

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 913**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2014** **E 17001347 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 3292873**

54 Título: **Combinación de vacunación e inhibición de la ruta PD-1**

30 Prioridad:

**22.02.2013 WO PCT/EP2013/000526**

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

**04.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FOTIN-MLECZEK, MARIOLA;  
KALLEN, KARL-JOSEF y  
PROBST, JOCHEN**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 739 913 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

Combinación de vacunación e inhibición de la ruta PD-1

5 La presente invención está definida por sus reivindicaciones y se refiere a una combinación de vacuna/inhibidor que comprende (i) como vacuna un ARN de vacuna que comprende al menos un ARN, donde dicho al menos un ARN es un ARNm, que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno y (ii) como inhibidor una composición que comprende un inhibidor de la ruta PD-1, donde el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-L1. La presente invención además se refiere a una composición farmacéutica y al kit de partes que comprende tal combinación vacuna/inhibidor. Además, la presente invención se refiere al uso médico de tal combinación vacuna/inhibidor, de la composición farmacéutica y del kit de partes que comprende tal combinación vacuna/inhibidor, en particular para la prevención o el tratamiento de enfermedades cancerosas o tumorales o de enfermedades infecciosas. Además, la presente invención se refiere a tal vacuna de ARN para su uso en terapia en combinación con un inhibidor de la ruta PD-1 como se define anteriormente y a tal inhibidor de la ruta PD-1 para su uso en terapia en combinación con una vacuna de ARN tal como se define anteriormente.

20 Tradicionalmente, la inmunoterapia del cáncer se ha centrado en estimular el sistema inmunitario mediante la vacunación o la inmunoterapia celular adoptiva para provocar una respuesta anti-tumoral. Este enfoque se basa en la asunción de que las células tumorales expresan dianas antigénicas, pero en que las células T anti-tumorales no se activan lo suficiente. Por tanto, para evitar este problema, se intentó principalmente incrementar el reconocimiento de estas dianas antigénicas estimulando las rutas inmunes innatas y co-estimuladoras positivas claves (tal como los receptores CD28, CD154 y TLR).

25 Más recientemente, se ha hecho evidente que el sistema inmunitario no reconoce antígenos tumorales, sino que permanece en reposo a pesar de estar presentes antígenos tumorales. Esta observación lleva a la hipótesis de que existen mecanismos inhibidores específicos que limitan o incluso detienen la respuesta antitumoral. Esta hipótesis se confirmó cuando se descubrió que las moléculas de superficie de las células T reguladoras negativas eran sobre-reguladas en las células T activadas para amortiguar su actividad, resultando en una muerte menos efectiva de las células tumorales. Estas moléculas inhibitoras se denominaron moléculas co-estimuladoras negativas debido a su homología con las moléculas co-estimuladoras de células T CD28. Estas proteínas, también referidas como proteínas de punto de control inmunes, funcionan en múltiples rutas, incluyendo la atenuación de señales de activación temprana, competencia para la co-estimulación positiva e inhibición directa de antígeno presentador de células (Bour-Jordan *et al.*, 2011. *Immunol Rev.* 241(1): 180-205; PMID: 21488898). Un miembro de esta familia de proteínas es muerte programada-1 (PD-1) y sus ligandos B7-H1/PD-L1 (CD274) y B7-DC/PD-L2 (CD273).

35 PD-1 se expresa en células T y B activadas, así como en monocitos implicados en regular el equilibrio entre la activación inmune y la tolerancia. El papel principal de PD-1 es limitar la actividad de las células T en la periferia durante una respuesta inflamatoria a la infección y limitar la autoinmunidad. La base para esta regulación es que los ligandos PD-1 B7-H1/PD-L1 y B7-DC/PD-L2 aumentan en respuesta a diversas citoquinas proinflamatorias y pueden enlazar a PD-1 en células T activadas de tejidos inflamados, limitando así la respuesta inmunitaria. La eliminación del gen PD-1 lleva a complicaciones autoinmunes, por ejemplo a síntomas similares al lupus (Nishimura *et al.*, 1999. *Immunity* 11(2):141-51; PMID: 10485649).

40 Además, se ha encontrado que B7-H1/PD-L1 con frecuencia está sobre-regulado en muchos tipos de tumor diferentes, donde inhibe las respuestas de las células T antitumorales locales enlazándose a PD-1 en los linfocitos infiltrantes tumorales. Por ejemplo, se demostró que PD-L1 juega un papel en la evasión inmune tumoral en carcinomas de células escamosas de la cabeza y cuello (Dong *et al.*, 2002. *Nat Med.* 8(8):793-800). Los autores demuestran que la expresión forzada de B7-H1/PD-L1 en tumores que son normalmente B7-H1/PD-L1-negativos inhibe su eliminación inmune y que el bloqueo de anticuerpos restaura las respuestas anti-tumorales. Además, se demostró que muchos tumores humanos, como carcinomas del pulmón, ovario y colon, sobregulan B7-H1/PD-L1 en relación a sus contrapartes de tejido normales. En resumen, estas observaciones sugieren usar el bloqueo de la ruta PD-1 para la inmunoterapia del cáncer (Zitvogel and Kroemer, 2012. *Oncoimmunology* 1, 1223-1125).

50 En este contexto la US 2010/0055102 describe el uso de antagonistas de PD-1 para incrementar una respuesta inmunitaria de células T en un mamífero.

55 Recientemente se han realizado los primeros ensayos clínicos con inhibidores del punto de control inmune (ICIs) contra el receptor PD-1 y su ligando PD-L1. El primer ensayo de fase I con el anticuerpo monoclonal anti-PD-1 BMS-936558 se llevó a cabo en pacientes con tumores sólidos metastásicos refractarios al tratamiento. La actividad clínica se observó en pacientes con melanoma, carcinoma renal, cáncer colon-rectal y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Se pudo demostrar que PD-L1 se sobre-expresa en muchos cánceres y está asociado frecuentemente a un mal pronóstico. Además, la expresión tumoral de la superficie celular de PD-L1 en biopsias pre-tratamiento surge como un potencial biomarcador de respuesta, consistente con la biología de la ruta (Brahmer *et al.*, 2010. *J Clin Oncol.* 28(19):3167-75; PMID: 20516446).

Otro estudio clínico con BMS-936558 produce respuestas objetivo en aproximadamente uno de cada cuatro hasta uno de cada cinco pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma o cáncer de células renales; el perfil de evento adverso no aparece para impedir su uso. Los datos preliminares sugieren una relación entre la expresión de PD-L1 en las células tumorales y la respuesta objetivo (Topalian *et al.*, 2012. N Engl J Med. 366(26):2443-54; PMID: 22658127).

Además, un estudio de fase I con el anticuerpo anti-PD-L1 BMS-936559 induce la regresión tumoral duradera (velocidad de respuesta objetivo de 6 hasta 17%) y la estabilización prolongada de la enfermedad (velocidades de 12 hasta 41% en 24 semanas) en pacientes con cánceres avanzados, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma y cáncer de células renales. Específicamente, se observó una respuesta objetivo (una respuesta completa o parcial) en 9 de 52 pacientes con melanoma, 2 de 17 con cáncer de células renales, 5 de 49 con cáncer de pulmón de células no pequeñas y 1 de 17 con cáncer de ovario (Brahmer *et al.* 2012. N Engl J Med. 366(26):2455-65; PMID: 22658128).

Sin embargo, únicamente respuestas relativamente bajas en algunos cánceres se podrían demostrar en estos estudios (por ejemplo cáncer de pulmón y próstata) para los inhibidores del punto de control de la ruta PD-1. En estudios más recientes las combinaciones con inhibidores del punto de control de la ruta PD-1 se han evaluado en modelos preclínicos.

Un estudio reporta por ejemplo la generación de una vacuna de células dendríticas (DC) con una combinación de un ligando de siARN de PD-1 y antígeno de ARNm diana. Estas DC PD-L1-silenciadas cargadas con antígeno de ARNm incrementan la respuesta de las células T CD8+ específicas de antígeno *ex vivo* en pacientes con cáncer trasplantados (Hobo *et al.* 2013. Cancer Immunol Immunother. 62(2):285-97; PMID: 22903385).

Igualmente, Dai *et al.* demuestran que un sistema de vector lentiviral dirigido a células dendríticas (DCLV) que codifica la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-1 combinado con un bloqueo de la señal inhibidora de ligando PD-1/PD-1 (PD-L) mediante un anticuerpo anti-PD-L1 genera una respuesta inmunitaria CD8+ específica de Gag de VIH-1 mejorada después de la inmunización con DCLV (Dai *et al.* 2012. Mol Ther. 20(9):1800-9; PMID: 22588271).

Otro estudio examina la combinación de vacunación de lentivector recombinante (rLV) con anticuerpos de bloqueo PD-1 y PD-L1. La combinación de anticuerpos de bloqueo con vacunación rLV retarda el crecimiento de tumor pero no fue suficiente para inducir el rechazo completo de tumores establecidos (Sierra *et al.* 2011. Eur J Immunol.; 41(8): 2217-28; PMID: 21538347).

Adicionalmente, la WO 2008/11344 describe la modulación de una respuesta inmunitaria por la combinación de un constructo adenoviral recombinante basado en ADN (rAAV) que codifica para un antígeno o proteína terapéutica y un ácido nucleico que codifica para un modulador de señalización PD-1, particularmente siARN, ARN antisentido o una ribozima específica para el gen PD-L1.

En este contexto también se estudió la fusión de la proteína PD-1 soluble y fragmentos de proteína antigénica (WO 2012/062218).

Otro estudio pre-clínico reporta que el bloqueo de la combinación de los receptores co-estimuladores CTLA-4- y PD-1- negativos lleva a niveles sinérgicos de rechazo del tumor en el contexto de una vacuna adecuada (Curran *et al.*, 2010. Proc Natl Acad Sci USA 107(9): 4275-80; PMID: 20160101). Ratones pre-implantados con células de melanoma B16 se vacunaron con células de melanoma B16 irradiadas que expresan ya sea GM-CSF (Gvax) o ligando Flt3 (Fvax) combinado con el bloqueo de anticuerpos de antígeno-4 de linfocito T citotóxico del receptor co-estimulador de células T negativo (CTLA-4), muerte programada-1 (PD-1) y su ligando PD-L1. En el contexto de Gvax, ni el bloqueo de cualquier receptor co-inhibidor simple ni de cualquier combinación resulta en una supervivencia superior al 20%. Usando Fvax, el bloqueo de cualquiera de PD-L1 (8% de supervivencia), CTLA-4 (10% de supervivencia) o PD-1 (25% de supervivencia) mostró un beneficio terapéutico modesto. Sin embargo, únicamente el bloqueo combinado de CTLA-4 y PD-1 lleva al rechazo tumoral en un 50% de los ratones y la adición posterior de anticuerpo anti-PD-L1 incrementa la tasa al 65%. En resumen, únicamente el bloqueo CTLA-4 combinado con el bloqueo PD-1 tenía un efecto significativo en promover el rechazo de melanomas B16 en conjunto con la vacuna celular de melanoma B16. El bloqueo de un receptor inhibidor simple (PD-1 o CTLA-4) lleva a una sobre-regulación de la trayectoria desbloqueada. Por tanto, este estudio sugiere que puede ser necesario el bloqueo simultáneo de múltiples receptores co-estimuladores negativos para permitir a las células T que infiltran el tumor ser efectivas. Además, en base a sus datos pre-clínicos en el modelo de melanoma B16, los autores sugieren que combinar estos agentes puede tener efectos sinérgicos en conducir el rechazo del tumor, pero señalan que combinar múltiples anticuerpos de bloqueo co-inhibidores en la clínica debe realizarse con gran precaución.

Mkrtichya *et al.* reporta además respuestas inmunitarias específicas de antígeno sinérgicas empleando un anticuerpo anti-PD-1 (CT-011) con depleción de células Treg por ciclofosfamida a dosis bajas (CPM), combinado con una vacuna de tumor (vacuna de péptido HPV16-E7). Pero únicamente la combinación de estos 3 tratamientos resulta en una regresión completa de los tumores (Mkrtichya *et al.* 2011. Eur J Immunol. 41(10): 2977-86; PMID: 21710477).

Un reporte adicional que examina el efecto de la inhibición PD-L1 en el crecimiento tumoral demuestra que la administración sistémica de anticuerpo anti-PD-L1 más células dendríticas pulsadas con péptidos de melanoma (DCs) resulta en un número más alto de células T CD8+ específicas de péptido de melanoma, pero que esta combinación es insuficiente para retrasar el crecimiento de melanoma B16 establecido. Aunque la irradiación corporal adicional retarda el crecimiento tumoral, es necesaria la transferencia adoptiva adicional de células T CD8+ específicas de antígeno para alcanzar la regresión tumoral y supervivencia a largo plazo de los ratones tratados (Pilon-Thomas *et al.* 2010. J Immunol. 1; 184(7): 3442-9; PMID: 20194714).

En un estudio pre-clínico Fotin-Mleczek *et al.* muestran la combinación beneficiosa de una vacuna tumoral basada en ARNm y un anticuerpo dirigido contra el receptor CTLA4 que atenúa la señalización de las células T (Fotin-Mleczek *et al.*, 2012. J Gene Med. 14(6):428-39; PMID: 22262664).

En resumen, el uso de inhibidores del punto de control inmune parece representar un enfoque prometedor para una mejor inmunoterapia del cáncer. Sin embargo, la combinación de vacunas con un ICI simple a menudo no lleva a la mejora esperada de la inmunoterapia y el uso clínico combinado de los ICI que dirigen múltiples receptores co-estimuladores negativos o la combinación de los ICI con otros tratamientos puede inducir complicaciones clínicas, por ejemplo inducir una enfermedad autoinmunitaria.

Por tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar medios seguros y efectivos para una terapia basada en los ICI, particularmente basada en inhibidores de la ruta PD-1, en particular para una terapia tumoral, del cáncer y/o de enfermedades infecciosas.

El objetivo que subyace en la presente invención se resuelve por la materia reivindicada. En particular, el objeto de la invención se resuelve proporcionando una combinación vacuna/inhibidor que comprende, como vacuna, una vacuna de ARN que comprende al menos un ARNm que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno y, como inhibidor, una composición que comprende un inhibidor de la ruta PD-1, donde el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-L1. Además, el objeto se resuelve mediante una composición farmacéutica o un kit de partes que comprende la combinación vacuna/inhibidor o los componentes respectivos de los misma.

Para claridad y legibilidad se proporcionan las siguientes definiciones. Cualquier característica técnica mencionado para estas definiciones se puede leer en todas y cada realización de la invención. Las definiciones y explicaciones adicionales se pueden proporcionar específicamente en el contexto de estas realizaciones.

**Respuesta inmunitaria:** Una respuesta inmunitaria puede ser típicamente cualquiera de una reacción específica del sistema inmunitario adaptativo a un antígeno particular (denominada respuesta inmunitaria específica o adaptativa) o una reacción no específica del sistema inmunitario innato (denominada respuesta inmunitaria no específica o innata). En esencia, la invención se asocia con reacciones específicas (respuestas inmunitarias adaptativas) del sistema inmunitario adaptativo. Sin embargo, esta respuesta específica se puede soportar por una reacción no específica adicional (respuesta inmunitaria innata). Por tanto, la invención también se refiere a un compuesto, composición o combinación para la estimulación simultánea del sistema inmunitario innato y el adaptativo con el fin de evocar una respuesta inmunitaria adaptiva eficiente.

**Sistema inmunitario:** El sistema inmunitario puede proteger a los organismos de infecciones. Si un patógeno tiene éxito traspasando una barrera física de un organismo y entra en éste, el sistema inmunitario innato proporciona una respuesta inmediata, pero no específica. Si los patógenos evaden esta respuesta innata, los vertebrados tienen una segunda capa de protección, el sistema inmunitario adaptativo. Aquí, el sistema inmunitario adapta su respuesta durante una infección para mejorar su reconocimiento del patógeno. Esta respuesta mejorada se mantiene así después de que el patógeno se ha eliminado en forma de una memoria inmunológica y permite al sistema inmunitario adaptativo desarrollar ataques más rápidos y fuertes cada vez que se encuentra este patógeno. De acuerdo con esto, el sistema inmunitario comprende el sistema inmunitario innato y el adaptativo. Cada una de estas dos partes típicamente contiene los denominados componentes humorales y celulares.

**Respuesta inmunitaria adaptiva:** La respuesta inmunitaria adaptiva se entiende típicamente como una respuesta específica de antígeno del sistema inmunitario. La especificidad de antígeno permite generar respuestas que se adaptan a patógenos específicos o células infectadas por patógenos. Normalmente, la capacidad de desarrollar estas respuestas adaptadas es mantenida en el cuerpo por "células de memoria". Si un patógeno infecta el cuerpo más de una vez, se usan estas células de memoria específicas para eliminarlo rápidamente. En este contexto, la primera etapa de una respuesta inmunitaria adaptiva es la activación de células T específicas de antígeno primitivo o diferentes células inmunitarias capaces de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno por células presentadoras de antígeno. Esto ocurre en los tejidos linfoides y órganos a través de los cuales las células T naive pasan constantemente. Los tres tipos de células que pueden servir como células presentadoras de antígeno son células dendríticas, macrófagos y células B. Cada una de estas células tiene una función distinta provocando respuestas inmunitarias. Las células dendríticas pueden tomar

antígenos por fagocitosis y macropinocitosis y pueden volverse a estimular por contacto con, por ejemplo, un antígeno exterior para migrar al tejido linfóide local, donde se diferencian en células dendríticas maduras. Los macrófagos ingieren antígenos de partículas como bacterias y se inducen por agentes infecciosos u otros estímulos apropiados para expresar las moléculas MHC. La capacidad única de las células B de enlazar e interiorizar antígenos de proteína solubles por medio de sus receptores también puede ser importante para inducir las células T. Las moléculas MHC son típicamente responsables de la presentación de un antígeno a células T. A este respecto, presentar el antígeno en moléculas MHC lleva a la activación de las células T que inducen su proliferación y diferenciación en células T efectoras armadas. La función más importante de las células T efectoras es la eliminación de células infectadas por células T citotóxicas CD8+ y la activación de macrófagos por células Th1 que juntos conforman la inmunidad mediada por célula, y la activación de células B por ambas células Th2 y Th1 para producir diferentes clases de anticuerpo, conduciendo así a la respuesta inmunitaria humoral. Las células T reconocen un antígeno por sus receptores de células T que no reconocen y enlazan el antígeno directamente, pero en su lugar reconocen fragmentos peptídicos cortos, por ejemplo de antígenos de proteína derivados de patógeno, por ejemplo los llamados epítopos, que se enlazan a moléculas MHC en las superficies de otras células.

15 Sistema inmunitario adaptativo: El sistema inmunitario adaptativo se dedica esencialmente a eliminar o impedir el crecimiento patógeno. Típicamente regula la respuesta inmunitaria adaptativa dotando al sistema inmunitario vertebrado de la capacidad para reconocer y recordar patógenos específicos (para generar inmunidad) y para desarrollar ataques más fuertes cada vez que se encuentra el patógeno. El sistema es altamente adaptable debido a la hipermutación somática (un proceso de mutaciones somáticas aceleradas) la y recombinación V(D)J (una recombinación genética irreversible de segmentos de gen de receptor de antígeno). Este mecanismo permite a un número pequeño de genes generar un gran número de diferentes receptores de antígeno, que luego se expresan únicamente en cada linfocito individual. Debido a que el reordenamiento del gen lleva a un cambio irreversible del ADN de cada célula, toda de la progenie (descendencia) de tal célula heredará entonces genes que codifican la misma especificidad de receptor, que incluye células B de Memoria y células T de Memoria, claves para la inmunidad específica longeva.

25 Inmunidad celular/respuesta inmunitaria celular: La inmunidad celular se relaciona típicamente con la activación de macrófagos, células asesinas naturales (NK), linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y la liberación de diversas citoquinas en respuesta a un antígeno. En términos más generales, la inmunidad celular no se basa en anticuerpos, sino en la activación de células del sistema inmunitario. Típicamente, una respuesta inmunitaria celular se puede caracterizar por ejemplo activando linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno que son capaces de inducir la apoptosis celular, por ejemplo en células inmunitarias específicas como células dendríticas u otras células, que detectan epítopos de antígenos extraños en su superficie. Tales células se pueden infectar por virus o con bacterias intracelulares o con células de cáncer que detectan antígenos tumorales. Las características adicionales pueden ser la activación de macrófagos y células asesinas naturales, permitiéndoles destruir patógenos y la estimulación de células para secretar una variedad de citoquinas que influyen en la función de otras células implicadas en respuestas inmunitarias adaptativas e innatas.

35 Inmunidad humoral/respuesta inmunitaria humoral: La inmunidad humoral se refiere típicamente a la producción de anticuerpos y opcionalmente a procesos accesorios que acompañan a la producción de anticuerpos. Una respuesta inmunitaria humoral típicamente se puede caracterizar, por ejemplo, por la activación Th2 y la producción de citoquina, formación de centro germinal y cambio de isotipo, maduración de la afinidad y generación celular de memoria. La inmunidad humoral también puede referirse típicamente a funciones efectoras de anticuerpos, que incluyen la neutralización de patógenos y toxinas, la activación de complemento clásica y la promoción de opsonina de la fagocitosis y la eliminación de patógenos.

45 Sistema inmunitario innato: El sistema inmunitario innato, también conocido como sistema inmunitario no específico (o inespecífico), típicamente comprende células y mecanismos que defienden al huésped de la infección por otros organismos de manera no específica. Esto significa que las células del sistema innato pueden reconocer y responder a patógenos de forma genérica, pero, a diferencia del sistema inmunitario adaptativo, no confiere inmunidad de larga duración o de protección al huésped. El sistema inmunitario innato puede ser, por ejemplo, activado por ligandos de receptores tipo Toll (TLRs) u otras sustancias auxiliares, como lipopolisacáridos, TNF-alfa, ligando CD40, o citoquinas, monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimiocinas, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta, TNF-alfa, factores de crecimiento y hGH, un ligando de receptor tipo Toll humano TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, un ligando de receptor tipo Toll de murino TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13, un ligando de un receptor tipo NOD, un ligando de un receptor tipo RIG-I, un ácido nucleico inmunoestimulador, un ARN inmunoestimulador (isARN), un CpG-ADN, un agente antibacteriano o un agente anti-viral. La combinación vacuna/inhibidor, la composición farmacéutica o el kit de partes de acuerdo con la presente invención pueden comprender una o más de tales sustancias. Típicamente, una respuesta del sistema inmunitario innato incluye células inmunitarias de reclutamiento a sitios de infección mediante la producción de factores químicos, incluyendo mediadores químicos especializados denominados citoquinas; activación de la cascada del complemento; identificación y eliminación de sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa por glóbulos blancos especializados; activación del

sistema inmunitario adaptativo; y/o actuando como barrera física y química a agentes infecciosos.

