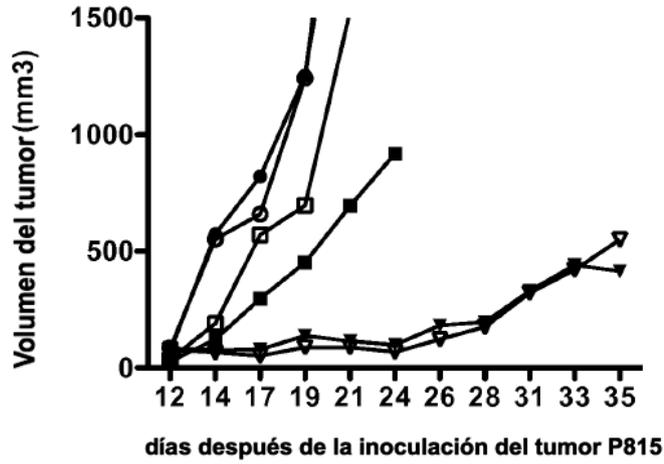
E



F



G



- Tumor tratado con vehículo
- Tumor no tratado con vehículo
- Tumor tratado con ARNm de control
- Tumor no tratado con ARNm de control
- ▲ Tumor tratado con ARNm TriMix
- △ Tumor no tratado con ARNm TriMix

H

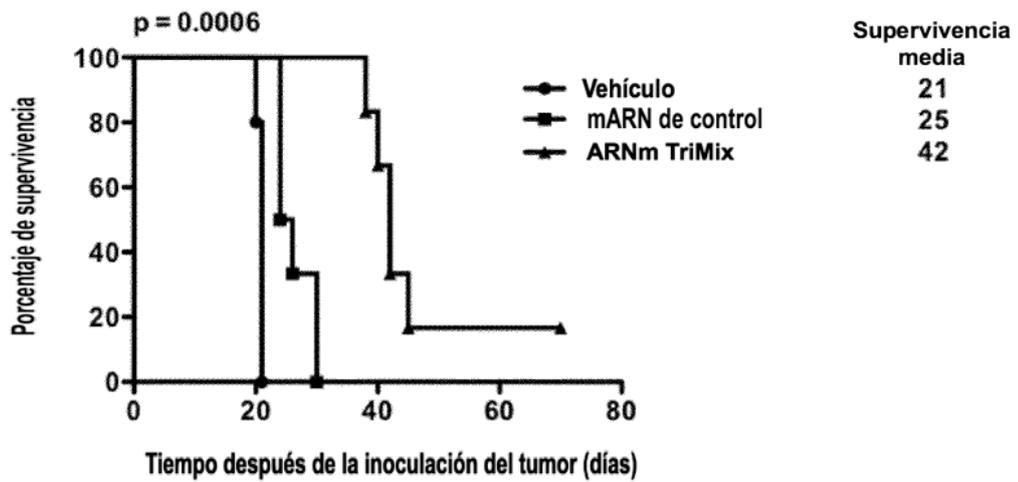


Fig. 7

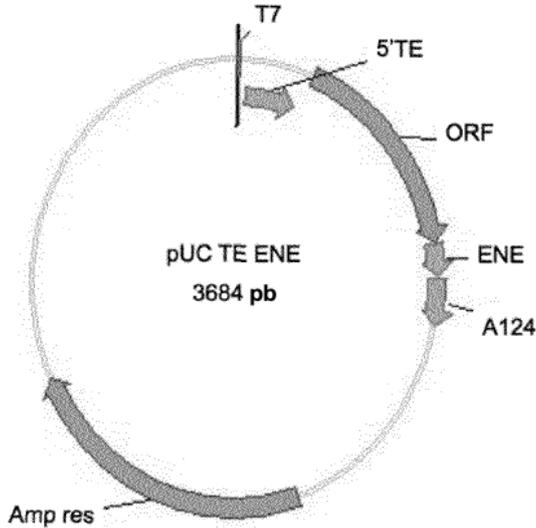


Fig. 8

SEQ ID N° 1:	100%	89%	92%
SEQ ID N° 2:	89%	100%	99%
SEQ ID N° 3:	92%	99%	100%

```

SEQ ID N°3  AAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGCCGGCGGAATTCTGACATCCGGCGGAATTCTGAC
SEQ ID N°1  -----ggCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGAC
SEQ ID N°2  AAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGAC
                *****_:*****_:*****

SEQ ID N°3  ATCCGGCGGAATTCTGACATCCGGCGGAATTCTGACATCCGGCGGAA-----TTCTGAC
SEQ ID N°1  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTGAATTCTTCTGAC
SEQ ID N°2  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGT-----TTCTGAC
                *****_:*****_:*****_:*****

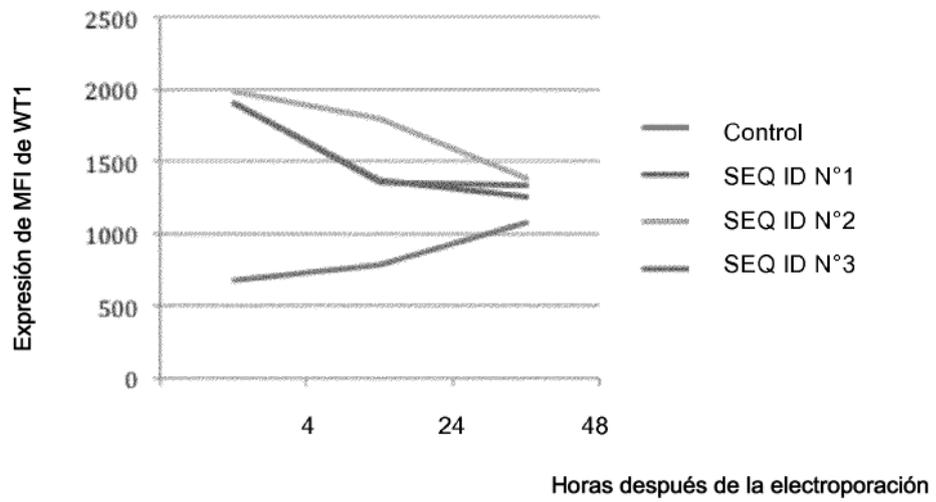
SEQ ID N°3  ATCCGGCGGAATTCTGACATCCGGCGGAATTCTGACATCCGGCGGAATTCTGACATCCGG
SEQ ID N°1  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGG
SEQ ID N°2  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGG
                *****_:*****_:*****_:*****

SEQ ID N°3  CGGAATTCTGACATCCGGCGGAATTCTGACATTCACAACCAGGCCTCCACAACCATGGCT
SEQ ID N°1  CGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTGAC-----TCACAACCAGGCCTCCACAACc-----
SEQ ID N°2  CGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATTCACAACCAGGCCTCCACAACCATGGCT
                ***_:*****_:;*          *****

SEQ ID N°3  CGAG
SEQ ID N°1  ----
SEQ ID N°2  CGAG
    
```

Fig. 9

A



B