**Adyuvante/componente adyuvante:** Un adyuvante o un componente adyuvante en el sentido más amplio es típicamente un agente farmacológico y/o inmunológico que puede modificar, por ejemplo mejorar, el efecto de otros agentes, tal como un fármaco o vacuna. Esto debe interpretarse en un sentido amplio y se refiere a un espectro amplio de sustancias. Típicamente, estas sustancias son capaces de incrementar la inmunogenicidad de antígenos. Por ejemplo, los adyuvantes se pueden ser reconocidos por los sistemas inmunitarios innatos y, por ejemplo, pueden provocar una respuesta inmunitaria innata. Los “adyuvantes” típicamente no provocan una respuesta inmunitaria adaptativa. A este respecto, los “adyuvantes” no califican como antígenos. Su modo de acción es distinto de los efectos desencadenados por antígenos que resultan en una respuesta inmunitaria adaptativa.

**Antígeno:** En el contexto de la presente invención el “antígeno” se refiere típicamente a una sustancia que puede ser reconocida por el sistema inmunitario, preferiblemente por el sistema inmunitario adaptativo, y es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, por ejemplo por la formación de anticuerpos y/o células T específicas de antígeno como parte de una respuesta inmunitaria adaptativa. Típicamente, un antígeno puede ser o puede comprender un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo y que se puede presentar por la MHC a células T. En el sentido de la presente invención, un antígeno puede ser el producto de la traducción de un ARN proporcionado, preferiblemente un ARNm tal como se define aquí. En este contexto, también fragmentos, variantes y derivados de péptidos y proteínas que comprenden al menos un epítipo se entienden como antígenos. En el contexto de la presente invención, los antígenos tumorales y patogénicos como se definen aquí son particularmente preferentes.

**Epítipo:** Los epítipos (también llamados “determinantes de antígeno”) pueden distinguirse en epítipos de células T y epítipos de células B. Los epítipos de células T o partes de las proteínas en el contexto de la presente invención pueden comprender fragmentos que, preferiblemente, tienen una longitud de alrededor de 6 a alrededor de 20 o aún más aminoácidos, por ejemplo fragmentos tal como se procesan y presentan por moléculas de clase I MHC, preferiblemente con una longitud de alrededor de 8 a alrededor de 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9, o 10, (o aún 11, o 12 aminoácidos), o fragmentos tales como se procesan y presentan por moléculas de clase II MHC, preferiblemente de una longitud de alrededor de 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o aún más aminoácidos, donde estos fragmentos se pueden seleccionar de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son típicamente reconocidos por células T en forma de un complejo que consiste en el fragmento de péptido y una molécula MHC, así, los fragmentos típicamente no son reconocidos en su forma nativa. Los epítipos de células B son típicamente fragmentos ubicados en la superficie externa de proteínas (nativas) o antígenos de péptido como se define aquí, preferiblemente de 5 a 15 aminoácidos, más preferiblemente de 5 a 12 aminoácidos, aún más preferiblemente de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por anticuerpos, esto es en su forma nativa.

Tales epítipos de proteínas o péptidos además se pueden seleccionar de cualquiera de las variantes aquí mencionadas de tales proteínas o péptidos. En este contexto, los determinantes antigénicos pueden ser epítipos conformacionales y discontinuos que se componen de segmentos de las proteínas o péptidos tal como se definen aquí que son discontinuos en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos como se definen aquí, pero se reúnen en la estructura tridimensional, o epítipos continuos o lineales que se componen de una única cadena de polipéptidos.

**Vacuna:** Una vacuna se entiende típicamente como un material profiláctico o terapéutico que proporciona al menos un antígeno, preferiblemente un inmunógeno. “Proporcionar al menos un antígeno” significa, por ejemplo, que la vacuna comprende el antígeno o que la vacuna comprende una molécula que, por ejemplo, codifica para el antígeno o una molécula que comprende el antígeno. Por ejemplo, la vacuna puede comprender un ácido nucleico, tal como un ARN (por ejemplo vacuna de ARN), que codifica para un péptido o proteína que comprende el antígeno. El antígeno o inmunógeno se puede derivar de cualquier material adecuado para la vacunación. Por ejemplo, el antígeno o inmunógeno se puede derivar de un patógeno, tal como de bacterias o partículas virales, etc., o de un tumor o tejido canceroso. El antígeno o inmunógeno estimula el sistema inmunitario adaptativo del cuerpo para proporcionar una respuesta inmunitaria adaptativa. En el contexto de la presente invención, la vacuna preferiblemente no comprende células, como células dendríticas o células cancerosas, por ejemplo células de melanoma B16. Además, en el contexto de la presente invención, la vacuna preferiblemente no consiste en antígenos de péptido, tal como antígenos de péptido tumorales. En el contexto de la presente invención, la vacuna es preferiblemente una vacuna de ARN.

**Vacuna de ARN:** La vacuna de ARN se define aquí como una vacuna que comprende al menos una molécula de ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno. En el contexto de la presente invención, la al menos una molécula de ARN comprendida en la vacuna es preferiblemente una molécula de ARN aislado. Este al menos un ARN es preferiblemente un ARN viral, un ARN auto-replicante (replicón) o más preferiblemente un ARNm. También se incluyen aquí híbridos ARN/ADN que se refieren a que al menos una molécula de ARN de la vacuna de ARN consiste en partes de ribonucleótidos y de desoxirribonucleótidos. En este contexto, al menos un ARN de la vacuna de ARN consiste en al menos un 50% de ribonucleótidos, más preferiblemente hasta al menos un 60%, 70%, 80%, 90% y más preferiblemente hasta un 100%. En este contexto, al menos un ARN de la vacuna de ARN también se puede proporcionar como ARN complejo o ARNm, como partícula viral y como partícula de replicón como

se define aquí. En el contexto de la presente invención, al menos un ARN comprendido en la vacuna de ARN no se presenta preferiblemente en células, tal como células dendríticas o de cáncer, por ejemplo células de melanoma B16. Además es particularmente preferente que la vacuna de ARN de la invención no comprenda o consiste en un vector lentiviral, en particular no una célula dendrítica - vector lentiviral dirigido, o un (recombinante) vector adenoviral/adeno-  
 5 asociado (vector (r)AAV). Preferiblemente, la vacuna de ARN de la invención no es una vacuna de VIH. En particular, se prefiere que la vacuna de ARN de la invención no comprenda un AAV o vector lentiviral que codifique uno o más antígenos. Igualmente, la vacuna de ARN de la invención no puede preferiblemente codificar antígenos específicos de VIH, por ejemplo proteína Gag, en particular no un vector lentiviral que codifica antígenos específicos de VIH, como Gag.  
 10 Preferiblemente, la vacuna de ARN de la invención no comprende una proteína de fusión de una proteína PD1 y una proteína antigénica o una proteína de fusión de una proteína PD1 y una inmunoglobulina o una porción de los mismos y no codifica tal proteína de fusión PD1.

Vacunación genética: La vacunación genética típicamente se puede entender como la vacunación por administración de una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno o un inmunógeno o fragmentos de los mismos. La molécula de ácido nucleico se puede administrar a un cuerpo del sujeto o a células aisladas de un sujeto. Tras la transfección de ciertas células del cuerpo o tras la transfección de las células aisladas, el antígeno o inmunógeno puede ser expresado por aquellas células y posteriormente ser presentado al sistema inmunitario, provocando una respuesta inmunitaria adaptativa, esto es específica de antígeno. En consecuencia, la vacunación genética típicamente comprende al menos una de las etapas de a) administrar un ácido nucleico, preferiblemente un ARN (aislado) como se define aquí, a un sujeto, preferiblemente un paciente, o a células aisladas de un sujeto, preferiblemente de un paciente, que usualmente resulta en la transfección de las células del sujeto ya sea *in vivo* o *in vitro*; b) transcripción y/o traducción de la molécula de ácido nucleico introducida; y opcionalmente c) re-administración de células aisladas transfectadas al sujeto, preferiblemente al paciente, si el ácido nucleico no se ha administrado directamente al paciente.

Ácido nucleico: El término ácido nucleico se refiere a cualquier molécula de ADN o ARN y se emplea como sinónimo de polinucleótido. Además, las modificaciones o derivados del ácido nucleico como se definen aquí se incluyen explícitamente en el término general "ácido nucleico". Por ejemplo, APN también se incluye en el término "ácido nucleico".

ARN monocistrónico: Un ARN monocistrónico típicamente puede ser un ARN, preferiblemente un ARNm, que comprende únicamente un marco de lectura abierto. Un marco de lectura abierto en este contexto es una secuencia de diversos tripletes de nucleótidos (codones) que se pueden traducir en un péptido o proteína.

ARN Bi-/multicistrónico: ARN, preferiblemente ARNm, que típicamente puede tener dos (bicistrónico) o más (multicistrónico) marcos de lectura abiertos (ORF). Un marco de lectura abierto en este contexto es una secuencia de diversos tripletes de nucleótidos (codones) que se pueden traducir en un péptido o proteína.

Estructura 5'-Cap: Un 5' Cap es típicamente un nucleótido modificado, particularmente un nucleótido de guanina, agregado al extremo 5' de una molécula de ARN. Preferiblemente, el 5'-Cap se agrega usando un enlace 5'-5'-trifosfato.

Secuencia Poli(C): Una secuencia poli(C) es típicamente una secuencia larga de nucleótidos de citosina, típicamente de alrededor de 10 a alrededor de 200 nucleótidos de citidina, preferiblemente alrededor de 10 a alrededor de 100 nucleótidos de citidina, más preferiblemente alrededor de 10 a alrededor de 70 nucleótidos de citidina o aún más preferiblemente alrededor de 20 a alrededor de 50 o aún alrededor de 20 a alrededor de 30 nucleótidos de citidina. Una secuencia poli(C) preferiblemente se puede ubicar en 3' de la región codificadora comprendida en el ácido nucleico.

Cola poli(A): Una cola poli(A) también llamada "cola 3'-poli(A)" es típicamente una secuencia larga de nucleótidos de adenina de hasta alrededor de 400 nucleótidos de adenosina, por ejemplo de alrededor de 25 a alrededor de 400, preferiblemente desde alrededor de 50 a alrededor de 400, más preferiblemente desde alrededor de 50 a alrededor de 300, aún más preferiblemente desde alrededor de 50 a alrededor de 250, más preferiblemente desde alrededor de 60 a alrededor de 250 nucleótidos de adenosina, agregada al extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico, preferiblemente un ARNm. Una cola poli(A) preferiblemente se puede ubicar en 3' en la región codificadora comprendida en un ácido nucleico, por ejemplo un ARNm.

Ácido nucleico estabilizado: Un ácido nucleico estabilizado típicamente puede ser esencialmente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo degradación por una exo- o endo-nucleasa) y/o la degradación *ex vivo* (por ejemplo por el proceso de fabricación antes de la administración de la vacuna, por ejemplo durante la preparación de la solución de vacuna de ARN a administrarse). La estabilización de ARN, particularmente de ARNm, puede por ejemplo alcanzarse proporcionando una estructura 5'-Cap, una cola poli(A), una cola poli(C) y/o cualquier otra modificación UTR. También puede conseguirse modificando la estructura, por modificación de azúcar, modificación de bases y/o modificación del contenido G/C del ácido nucleico. Diversos otros métodos son concebibles en el contexto de la invención.

Modificación de un ácido nucleico (ácido nucleico modificado): La modificación de una molécula de ácido nucleico,

particularmente de un ARN o ARNm, puede contener modificaciones estructurales, modificaciones de azúcar o modificaciones de bases. Una modificación estructural en conexión con la presente invención es una modificación donde los fosfatos de la estructura de nucleótidos contenida en la molécula de ácido nucleico se modifica químicamente. Una modificación de azúcar en conexión con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos del ácido nucleico. Además, una modificación de bases en conexión con la presente invención es una modificación química de la parte base de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico. Por tanto, un ácido nucleico modificado también se define aquí como una molécula de ácido nucleico que puede incluir análogos de nucleótidos. Además una modificación de una molécula de ácido nucleico puede contener una modificación de lípido. Tal ácido nucleico modificado por lípido típicamente comprende un ácido nucleico como se define aquí. Tal molécula de ácido nucleico modificada por lípido típicamente además comprende al menos un enlazante unido covalentemente a esa molécula de ácido nucleico y al menos un lípido enlazado covalentemente al enlazante respectivo. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico modificada por lípido comprende al menos una molécula de ácido nucleico como se define aquí y al menos un lípido unido covalentemente (bifuncional) (sin enlazante) a esa molécula de ácido nucleico. De acuerdo con una tercera alternativa, la molécula de ácido nucleico modificada por lípido comprende una molécula de ácido nucleico como se define aquí, al menos un enlazante unido covalentemente a esa molécula de ácido nucleico y al menos un lípido unido covalentemente al enlazante respectivo, y también al menos un lípido (bifuncional) unido covalentemente (sin enlazante) a esa molécula de ácido nucleico.

Una modificación de un ácido nucleico también puede comprender la modificación del contenido G/C de la región de codificación de una molécula de ácido nucleico, especialmente de al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor de la invención. En este contexto, es particularmente preferente que el contenido G/C de la región de codificación de la molécula de ácido nucleico aumente en comparación con el contenido G/C de la región de codificación de su secuencia de codificación de tipo natural particular, esto es el ARN no modificado. La secuencia de aminoácidos codificada de la secuencia de ácido nucleico no se modifica preferiblemente en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo natural particular. La modificación del contenido G/C de la molécula de ácido nucleico, especialmente si la molécula de ácido nucleico está en forma de un ARNm o codifica para un ARNm, se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región de ARNm a ser transferida es importante para la traducción eficiente de ese ARNm. Por tanto, la composición y la secuencia de los diversos nucleótidos es importante. En particular, las secuencias que tienen un contenido de G (guanosina)/C(citosina) incrementado son más estables que las secuencias que tienen un contenido de A (adenosina)/U (uracilo) incrementado. Por tanto, los codones de la secuencia de codificación o del ARNm varían así en comparación con su secuencia de codificación o ARNm de tipo natural, mientras que conserva la secuencia de aminoácidos traducida, de manera que incluye una cantidad incrementada de nucleótidos G/C. Con respecto al hecho de que diversos codones codifican para uno y el mismo aminoácido (llamado degeneración del código genético), pueden determinarse los codones más favorables para la estabilidad (el llamado uso de codón alternativo). Preferiblemente, el contenido G/C de la región de codificación de la molécula de ácido nucleico, especialmente de al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor de la invención, se incrementa en al menos un 7%, más preferiblemente al menos un 15%, en particular al menos un 20%, en comparación con el contenido G/C de la región codificada del ARNm tipo natural. De acuerdo con una realización específica, al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, más preferiblemente al menos el 70%, aún más preferiblemente al menos el 80% y más preferiblemente al menos el 90%, 95% o aún 100% de los codones sustituibles en la región que codifica para una proteína o péptido como se define aquí o su fragmento, variante y/o derivado o la secuencia completa de la secuencia de ARNm tipo natural o secuencia de codificación se sustituyen, incrementando así el contenido G/C de tal secuencia. En este contexto, es particularmente preferible incrementar el contenido G/C de la molécula de ácido nucleico, especialmente de al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, al máximo (esto es 100% de los codones sustituibles), en particular en la región que codifica para una proteína, en comparación con la secuencia de tipo natural. Además una modificación del ácido nucleico, especialmente de al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva se basa en el hallazgo de que la eficiencia de la traducción también está determinada por una frecuencia diferente en la ocurrencia de los ARNt en las células. La frecuencia en la ocurrencia de los ARNt en una célula, y por tanto el uso del codón en tal célula, depende de la especie de la célula de la que se deriva. En consecuencia, una célula de levadura generalmente exhibe un uso de codón diferente que una célula de mamífero, tal como una célula de humano. Por tanto, si los llamados "codones raros" están presentes en la molécula de ácido nucleico (con respecto al sistema de expresión respectivo), especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, en un grado creciente, la molécula de ácido nucleico modificada correspondiente se traduce en un grado significativamente más pobre que en el caso en que los codones que codifican para ARNt relativamente "frecuentes" están presentes. Por tanto, la región de codificación del ácido nucleico modificado, particularmente al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, preferiblemente está modificada en comparación con la región correspondiente del ARNm tipo natural o en la secuencia de codificación, de manera que al menos un codón de la secuencia de tipo natural que codifica para un ARNt que es relativamente raro en la célula se intercambia por un codón que codifica para un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y lleva el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Por esta modificación, las secuencias de la molécula de ácido nucleico, particularmente de al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, se modifica de manera que se insertan los codones para los cuales los ARNt frecuentes están disponibles. En otras palabras, por esta modificación todos los codones de la



donde:

elementos frontera del tallo1 o tallo2  $N_{1-6}$ : es una secuencia consecutiva de 1 a 6, preferiblemente de 2 a 6, más preferiblemente de 2 a 5, aún más preferiblemente de 3 a 5, más preferiblemente de 4 a 5 o de 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de entre A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

tallo1  $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ : es complementaria inversa o complementaria parcialmente inversa con el elemento tallo2 y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde  $N_{0-2}$  es una secuencia consecutiva de 0 a 2, preferiblemente de 0 a 1, más preferiblemente de 1 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde  $N_{3-5}$  es una secuencia consecutiva de 3 a 5, preferiblemente de 4 a 5, más preferiblemente de 4 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanosina o un análogo del mismo, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, siempre que su citidina de nucleótido complementario en tallo2 se reemplace por guanosina;

secuencia bucle  $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ : se ubica entre los elementos tallo1 y tallo2 y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, más preferiblemente de 4 nucleótidos; donde cada  $N_{0-4}$  es independiente de otra secuencia consecutiva de 0 a 4, preferiblemente de 1 a 3, más preferiblemente de 1 a 2 N, donde cada N se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde U/T representa uridina u opcionalmente timidina;

tallo2  $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ : es complementaria inversa o complementaria parcialmente inversa al elemento tallo1 y es una secuencia consecutiva de 5 a 7 nucleótidos; donde  $N_{3-5}$  es una secuencia consecutiva de 3 a 5, preferiblemente de 4 a 5, más preferiblemente de 4 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; siendo  $N_{0-2}$  una secuencia consecutiva de 0 a 2, preferiblemente de 0 a 1, más preferiblemente de 1 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma siempre que su guanosina de nucleósido complementario en tallo1 se reemplace por citidina;

donde

tallo1 y tallo2 son capaces de apareamiento de bases entre sí formando una secuencia inversa complementaria, donde el apareamiento de bases puede ocurrir entre tallo1 y tallo2, por ejemplo por apareamiento de bases Watson-Crick de nucleótidos A y U/T o G y C o por apareamiento de bases no Watson-Crick, por ejemplo apareamiento de bases de tambaleo, apareamiento de bases Watson-Crick inverso, apareamiento de bases Hoogsteen, apareamiento de bases Hoogsteen inverso o son capaces de apareamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un apareamiento de bases incompleto puede ocurrir entre tallo1 y tallo2, en base a que una o más bases en un tallo no tienen una base complementaria en la secuencia complementaria inversa del otro tallo.

Síntesis de ácido nucleico: Las moléculas de ácido nucleico usadas de acuerdo con la invención como se definen aquí se pueden preparar usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos como síntesis en fase sólida, propagación *in vivo* (por ejemplo propagación *in vivo* viral), así como métodos *in vitro*, tal como reacciones de transcripción *in vitro*.

Para preparar una molécula de ácido nucleico, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARN o ARNm, una molécula de ADN correspondiente por ejemplo puede ser transcrita *in vitro*. Esta matriz de ADN preferiblemente comprende un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, que es seguido por la secuencia de nucleótido deseada que codifica para la molécula de ácido nucleico, por ejemplo el ARNm a preparar y una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN que forma la matriz de al menos un ARN de interés se puede preparar por proliferación fermentativa y aislamiento posterior como parte de un plásmido que se puede replicar en bacterias. Plásmidos adecuados para la presente invención son por ejemplo los plásmidos pT7Ts (número de acceso del GenBank U26404; Lai *et al.*, Development 1995, 121: 2349 to 2360), serie pGEM<sup>®</sup>, por ejemplo pGEM<sup>®</sup>-1 (número de acceso de GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso de GenBank X65327); cf. también Mezei and Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin and Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

ARN: El ARN es la abreviatura habitual para un ácido ribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, esto es un polímero que consiste en nucleótidos. Estos nucleótidos son usualmente monómeros de adenosina-monofosfato, uridina-monofosfato, guanosina-monofosfato y citidina-monofosfato que se unen unos a otros a lo largo de un llamado esqueleto. El esqueleto se forma por enlaces fosfodiéster entre el azúcar, esto es ribosa, de un primer y una porción fosfato de un segundo monómero adyacente. La sucesión específica de monómeros se denomina secuencia de ARN.

**ARN mensajero (ARNm):** En células eucariotas, la transcripción se realiza típicamente dentro del núcleo o la mitocondria. La transcripción *in vivo* de ADN usualmente resulta en el llamado ARN prematuro, que tiene que ser procesado en el llamado ARN mensajero, usualmente abreviado como ARNm. El procesamiento del ARN prematuro, por ejemplo en organismos eucariotas, comprende diversas modificaciones post-transcripcionales tal como empalme, 5'-protección, poliadenilación, exportación del núcleo o la mitocondria y similares. La suma de estos procesos también se llama maduración de ARN. El ARN mensajero maduro usualmente proporciona la secuencia de nucleótidos que se puede transferir en una secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína particular. Típicamente, un ARNm maduro comprende una 5'-cap, una 5'UTR, un marco de lectura abierto, una 3'UTR y una secuencia poli(A). En el contexto de la presente invención, un ARNm también puede ser una molécula artificial, esto es una molécula que no ocurre en la naturaleza. Esto significa que el ARNm en el contexto de la presente invención puede, por ejemplo, comprender una combinación de una 5'UTR, un marco de lectura abierto, una 3'UTR y una secuencia poli(A) que no ocurre en esta combinación en la naturaleza.

**Retrovirus:** Un retrovirus es un virus de ARN que se duplica en una célula huésped usando la enzima transcriptasa inversa para producir un ADN de su genoma de ARN. El ADN se incorpora luego en el genoma del huésped mediante una enzima integrasa. El virus después replica el ADN como parte de la célula huésped y luego experimenta los procesos de transcripción y traducción para expresar los genes llevados por el virus. Con frecuencia se emplean lentivirus para la terapia génica. Por razones de seguridad, los vectores lentivirales normalmente no llevan los genes requeridos para su replicación. Para producir un lentivirus, se transfectan diversos plásmidos en una llamada línea celular envase, comúnmente HEK 293. Uno o más plásmidos, generalmente denominados como plásmidos envase, codifican las proteínas del virión, tal como la cápside y la transcriptasa inversa. Otro plásmido contiene el material genético a suministrarse por el vector. Se transcribe para producir el genoma viral de ARN monocatenario que se envasa en el virión, que se usa para la infección celular en la terapia o la vacunación genética.

**Virión:** Las partículas de virus (conocidas como viriones) consisten en dos o tres partes: i) el material genético (que comprende genes virales y genes heterólogos sustituidos opcionales) ya sea de ADN o ARN; ii) una cubierta proteica que protege estos genes; y en algunos casos iii) una envoltura de lípidos que rodea la cubierta proteica cuando están fuera de una célula.

**ARN auto-replicante (Replicones):** El ARN auto-replicante son vectores de suministro basados en alfavirus que se han desarrollado de virus Semliki Forest (SFV), virus Sindbis (SIN) y Virus de encefalitis equina venezolana (VEE). Los alfavirus son virus de ARN monocatenario donde los genes heterólogos de interés pueden ser sustituidos con genes estructurales de alfavirus. Al proporcionar los genes estructurales *in trans*, el ARN replicón se envasa en partículas de replicón (RP) que se pueden usar para la terapia o la vacunación genética (ver por ejemplo Vander Veen *et al.*, 2012. Alphavirus replicon vaccines. Animal Health Research Reviews 13(1):1-9). Después de la entrada en la célula huésped, el ARN viral genómico inicialmente sirve como ARNm para la traducción de las proteínas estructurales virales (nsPs) requeridas para iniciar la amplificación del ARN viral. La replicación del ARN ocurre vía la síntesis de un intermedio de longitud completa de hebra negativa que se usa como la plantilla para la síntesis de los ARN de longitud completa adicionales y para la transcripción de un ARN subgenómico de hebra positiva de un promotor interno. Tal ARN se puede luego considerar como ARN auto-replicante, ya que las proteínas no estructurales responsables de la replicación (y transcripción de los genes heterólogos) todavía están presentes en tal replicón. Tales vectores de alfavirus se denominan "replicones".

**Partícula de replicón:** Una partícula de replicón consiste de dos o tres partes: i) el material genético (= el replicón) (que comprende genes virales y genes heterólogos sustituidos opcionales) ya sea de ADN o de ARN; ii) una cubierta proteica que protege estos genes; y en algunos casos iii) una envoltura de lípidos que rodea la cubierta proteica cuando están fuera de una célula.

**ARN aislado:** El ARN aislado se define aquí como un ARN que no es parte de una célula, una célula irradiada o un lisado celular. Un ARN aislado se puede producir por aislamiento y/o purificación de células o lisados celulares, o de sistemas de transcripción *in vitro*.

El término ARN aislado en el contexto de la presente invención se define aquí como un ARN que no es parte de las células, células irradiadas o lisados celulares que incluyen el ARN de la vacuna de ARN o que no es parte de células transfectadas con el ARN de la vacuna de ARN. En otras palabras, el término "ARN aislado" excluye (*ex vivo*) células transfectadas o moduladas usadas como vacuna de ARN, en particular excluye células transfectadas *ex vivo* o moduladas inmunes, tal como células dendríticas (DC), por ejemplo DC transfectada/traducida con un ARN usado como vacuna de ARN. Además, el término ARN aislado excluye ARN comprendido en células, células irradiadas o lisado celular que comprende naturalmente al menos un ARN que codifica para un antígeno usado como vacuna de ARN. En consecuencia, la vacuna de ARN de la combinación inventiva preferiblemente no comprende células moduladas o transfectadas, en particular células no transfectadas o moduladas inmunes (por ejemplo antígeno presentador de células), más particularmente células irradiadas, no transfectadas o moduladas DC o lisados celulares que comprenden naturalmente al menos un ARN de la vacuna de ARN. Con esta realización se hace evidente que la vacuna de ARN usada en la presente

5 invención preferiblemente no corresponde a una vacuna basada en células o una vacuna basada en DC, o, más generalmente, preferiblemente no corresponde a una vacuna basada en células o, más generalmente, la vacuna de ARN usada en la presente invención preferiblemente está libre de células y la combinación inventiva a administrar proporciona la vacuna de ARN como ARN, más preferiblemente como ARNm, opcionalmente en asociación con un portador y/o componente adyuvante. El término ARN aislado también incluye ARN complejado con componentes adicionales, por ejemplo péptidos, proteínas, portadores etc., ARN envasado en partículas, por ejemplo partículas de replicón o partículas virales (viriones) y ARN contenido en solución, que además del ARN puede comprender componentes adicionales, por ejemplo una solución tampón, reactivos de estabilización, inhibidores de ARNasa, etc.

10 Secuencia de una molécula de ácido nucleico: La secuencia de una molécula de ácido nucleico se entiende típicamente como el orden particular e individual, esto es la sucesión de sus nucleótidos.

Secuencia de una proteína o péptido: La secuencia de una proteína o péptido se entiende típicamente como el orden, esto es la sucesión de sus aminoácidos.

15 Identidad de secuencia: Dos o más secuencias son idénticas si tienen la misma longitud y orden de nucleótidos o aminoácidos. El porcentaje de identidad típicamente describe el grado en que dos secuencias son idénticas, esto es típicamente describe el porcentaje de nucleótidos que corresponden en su posición de secuencia con nucleótidos idénticos de una secuencia de referencia. Para determinar el grado de identidad, las secuencias a comparar se consideran de la misma longitud, esto es la longitud de la secuencia más larga de las secuencias a comparar. Esto significa que una primera secuencia que consiste en 8 nucleótidos es un 80% idéntica a una segunda secuencia que consiste en 10 nucleótidos que comprende la primera secuencia. En otras palabras, en el contexto de la presente invención, la identidad de secuencia preferiblemente se refiere al porcentaje de nucleótidos de una secuencia que tiene la misma posición en dos o más secuencias de la misma longitud. Los espacios son usualmente considerados como posiciones no idénticas, independientemente de su posición actual en una alineación.

25 Fragmento de una secuencia: Un fragmento de una secuencia es típicamente una parte más corta de una secuencia de longitud completa de, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos. En consecuencia, un fragmento de una secuencia típicamente consiste en una secuencia que es idéntica al tramo o tramos correspondientes dentro de la secuencia de longitud completa. Un fragmento preferente de una secuencia en el contexto de la presente invención consiste en un tramo continuo de entidades, como nucleótidos o aminoácidos, que corresponden a un tramo continuo de entidades en la molécula de la que se deriva el fragmento, lo que representa al menos el 5%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, aún más preferiblemente al menos el 60%, aún más preferiblemente al menos el 70% y con total preferencia al menos el 80% de la molécula total (esto es longitud completa) de la cual se deriva el fragmento. Así, por ejemplo, un fragmento de una proteína o antígeno de péptido preferiblemente corresponde a un tramo continuo de entidades de la proteína o del antígeno de péptido del que se deriva el fragmento, lo que representa al menos el 5%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, aún más preferiblemente al menos el 60%, aún más preferiblemente al menos el 70%, y con total preferencia al menos el 80% de la proteína total (esto es longitud completa) o del antígeno de péptido. Es particularmente preferente que el fragmento de una secuencia sea un fragmento funcional, esto es que el fragmento cumpla una o más de las funciones realizadas por la secuencia de la que se deriva el fragmento. Por ejemplo, un fragmento de una proteína o de antígeno de péptido preferiblemente exhibe al menos una función antigénica (por ejemplo es capaz de provocar una reacción inmune específica frente a al menos un antígeno determinante en tal proteína o antígeno de péptido) de la proteína o antígeno de péptido de la que se deriva el fragmento.

45 Fragmentos de proteínas: "Fragmentos" de proteínas o péptidos, esto es, fragmentos de secuencias de aminoácidos, en el contexto de la presente invención pueden típicamente comprender una secuencia de una proteína o péptido tal como se define aquí que es, con respecto a su secuencia de aminoácidos (o su molécula de ácido nucleico de codificación), N-terminal, C-terminal y/o intrasecuencialmente truncada en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína original (nativa) (o su molécula de ácido nucleico codificada). Así, tal truncamiento puede ocurrir ya sea en el nivel de aminoácidos o correspondientemente en el nivel de ácido nucleico. Una identidad de secuencia con respecto a tal fragmento como se define aquí puede preferiblemente referirse a la proteína completa o al péptido como se define aquí o a la molécula de ácido nucleico completa (codificación) de tal proteína o péptido.

50 Igualmente, los "fragmentos" de las secuencias de ácido nucleico en el contexto de la presente invención pueden comprender una secuencia de un ácido nucleico como se define aquí que está, con respecto a su molécula de ácido nucleico, 5'-, 3'- y/o intrasecuencialmente, truncada en comparación con la molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico original (nativa). Una identidad de secuencia con respecto a tal fragmento como se define aquí puede por tanto preferiblemente referirse al ácido nucleico completo como se define aquí.

55 Transfección: El término 'transfección' se refiere a la introducción de moléculas de ácido nucleico, tal como moléculas de ADN o ARN (por ejemplo ARNm), en células, preferiblemente en células eucariotas. En el contexto de la presente

invención, el término 'transfección' abarca cualquier método conocido por el experto para introducir moléculas de ácido nucleico, preferiblemente moléculas de ARN, en las células, preferiblemente en células eucariotas, tal como en células de mamífero. Tales métodos abarcan, por ejemplo, electroporación, lipofección, por ejemplo basado en lípidos catiónicos y/o liposomas, precipitación de fosfato de calcio, transfección basada en nanopartículas, transfección basada en virus o transfección basada en polímeros catiónicos, tal como DEAE-dextrano o polietilenimina etc.

**Portador:** Un portador en el contexto de la invención típicamente puede ser un compuesto que facilita el transporte y/o la complejación de otro compuesto (carga). Un portador se puede asociar a su carga por interacción covalente o no covalente. Un portador puede transportar ácidos nucleicos, por ejemplo ARN o ADN, a las células diana. El portador – para algunas realizaciones – puede ser un compuesto catiónico o policatiónico o un portador polimérico como se define aquí. Un portador, en el contexto de la presente invención es preferiblemente adecuado como portador para moléculas de ácido nucleico, por ejemplo para mediar la disolución en líquidos fisiológicamente aceptables, el transporte y la absorción celular de las moléculas de ácido nucleico o un vector. En consecuencia, un portador en el contexto de la presente invención puede ser un componente que puede ser adecuado para almacenar y suministrar una molécula de ácido nucleico o un vector. Tales portadores pueden ser, por ejemplo, portadores catiónicos o policatiónicos o compuestos que pueden servir como agentes de transfección o de complejación. Son particularmente preferentes en este contexto portadores o portadores poliméricos como compuestos catiónicos o policatiónicos.

**Compuesto/componente catiónico o policatiónico:** El término "compuesto/componente catiónico o policatiónico" típicamente se refiere a una molécula cargada que está carga positivamente (catión) a un valor de pH típico de 1 a 9, preferiblemente a un pH de o por debajo de 9 (por ejemplo de 5 a 9), de o por debajo de 8 (por ejemplo de 5 a 8), de o por debajo de 7 (por ejemplo de 5 a 7), más preferiblemente a pH fisiológico, por ejemplo de 7,3 a 7,4. En consecuencia, un compuesto/componente catiónico o policatiónico puede ser cualquier compuesto cargado positivamente o polímero, preferiblemente una proteína o péptido catiónico o policatiónico que se carga positivamente bajo condiciones fisiológicas, en particular bajo condiciones fisiológicas *in vivo*. Una 'proteína o péptido catiónico' puede contener al menos un aminoácido cargado positivamente o más de un aminoácido cargado positivamente, por ejemplo seleccionado de Arg, His, Lys u Orn. En consecuencia, compuestos 'policatiónicos' también están dentro del alcance, presentando más de una carga positiva bajo las condiciones dadas. En este contexto una proteína o péptido catiónico contiene un número mayor de aminoácidos catiónicos, por ejemplo un número mayor de Arg, His, Lys u Orn, que aminoácidos negativamente cargados. En una realización preferente, una proteína o péptido catiónico en el contexto de la presente invención contiene un número mayor de aminoácidos catiónicos, por ejemplo un número mayor de Arg, His, Lys u Orn, que de otros residuos.

El término "compuesto catiónico o policatiónico" en el contexto de la presente invención preferiblemente se refiere a compuestos que se pueden usar como agentes de transfección o de complejación, particularmente de ácidos nucleicos, usados de acuerdo a la invención.

Los compuestos catiónicos o policatiónicos según la invención, que son agentes particularmente preferidos en este contexto, incluyen protamina, nucleolina, espermina o espermidina, u otros péptidos o proteínas catiónicos, tal como poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos penetradores de células (CPPs), incluyendo péptidos que enlazan el VIH, Tat VIH-1 (VIH), péptidos derivados de Tat, penetratina, péptidos análogos o derivados de VP22, VP22 HSV (Herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteína (PTDs), PpT620, péptidos enriquecidos con prolina, péptidos enriquecidos con arginina, péptidos enriquecidos con lisina, péptido(s) MPG, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, péptidos derivados Antennapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, pIsl, FGF, Lactoferrina, Transportan, Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, o histonas. La protamina es particularmente preferente.

Adicionalmente, proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos preferentes usados como agentes de transfección o de complejación se pueden seleccionar de las siguientes proteínas o péptidos de la siguiente fórmula total (III):

**(Arg)<sub>l</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>;(Xaa)<sub>x</sub>, (formula (III))**

donde  $l + m + n + o + x = 8-15$ , y  $l, m, n$  u  $o$ , independientemente, puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, siempre que el contenido global de Arg, Lys, His y Orn representa al menos 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= que se presentan naturalmente) o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y  $x$  puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4, siempre que el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Son particularmente preferentes en este contexto por ejemplo los péptidos catiónicos Arg<sub>7</sub>, Arg<sub>8</sub>, Arg<sub>9</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>, R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>R<sub>9</sub>H<sub>3</sub>, YSSR<sub>9</sub>SSY, (RKH)<sub>4</sub>, Y(RKH)<sub>2</sub>R, etc.

Otros compuestos catiónicos o policatiónicos preferidos que se pueden usar como agentes de transfección o de complejación pueden incluir polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenimina (PEI), lípidos catiónicos, por ejemplo DOTMA: cloruro de [1-(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil fosfatidiletanol amina,

DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: bromuro de dimiristo-oxipropil-dimetilhidroxietyl-amonio, DOTAP: dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)-propano, DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil)-dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadeciloxipropil)(2-hidroxietyl)]-dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oximetiloxi)etyl]-trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisucciniloxi)etyl]-trimetilamonio, oligofectamina, Lipofectamine® o polímeros catiónicos o policatiónicos, por ejemplo poliaminoácidos modificados, como  $\beta$ -aminoácido-polímeros o poliamidas invertidas, etc., polietilenos modificados, tal como PVP (poli(bromuro de N-etyl-4-vinilpiridinio)), etc., acrilatos modificados, como pDMAEMA (poli(dimetilaminoetyl metilacrilato)), etc., amidoaminas modificadas tal como pAMAM (poli(amidoamina)), etc., polibetaaminoéster modificado (PBAE), tal como diamina y polímeros 1,4-butanodiol-diacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificados, etc., dendrímeros, como dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros basados en pAMAM, etc., poliimina(s), tal como PEI: poli(etilenimina), poli(propilenimina), etc., polialilamina, polímeros basados en estructura de azúcar, tal como polímeros basados en ciclodextrina, polímeros basados en dextrano, quitosano, etc., polímeros basados en estructuras silano, tal como copolímeros PMOXA-PDMS, etc., polímeros en bloque que consisten en una combinación de uno o más bloques catiónicos (por ejemplo seleccionados de un polímero catiónico como se mencionó arriba) y de uno o más bloques hidrofílicos o hidrofóbicos (por ejemplo polietilenglicol); etc.

Portador polimérico: Un portador polimérico es típicamente un portador que está forma por un polímero. Un portador polimérico en el contexto de la presente invención, usado como agente de transfección o de complejación, puede ser un portador polimérico formado por componentes catiónicos disulfuro-reticulados. Los componentes catiónicos disulfuro-reticulados pueden ser los mismos o diferentes unos de otros. El portador polimérico también puede contener componentes adicionales. Es también particularmente preferido que el portador polimérico comprenda mezclas de péptidos catiónicos, proteínas o polímeros y componentes opcionalmente adicionales como se definen aquí, que están reticulados por enlaces disulfuro como se describe aquí.

En este contexto, los componentes catiónicos, que forman bases para el portador polimérico reticulado de disulfuro, se seleccionan típicamente de cualquiera de péptidos catiónicos o policatiónicos adecuados, proteínas o polímeros adecuados para este propósito, en particular cualquier péptido catiónico o policatiónico, proteína o polímero capaz de complejar un ácido nucleico como se define de acuerdo a la presente invención, y así preferiblemente condensar el ácido nucleico. El péptido catiónico o policatiónico, proteína o polímero, es preferiblemente una molécula lineal, sin embargo, también se pueden usar péptidos catiónicos o policatiónicos ramificados, proteínas o polímeros.

Cada proteína, péptido o polímero catiónicos o policatiónicos reticulados disulfuro del portador polimérico, que se pueden usar para complejar por ejemplo al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, contiene al menos una porción -SH, más preferiblemente al menos un residuo cisteína o cualquier grupo químico adicional que tenga una porción -SH, capaz de formar un enlace disulfuro sobre la condensación con al menos una proteína, péptido o polímero catiónicos o policatiónicos adicionales como componente catiónico del portador polimérico como se menciona aquí.

Como se definió arriba, el portador polimérico, que se puede usar para complejar por ejemplo el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, puede estar formado por componentes catiónicos (o policatiónicos) reticulados con disulfuro.

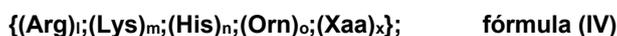
De acuerdo a una primera alternativa, al menos un componente catiónico (o policatiónico) del portador polimérico que se puede usar en este contexto se puede seleccionar de proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos. Tales proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos preferiblemente tienen una longitud de alrededor de 3 a 100 aminoácidos, preferiblemente una longitud de alrededor de 3 a 50 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de alrededor de 3 a 25 aminoácidos, por ejemplo una longitud de alrededor de 3 a 10, 5 a 15, 10 a 20 o 15 a 25 aminoácidos. Alternativa o adicionalmente, tales proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos pueden tener un peso molecular de alrededor de 0,01 kDa a alrededor de 100 kDa, incluyendo un peso molecular de alrededor de 0,5 kDa a alrededor de 100 kDa, preferiblemente de alrededor de 10 kDa a alrededor de 50 kDa, aún más preferiblemente de alrededor de 10 kDa a alrededor de 30 kDa.

En el caso específico que el componente catiónico del portador polimérico, que se puede usar para complejar por ejemplo el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico de adyuvante en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, comprende una proteína o péptido catiónico o policatiónico, las propiedades catiónicas de la proteína o péptido catiónico o policatiónico o del portador polimérico completo, si el portador polimérico se compone totalmente de proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos, se puede determinar en base a su contenido en aminoácidos catiónicos. Preferiblemente, el contenido de aminoácidos catiónicos en la proteína o péptido catiónico o policatiónico y/o el portador polimérico es al menos el 10%, 20% o 30%, preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, 60% o 70%, pero también preferiblemente al menos el 80%, 90%, o aún el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, más preferiblemente al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el intervalo de alrededor de 10% a 90%, más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 15% a 75%, aún más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 20% a 50%, por ejemplo 20, 30, 40 o 50%, o en

un intervalo formado por cualquiera de dos de los valores antes mencionados, siempre que el contenido de todos los aminoácidos, por ejemplo aminoácidos catiónicos, lipofílicos, hidrofílicos, aromáticos y adicionales, en la proteína o péptido catiónico o policatiónico, o en el portador polimérico completo, si el portador polimérico se compone totalmente de proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos, sea el 100%.

- 5 Preferiblemente, tales proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos del portador polimérico, que comprenden o adicionalmente se modifican para comprender al menos una porción –SH, se seleccionan de, sin limitarse a, proteínas o péptidos catiónicos tales como protamina, nucleolina, espermina o espermidina, oligo- o poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, oligo- o poli-arginina, péptidos penetradores celulares (CPPs), CPP quiméricos, tal como Transportan, o péptidos MPG, péptidos que enlazan VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, miembros de la familia de penetratina, por ejemplo Penetratina, péptidos derivados de Antennapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPP derivados antimicrobianos por ejemplo Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, PpTG20, Loligomero, FGF, Lactoferrina, histonas, péptidos análogos o derivados de VP22, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (Herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteína (PTDs), PpT620, péptidos enriquecidos con prolina, péptidos enriquecidos con arginina, péptidos enriquecidos con lisina, Pep-1, L-oligómeros, péptido(s) de calcitonina, etc.

Alternativa o adicionalmente, tales proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos del portador polimérico, que comprenden o adicionalmente se modifican para comprender al menos una porción –SH, se seleccionan de, sin limitarse a, los siguientes péptidos catiónicos de la siguiente fórmula suma (IV):



- 20 donde  $i + m + n + o + x = 3-100$ , y  $i, m, n$  u  $o$ , independientemente, es cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 y 91-100 siempre que el contenido total de Arg (Arginina), Lys (Lisina), His (Histidina) y Orn (Ornitina) representa al menos 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa es cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= que se presentan naturalmente) o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y  $x$  es cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, siempre que el contenido total de Xaa no exceda el 90% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Cualquiera de los aminoácidos Arg, Lys, His, Orn y Xaa se puede situar en cualquier lugar del péptido. En este contexto, las proteínas o péptidos catiónicos en el intervalo de 7-30 aminoácidos son particularmente preferentes. Péptidos aún más preferidos de esta fórmula son oligoargininas, por ejemplo Arg<sub>7</sub>, Arg<sub>8</sub>, Arg<sub>9</sub>, Arg<sub>12</sub>, His<sub>3</sub>Arg<sub>9</sub>, Arg<sub>9</sub>His<sub>3</sub>, His<sub>3</sub>Arg<sub>9</sub>His<sub>3</sub>, His<sub>6</sub>Arg<sub>9</sub>His<sub>6</sub>, His<sub>3</sub>Arg<sub>4</sub>His<sub>3</sub>, His<sub>6</sub>Arg<sub>4</sub>His<sub>6</sub>, TyrSer<sub>2</sub>-Arg<sub>9</sub>Ser<sub>2</sub>Tyr, (ArgLysHis)<sub>4</sub>, Tyr(ArgLysHis)<sub>2</sub>Arg, etc.

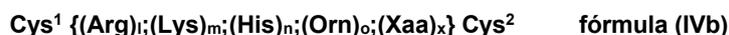
De acuerdo con una realización particularmente preferente adicional, la proteína o péptido catiónico o policatiónico del portador polimérico, cuando se define según la fórmula  $\{(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x\}$  (fórmula (IV)) como se muestra arriba y que comprende o se modifica adicionalmente para comprender al menos una porción –SH, puede seleccionarse, sin limitarse a, de la subfórmula (IVa):



- 40 donde  $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o$ ; y  $x$  son como se definen aquí, Xaa' es cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (que se presentan naturalmente) o no nativos excepto Arg, Lys, His, Orn o Cys e  $y$  es cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80 y 81-90, siempre que el contenido total de Arg (Arginina), Lys (Lisina), His (Histidina) y Orn (Ornitina) representa al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido.

- 45 Esta realización puede aplicarse a situaciones donde la proteína o péptido catiónico o policatiónico del portador polimérico, por ejemplo cuando se define de acuerdo a la fórmula empírica  $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$  (fórmula (IV)) como se muestra arriba, comprende o se ha modificado con al menos una cisteína como porción –SH en el significado anterior, de manera que el péptido catiónico o policatiónico como componente catiónico lleva al menos una cisteína que es capaz de formar un enlace disulfuro con otros componentes del portador polimérico.

De acuerdo con otra realización particularmente preferida, la proteína o péptido catiónico o policatiónico del portador polimérico, cuando se define de acuerdo a la fórmula  $\{(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x\}$  (fórmula (IV)) como se muestra arriba, puede seleccionarse, sin limitarse a, la subfórmula (IVb):



- 50 donde la fórmula empírica  $\{(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x\}$  (fórmula (IV)) es como se define aquí y forma un núcleo de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula (IV) (semiempírica) y donde Cys<sup>1</sup> y Cys<sup>2</sup> son cisteínas próximas

a o terminales a (Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>;(Xaa)<sub>x</sub>. Esta realización puede aplicarse a situaciones donde la proteína o péptido catiónico o policatiónico del portador polimérico, que se puede usar para complejar al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico de adyuvante en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, por ejemplo cuando se define de acuerdo con la fórmula empírica (Arg)<sub>i</sub>;(Lys)<sub>m</sub>;(His)<sub>n</sub>;(Orn)<sub>o</sub>;(Xaa)<sub>x</sub> (fórmula (IV)) como se muestra arriba, se ha modificado con al menos dos cisteínas como porciones-SH en el significado anterior, de manera que el péptido catiónico o policatiónico del portador polimérico inventivo lleva al menos dos cisteínas (terminales) que son capaces de formar un enlace disulfuro con otros componentes del portador polimérico.

De acuerdo a una segunda alternativa, al menos un componente catiónico (o policatiónico) del portador polimérico se puede seleccionar de, por ejemplo, cualquier polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) adecuado en este contexto, siempre que este polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) tenga o se modifique para tener al menos una porción -SH-, que dota de un enlace disulfuro al polímero catiónico o policatiónico con otro componente del portador polimérico como se define aquí. Por tanto, tal como se define aquí, el portador polimérico puede comprender los mismos o diferentes polímeros catiónicos o policatiónicos.

En el caso específico de que el componente catiónico del portador polimérico comprenda un polímero catiónico o policatiónico (no peptídico), las propiedades catiónicas del polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) se pueden determinar en base a su contenido de cargas catiónicas cuando se compara con las cargas generales de los componentes del polímero catiónico. Preferiblemente, el contenido de cargas catiónicas en el polímero catiónico a pH (fisiológico) como se define aquí es de al menos 10%, 20%, o 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, 60% o 70%, pero también preferiblemente al menos 80%, 90%, o aún 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, más preferiblemente al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el intervalo de alrededor de 10% a 90%, más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 30% a 100%, aún más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 50% a 100%, por ejemplo 50, 60, 70, 80%, 90% o 100%, o en un intervalo formado por cualquiera de dos de los valores antes mencionados, siempre que el contenido de todas las cargas, por ejemplo cargas positivas y negativas, a pH (fisiológico) como se define aquí en el polímero catiónico completo sea del 100%.

Preferiblemente, el componente catiónico (no peptídico) del portador polimérico representa un polímero catiónico o policatiónico, típicamente con un peso molecular de alrededor de 0,1 o 0,5 kDa a alrededor de 100 kDa, preferiblemente de alrededor de 1 kDa a alrededor de 75 kDa, más preferiblemente de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa, aún más preferiblemente de alrededor de 5 kDa a alrededor de 30 kDa, o un peso molecular de alrededor de 10 kDa a alrededor de 50 kDa, aún más preferiblemente de alrededor de 10 kDa a alrededor de 30 kDa. Adicionalmente, el polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) típicamente tiene al menos una porción -SH- que es capaz de formar un enlace disulfuro en base a la condensación con cualquiera de los otros componentes catiónicos u otros componentes del portador polimérico como se define aquí.

En el contexto anterior, el componente catiónico (no peptídico) del portador polimérico, que se puede usar para complejar por ejemplo el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, se puede seleccionar de acrilatos, acrilatos modificados, tal como pDMAEMA (poli(dimetilaminoetil metilacrilato)), quitosanos, aziridinas o 2-etil-2-oxazolona (formando oligo etileniminas o oligoetileniminas modificadas), polímeros obtenidos por la reacción de bisacrilatos con aminas formando oligo-beta-aminoésteres o poli-amido-aminas, u otros polímeros como poliésteres, policarbonatos, etc. Cada molécula de estos polímeros catiónicos o policatiónicos (no peptídicos) típicamente exhibe al menos una porción -SH-, donde al menos una porción -SH- se puede introducir en el polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) por modificaciones químicas, por ejemplo usando imonotiolano, ácido 3-tiopropiónico o introduciendo porciones -SH- contenidas en aminoácidos, tales como cisteína o cualquier aminoácido adicional (modificado). Tales porciones-SH- son preferiblemente como ya se definió arriba.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, el componente adicional que puede estar contenido en el portador polimérico, que se puede usar para modificar los diferentes péptidos catiónicos o policatiónicos (cortos) o polímeros (no peptídicos) que forman bases para el portador polimérico o las propiedades biofísicas/bioquímicas del portador polimérico como se define aquí, es un componente aminoácido (AA). De acuerdo con la presente invención, el componente aminoácido (AA) comprende un número de aminoácidos preferente en el intervalo de alrededor de 1 a 100, preferiblemente en el intervalo de alrededor de 1 a 50, más preferiblemente seleccionado de un número que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15-20, o se puede seleccionar de un intervalo formado por cualquiera de dos de los valores antes mencionados. En este contexto los aminoácidos del componente aminoácido (AA) se pueden elegir independientemente uno del otro. Por ejemplo si en el portador polimérico dos o más componentes (AA) están presentes, pueden ser iguales o pueden ser diferentes.

El componente aminoácido (AA) puede contener o se puede flanquear (por ejemplo terminalmente) por una porción que contiene -SH-, que permite introducir este componente (AA) mediante un enlace disulfuro en el portador polimérico como se define aquí. En el caso específico que la porción que contiene -SH- sea una cisteína, el componente aminoácido (AA)

también se puede leer como -Cys-(AA)-Cys-, donde Cys representa cisteína y proporciona para la porción -SH- necesaria un enlace disulfuro. La porción que contiene -SH también se puede introducir en el componente aminoácido (AA) usando cualquiera de las modificaciones o reacciones como se indican arriba para el componente catiónico o cualquiera de sus componentes.

5 Además, el componente aminoácido (AA) se puede proporcionar con dos porciones -SH- (o aún más), por ejemplo en la forma representada por la fórmula HS-(AA)-SH, para permitir el enlace a dos funcionalidades con enlaces disulfuro, por ejemplo si el componente aminoácido (AA) se usa como enlazante entre dos componentes adicionales (por ejemplo entre dos polímeros catiónicos).

10 Alternativamente, el componente aminoácido (AA) se puede proporcionar con otras funcionalidades como ya se describió arriba para los otros componentes del portador polimérico, permitiendo el enlace del componente aminoácido (AA) a cualquiera de los componentes del portador polimérico.

15 Así, de acuerdo con la presente invención, el componente aminoácido (AA) del portador polimérico se puede enlazar a componentes adicionales del portador polimérico, los cuales se pueden usar para complejar por ejemplo al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico de adyuvante en la vacuna/inhibidor inventivo con o sin usar un enlace disulfuro.

De acuerdo con una alternativa adicional y particularmente preferente, el componente aminoácido (AA) se puede usar para modificar el portador polimérico, particularmente el contenido de componentes catiónicos del portador polimérico como se definió arriba.

20 En el contexto de la presente invención, el componente aminoácido (AA) se puede seleccionar de las siguientes alternativas: un componente aminoácido aromático, un componente aminoácido hidrofílico (y preferiblemente sin carga polar), un componente aminoácido lipofílico o un componente aminoácido básico débil.

25 De acuerdo con una alternativa adicional, el componente aminoácido (AA) puede ser un péptido señal o una secuencia señal, una secuencia o señal de localización, una secuencia o señal de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular (por ejemplo TAT), etc. Adicionalmente, de acuerdo con otra alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un péptido o proteína funcional que puede modular la funcionalidad del portador polimérico en consecuencia. Tales péptidos o proteínas funcionales como componente aminoácido (AA) preferiblemente comprenden cualquiera de los péptidos o proteínas como se definen aquí, por ejemplo como se definen aquí como antígenos. De acuerdo con una alternativa, tales péptidos o proteínas funcionales adicionales pueden comprender los denominados péptidos penetradores de la célula (CPP) o péptidos catiónicos de transporte.

30 De acuerdo con una última alternativa, el componente aminoácido (AA) puede consistir en o puede comprender cualquier péptido o proteína que pueda realizar cualquier función favorable en la célula. Particularmente preferentes son péptidos o proteínas seleccionados de proteínas o péptidos terapéuticamente activos, de antígenos, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos patogénicos (por ejemplo antígenos de animales, antígenos virales, antígenos de protozoarios, antígenos bacterianos), de anticuerpos, de proteínas o péptidos inmunoestimuladores, de receptores de células T  
35 específicos de antígeno, o de cualquier otra proteína o péptido adecuado para una aplicación específica (terapéutica). En particular, se prefieren epitopos de péptido de estos antígeno(s) codificados por al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación de vacuna/inhibidor inventiva.

40 El portador polimérico, que se puede usar para complejar por ejemplo el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico de adyuvante en la combinación de vacuna/inhibidor inventiva puede comprender al menos uno de los péptidos catiónicos o policatiónicos mencionados anteriormente, proteínas o polímeros o componentes adicionales, por ejemplo (AA), donde cualquiera de las alternativas anteriores se pueden combinar juntas, y se pueden formar por polimerización en una reacción de condensación de polimerización vía sus partes -SH-.

Además, el portador polimérico se puede seleccionar de una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (V):

45 
$$L-P^1-S-[S-P^2-S]_n-S-P^3-L$$
 fórmula (V)

donde

50 P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> son diferentes o idénticos y representan una cadena de polímero hidrofílico lineal o ramificada, cada P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> tiene al menos una porción -SH- capaz de formar un enlace disulfuro sobre la condensación con el componente P<sup>2</sup>, o alternativamente con (AA), (AA)<sub>x</sub>, o [(AA)<sub>x</sub>]<sub>z</sub> si tales componentes se usan como enlazante entre P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup> o P<sup>3</sup> y P<sup>2</sup> y/o con componentes adicionales (por ejemplo (AA), (AA)<sub>x</sub>, [(AA)<sub>x</sub>]<sub>z</sub> o L), la cadena de polímero hidrofílico lineal o ramificada se

seleccionada independientemente de polietilenglicol (PEG), poli-*N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida, poli-2-(metacrililoiloxi)etil-fosforilcolinas, poli(hidroxialquil-L-asparagina), poli(2-(metacrililoiloxi)etil-fosforilcolina), hidroxietil-almidón o poli(hidroxialquil-L-glutamina), donde la cadena de polímero hidrofílico tiene un peso molecular de alrededor de 1 kDa a alrededor de 100 kDa, preferiblemente de alrededor de 2 kDa a alrededor de 25 kDa; o más preferiblemente de alrededor de 2 kDa a alrededor de 10 kDa, por ejemplo alrededor de 5 kDa a alrededor de 25 kDa o 5 kDa a alrededor de 10 kDa;

P<sup>2</sup> es una proteína o péptido catiónico o policatiónico, por ejemplo como se definió arriba para el portador polimérico formado por componentes catiónicos disulfuro-reticulados, y preferiblemente de una longitud de alrededor de 3 a alrededor de 100 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de alrededor de 3 a alrededor de 50 aminoácidos, aún más preferiblemente de una longitud de alrededor de 3 a alrededor de 25 aminoácidos, por ejemplo una longitud de alrededor de 3 a 10, 5 a 15, 10 a 20 o 15 a 25 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de alrededor de 5 a alrededor de 20 y aún más preferiblemente una longitud de alrededor de 10 a alrededor de 20; o es un polímero catiónico o policatiónico, por ejemplo como se definió arriba para el portador polimérico formado por componentes catiónicos disulfuro-reticulados, típicamente con un peso molecular de alrededor de 0,5 kDa a alrededor de 30 kDa, incluyendo un peso molecular de alrededor de 1 kDa a alrededor de 20 kDa, aún más preferiblemente de alrededor de 1,5 kDa a alrededor de 10 kDa, o con un peso molecular de alrededor de 0,5 kDa a alrededor de 100 kDa, incluyendo un peso molecular de alrededor de 10 kDa a alrededor de 50 kDa, aún más preferiblemente de alrededor de 10 kDa a alrededor de 30 kDa; teniendo cada P<sup>2</sup> al menos dos porciones -SH-, capaces de formar un enlace disulfuro sobre la condensación con componentes adicionales P<sup>2</sup> o componente(s) P<sup>1</sup> y/o P<sup>3</sup> o alternativamente con componentes adicionales (por ejemplo (AA), (AA)<sub>x</sub>, o [(AA)<sub>x</sub>]<sub>z</sub>);

-S-S- es un enlace disulfuro (reversible) (los corchetes se omiten para una mejor legibilidad), donde S preferiblemente representa azufre o una porción que lleva -SH-, que forma un enlace disulfuro (reversible). El enlace disulfuro (reversible) se forma preferiblemente por condensación de porciones -SH- de cualquiera de los componentes P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup>, P<sup>2</sup> y P<sup>2</sup>, o P<sup>2</sup> y P<sup>3</sup>, u opcionalmente de componentes adicionales como se definen aquí (por ejemplo L, (AA), (AA)<sub>x</sub>, [(AA)<sub>x</sub>]<sub>z</sub>, etc.); La porción -SH- puede ser parte de la estructura de estos componentes o agregarse por una modificación como se define abajo;

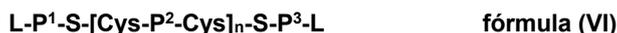
L es un ligando opcional, que puede estar o no presente, y se puede seleccionar independientemente de RGD, transferrina, folato, un péptido señal o secuencia señal, una secuencia o señal de localización, una secuencia o señal de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular,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

n es un entero, típicamente seleccionado de un intervalo de alrededor de 1 a 50, preferiblemente de un intervalo de alrededor de 1, 2 o 3 a 30, más preferiblemente de un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 25, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 20, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 15, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de alrededor de 4 a 9, 4 a 10, 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20 o 10 a 20, o un intervalo de alrededor de 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15 o 10 a 15, o un intervalo de alrededor de 6 a 11 o 7 a 10. Más preferiblemente, n está en el intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 a 9, en el intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 a 8, o en el intervalo de alrededor de 1, 2 o 3 a 7.

Cada uno de los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> típicamente tienen al menos una porción -SH-, donde la al menos una porción -SH- es capaz de formar un enlace disulfuro por reacción con el componente P<sup>2</sup> o con componente el (AA) o (AA)<sub>x</sub>, si se usa como enlazante entre P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup> o P<sup>3</sup> y P<sup>2</sup> como se define abajo y opcionalmente con un componente adicional, por ejemplo L y/o (AA) o (AA)<sub>x</sub>, por ejemplo si existen dos o más porciones -SH-. Las siguientes subfórmulas "P<sup>1</sup>-S-S-P<sup>2</sup>" y "P<sup>2</sup>-S-S-P<sup>3</sup>" dentro de la fórmula genérica (V) anterior (los corchetes se omiten para una mejor legibilidad), donde cualquiera de S, P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> son como se definen aquí, típicamente representan una situación donde una porción -SH- de los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> se condensa con una porción -SH- del componente P<sup>2</sup> de la fórmula genérica (V) anterior, formando ambos azufres de estas porciones -SH- un enlace disulfuro -S-S- como se define aquí en la fórmula (V). Estas porciones -SH- son proporcionadas típicamente por cada uno de los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup>, por ejemplo mediante una cisteína interna o cualquier aminoácido adicional (modificado) o compuesto que tenga una porción -SH-. En consecuencia, las subfórmulas "P<sup>1</sup>-S-S-P<sup>2</sup>" y "P<sup>2</sup>-S-S-P<sup>3</sup>" también pueden ser escritas como "P<sup>1</sup>-Cys-Cys-P<sup>2</sup>" y "P<sup>2</sup>-Cys-Cys-P<sup>3</sup>", si la porción -SH- se proporciona por una cisteína, en donde el término Cys-Cys representa dos cisteínas acopladas por un enlace disulfuro, no por un enlace peptídico. En este caso, el término "-S-S-" en estas fórmulas también puede escribirse como "-S-Cys", como "-Cys-S" o como "-Cys-Cys-". En este contexto, el término "-Cys-Cys-" no representa un enlace peptídico sino un enlace de dos cisteínas por sus porciones -SH- para formar un enlace disulfuro. En consecuencia, el término "-Cys-Cys-" también se puede entender generalmente como "-(Cys-S)-(S-Cys)-", donde en este caso específico S indica el azufre de la porción -SH- de la cisteína. Igualmente, los términos "-S-Cys" y "-Cys-S" indican un enlace disulfuro entre una porción que contiene -SH- y una cisteína, que también puede escribirse como "-S-(S-Cys)" y "-(Cys-S)-S". Alternativamente, los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> se pueden modificar con una porción -SH,

preferiblemente por una reacción química con un compuesto que lleva una porción –SH, de manera que cada uno de los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> lleva al menos una de tales porciones –SH. Tal compuesto que lleva una porción –SH puede ser por ejemplo una cisteína (adicional) o cualquier aminoácido adicional (modificado) que tenga una porción –SH. Tal compuesto también puede ser cualquier porción o compuesto no amino que contiene o permite introducir una porción –SH en los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> como se definen aquí. Tales compuestos no amino se pueden enlazar a los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> de fórmula (VI) del portador polimérico de acuerdo con la presente invención por reacciones químicas o enlace de compuestos, por ejemplo por enlace de un ácido 3-tiopropiónico o tioimolano, por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfúricos, aminas, etc.), por adición Michael (por ejemplo porciones de maleinimida, carbonilos α,β-insaturados, etc.), por química clic (por ejemplo azidas o alquinos), por metátesis de alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de formación de complejo (avidina, biotina, proteína G) o componentes que permiten reacciones de sustitución tipo S<sub>n</sub> (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras porciones químicas que se pueden utilizar en el enlace de componentes adicionales. Un derivado PEG particularmente preferido en este contexto es alfa-metoxi-omega-mercapto-poli(etilenglicol). En cada caso, la porción SH, por ejemplo de una cisteína o de cualquier aminoácido adicional (modificado) o compuesto, puede estar presente en los extremos terminales o internamente en cualquier posición de los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup>. Como se define aquí, cada uno de los polímeros hidrofílicos P<sup>1</sup> y P<sup>3</sup> típicamente tiene al menos una porción –SH- preferiblemente en un extremo terminal, pero también pueden contener dos o aún más porciones –SH-, que se pueden usar para enlazar adicionalmente componentes adicionales como se definen aquí, preferiblemente péptidos o proteínas funcionales adicionales, por ejemplo un ligando, un componente aminoácido (AA) o (AA)<sub>x</sub>, anticuerpos, péptidos penetradores de la célula o péptidos potenciadores (por ejemplo TAT, KALA), etc.

En el contexto de la fórmula (V) completa del portador polimérico inventivo se puede definir preferiblemente como sigue:



donde L, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, P<sup>3</sup> y n son como se definen aquí, S es azufre y cada Cys proporciona una porción –SH- para el enlace disulfuro.

El componente aminoácido (AA) o (AA)<sub>x</sub> en el portador polimérico de fórmula (V o VI), por ejemplo como se definió arriba para el portador polimérico formado por componentes catiónicos disulfuro-reticulados, también puede ocurrir como un componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)<sub>x</sub>]<sub>z</sub>, donde el número de componentes aminoácido (AA) o (AA)<sub>x</sub> se define además por el entero z. En este contexto, z se puede seleccionar de un intervalo de alrededor de 1 a 30, preferiblemente de un intervalo de alrededor de 1 a 15, más preferiblemente 1 a 10 o 1 a 5 y aún más preferiblemente seleccionado de un número seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o se puede seleccionar de un intervalo formado por cualquiera de dos de los valores antes mencionados.

De acuerdo con una alternativa específica y particularmente preferida, el componente aminoácido (AA) o (AA)<sub>x</sub>, preferiblemente escrito como S-(AA)<sub>x</sub>-S o [S-(AA)<sub>x</sub>-S] se puede usar para modificar el componente P<sup>2</sup>, particularmente el contenido del componente S-P<sup>2</sup>-S en el componente repetitivo [S-P<sup>2</sup>-S]<sub>n</sub> del portador polimérico de la fórmula (V) anterior. Esto se puede representar en el contexto del portador polimérico completo de acuerdo con la fórmula (VI) por ejemplo por la siguiente fórmula (VIa):



donde x, S, L, AA, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> y P<sup>3</sup> son preferiblemente como se definen aquí. En la fórmula (VIa) anterior, cualquiera de los componentes simples [S-P<sup>2</sup>-S] y [S-(AA)<sub>x</sub>-S] puede ocurrir en cualquier orden en la subfórmula {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)<sub>x</sub>-S]<sub>b</sub>}. El número de componentes simples [S-P<sup>2</sup>-S] y [S-(AA)<sub>x</sub>-S] en la subfórmula {[S-P<sup>2</sup>-S]<sub>a</sub>[S-(AA)<sub>x</sub>-S]<sub>b</sub>} está determinado por los enteros a y b, donde a + b = n. n es un entero y se define como antes para la fórmula (V).

De acuerdo con otra realización, el portador polimérico que se puede usar para complejar por ejemplo al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico de adyuvante en la combinación vacuna/inhibidor inventiva o componentes simples del mismo, por ejemplo los péptidos catiónicos o policatiónicos mencionados anteriormente, proteínas o polímeros o componentes adicionales, por ejemplo (AA), se pueden además modificar con un ligando, preferiblemente un carbohidrato, más preferiblemente un azúcar, aún más preferiblemente manosa.

De acuerdo con una realización específica, el portador polimérico completo se puede formar por condensación de polimerización (de al menos uno) de los péptidos catiónicos o policatiónicos mencionados anteriormente, proteínas o polímeros o componentes adicionales, por ejemplo (AA), a partir de sus porciones –SH- en una primera etapa, y formar complejos por ejemplo de al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico de adyuvante en la combinación vacuna/inhibidor inventiva con tal portador polimérico en una segunda etapa. El portador

polimérico puede entonces contener un número de al menos uno o aún más del mismo o de diferentes péptidos catiónicos o policatiónicos definidos anteriormente, proteínas o polímeros o componentes adicionales, por ejemplo (AA), preferiblemente en el número indicado por el intervalo anterior.

5 De acuerdo con una realización específica alternativa, el portador polimérico que se puede usar para complejar por ejemplo el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico de adyuvante en la combinación vacuna/inhibidor inventiva se forma por condensación de polimerización de al menos uno de los péptidos catiónicos o policatiónicos mencionados anteriormente, proteínas o polímeros o componentes adicionales, por ejemplo (AA), a partir de sus porciones -SH- simultáneamente para formar complejos por ejemplo con al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o un ácido nucleico de adyuvante en la combinación  
10 vacuna/inhibidor inventiva al portador polimérico (preparado *in situ*). Igualmente, el portador polimérico también aquí puede entonces contener un número de al menos uno o aún más del mismo o de diferentes péptidos catiónicos o policatiónicos definidos anteriormente, proteínas o polímeros o componentes adicionales, por ejemplo (AA), en el número preferiblemente determinado por el intervalo anterior.

15 Relación N/P: La relación N/P es una medida de la carga iónica del componente catiónico (cadena lateral) del compuesto catiónico o policatiónico o del portador polimérico usado como portador o agente de complejante como se define aquí. En particular, si las propiedades catiónicas del componente catiónico son debidas a nitrógenos (por ejemplo de las cadenas laterales de aminoácidos), la relación N/P expresa la relación entre los átomos de nitrógeno básico y los residuos fosfato en la estructura del nucleótido, considerando que (cadena lateral) los átomos de nitrógeno del componente catiónico del compuesto catiónico o policatiónico o del portador polimérico contribuyen a las cargas positivas y el fosfato de la estructura  
20 fosfato de la carga de ácido nucleico, por ejemplo al menos un ARN que codifica para al menos un antígeno compuesto en la vacuna de ARN o un ácido nucleico de adyuvante, contribuye a la carga negativa. Generalmente, un fosfato proporciona una carga negativa, por ejemplo un nucleótido en la molécula de ácido nucleico de carga proporciona una carga negativa. Esto se puede calcular en base a que, por ejemplo, 1 µg de ARN típicamente contiene alrededor de 3 nmol de residuos fosfato, siempre que el ARN exhiba una distribución estadística de bases. Adicionalmente, 1 nmol de péptido típicamente contiene alrededor de x nmol de residuos de nitrógeno, dependiendo del peso molecular y del número de sus aminoácidos (catiónicos).  
25

Potencial zeta: El "potencial zeta" es un parámetro ampliamente usado para la carga eléctrica superficial de una partícula. Se determina típicamente moviendo la partícula cargada en un campo eléctrico. En el contexto de la presente invención, el potencial zeta es el parámetro preferido para caracterizar la carga de una partícula, por ejemplo de un complejo que  
30 comprende como portador o agente complejante un compuesto catiónico o policatiónico y/o un portador polimérico y, como carga de ácido nucleico, al menos un ARN que codifica para al menos un antígeno de la vacuna de ARN o un ácido nucleico de adyuvante. Por tanto, en el contexto de la presente invención, la carga de una partícula preferiblemente se determina calculando el potencial zeta por el método de electroforesis de Doppler láser usando un instrumento Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, RU) a 25°C y un ángulo de dispersión de 173°. La carga superficial de una partícula determinada también depende de la fuerza iónica de la matriz utilizada (por ejemplo sal que contiene una solución tampón) y del pH de la solución. Por tanto, el potencial zeta real de un complejo determinado en una relación de carga (N/P) puede variar ligeramente entre diferentes soluciones tampón usadas para la inyección. Para la medida, las partículas, tal como complejos que comprenden como portador o agente de formación de complejo un compuesto catiónico o policatiónico y/o un portador polimérico y como carga de ácido nucleico al menos un ARN que codifica para al menos un antígeno de la  
40 vacuna de ARN o un ácido nucleico de adyuvante de acuerdo a la invención, se suspenden preferiblemente en una solución de Lactato Ringer. En una realización específica, la presente invención se refiere al uso de un complejo cargado negativamente bajo las condiciones de una solución tampón de inyección determinada, preferiblemente una solución de lactato Ringer, evaluada por su potencial zeta. Una solución de lactato Ringer de acuerdo con la presente invención preferiblemente contiene 130 mmol/l de iones sodio, 109 mmol/l de iones cloruro, 28 mmol/l de lactato, 4 mmol/l de iones potasio y 1,5 mmol/l de iones calcio. El sodio, cloruro, potasio y lactato típicamente provienen de NaCl (cloruro de sodio), NaC<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (lactato de sodio), CaCl<sub>2</sub> (cloruro de calcio) y KCl (cloruro de potasio). La osmolaridad de la solución de lactato Ringer es 273 mOsm/l y el pH se ajusta a 6,5.  
45

Composición inmunoestimuladora: En el contexto de la invención, una composición inmunoestimuladora típicamente se puede entender como una composición que contiene al menos un componente capaz de inducir una respuesta inmunitaria o partir de la cual es derivable un componente que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Tal respuesta inmunitaria puede ser preferiblemente una respuesta inmunitaria innata o una combinación de una respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Preferiblemente, una composición inmunoestimuladora en el contexto de la invención contiene al menos una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante/adyuvante, más preferiblemente un ARN, por ejemplo una molécula de ARNm. El componente inmunoestimulador, tal como el ARNm puede ser formador de complejo con un portador adecuado. Por tanto, la composición inmunoestimuladora puede comprender un ARNm/portador-complejo.  
50 Además, la composición inmunoestimuladora puede comprender un adyuvante y/o un vehículo adecuado para el componente inmunoestimulador, tal como el ARNm.  
55

Ácido nucleico adyuvante: Un ácido nucleico adyuvante, como se usa aquí, se selecciona preferiblemente de ácidos

nucleicos conocidos por enlazarse a los receptores TLR. Tal ácido nucleico adyuvante puede estar en forma de un ácido nucleico CpG (inmunoestimulador), en particular CpG-ARN o CpG-ADN, que preferiblemente induce una respuesta inmunitaria innata. Un CpG-ARN o CpG-ADN usado de acuerdo a la invención puede ser un CpG-ADN de hebra simple (ss CpG-ADN), un CpG-ADN de hebra doble (dsADN), un CpG-ARN de hebra simple (ss CpG-ARN) o un CpG-ARN de hebra doble (ds CpG-ARN). El ácido nucleico CpG usado de acuerdo a la invención está preferiblemente en forma de CpG-ARN, más preferiblemente en forma de CpG-ARN de hebra simple (ss CpG-ARN). También preferiblemente, tal ácidos nucleicos CpG tienen una longitud como se describió anteriormente. Preferiblemente, los motivos CpG son no metilados. Además, un ácido nucleico de adyuvante, como se usa aquí, puede ser un ARN inmunoestimulador (isARN), que preferiblemente provoca una respuesta inmunitaria innata.

Preferiblemente, un ácido nucleico adyuvante, preferiblemente un ARN inmunoestimulador (isARN), como se usa aquí, puede comprender cualquier secuencia de ácido nucleico conocida para ser inmunoestimuladora, incluyendo, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que representan y/o que codifican ligandos de TLRs, preferiblemente seleccionados de miembros de la familia humana TLR1 – TLR10 o miembros de la familia murina TLR1 – TLR13, más preferiblemente seleccionados de miembros de la familia TLR1 – TLR10 (humana), aún más preferiblemente de TLR7 y TLR8, ligandos para receptores intracelulares para ARN (tal como RIG-I o MDA-5, etc.) (ver por ejemplo Meylan, E., Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol. Cell* 22, 561-569), o cualquier otra secuencia de ARN inmunoestimuladora. Tal ácido nucleico adyuvante puede comprender una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 5.000, de 5 a 5.000, o de 5 a 1.000, 5 a 500, 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

De acuerdo a una realización particularmente preferida, una secuencia de ácido nucleico adyuvante, particularmente un isARN, como se usa aquí, puede consistir en o comprender un ácido nucleico de fórmula (VII) o (VIII):

#### **$G_l X_m G_n$ , (fórmula (VII))**

donde:

G es guanosina, uracilo o un análogo de guanosina o uracilo;

X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente;

l es un entero de 1 a 40, donde cuando l = 1, G es guanosina o un análogo de la misma, cuando l > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma;

m es un entero y es al menos 3; donde cuando m = 3, X es uracilo o un análogo del mismo, cuando m > 3 están presentes al menos 3 uracilos sucesivos o análogos de uracilo;

n es un entero de 1 a 40, donde cuando n = 1, G es guanosina o un análogo de la misma, cuando n > 1, al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma.

#### **$C_l X_m C_n$ , (fórmula (VIII))**

donde:

C es citosina, uracilo o un análogo de citosina o uracilo;

X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente;

l es un entero e 1 a 40, donde cuando l = 1, C es citosina o un análogo de la misma, cuando l > 1, al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma;

m es un entero y es al menos 3; donde cuando m = 3, X es uracilo o un análogo del mismo, cuando m > 3, existen al menos 3 uracilos sucesivos o análogos de uracilo;

n es un entero de 1 a 40, donde cuando n = 1, C es citosina o un análogo de la misma, cuando n > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma.

Los ácidos nucleicos de fórmulas (VII) o (VIII), que se pueden usar como una secuencia de ácido nucleico adyuvante, particularmente un isARN, pueden ser moléculas de ácido nucleico relativamente cortas, de una longitud típica de aproximadamente de 5 a 100 (pero también pueden ser más largas a 100 nucleótidos para realizaciones específicas, por ejemplo hasta 200 nucleótidos), de 5 a 90 o de 5 a 80 nucleótidos, preferiblemente una longitud de aproximadamente 5 a 70, más preferiblemente una longitud de aproximadamente 8 a 60 y más preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a 60 nucleótidos, más preferiblemente de 20 a 60, más preferiblemente de 30 a 60 nucleótidos. Si el ácido nucleico de fórmula (VII) o (VIII) tiene una longitud máxima de por ejemplo 100 nucleótidos, m típicamente será  $\leq 98$ . El número de nucleótidos G en el ácido nucleico de fórmula (I) está determinado por l o n. l y n, independientemente uno de otro, son cada uno un entero de 1 a 40, donde cuando l o n = 1, G es guanosina o un análogo de la misma, y cuando l o n > 1, al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4,  $G_l$  o  $G_n$  puede ser, por ejemplo, GUGU, GGUU, UGUG, UUGG, GUUG, GGGU, GGUG, GUGG, UGGG o GGGG, etc.; cuando l o n = 5,  $G_l$  o  $G_n$  puede ser, por ejemplo, GGGUU, GGUGU, GUGGU, UGGGU, UGGUG, UGUGG, UUGGG, GUGUG, GGGGU, GGGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG, o GGGGG, etc.; etc. Un nucleótido adyacente a  $X_m$  en el ácido nucleico de fórmula (VII) de acuerdo con la invención preferiblemente no es uracilo. Similarmente, el número de nucleótidos C en el ácido nucleico de fórmula (VIII) de acuerdo con la invención está determinado por l o n. l y n, independientemente uno de otro, son cada uno un entero de 1 a 40, donde cuando l o n = 1, C es citosina o un análogo de la misma, y cuando l o n > 1, al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4,  $C_l$  o  $C_n$  pueden ser, por ejemplo, CUCU, CCUU,

UCUC, UUCC, CUUC, CCCU, CCUC, CUCC, UCCC o CCCC, etc.; cuando  $l$  o  $n = 5$ ,  $C_l$  o  $C_n$  pueden ser, por ejemplo, CCCUU, CCUCU, CUCCU, UCCCU, UCCUC, UCUCC, UUCCC, CUCUC, CCCC, CCCUC, CCUCC, CUCCC, UCCCC, o CCCCC, etc.; etc. Un nucleótido adyacente a  $X_m$  en el ácido nucleico de fórmula (VIII) de acuerdo con la invención preferiblemente no es uracilo. Preferiblemente, para la fórmula (VII), cuando  $l$  o  $n > 1$ , al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o aún el 100% de los nucleótidos son guanósina o un análogo de la misma como se definió arriba. Los nucleótidos restantes hasta el 100% (cuando guanósina constituye menos del 100% de los nucleótidos) en las secuencias que flanquean  $G_1$  y/o  $G_n$  son uracilo o un análogo del mismo, como se definió anteriormente.

También preferiblemente,  $l$  y  $n$ , independientemente uno de otro, son cada uno un entero de 2 a 30, más preferiblemente un entero de 2 a 20 y aún más preferiblemente un entero de 2 a 15. El límite inferior de  $l$  o  $n$  puede variar si es necesario y es al menos 1, preferiblemente al menos 2, más preferiblemente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Esta definición se aplica correspondientemente a la fórmula (VIII).

De acuerdo con una realización particularmente preferida adicional, una secuencia de ácido nucleico adyuvante, particularmente un isARN, como se usa aquí, puede consistir en o comprender un ácido nucleico de fórmula (IX) o (X):

**$(N_u G_l X_m G_n N_v)_a$ , (fórmula (IX))**

15 donde:

G es guanósina (guanina), uridina (uracilo) o un análogo de guanósina (guanina) o uridina (uracilo), preferiblemente guanósina (guanina) o un análogo de la misma;

X es guanósina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina), o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos), preferiblemente uridina (uracilo) o un análogo del mismo;

20 N es una secuencia de ácido nucleico con una longitud de alrededor de 4 a 50, preferiblemente de alrededor de 4 a 40, más preferiblemente de alrededor de 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, seleccionándose cada N independientemente de guanósina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);

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

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

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

30 n es un entero de 1 a 40, donde cuando  $n = 1$ , G es guanósina (guanina) o un análogo de la misma, cuando  $n > 1$ , al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanósina (guanina) o un análogo de la misma;

u, v pueden ser independientemente uno del otro un entero de 0 a 50, preferiblemente donde cuando  $u = 0$ ,  $v \geq 1$ , o cuando  $v = 0$ ,  $u \geq 1$ ;

35 teniendo la molécula de ácido nucleico de fórmula (IX) una longitud de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de al menos 100 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 150 nucleótidos, aún más preferiblemente de al menos 200 nucleótidos y más preferiblemente de al menos 250 nucleótidos.

**$(N_u C_l X_m C_n N_v)_a$  (fórmula (X))**

donde:

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

40 X es guanósina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de los nucleótidos mencionados anteriormente (nucleósidos), preferiblemente uridina (uracilo) o un análogo de la misma;

N es cada una secuencia de ácido nucleico que, independiente una de otra, tiene una longitud de alrededor de 4 a 50, preferiblemente de alrededor de 4 a 40, más preferiblemente de alrededor de 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, seleccionándose cada N independientemente de guanósina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);

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

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

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

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

u, v pueden ser independientemente uno del otro un entero de 0 a 50, preferiblemente donde cuando  $u = 0$ ,  $v \geq 1$ , o cuando  $v = 0$ ,  $u \geq 1$ ;

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

Cualquiera de las definiciones dadas anteriormente en las fórmulas (VII) y (VIII), por ejemplo para los elementos N (esto es  $N_u$  y  $N_v$ ) y X ( $X_m$ ), particularmente la estructura de núcleo como se definió arriba, así como para los enteros a, l, m, n, u y v, similarmente aplica a los elementos de la fórmula (IX) y (X) correspondientemente. La definición de elementos limítrofes  $N_u$  y  $N_v$  en la fórmula (X) es idéntica a las definiciones dadas anteriormente para  $N_u$  y  $N_v$  en la fórmula (IX).

5 ARN inmuoestimulador: Un ARN inmuoestimulador (isARN) en el contexto de la invención típicamente puede ser un ARN que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria innata. Éste usualmente no tiene un marco de lectura abierto y, por tanto, no proporciona un péptido-antígeno o inmunógeno, pero provoca una respuesta inmunitaria innata, por ejemplo por enlace a una clase específica de receptor tipo Toll (TLR) u otros receptores adecuados. Sin embargo, por supuesto también los ARNm que tienen un marco de lectura abierto y que codifican para un péptido/proteína puede inducir una  
10 respuesta inmunitaria innata y, por tanto, pueden ser ARN inmuoestimuladores. Preferiblemente, el ARN inmuoestimulador puede ser un ARN de hebra simple, uno de hebra doble o uno parcialmente de hebra doble, más preferiblemente un ARN de hebra simple, y/o un ARN circular o lineal, más preferiblemente un ARN lineal. Más preferiblemente, el ARN inmuoestimulador puede ser un ARN (lineal) de hebra simple. Aún más preferiblemente, el ARN inmuoestimulador puede ser un ARN no codificante (largo) (lineal) (de hebra simple). En este contexto es particularmente preferido que el isARN lleve un trifosfato en su extremo 5'- que es el caso para ARN transcrito *in vitro*. Un ARN inmuoestimulador también puede ocurrir como un oligonucleótido de ARN corto como se define aquí. Un ARN inmuoestimulador como se usa aquí además se puede seleccionar de cualquier clase de moléculas de ARN, encontradas en la naturaleza o que se preparan sintéticamente, y que pueden inducir una respuesta inmunitaria innata y pueden soportar una respuesta inmunitaria adaptativa inducida por antígeno. Además, (clases de) moléculas de ARN inmuoestimulador, usadas como un compuesto adicional de la combinación de vacuna/inhibidor inventiva, puede incluir cualquier otro ARN capaz de provocar una respuesta inmunitaria innata. Por ejemplo, tal ARN inmuoestimulador puede incluir ARN ribosomal (ARNr), ARN transferente (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y ARN viral (ARNv). Tal ARN inmuoestimulador puede comprender una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 5.000, de 5 a 5.000, o de 5 a 1.000, 5 a 500, 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

25 siARN: Un pequeño ARN de interferencia (siARN) es de interés particularmente en conexión con el fenómeno de interferencia de ARN. La técnica *in vitro* de interferencia de ARN (ARNi) se basa en moléculas de ARN de hebra doble (dsARN), que provoca la supresión específica de secuencia de la expresión génica (Zamore (2001) Nat. Struct. Biol. 9: 746-750; Sharp (2001) Genes Dev. 5:485-490; Hannon (2002) Nature 41: 244-251). En la transfección de células de mamíferos con dsARN largo, la activación de la proteína-quinasa R y RNAsa-L produce unos efectos no específicos, por ejemplo una respuesta de interferón (Stark *et al.* (1998) Annu. Rev. Biochem. 67: 227-264; He and Katze (2002) Viral Immunol. 15: 95-119). Estos efectos no específicos se evitan cuando se usa el llamado siARN más corto, por ejemplo 21- hasta 23-mer, (ARN de interferencia pequeño), debido a que los efectos no específicos no se desencadenan por un siARN que es más corto de 30 pb (Elbashir *et al.* (2001) Nature 411: 494-498).

En el contexto de la presente descripción, los siARN (no reivindicados) dirigidos contra PD-1, PD-L1 o PD-L2 por tanto pueden ser ARN de hebra doble (dsARNs) que tienen una longitud de 17 a 29, preferiblemente de 19 a 25 y preferiblemente es al menos en un 90%, más preferiblemente 95% y especialmente 100% (de los nucleótidos de un dsARN) complementario a una sección de la secuencia de ARNm que se presenta naturalmente que codifica para PD-1, PD-L1 o PD-L2 tanto en una sección codificante o como no codificante, preferiblemente una sección codificante. Tal sección de la secuencia de ARNm que se presenta naturalmente se puede denominar aquí "secuencia diana" y puede ser cualquier sección de ARNm que se presenta naturalmente que codifica para PD-1, PD-L1 o PD-L2. 90% complementario significa que, con una longitud del dsARN aquí descrito de, por ejemplo, 20 nucleótidos, el dsARN contiene no más de 2 nucleótidos que no muestran complementariedad con la correspondiente sección de la secuencia diana. Sin embargo, la secuencia del siARN de hebra doble usada de acuerdo con la invención es preferiblemente totalmente complementaria en su estructura general con una sección de la secuencia diana. En este contexto, la molécula de ácido nucleico del complejo puede ser un dsARN que tiene la estructura general 5'-( $N_{17-29}$ )-3', preferiblemente que tiene la estructura general 5'-( $N_{19-25}$ )-3', más preferiblemente que tiene la estructura general 5'-( $N_{19-24}$ )-3', o aún más preferiblemente que tiene la estructura general 5'-( $N_{21-23}$ )-3', donde, para cada estructura general, cada N es un nucleótido (preferiblemente diferente) de una sección de la secuencia diana, preferiblemente seleccionado de un número continuo de 17 a 29 nucleótidos de una sección de la secuencia diana, y que está presente en la estructura general 5'-( $N_{17-29}$ )-3' en su orden natural. En principio, todas las secciones con una longitud de 17 a 29, preferiblemente de 19 a 25, pares de bases que ocurren en la secuencia diana pueden servir para preparar un dsARN como se define aquí. Igualmente, los dsARN usados como siARN pueden también dirigirse contra secuencias de ARNm que no se encuentran en la región de codificación, en particular en la región no codificadora 5' de la secuencia diana, por ejemplo, así, contra regiones no codificadoras de la secuencia diana que tienen una función reguladora. La secuencia diana del dsARN usada como siARN puede, por tanto, caer en la región traducida y no traducida de la secuencia diana y/o en la región de los elementos de control de la secuencia de ARNm. La secuencia diana para un dsARN usada como siARN dirigida contra PD-1, PD-L1 o PD-L2 puede también caer en la región de solape de la secuencia no traducida y traducida; en particular, la secuencia diana puede comprender al menos un nucleótido aguas arriba del triplete de inicio de la región de codificación de la secuencia de ARNm.

Marco de lectura abierto: Un marco de lectura abierto (ORF) en el contexto de la invención típicamente puede ser una

5 secuencia de diversos tripletes de nucleótidos que se pueden traducir en un péptido o proteína. Un marco de lectura abierto preferiblemente contiene un codón de inicio, esto es una combinación de tres nucleótidos subsiguientes que codifican usualmente para el aminoácido metionina (ATG o AUG), en su extremo 5'- y una región posterior que usualmente tiene una longitud múltiplo de 3 nucleótidos. Un ORF preferiblemente está terminado por un codón de parada (por ejemplo, TAA, TAG, TGA). Típicamente, éste es únicamente codón de parada del marco de lectura abierto. Por tanto, un marco de lectura abierto en el contexto de la presente invención es preferiblemente una secuencia de nucleótidos que consiste en un número de nucleótidos que se pueden dividir entre tres, que inician con un codón de inicio (por ejemplo ATG o AUG) y que preferiblemente terminan con un codón de parada (por ejemplo, TAA, TGA, o TAG o UAA, UAG, UGA, respectivamente). El marco de lectura abierto se puede aislar o se puede incorporar en una secuencia de ácido nucleico más larga, por ejemplo en un vector o un ARNm. Un marco de lectura abierto también se puede denominar "región de codificación de proteína" o "región de codificación".

15 Secuencia IRES (sitio de entrada ribosomal interno): Una IRES puede funcionar como un sitio de enlace de ribosoma único, pero también puede servir para proporcionar un ARN bi- o multi-cistrónico como se define aquí que codifica para diversas proteínas o péptidos, que son traducidos por los ribosomas independientemente uno de otro. Ejemplos de secuencias IRES que se pueden usar de acuerdo con la invención son aquellas de picornavirus (por ejemplo FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de enfermedad de pies y boca (FMDV), virus de hepatitis C (HCV), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), virus de leucemia de ratón (MLV), virus de inmunodeficiencia de simio (SIV) o virus de parálisis de grillo (CrPV).

20 Fragmento o parte de un antígeno (proteína/péptido): Se entiende como fragmentos o partes de un antígeno (proteína/péptido) en el contexto de la presente invención típicamente péptidos que corresponden a una parte continua de la secuencia de aminoácidos de un antígeno (proteína/péptido), preferiblemente con una longitud de alrededor de 6 a alrededor de 20 o aún más aminoácidos, por ejemplo partes tal como se procesan y son presentadas por moléculas de clase I MHC, preferiblemente con una longitud de alrededor de 8 a alrededor de 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9, o 10, (o aún 11, o 12 aminoácidos), o fragmentos como se procesan y presentan por moléculas de clase II MHC, preferiblemente con una longitud de alrededor de 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o aún más aminoácidos, donde estos fragmentos se pueden seleccionar de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son reconocidos típicamente por las células T en forma de un complejo que consiste en el fragmento peptídico y una molécula MHC, esto es, los fragmentos típicamente no son reconocidos en su forma nativa. Los fragmentos o partes de los antígenos (proteína/péptido) como se definen aquí también pueden comprender epítopos o sitios funcionales de estos antígenos (proteína/péptido). Preferiblemente, los fragmentos o partes de un antígeno (proteína/péptido) en el contexto de la invención son o comprenden epítopos, o tienen características antigénicas, que provocan una respuesta inmunitaria adaptativa. Por tanto, los fragmentos de antígenos (proteína/péptido) pueden comprender al menos un epítipo de estos antígenos (proteína/péptido). Además, también los dominios de un antígeno (proteína/péptido), como el dominio extracelular, el dominio intracelular o el dominio de transmembrana y versiones acortadas o truncadas de un antígeno (proteína/péptido) se puede considerar que comprenden un fragmento de un antígeno (proteína/péptido).

40 Variantes de proteínas: Se pueden generar "variantes" de proteínas o péptidos como se definen en el contexto de la presente invención con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia inicial en una o más mutaciones, tal como uno o más aminoácidos sustituidos, insertados y/o eliminados. Preferiblemente, estas variantes tienen la misma función biológica o actividad específica en comparación con la proteína nativa de longitud completa, por ejemplo su propiedad antigénica específica. "Variantes" de proteínas o péptidos como se definen en el contexto de la presente invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con su secuencia, nativa, esto es fisiológica no mutada. Estas secuencias de aminoácidos, así como sus secuencias de nucleótidos de codificación, en particular caen bajo el término variantes como se define aquí. Las sustituciones donde los aminoácidos, que se originan de la misma clase, se intercambian unos por otros se llaman sustituciones conservativas. En particular, son aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales cargadas positiva o negativamente, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos, las cadenas laterales de las cuales pueden participar en puentes de hidrógeno, por ejemplo cadenas laterales con una función hidroxilo. Esto significa que, por ejemplo un aminoácido que tiene una cadena lateral polar, se reemplaza por otro aminoácido que tiene una cadena lateral también polar, o, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrofóbica se sustituye por otro que tiene una cadena lateral también hidrofóbica (por ejemplo serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Son posibles las inserciones y sustituciones, en particular, en aquellas posiciones de secuencia que no causan una modificación de la estructura tridimensional o no afectan a la región de enlace. Las modificaciones de una estructura tri-dimensional por inserciones o eliminaciones se puede determinar fácilmente por ejemplo usando espectros CD (espectros de dicroísmo circular) (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, in: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger *et al.* (ed.), Elsevier, Ámsterdam).

Además, las variantes de proteínas o péptidos como se definen aquí, que se pueden codificar por una molécula de ácido nucleico, también pueden comprender aquellas secuencias donde los nucleótidos del ácido nucleico se intercambian de acuerdo con la degeneración del código genético, sin conllevar a una alteración de la respectiva secuencia de aminoácidos de la proteína o péptido, esto es la secuencia de aminoácidos o al menos parte de la misma no puede diferir de la

secuencia inicial en una o más mutaciones dentro del significado anterior.

Con objeto de determinar el porcentaje en que dos secuencias son idénticas, por ejemplo secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos como se definen aquí, preferiblemente las secuencias de aminoácidos codificadas por una secuencia de ácido nucleico del portador polimérico como se define aquí o las secuencias de aminoácidos por sí mismas, se pueden alinear con objeto de posteriormente compararse con otras. Por lo tanto, por ejemplo una posición de una primera secuencia se puede comparar con la posición correspondiente de una segunda secuencia. Si una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo componente (residuo) que en una posición de la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esta posición. Si este no es el caso, las secuencias difieren en esta posición. Si las inserciones ocurren en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, se pueden insertar espaciadores en la primera secuencia para permitir una alineación adicional. Si las eliminaciones ocurren en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, los espaciadores se pueden insertar en la segunda secuencia para permitir una alineación adicional. El porcentaje en que dos secuencias son idénticas es entonces función del número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones, incluyendo aquellas posiciones únicamente ocupadas en una secuencia. El porcentaje en que dos secuencias son idénticas se puede determinar usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente de algoritmo matemático que se puede usar, pero sin limitación, es el algoritmo de Karlin *et al.* (1993), PNAS USA, 90:5873-5877 o Altschul *et al.* (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Tal algoritmo se integra en el programa BLAST. Las secuencias que son idénticas a las secuencias de la presente invención hasta cierto punto se pueden identificar con este programa. Una "variante" de una proteína o péptido puede tener al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de aminoácido en un tramo de 10, 20, 30, 50, 75 o 100 aminoácidos de tal proteína o péptido, preferiblemente en la secuencia de longitud completa de la que se deriva esa variante. Análogamente, una "variante" de una secuencia de ácido nucleico puede tener al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de nucleótido en un tramo de 10, 20, 30, 50, 75 o 100 nucleótidos de tal secuencia de ácido nucleico, preferiblemente en la secuencia de longitud completa de la que se deriva la variante.

Derivado de una proteína o péptido: Un derivado de un péptido o proteína se entiende típicamente como una molécula que se deriva de otra molécula, tal como tal péptido o proteína. Un "derivado" de un péptido o proteína también abarca fusiones que comprenden un péptido o proteína usado en la presente invención. Por ejemplo, la fusión comprende una etiqueta, por ejemplo un epítipo, por ejemplo un epítipo FLAG o un epítipo V5. Por ejemplo, el epítipo es un epítipo FLAG. Tal etiqueta es útil para, por ejemplo, purificar la proteína de fusión.

Cantidad farmacéuticamente efectiva: Una cantidad farmacéuticamente efectiva en el contexto de la invención se entiende típicamente como una cantidad que es suficiente para inducir un efecto farmacéutico, tal como una respuesta inmunitaria, que altera un nivel patológico de un péptido o proteína expresado, o sustituye un producto carente de gen, por ejemplo, en el caso de una situación patológica.

Vehículo: Un vehículo se entiende típicamente como un material adecuado para almacenar, transportar y/o administrar un compuesto, tal como un compuesto farmacéuticamente activo. Por ejemplo, puede ser un líquido fisiológicamente aceptable adecuado para almacenar, transportar y/o administrar un compuesto farmacéuticamente activo.

Ruta PD-1: Los miembros de la ruta PD-1 son todas las proteínas que están asociadas a la señalización de PD-1. Por un lado, podrían ser proteínas que inducen la señalización PD-1 aguas arriba de PD-1, por ejemplo los ligandos de PD-1 PD-L1 y PD-L2 y el receptor de transducción de señal PD-1. Por otro lado, podrían ser proteínas de transducción de señal aguas abajo del receptor PD-1. Miembros de la ruta PD-1 son por ejemplo PD-1, PD-L1 y PD-L2.

Inhibidor de la ruta PD-1: De acuerdo con la presente invención tal como se define en sus reivindicaciones adjuntas, el inhibidor de la ruta PD-1 comprendido en la combinación vacuna/inhibidor es un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-L1. También se describen aquí realizaciones no reivindicadas donde un inhibidor de la ruta PD-1 preferentemente se define como un compuesto capaz de dañar la señalización de la ruta PD-1, preferiblemente la señalización mediada por el receptor PD-1. Además, se describe aquí que el inhibidor de la ruta PD-1 puede ser cualquier inhibidor dirigido contra cualquier miembro de la ruta PD-1 capaz de antagonizar la señalización de la ruta PD-1. Según una realización no reivindicada, el inhibidor puede ser un anticuerpo antagonista como se define aquí, cuya diana es cualquier miembro de la ruta PD-1, preferiblemente dirigido contra el receptor PD-1, PD-L1 o PD-L2. Este anticuerpo antagonista también puede estar codificado por un ácido nucleico (no reivindicado). Tales anticuerpos codificados también se llaman "intracuerpos" como se definen aquí. También, el inhibidor de la ruta PD-1 puede ser un fragmento del receptor PD-1 o el receptor PD1 que bloquea la actividad de ligandos PD1 (no reivindicado). B7-1 o fragmentos del mismo pueden actuar como ligandos que inhiben PD1 también. Además, el inhibidor de la ruta PD-1 puede ser un siARN (pequeño ARN de interferencia) o ARN antisentido dirigido contra un miembro de la ruta PD-1, preferiblemente PD-1, PD-L1 o PD-L2 (no reivindicado). Adicionalmente, un inhibidor de la ruta PD-1 puede ser una proteína que comprende (o un ácido nucleico que codifica para) una secuencia de aminoácidos capaz de enlazar a PD-1 pero de prevenir la señalización PD-1, por ejemplo inhibiendo la interacción con PD-1 y B7-H1 o B7-DL (no reivindicado). Adicionalmente, un inhibidor de la ruta PD-1 puede ser un inhibidor de molécula pequeña capaz de inhibir la señalización de la ruta PD-1, por ejemplo un péptido de enlace PD-1 o una molécula orgánica pequeña (no reivindicado).

**Anticuerpo:** Un anticuerpo se puede seleccionar de cualquier anticuerpo, por ejemplo cualquiera de los anticuerpos producidos de forma recombinante o que se presentan naturalmente, conocidos en la técnica, de anticuerpos particulares adecuados para propósitos terapéuticos, diagnósticos o científicos, particularmente dirigido contra PD-1, PD-L1 o PD-L2. Aquí, el término “anticuerpo” se usa en su sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales y policlonales (que incluyen, antagonista, y anticuerpos de bloqueo o neutralizantes) y especies de anticuerpos con especificidad poliepitópica. De acuerdo con la invención, “anticuerpo” típicamente comprende cualquier anticuerpo conocido en la técnica (por ejemplo anticuerpos IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), tales como anticuerpos que se presentan naturalmente, anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped, anticuerpos que se aislaron e identificaron de anticuerpos que se presentan naturalmente o anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped y producido de forma recombinante por métodos biomoleculares conocidos en la técnica, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, intracuerpos, esto es anticuerpos expresados en células y opcionalmente ubicados en compartimientos celulares específicos, y fragmentos y variantes de los anticuerpos mencionados anteriormente. En general, un anticuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada, ambas con dominios variables y constantes. La cadena ligera consiste en un dominio variable N-terminal, VL, y un dominio constante C-terminal, CL. En contraste, la cadena pesada del anticuerpo IgG, por ejemplo, se compone de un dominio variable N-terminal, VH, y tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos de cadena simple también se pueden usar de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos preferiblemente pueden comprender anticuerpos de longitud completa, esto es anticuerpos compuestos de las cadenas pesada completa y ligera completa, como se describió anteriormente. Sin embargo, derivados de anticuerpos tales como fragmentos de anticuerpo, variantes o aductos, también se pueden usar como inhibidores de la ruta PD-1 de acuerdo con la invención. Los fragmentos de anticuerpos se pueden seleccionar de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc, Facb, pFc', Fd y fragmentos Fv de los anticuerpos antes mencionados (longitud completa). En general, los fragmentos de anticuerpo se conocen en la técnica. Por ejemplo, un fragmento Fab (“fragmento, enlace de antígeno”) se compone de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Los dos dominios variables enlazan el epítipo en antígenos específicos. Las dos cadenas se conectan por un enlace disulfuro. Un fragmento scFv (“fragmento variable de cadena simple”), por ejemplo, típicamente consiste en los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. Los dominios se unen por un enlace artificial, en general por un polipéptido tal como un péptido compuesto de 15-25 residuos de glicina, prolina y/o serina.

**Anticuerpo policlonal:** “Anticuerpo policlonal” típicamente significa mezclas de anticuerpos dirigidos a antígenos específicos o inmunógenos o epítipos de una proteína generados por inmunización de un organismo huésped, tal como un mamífero, por ejemplo incluyendo cabra, ganado, cerdos, perros, gatos, burro, mono, simio, roedores como un, hámster y conejo. Los anticuerpos policlonales generalmente no son idénticos y, por tanto, usualmente reconocen diferentes epítipos o regiones del mismo antígeno. Así, en tal caso, se emplea típicamente una mezcla (una composición) de diferentes anticuerpos, dirigiéndose cada anticuerpo a antígenos específicos o inmunógenos o epítipos de una proteína, en particular dirigidos a PD-1, PD-L1 o PD-L2.

**Anticuerpo monoclonal:** El término “anticuerpo monoclonal” típicamente se refiere aquí a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, esto es, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para mutaciones que se presentan naturalmente, que pueden aparecer en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, que se dirigen a un sitio antigénico simple. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonal) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal se dirige a un determinante simple en el antígeno. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales como se definen arriba se pueden obtener por el método de hibridoma descrito primero por Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), o por métodos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en la Patente US 4.816.567. Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de colecciones de fago generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990), por ejemplo. De acuerdo a Kohler y Milstein, un inmunógeno (antígeno) de interés se inyecta en un huésped, tal como un ratón, y los linfocitos de células B producidos en respuesta al inmunógeno se cosechan después de un tiempo. Las células B se combinan con células de mieloma obtenidas de ratón e introducidas en un medio que permite a las células B fusionarse con las células de mieloma, produciendo hibridomas. Estas células fusionadas (hibridomas) se colocan luego en pocillos separados de placas de microtitulación y crecen para producir anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se ensayan para determinar cuáles son adecuados para detectar el antígeno de interés. Después de seleccionarse, los anticuerpos monoclonales se pueden cultivar en cultivos celulares o inyectando los hibridomas en ratones. En el contexto de la presente invención, son particularmente preferidos anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1, PD-L1 y PD-L2.

**Anticuerpos quiméricos:** Los anticuerpos quiméricos que se pueden usar como inhibidores de la ruta PD-1 de acuerdo con la invención son preferiblemente anticuerpos donde los dominios constantes de un anticuerpo descrito arriba se reemplazan por secuencias de anticuerpos de otros organismos, preferiblemente secuencias humanas.

**Anticuerpos humanizados:** Los anticuerpos humanizados (no humanos) que se pueden usar como inhibidores de la ruta PD-1 de acuerdo con la invención son anticuerpos donde los dominios constante y variable (excepto para los dominios hipervariables) de un anticuerpo se reemplazan por secuencias humanas.

Anticuerpos humanos: Los anticuerpos humanos se pueden aislar de tejidos humanos o de organismos huésped no humanos inmunizados que son transgen para la ubicación del gen IgG humano. Adicionalmente, los anticuerpos humanos se pueden proporcionar por el uso de una visualización de fago.

5 Anticuerpos biespecíficos: Los anticuerpos biespecíficos en el contexto de la invención son preferiblemente anticuerpos que actúan como un adaptador entre un efector y una diana respectiva por dos diferentes dominios  $F_{a/b}$ , por ejemplo con el propósito de reclutar moléculas efectoras como toxinas, fármacos, citoquinas etc., que dirigen células efectoras, como células CTL, NK, macrófagos, granulocitos, etc. (ver para revisión: Kontermann R.E., Acta Pharmacol. Sin, 2005, 26(1): 1-9). Los anticuerpos biespecíficos como se describen aquí en general están configurados para ser reconocidos por dos diferentes dominios  $F_{a/b}$ , por ejemplo dos diferentes antígenos, inmunógenos, epítomos, fármacos, células (o receptores en células), u otras moléculas (o estructuras) como se describió anteriormente. Biespecificidad significa aquí que las regiones de enlace de antígeno de los anticuerpos son específicas para dos diferentes epítomos. Por tanto, diferentes antígenos, inmunógenos o epítomos, etc. pueden ser llevados juntos, lo que, opcionalmente, permite una interacción directa de los dos componentes. Por ejemplo, diferentes células, como células efectoras y células diana, se pueden conectar mediante un anticuerpo biespecífico. Abarcado, pero no limitado, por la presente invención son anticuerpos o fragmentos del mismo que enlazan, por una parte, un antígeno soluble y, por otro lado, un antígeno o receptor, por ejemplo PD-1 o sus ligandos PD-L1 y PD-L2, en la superficie de una célula, por ejemplo una célula tumoral.

10 Intracuerpos: Los intracuerpos pueden ser anticuerpos como se definen arriba. Estos anticuerpos son anticuerpos expresados intracelulares y, por tanto, estos anticuerpos pueden ser codificados por ácidos nucleicos a emplearse para la expresión de los anticuerpos codificados. Según una realización no reivindicada, los ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo, preferiblemente como se definió arriba, en particular un anticuerpo dirigido contra un miembro de la ruta PD-1, por ejemplo PD-1, PD-L1 o PD-L2, se pueden usar como inhibidor de la ruta PD-1 de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con un primer aspecto, el objeto que subyace en la presente invención se resuelve mediante una combinación vacuna/inhibidor que comprende:

- 25 (i) como vacuna, una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN, donde dicho al menos un ARN es un ARNm, que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno, y
- (ii) como inhibidor, una composición que comprende al menos un inhibidor de la ruta PD-1, donde el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo antagonista que está dirigido contra PD-L1.

30 En el contexto de la presente invención, el término “combinación vacuna/inhibidor” preferiblemente significa una ocurrencia combinada de una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno y de una composición que comprende al menos un inhibidor de la ruta PD-1 tal como se define en las reivindicaciones. Por tanto, esta combinación vacuna/inhibidor puede ocurrir ya sea como una composición, que comprende todos estos componentes en una y la misma mezcla (por ejemplo en una composición farmacéutica), o puede ocurrir como un kit de partes donde los diferentes componentes forman diferentes partes de tal kit de partes. Esta combinación vacuna/inhibidor inventiva preferiblemente permite provocar una respuesta inmunitaria adaptativa (y opcionalmente una respuesta inmunitaria innata) en un paciente a tratar, preferiblemente un mamífero, empleando como un primer componente una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica al menos un antígeno, preferiblemente que codifica un antígeno tumoral o un antígeno patogénico. Este inhibidor de la combinación vacuna/inhibidor inventiva que es un inhibidor de la ruta PD-1 puede antagonizar la señalización de la ruta PD-1 preferiblemente inhibiendo o suprimiendo la transducción de señal mediada por el receptor PD-1. Por tanto, la administración de la vacuna y el inhibidor puede ocurrir ya sea simultáneamente o escalonada en el tiempo, ya sea en el mismo sitio de administración o en diferentes sitios de administración, como se resume más adelante. Tal combinación vacuna/inhibidor puede inducir una respuesta inmunitaria activa y así previene por ejemplo el crecimiento tumoral o induce la regresión tumoral. La combinación vacuna/inhibidor inventiva es por tanto adecuada para estimular efectivamente la respuesta inmunitaria específica de antígenos contra cáncer y células infectadas con patógeno. Más precisamente, la combinación vacuna/inhibidor de la invención es particularmente adecuada para el tratamiento de enfermedades tumorales y enfermedades infecciosas que se pueden asociar a una sobreexpresión de PD-1, PD-L1 o PD-L2 y para mejorar además la respuesta inmunitaria contra tales células tumorales e infectadas.

40 Por tanto, la invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la combinación de una vacuna de ARN y un inhibidor de la ruta PD-1 muestra una inhibición del crecimiento tumoral extremadamente ventajosa, resultando en una supervivencia mejorada que no se podría esperar de la técnica previa. Así, el tratamiento combinado con una vacuna de ARN, por ejemplo que codifica para un antígeno específico (vacunación activa) tal como un antígeno tumoral, y con un inhibidor dirigido a un miembro de la ruta PD-1, particularmente el receptor PD-1 o sus ligandos PD-L1 y PD-L2, podrían disminuir fuertemente el impacto perjudicial de una enfermedad a tratar, por ejemplo la velocidad de crecimiento de un tumor. En este contexto, los inventores sorprendentemente encontraron que el tratamiento con una vacuna de ARN que

comprende un ARN que codifica para un antígeno tumoral en combinación con un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en las reivindicaciones inesperadamente inhibe el crecimiento del tumor, resultando en una supervivencia mejorada de ratones enfrentados al tumor de una manera sinérgica, como se evidencia por la ocurrencia del 50% de respuestas completas.

- 5 Como un primer componente, la combinación vacuna/inhibidor inventiva incluye como vacuna una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno, preferiblemente un antígeno tumoral o un antígeno patogénico.

10 De acuerdo con la invención, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva preferiblemente comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica al menos un antígeno como se define aquí.

El al menos un ARN de la vacuna de ARN es un ARN mensajero (ARNm).

Sin embargo otras formas de ARN pueden encontrar igualmente su aplicación en realizaciones no cubiertas por las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, el ARN puede ser un ARN derivado de virus, tal como ARN de retrovirus o un replicón de ARN como se define aquí, por ejemplo derivado de un alfavirus.

- 15 En realizaciones específicas, el al menos un ARN de la vacuna de ARN no comprende o no consiste en un vector lentiviral o un vector adenoviral/adeno-asociado.

En una realización específica, la vacuna de ARN comprende o consiste en ARN aislado tal como se define aquí.

20 Además, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva puede ser un ARN mono- o bi-catenario (que también se puede considerar como un ARN (molécula) debido una asociación no covalente de dos ARN monocatenarios (moléculas)) o un ARN parcialmente de doble hebra o parcialmente de una hebra que son al menos parcialmente auto-complementarios (ambas moléculas de ARN parcialmente de hebra doble o parcialmente de hebra simple típicamente se forman por una molécula de ARN de hebra simple más larga y una más corta o por dos moléculas de ARN de hebra simple, que son aproximadamente de igual en longitud, donde una molécula de ARN de hebra simple es en parte complementaria a la otra molécula de ARN de hebra simple y ambas forman así una molécula de ARN de hebra doble en esta región, esto es un ARN parcialmente de hebra doble o parcialmente de hebra simple).  
 25 Preferiblemente, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva puede ser un ARN monocatenario. Además, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva puede ser un ARN circular o lineal, preferiblemente un ARN lineal. Más preferiblemente, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva puede ser un ARN de una hebra (lineal).

- 30 Preferiblemente, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva comprende una longitud de alrededor de 5 a alrededor de 20.000, o 100 a alrededor de 20.000 nucleótidos, preferiblemente de alrededor de 250 a alrededor de 20.000 nucleótidos, más preferiblemente de alrededor de 500 a alrededor de 10.000, aún más preferiblemente de alrededor de 500 a alrededor de 5.000.

35 En una realización particularmente preferida del primer aspecto de la invención, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto codifica al menos un antígeno tumoral. En este contexto, los antígenos tumorales se ubican preferiblemente en la superficie de la célula (tumoral). Los antígenos tumorales también se pueden seleccionar de proteínas que se sobreexpresan en células tumorales en comparación con una célula normal (por ejemplo células no tumorales). Además, los antígenos tumorales también incluyen antígenos expresados en las células que no están (estaban) ellos mismos (u originalmente no estaban ellos mismos) degenerados, sino asociados al supuesto tumor. Los antígenos que se conectan con vasos que alimentan al tumor o su (re)formación, en particular aquellos asociados a la neovascularización, por ejemplo factores de crecimiento, tal como VEGF, bFGF etc., también se incluyen aquí. Los antígenos asociados a tumor además incluyen antígenos de células o tejidos que típicamente incrustan el tumor. Además, ciertas sustancias (usualmente proteínas o péptidos) se expresan en pacientes que padecen (intencionadamente o no intencionadamente) una enfermedad de cáncer y se producen en concentraciones incrementadas en los fluidos del cuerpo de tales pacientes. Estas sustancias también son referidas como "antígenos tumorales", sin embargo no son antígenos en el sentido estricto de una respuesta inmunitaria que induce la sustancia. La clase de antígenos tumorales se puede dividir además en antígenos específicos de tumor (TSAs) y antígenos asociados a tumor (TAAs). Los TSA se pueden presentar únicamente por células de tumor y nunca por células "saludables" normales. Típicamente son el resultado de una mutación específica de tumor. Los TAA, que son más comunes, son usualmente presentados por ambas células tumorales y sanas. Estos antígenos son reconocidos y la célula que presenta el antígeno se puede ser destruida por las células T citotóxicas. Adicionalmente, los antígenos de tumor también pueden ocurrir en la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado. En este caso, pueden ser reconocidos por los anticuerpos.

Además, los antígenos asociados a tumor se pueden clasificar como antígenos específicos de tejido, también llamados antígenos específicos de melanocito, antígenos de cáncer de testículo y antígenos específicos tumorales. Los antígenos de cáncer de testículo típicamente se entienden como péptidos o proteínas de genes asociados a la línea germinal que se pueden activar en una amplia variedad de tumores. Los antígenos de cáncer de testículo humano se puede además subdividir en antígenos que se codifican en el cromosoma X, llamados antígenos-CT-X, y aquellos antígenos que no se codifican en el cromosoma X, los llamados (antígenos CT no X). Los antígenos de cáncer de testículo que se codifican en el cromosoma X comprenden, por ejemplo, la familia de genes de antígeno de melanoma, la llamada familia MAGE. Los genes de la familia MAGE se pueden caracterizar por un dominio de homología MAGE compartida (MHD). Cada uno de estos antígenos, esto es antígenos específicos de melanocito, antígenos de cáncer de testículo y antígenos específicos tumorales, pueden provocar respuestas inmunitarias celulares y humorales autólogas. En consecuencia, el antígeno de tumor codificado por el ARN comprendido en la vacuna de ARN usada en la presente invención es preferiblemente un antígeno específico de melanocito, un antígeno de cáncer de testículo o un antígeno específico de tumor, preferiblemente puede ser un antígeno CT-X, un antígeno CT no X, una pareja de enlace para un antígeno CT-X o una pareja de enlace para un antígeno CT no X o un antígeno específico de tumor, más preferiblemente un antígeno CT-X, una pareja de enlace para un antígeno CT no X o un antígeno específico de tumor.

Antígenos de tumor particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención se seleccionan de la lista que consiste en 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinina-4/m, racemasa alfa-metilacil-coenzima A, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína como coactosin, mezcla XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsin, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A\*0201-R17I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, homeobox NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, ICE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmaduro, calicreína-2, calicreína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína 22 de matriz, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, MN/CA IX-antígeno, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-B, NY-ESO-1, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, p15, p190 bcr-abl menor, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PAP, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-Quinasa, Pin-1, Pml/PARalfa, POTE, PRAME, PRDX5/m, prosteina, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP-1, survivina, survivina-2B, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGFbeta, TGFbetaRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, tirosinasa, UPA, VEGFR1, VEGFR-2/FLK-1, y WT1. Tales antígenos de tumor preferiblemente se pueden seleccionar del grupo que consiste en p53, CA125, EGFR, Her2/neu, hTERT, PAP, MAGE-A1, MAGE-A3, Mesotelina, MUC-1, GP100, MART-1, Tirosinasa, PSA, PSCA, PSMA, STEAP-1, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, Ras, CEA or WT1, y más preferiblemente de PAP, MAGE-A3, WT1, y MUC-1. Tales antígenos de tumor preferiblemente se pueden seleccionar del grupo que consiste en MAGE-A1 (por ejemplo MAGE-A1 de acuerdo al número de acceso M77481), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6 (por ejemplo MAGE-A6 de acuerdo al número de acceso NM\_005363), MAGE-C1, MAGE-C2, melan-A (por ejemplo melan-A de acuerdo al número de acceso NM\_005511), GP100 (por ejemplo GP100 de acuerdo al número de acceso M77348), tirosinasa (por ejemplo tirosinasa de acuerdo al número de acceso NM\_000372), survivina (por ejemplo survivina de acuerdo al número de acceso AF077350), CEA (por ejemplo CEA de acuerdo al número de acceso NM\_004363), Her-2/neu (por ejemplo Her-2/neu de acuerdo al número de acceso M11730), WT1 (por ejemplo WT1 de acuerdo al número de acceso NM\_000378), PRAME (por ejemplo PRAME de acuerdo al número de acceso NM\_006115), EGFR1 (receptor 1 de factor de crecimiento epidérmico) (por ejemplo EGFR1 (receptor 1 de factor de crecimiento epidérmico) de acuerdo al número de acceso AF288738), MUC1, mucina-1 (por ejemplo mucina-1 de acuerdo al número de acceso NM\_002456), SEC61G (por ejemplo SEC61G de acuerdo al número de acceso NM\_014302), hTERT (por ejemplo hTERT número de acceso NM\_198253), 5T4 (por ejemplo 5T4 de acuerdo al número de acceso NM\_006670), TRP-2 (por ejemplo TRP-2 de acuerdo al número de acceso NM\_001922), STEAP1 (antígeno epitelial de seis transmembrana de próstata 1), PSCA, PSA, PSMA, etc. En este contexto es particularmente preferente que al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva codifique antígenos de tumor seleccionados de PCA, PSA, PSMA, STEAP y MUC-1 opcional, o fragmentos, variantes o derivados del mismo.

En una realización particularmente preferente adicional, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva comprende al menos un ARN que codifica para antígenos de tumor seleccionados de NY-ESO-1, MAGE-C1, MAGE-C2, Survivina, 5T4 opcional y MUC-1 opcional, o fragmentos, variantes o derivados del mismo.

Además, los antígenos de tumor también pueden abarcar antígenos idiotípicos asociados a un cáncer o enfermedad tumoral, particularmente linfoma o una enfermedad asociada a linfoma, donde tal antígeno idiopático es un idiotipo de inmunoglobulina de un glóbulo linfoide o un idiotipo de receptor de célula T de un glóbulo linfoide.

5 En una realización particularmente preferente adicional del primer aspecto de la invención, el al menos un ARN de la vacuna de ARN comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno patogénico. Los antígenos patogénicos son antígenos de péptido o proteína derivados de un patógeno asociado a una enfermedad infecciosa, preferiblemente seleccionados de antígenos derivados de los patógenos *Acinetobacter baumannii*, *Anaplasma* genus, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenale*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Ascaris lumbricoides*, *Aspergillus* genus, *Astroviridae*, *Babesia* genus, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella* *henselae*, virus BK, *Blastocystis hominis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia* genus, *Borrelia* spp, *Brucella* genus, *Brugia malayi*, familia *Bunyaviridae*, *Burkholderia cepacia* y otras especies de *Burkholderia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, familia de *Caliciviridae*, *Campylobacter* genus, *Candida albicans*, *Candida* spp, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydomydia psittaci*, CJD prion, *Clonorchis sinensis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium* spp, *Clostridium tetani*, *Coccidioides* spp, coronavirus, *Corynebacterium diphtheriae*, *Coxiella burnetii*, virus de fiebre hemorrágica de Crimean-Congo, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium* genus, Citomegalovirus (CMV), virus del Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4), *Dientamoeba fragilis*, *Ebolavirus* (EBOV), *Echinococcus* genus, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia* genus, *Entamoeba histolytica*, *Enterococcus* genus, *Enterovirus* genus, *Enteroviruses*, principalmente virus Coxsackie A y *Enterovirus 71* (EV71), *Epidermophyton* spp, Virus Epstein-Barr (EBV), *Escherichia coli* O157:H7, O111 y O104:H4, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, FFI prion, superfamilia Filarioidea, *Flavivirus*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium* genus, *Geotrichum candidum*, *Giardia intestinalis*, *Gnathostoma* spp, GSS prion, virus Guanarito, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Henipavirus* (virus Hendra virus Nipah), Virus de Hepatitis A, Virus de Hepatitis B (HBV), Virus de Hepatitis C (HCV), Virus de Hepatitis D, Virus de Hepatitis E, virus Herpes simple 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), *Histoplasma capsulatum*, VIH (Virus de inmunodeficiencia humana), *Hortaea werneckii*, bocavirus humano (HBoV), herpesvirus 6 humano (HHV-6) y herpesvirus 7 humano (HHV-7), metapneumovirus humano (hMPV), virus del papiloma humano (HPV), virus de parainfluenza (HPIV), virus de encefalitis Japonesa, virus JC, virus Junín, *Kingella kingae*, *Klebsiella granulomatis*, Kuru prion, virus Lassa, *Legionella pneumophila*, *Leishmania* genus, *Leptospira* genus, *Listeria monocytogenes*, Virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Machupo, *Malassezia* spp, virus Marburg, virus Measles, *Metagonimus yokagawai*, *Microsporidia* phylum, virus *Molluscum contagiosum* (MCV), virus Mumps, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepromatosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Naegleria fowleri*, *Necator americanus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia* spp, *Onchocerca volvulus*, *Orientia tsutsugamushi*, familia de *Orthomyxoviridae* (Influenza), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paragonimus* spp, *Paragonimus westermani*, *Parvovirus B19*, *Pasteurella* genus, *Plasmodium* genus, *Pneumocystis jirovecii*, *Poliovirus*, Virus de la rabia, Virus sincitial respiratorio (RSV), *Rinovirus*, *rinovirus*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia* genus, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, virus de la fiebre Rift Valley, *Rotavirus*, Virus de la rubéola, virus *Sabia*, género *Salmonella*, *Sarcoptes scabiei*, SARS coronavirus, género *Schistosoma*, género *Shigella*, virus Sin Nombre, *Hantavirus*, *Sporothrix schenckii*, *Staphylococcus* genus, *Staphylococcus* genus, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia* genus, *Taenia solium*, Virus de encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV), *Toxocara canis* o *Toxocara cati*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichophyton* spp, *Trichuris trichiura*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Ureaplasma urealyticum*, virus zóster de varicela (VZV), Virus zóster de varicela (VZV), *Viruela mayor* o *Viruela menor*, vCJD prion, Virus de encefalitis equina venezolana, *Vibrio cholerae*, virus del Nilo Occidental, Virus de encefalitis equina Occidental, *Wuchereria bancrofti*, Virus de fiebre amarilla, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, y *Yersinia pseudotuberculosis*.

45 En este contexto, son particularmente preferente antígenos de los patógenos seleccionados de virus de la gripe, virus sincitial respiratorio (RSV), virus de herpes simple (HSV), virus de papiloma humano (HPV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), *Plasmodium*, *Staphylococcus aureus*, virus del Dengue, *Chlamydia trachomatis*, Citomegalovirus (CMV), virus de hepatitis B (HBV), *Mycobacterium tuberculosis*, virus de la rabia y virus de fiebre amarilla.

50 El al menos un ARN de la vacuna de ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno de acuerdo al primer aspecto de la presente invención puede estar presente como un ARN mono-, di-, o aún multicistrónico, esto es un ARN que contiene el marco de lectura abierto de una, dos o más proteínas o péptidos. Tales marcos de lectura abiertos en los ARN di-, o aún multicistrónicos pueden estar separados por al menos una secuencia del sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), por ejemplo como se describe aquí o por péptidos de señal que inducen el desdoblamiento del polipéptido resultante que comprende diversas proteínas o péptidos.

55 El al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva se puede estabilizar con objeto de impedir la inestabilidad y la degradación (rápida) del ARN por diversos enfoques. Esta inestabilidad del ARN es típicamente debida a enzimas que degradan el ARN, "RNAsas" (ribonucleasas), donde la contaminación con tales ribonucleasas puede a veces degradar completamente el ARN en solución. En consecuencia, la degradación natural del ARN en el citoplasma de las células se regula finamente y las contaminaciones de RNasa se pueden eliminar

- generalmente por tratamiento especial antes del uso de tales composiciones, en particular con pirocarbonato de dietilo (DEPC). Son conocidos diversos mecanismos de degradación natural en este contexto en la técnica anterior, que también se pueden utilizar. Por ejemplo, la estructura terminal es típicamente de importancia crítica particularmente para un ARNm. Como ejemplo, en el extremo 5' de los ARNm que se presentan naturalmente usualmente hay una llamada estructura cap, que es un nucleótido de guanosina modificado también llamado estructura 5'Cap, y en el extremo 3' típicamente una secuencia de hasta 200 nucleótidos de adenosina (la llamada cola poli-A). En una realización adicional, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva comprende al menos uno de los siguientes elementos estructurales: una secuencia UTR 5' y/o 3', preferiblemente una modificación UTR 5' y/o 3', una estructura 5'Cap, una secuencia poli(C), una cola poli-A y/o una señal de poliadenilación, preferiblemente como se define aquí.
- 5
- 10 En una realización adicional, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva preferiblemente comprende al menos dos de los siguientes elementos estructurales: una secuencia UTR 5' y/o 3', preferiblemente una modificación UTR 5' y/o 3' (por ejemplo la secuencia mutada de la UTR 3' del gen (alfa)globina (muag)); una estructura tallo-bucle de histona, preferiblemente una tallo-bucle de histona en su región no traducida 3'; una estructura 5'-Cap; una secuencia poli(C); una cola poli-A; o una señal de poliadenilación, por ejemplo dada una estructura 5'-Cap y una tallo-bucle de histona y, potencialmente, una cola poli-A.
- 15

En este contexto es particularmente preferente que el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno comprendido en la combinación vacuna/inhibidor inventiva tiene la siguiente estructura en la dirección 5' a 3':

- 20
- a) una secuencia UTR 5' opcional que comprende una modificación UTR
  - b) un marco de lectura abierto que codifica un antígeno como se definió arriba;
  - c) una secuencia UTR 3' que comprende una modificación UTR;
  - d) al menos un tallo-bucle de histona, opcionalmente sin un elemento aguas abajo 3' al tallo-bucle de histona;
  - e) una secuencia poli(A) u, opcional, una señal de poliadenilación; y
  - f) una secuencia poli(C).

25 En otra realización particularmente preferente, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva tiene la siguiente estructura en la dirección 5' a 3':

- 30
- a) una secuencia UTR 5' opcional que comprende una modificación UTR;
  - b) un marco de lectura abierto que codifica un antígeno como se definió arriba;
  - c) una secuencia UTR 3' que comprende una modificación UTR;
  - d) una secuencia poli(A);
  - e) una secuencia poli(C); y
  - f) al menos un tallo-bucle de histona.

35 Para mejorar aún más la resistencia a, por ejemplo, la degradación *in vivo* (por ejemplo por una exo- o endo-nucleasa), el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva se puede proporcionar como un ácido nucleico estabilizado, por ejemplo en forma de un ácido nucleico modificado como se define aquí. De acuerdo con una realización adicional de la invención, es por tanto preferente que el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva esté estabilizado, preferiblemente por modificaciones de estructura, modificaciones de azúcar y/o modificaciones de base, en especial estabilizado por modificación del contenido G/C como se define aquí. Todas estas modificaciones se pueden introducir en el al menos un ARN sin perjudicar la función del ARN de ser traducido en el antígeno, para ser transcrito de forma inversa o replicarse.

40

De acuerdo a otra realización, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva se puede modificar y, por tanto estabilizar, modificando el contenido de G (guanosa)/C (citosina) del ARNm, preferiblemente del marco de lectura abierto del mismo.

45 Aquí, el contenido G/C del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva está particularmente incrementado en comparación con el contenido G/C del marco de lectura abierto de su marco de lectura abierto tipo natural particular, esto es el ARN no modificado como se define aquí. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos codificada del marco de lectura abierto del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en el ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva no se modifica preferiblemente en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del marco de lectura abierto tipo natural particular.

50 De acuerdo a una realización preferente adicional de la invención, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva está optimizado para la traducción (codón optimizado) como se define aquí, preferiblemente reemplazando los codones para los ARNt menos frecuentes de un determinado aminoácido por los codones que con más frecuencia de los ARNt del respectivo aminoácido.

En este contexto, es particularmente preferente ligar el contenido G/C secuencial que se incrementa, en particular se maximiza, en el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el marco de lectura abierto comprendido en el al menos un ARN de la vacuna de ARN.

5 En el contexto de la presente invención, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva se puede preparar usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos de síntesis tales como síntesis de fase sólida, así como propagación *in vivo*, por ejemplo producción de partículas tipo virus o partículas de replicón en células o métodos *in vitro*, como reacciones de transcripción *in vitro*. Los replicones, tal como ARN de auto-amplificación basado en un genoma de alfavirus, se pueden producir construyendo plásmidos de ADN que codifican el ARN de auto-amplificación usando técnicas moleculares estándar. El ADN linealizado se transcribe *in vitro* por, por ejemplo, la de ARN T7 polimerasa y el ARN resultante se introduce en las células, por ejemplo por electroporación. La producción de partículas de replicón se puede evaluar en ensayos de empaquetado en los cuales el replicón transcrito *in vitro* y ARN auxiliar defectuoso se co-transfectan en células (Perri *et al.*, 2003. J. Virol. 77(19):10394-403; 12970424).

15 En una realización adicional, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva comprende una pluralidad o más de una, preferiblemente de 2 a 10, más preferiblemente de 2 a 5, más preferiblemente de 2 a 4 moléculas ARN como se definen aquí. Estas vacunas de ARN comprenden más de una de las moléculas ARN, preferiblemente que codifican diferentes péptidos o proteínas que comprenden preferiblemente diferentes antígenos de tumor o antígenos patogénicos.

20 En este contexto es particularmente preferente que la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva que comprende una pluralidad (que significa típicamente más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de 10 ácidos nucleicos, por ejemplo 2 a 10, preferiblemente 2 a 5 ácidos nucleicos) de moléculas de ARN, particularmente para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata (PCa) comprenda al menos:

- 25 a) una molécula ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor PSA, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- b) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor PSMA, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- 30 c) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor PSCA, o un fragmento, variante o derivado del mismo;
- d) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor STEAP-1, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y opcionalmente
- e) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor MUC-1, o un fragmento, variante o derivado del mismo.

35 En una realización preferente adicional, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva que comprende una pluralidad (que significa típicamente más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de 10 ácidos nucleicos, por ejemplo 2 a 10, preferiblemente 2 a 5 ácidos nucleicos) de moléculas de ARN, particularmente para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) comprende al menos:

- 40 a) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor NY-ESO-1, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- b) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor MAGE-C1, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- c) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor MAGE-C2, o un fragmento, variante o derivado del mismo;
- 45 d) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor Survivina, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y opcional
- e) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor 5T4, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y opcional
- f) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde tal proteína o péptido codificado comprende el antígeno de tumor MUC-1, o un fragmento, variante o derivado del mismo.

50 De acuerdo a una realización de la presente invención, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva se puede administrar desnudo, sin estar asociado a cualquier vehículo adicional, agente de transfección o de formación de complejo, para incrementar la eficiencia de la transfección y/o las propiedades inmunoestimuladoras del al menos un ARN.

55 En una realización preferida, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva se puede formular junto con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un portador polimérico como se define aquí.

En consecuencia, en una realización específica de la invención se prefiere que el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva esté asociado con o forme complejo con un compuesto catiónico o policatiónico o un portador polimérico como se define aquí, opcionalmente en una relación en peso seleccionado de un intervalo de alrededor de 6:1 (p/p) hasta alrededor de 0,25:1 (p/p), más preferiblemente desde alrededor de 5:1 (p/p) hasta alrededor de 0,5:1 (p/p), aún más preferiblemente de alrededor de 4:1 (p/p) hasta alrededor de 1:1 (p/p) o de alrededor de 3:1 (p/p) hasta alrededor de 1:1 (p/p), y más preferiblemente una relación de alrededor de 3:1 (p/p) hasta alrededor de 2:1 (p/p), ARN:compuesto catiónico o policatiónico y/o portador polimérico; u opcionalmente en una relación N/P de al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1, 1,5 o 2. Preferiblemente, la relación N/P está en un intervalo de alrededor de 0,1, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 o 2 a 20, preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,2 (0,5 o 0,75 o 1,0) a 12, más preferiblemente en una relación N/P de alrededor de 0,4 (0,75 o 1,0) a 10, y aún más preferiblemente en una relación N/P de alrededor de 0,4 (0,75 o 1,0) a 5. Más preferiblemente la relación N/P está entre 0,1 y 0,9.

En este contexto es preferible que el compuesto catiónico o policatiónico o el portador polimérico usado como portador o agente de formación de complejo y el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva como se define aquí se proporcionen con una relación N/P de al menos alrededor de 1 o, preferiblemente, de un intervalo de alrededor de 1 hasta 20 para aplicaciones *in vitro* (por ejemplo en el caso de células extraídas del paciente, serían tratadas *in vitro* con la composición farmacéutica inventiva y posteriormente administradas al paciente).

Para aplicaciones *in vivo*, una relación N/P de al menos 0,1 (0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6), preferiblemente en un intervalo de alrededor de 0,1 (0,2, 0,3, 0,4, 0,5 o 0,6) a 1,5 es preferente. Aún más preferente es un intervalo de relación N/P de 0,1 o 0,2 a 0,9 o un intervalo de relación N/P de 0,5 a 0,9.

La relación N/P influye significativamente en la carga superficial del complejo resultante que consiste en compuestos catiónicos o policatiónicos o de un portador polimérico y una carga de ácido nucleico, por ejemplo el al menos un ARN que codifica para al menos un antígeno comprendido en la vacuna de ARN o de un ácido nucleico de adyuvante. Por tanto, es preferible que el complejo de carga de portador polimérico resultante se cargue positivamente para aplicaciones *in vitro* y negativamente o sea neutro para aplicaciones *in vivo*. La carga superficial del complejo de carga de portador polimérico resultante se puede indicar como Potencial zeta, que se puede medir por método de electroforesis de Doppler usando un Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, RU).

El al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva también puede estar asociado a un vehículo, agente de transfección o de formación de complejo para incrementar la eficiencia de la transfección y/o las propiedades inmunoestimuladoras del al menos un ARN.

En este contexto, es particularmente preferente que el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/inhibidor inventiva esté complejado al menos parcialmente con un compuesto catiónico o policatiónico y/o un portador polimérico, preferiblemente proteínas o péptidos catiónicos. Parcialmente significa que únicamente una parte del al menos un ARN se compleja con un compuesto catiónico y que el resto del al menos un ARN de la vacuna de ARN comprendido en la combinación vacuna/inhibidor inventiva está no complejado ("libre" o "desnudo"). Preferiblemente, la relación ARN complejado:ARN no complejado en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva se selecciona de un intervalo de alrededor de 5:1 (p/p) a alrededor de 1:10 (p/p), más preferiblemente de un intervalo de alrededor de 4:1 (p/p) a alrededor de 1:8 (p/p), aún más preferiblemente de un intervalo de alrededor de 3:1 (p/p) a alrededor de 1:5 (p/p) o 1:3 (p/p), y más preferiblemente la relación entre el ARN complejado y el ARN libre en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva se selecciona de una relación de alrededor de 1:1 (p/p).

El al menos un ARN complejado en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva preferiblemente se prepara de acuerdo con una primera etapa formando complejos el menos un ARN con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un portador polimérico, preferiblemente como se define aquí, en una relación específica, para formar un complejo estable. En este contexto, es altamente preferible que ningún compuesto catiónico o policatiónico libre o portador polimérico o únicamente una cantidad insignificamente pequeña del mismo permanezca en el componente del ARN complejado después de formar los complejos de ARN. En consecuencia, la relación entre el ARN y el compuesto catiónico o policatiónico y/o el portador polimérico en el componente de ARN complejado típicamente se selecciona en un intervalo en que el ARN está totalmente complejado y ningún compuesto catiónico o policatiónico libre o portador polimérico o únicamente una cantidad insignificamente pequeña del mismo permanece en la composición.

Preferiblemente, la relación entre el al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno y el compuesto catiónico o policatiónico y/o portador polimérico, preferiblemente como se define aquí, se selecciona de un intervalo de alrededor de 6:1 (p/p) hasta alrededor de 0,25:1 (p/p), más preferiblemente desde alrededor de 5:1 (p/p) hasta alrededor de 0,5:1 (p/p), aún más preferiblemente de alrededor de 4:1 (p/p) hasta alrededor de 1:1 (p/p) o de alrededor de 3:1 (p/p) hasta alrededor de 1:1 (p/p), y más preferiblemente una relación de alrededor de 3:1 (p/p) hasta alrededor de 2:1 (p/p). Alternativamente, la relación entre el ARN y el compuesto catiónico o

5 policatiónico y/o portador polimérico, preferiblemente como se define aquí, en el componente ARN complejado también se puede calcular en base a la relación nitrógeno/fosfato (relación N/P) de todo el complejo. En el contexto de la presente invención, la relación N/P está preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,1-10, preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,3-4 y más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,5-2 o 0,7-2 con respecto a la relación compuesto catiónico o policatiónico y/o portador polimérico:ARN, preferiblemente como se define aquí, en el complejo, y más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,7-1,5, 0,5-1 o 0,7-1, y aún más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,3-0,9 o 0,5-0,9 preferiblemente siempre que el compuesto catiónico o policatiónico en el complejo sea un proteína o péptido catiónico o policatiónico y/o el portador polimérico como se definió arriba. En esta realización específica, el ARN complejado también se incluye en el término "componente adyuvante".

10 En otra realización, el al menos un antígeno que proporciona ARN en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva como se definió arriba se puede formular junto con un adyuvante. Tal adyuvante preferiblemente puede ser un ácido nucleico adicional que no codifica un antígeno adicional, sino que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria no específica, esto es una respuesta inmunitaria innata, interactuando con cualquier parte del sistema inmunitario innato. Tal ácido nucleico que estimula una respuesta inmunitaria no específica se denomina aquí "ácido nucleico adyuvante".

15 En este contexto, un ácido nucleico adyuvante preferiblemente comprende o consiste en un oligo- o un poli-nucleótido; más preferiblemente un ácido nucleico adyuvante que comprende o consiste en un ARN o un ADN; aún más preferiblemente tal ácido nucleico adyuvante comprende o consiste en un ARN o un ADN complejado con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un portador polimérico como se define aquí; opcionalmente en una relación en peso seleccionado de un intervalo de alrededor de 6:1 (p/p) hasta alrededor de 0,25:1 (p/p), más preferiblemente desde alrededor de 5:1 (p/p) hasta alrededor de 0,5:1 (p/p), aún más preferiblemente de alrededor de 4:1 (p/p) hasta alrededor de 1:1 (p/p) o de alrededor de 3:1 (p/p) hasta alrededor de 1:1 (p/p), y más preferiblemente una relación de alrededor de 3:1 (p/p) hasta alrededor de 2:1 (p/p) ácido nucleico adyuvante:compuesto catiónico o policatiónico y/o portador polimérico; u opcionalmente en una relación nitrógeno/fosfato compuesto catiónico o policatiónico y/o portador polimérico:ácido nucleico adyuvante en el intervalo de alrededor de 0,1-10, preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,3-4, más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,7-1 o 0,5-1, y aún más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 0,3-0,9 o 0,5-0,9. Tal ácido nucleico adyuvante complejado también se incluye en el término "componente adyuvante":

20 En el caso específico de que la inducción de IFN- $\alpha$  este prevista, una relación N/P de al menos 0,1 (0,2, 0,3, 0,4, 0,5 o 0,6) o un intervalo de relación N/P de 0,1 a 1 es preferente o más preferido es un intervalo de relación N/P de 0,1 o 0,2 a 0,9 o un intervalo de relación N/P de 0,5 a 0,9. En otro caso, si se pretende la inducción de TNF $\alpha$ , una relación N/P de 1 a 20 es particularmente preferente.

25 En otras palabras, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor de acuerdo con la invención puede comprender el al menos un ARN que codifica al menos un antígeno y un ácido nucleico adicional actúa como adyuvante, el ácido nucleico adyuvante. Por supuesto, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva no se limita a comprender únicamente un ácido nucleico adyuvante, sino que puede comprender diferentes ácidos nucleicos. Ambas clases de ácido nucleico, el ARN que codifica el antígeno y el ácido nucleico adyuvante, pueden estar, independientemente, complejados con un portador como se define aquí. Por tanto, un compuesto catiónico o policatiónico y/o un portador polimérico usado para complejar el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o el ácido nucleico adyuvante se pueden seleccionar de cualquier compuesto catiónico o policatiónico y/o portador polimérico como se define aquí.

30 En caso de que la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva (o la combinación vacuna/inhibidor inventiva) comprenda un ARN que proporciona el antígeno y adicionalmente un ácido nucleico adyuvante, la respuesta inmunitaria que se evoca por la administración de tal vacuna comprende la activación de ambas partes del sistema inmunitario, el sistema inmunitario adaptativo y el innato.

35 Un factor esencial de la respuesta inmunitaria adaptativa adecuada es la estimulación de diferentes sub-poblaciones de células T. Los linfocitos T típicamente se dividen en dos sub-poblaciones, las células auxiliares T 1 en las siguientes células Th1, y las células auxiliares T 2 en las siguientes células Th2, con las cuales el sistema inmunitario es capaz de destruir patógenos intracelulares y extracelulares (por ejemplo antígenos). Así, las células Th1 son responsables de la destrucción del patógeno intracelular ayudando a la respuesta inmunitaria celular por activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otro lado, son principalmente para la eliminación de patógenos extracelulares y promueven la respuesta inmunitaria humoral estimulando las células B para su conversión en células plasmáticas y por la formación de anticuerpos (por ejemplo frente a antígenos). Las dos poblaciones de células auxiliares T difieren en el patrón de proteínas efectoras (citoquinas) producidas por ellas.

40 La relación célula Th1/célula Th2 es de gran importancia en la inducción y mantenimiento de una respuesta inmunitaria adaptativa. En conexión con la presente invención, la relación célula Th1/célula Th2 de la respuesta inmunitaria (adaptativa)

se desplaza preferiblemente en la dirección hacia la respuesta celular (respuesta Th1), induciéndose así una respuesta inmunitaria celular. La estimulación de esta respuesta del sistema inmunitario adaptativo principalmente se provoca por la traducción del ARN que proporciona el antígeno y la presencia resultante de los antígenos de péptido o proteína dentro del organismo.

5 El sistema inmunitario innato que puede soportar tal respuesta inmunitaria adaptiva y que puede inducir o ayudar un cambio hacia una respuesta Th1 puede ser activado por ligandos de receptores tipo Toll (TLRs). Los TLR son una familia de polipéptidos del receptor de reconocimiento del patrón altamente conservado (PRR) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y juegan un papel crítico en la inmunidad innata en mamíferos. Actualmente se han identificado al menos trece miembros de la familia, designados TLR1 – TLR13 (Receptores tipo Toll: TLR1, TLR2, 10 TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13). Además, se han identificado ciertos ligandos TLR específicos. Por ejemplo, se encontró que el ADN bacteriano no metilado y análogos sintéticos del mismo (ADN CpG) son ligandos para TLR9 (Hemmi H et al. (2000) Nature 408:740-5; Bauer S et al. (2001) Proc Natl. Acad. Sci. USA 98, 9237-42). Además, se reporta que ligandos para ciertos TLR incluyen ciertas moléculas de ácido nucleico y que ciertos tipos de ARN son inmunoestimuladores de forma independiente o dependiente de la secuencia, donde estos 15 diversos ARN inmunoestimuladores pueden por ejemplo estimular TLR3, TLR7, o TLR8, o receptores intracelulares tales como RIG-I, MDA-5, etc.

En el contexto de la invención, la activación del sistema inmunitario innato se puede proporcionar por un ácido nucleico adyuvante, preferiblemente un ARN inmunoestimulador (isARN) como se define aquí, comprendido en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, preferiblemente en la vacuna de ARN.

20 De acuerdo con lo anterior, en una realización preferente adicional de la invención, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva se formula para comprender

- a) dicho al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno; preferiblemente en forma de un ARN mono-, bi- o multicistrónico, opcionalmente estabilizado, 25 opcionalmente optimizado para la traducción y/u opcionalmente complejado con un compuesto catiónico o policatiónico o un portador polimérico;
- b) opcionalmente un componente adyuvante, que comprende o que consiste en al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno y/o al menos un ácido nucleico adyuvante, complejado con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un portador polimérico, y
- c) opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable como se define aquí.

30 En este contexto, es particularmente preferente que el componente adyuvante opcionalmente incluido comprenda el mismo ARNm que codifica para al menos un antígeno como está comprendido en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva como ARN proporcionador de antígeno.

Además, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva puede comprender componentes adicionales para facilitar la administración y absorción de los componentes de la vacuna de ARN. Tales componentes adicionales 35 pueden ser un portador o vehículo apropiado o por ejemplo adyuvantes adicionales para apoyar cualquier respuesta inmunitaria como se define aquí.

De acuerdo a una realización adicional, los componentes de la vacuna de ARN, por ejemplo el al menos un ARN que codifica para al menos un antígeno y un componente adyuvante de la combinación vacuna/inhibidor inventiva, se pueden formular juntos o de forma separada en la misma o diferentes composiciones.

40 Como un segundo componente, la combinación vacuna/inhibidor inventiva incluye como inhibidor una composición que comprende un inhibidor de la ruta PD-1 cuya diana es cualquier miembro de la ruta de señalización de PD-1, donde el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-L1.

La muerte-programada-1 (PD-1, PDCD1) es una proteína transmembrana tipo I que pertenece a la familia CD28 extendida de reguladores de células T. PD-1 carece del residuo de cisteína proximal a la membrana requerido para la 45 homodimerización de otros miembros de la familia CD28. Análisis estructurales y bioquímicos muestran que la PD-1 es monomérica en solución así como en la superficie celular (Okazaki and Honjo, 2007. Int Immunol. 19(7):813-24). PD-1 se expresa en células T activadas, células B y monocitos. La expresión más amplia de PD-1 contrasta con la expresión restringida de otros miembros de la familia CD28 a las células T, lo que sugiere que PD-1 regula un espectro amplio de respuestas inmunitarias comparadas con otros miembros de la familia CD28.

50 PD-1 regula negativamente la señalización de receptor de antígeno al reclutar la proteína de fosfatasa tirosina SHP-2 sobre la interacción con cualquiera de dos ligandos, PD-L1 o PD-L2.

- 5 PD-L1 (B7-H1, CD274) y PD-L2 (B7-DC, CD273) son glicoproteínas transmembrana tipo I compuestas de dominios extracelulares tipo IgC e IgV. PD-L1 y PD-L2 comparten un 40% de identidad de aminoácidos, mientras que los ortólogos de humano y de ratón de PD-L1 y PD-L2 comparten un 70% identidad de aminoácidos. Ambos PD-L1 y PD-L2 tienen colas citoplásmicas cortas sin motivo conocido para la transducción de señal, lo que sugiere que estos ligandos no transducen cualquier señal sobre la interacción con PD-1.
- 10 La interacción de PD-L1 y PD-1 proporciona una señal co-estimuladora negativa crucial a las células T y funciona como inductor de muerte celular. La interacción entre una concentración baja de PD-1 y PD-L1 lleva a la transmisión de una señal inhibitoria que inhibe la proliferación de células CD8+ específicas de antígeno. En concentraciones más altas, esta interacción no inhibe la proliferación de células T sino que reduce la producción de múltiples citoquinas. Por tanto, el enlace a PD-L1 puede antagonizar la señal B7 – CD28 cuando la estimulación antigénica es débil y juega un papel importante en sub-regular las respuestas de las células T.
- 15 El papel de PD-1 y los ligandos PD-1 en inhibir la proliferación y activación de células T sugiere que estas proteínas pueden servir como dianas terapéuticas para el tratamiento de la inflamación, cáncer o enfermedades infecciosas. Dependiendo del resultado terapéutico deseado, se requiere una sobre- o sub-modulación de la ruta PD-1. En particular, se requiere la sobre-modulación del sistema inmunitario en el tratamiento de cánceres e infecciones crónicas. Esto puede conseguirse por ejemplo por bloqueo PD-1 o inhibiendo la ruta PD-1. La inhibición de la ruta PD-1 se puede alcanzar, por ejemplo, por un anticuerpo dirigido a PD-1 o un ligando PD-1. En este contexto, el inhibidor de la ruta PD-1 puede eliminar la disfunción de las células T que resulta en la señalización PD-1 y así restaura o mejora la función de las células T (por ejemplo proliferación, producción de citoquina, eliminación de célula objetivo). Adicionalmente, las células T anérgicas que son insensibles a la estimulación de antígeno se pueden reactivar.
- 20 En el contexto de la presente invención, el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-L1. También se describe aquí un anticuerpo codificado por ácido nucleico (intracuerpo), un siARN, un ARN antisentido, una proteína que comprende (o un ácido nucleico que codifica para) una secuencia de aminoácidos capaz de enlazar a PD-1 pero que impide la señalización PD-1 (por ejemplo una proteína de fusión de un fragmento de PD-L1 o PD-L2 y la parte Fc de una inmunoglobulina), una proteína soluble (o un ácido nucleico que codifica para una proteína soluble) compitiendo con PD-1 enlazado a membrana para enlace de sus ligandos PD-L1 y PD-L2; o un inhibidor de molécula pequeña capaz de inhibir la señalización de trayectoria PD-1.
- 25 Por tanto, en una realización no reivindicada aquí descrita, el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-1, preferiblemente un anticuerpo que específicamente se enlaza al dominio extracelular de PD-1 y así inhibe la señalización PD-1. Preferiblemente, tal anticuerpo antagonista se enlaza cerca del sitio de enlace PD-L1 en PD-1, inhibiendo así el enlace de PD-L1 a PD-1.
- 30 En este contexto se describen aquí además los anticuerpos anti-PD1 Nivolumab (MDX-1106/BMS-936558/ONO-4538), (Brahmer et al., 2010. J Clin Oncol. 28(19):3167-75; PMID: 20516446); Pidilizumab (CT-011), (Berger et al., 2008. Clin Cancer Res. 14(10): 3044-51; PMID: 18483370); y MK-3475(SCH 900475).
- 35 De acuerdo con la presente invención, el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo dirigido contra un ligando PD-1, preferiblemente un anticuerpo que específicamente se enlaza al dominio extracelular del ligando PD-1 o PD-2. Preferiblemente, tal anticuerpo se enlaza de forma proximal y rompiendo el sitio de enlace PD-1 o PD-2 en el ligando.
- Son particularmente preferentes los anticuerpos anti-PD-L1 MDX-1105/BMS-936559 (Brahmer et al. 2012. N Engl J Med. 366(26):2455-65; PMID: 22658128); MPDL3280A/RG7446 o *MEDI4736*.
- 40 En una realización no reivindicada, el inhibidor de la ruta PD-1 es una proteína que comprende (o un ácido nucleico que codifica para) una secuencia de aminoácidos capaz de enlazar a PD-1 pero que impide la señalización de la ruta PD-1, en particular en este contexto una proteína de fusión de un fragmento de ligando PD-L1 o PD-L2.
- 45 En este contexto, también se describe aquí una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de PD-L1 o PD-L2 o un fragmento del mismo capaz de enlazar a PD-1 o a una porción Fc de una inmunoglobulina. Un ejemplo de tal proteína de fusión es AMP-224 (dominio extracelular de PD-L2/B7-DC murino fusionado a la porción Fc no modificada de proteína IgG2a murina; Mkrtychyan et al., 2012. J Immunol. 189(5):2338-47; PMID: 22837483).
- En el contexto de la presente invención, la administración de la vacuna y el inhibidor puede ocurrir ya sea simultáneamente o escalonada en el tiempo, ya sea en el mismo sitio de administración o en diferentes sitios de administración, como se resume más adelante.
- 50 Para asegurar que los mecanismos separados obtenidos por la vacuna de ARN y el inhibidor de la ruta PD-1 no se influyen negativamente uno al otro, el inhibidor de la ruta PD-1 y la vacuna de ARN preferiblemente se administran separados en

el tiempo (de forma escalonada en el tiempo), esto es secuencialmente, y/o se administran en diferentes sitios de administración. Esto significa que la vacuna de ARN se puede administrar por ejemplo previa, simultánea o después que el inhibidor de la ruta PD-1, o viceversa. Alternativa o adicionalmente, la vacuna de ARN y el inhibidor de la ruta PD-1 se pueden administrar en diferentes sitios de administración o en el mismo sitio de administración, preferiblemente, cuando se administra de forma escalonada en el tiempo. De acuerdo con una realización particularmente preferente, la vacuna de ARN se administra primero y el inhibidor de la ruta PD-1 se administra tras la vacuna de ARN. Este procedimiento asegura que las células inmunitarias, como células presentadoras de antígeno y células T, ya han encontrado el antígeno antes que el sistema inmunitario se estimule por la inhibición de la ruta PD-1, aunque una administración simultánea o una administración donde el inhibidor de la ruta PD-1 se administra antes de la vacuna de ARN puede llevar a los mismos o al menos a resultados comparables.

En consecuencia, en una realización adicional, la combinación vacuna/inhibidor inventiva además comprende un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal portador farmacéuticamente aceptable típicamente incluye la base líquida o no líquida de una composición que comprende los componentes de la combinación vacuna/inhibidor inventiva. Si la composición se proporciona en forma líquida, el portador preferiblemente será agua libre de pirógenos; solución salina isotónica o solución tampón (acuosa), por ejemplo fosfato, citrato, etc., soluciones tamponadas. El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico con respecto al medio de referencia específico, esto es la solución tampón puede tener un contenido de sal superior, idéntico o inferior con respecto al medio de referencia específico, donde preferiblemente se usan tales concentraciones de las sales mencionadas anteriormente que no conducen a daño celular debido a ósmosis u otros efectos de la concentración. Medios de referencia son por ejemplo líquidos que se emplean en métodos "in vivo", tal como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o por ejemplo líquidos que se pueden usar como medios de referencia en métodos "in vitro", como soluciones tampón o líquidos comunes. Tales soluciones tampón o líquidos comunes son conocidos por el experto. La solución Lactato Ringer es particularmente preferente como base líquida.

Sin embargo, se pueden usar también para la combinación vacuna/inhibidor de acuerdo con la invención uno o más diluyentes o cargas sólidos o líquidas compatibles o compuestos de encapsulación, adecuados para la administración a un paciente a tratar. El término "compatible" como se usa aquí significa que estos constituyentes de la combinación vacuna/inhibidor pueden mezclarse con la vacuna de ARN y/o el inhibidor de la ruta PD-1 de manera que no se produce ninguna interacción que reduzca esencialmente la efectividad farmacéutica de la combinación vacuna/inhibidor bajo las condiciones de uso típicas.

Además, la combinación vacuna/inhibidor inventiva puede comprender uno o más adyuvantes adicionales adecuados para iniciar o incrementar una respuesta inmunitaria del sistema inmunitario innato, esto es una respuesta inmunitaria no específica, particularmente por el enlace a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Con otras palabras, cuando se administra, la vacuna de ARN preferiblemente provoca una respuesta inmunitaria innata debido al adyuvante opcionalmente contenido allí. Sin embargo, el adyuvante también puede ser parte de otro componente de la combinación vacuna/inhibidor inventiva que la vacuna de ARN. Preferiblemente, tal adyuvante se puede seleccionar de un adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, esto es que soporta la inducción de una respuesta inmunitaria innata en un mamífero, por ejemplo un ácido nucleico adyuvante o un componente adyuvante como se definió arriba o un adyuvante como se define en lo siguiente.

Así, tal adyuvante también puede seleccionarse de cualquier adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, esto es que soporta la inducción de una respuesta inmunitaria innata en un mamífero y/o adecuado para almacenar y suministrar los componentes de la combinación vacuna/inhibidor inventiva. Como adyuvantes adecuados para almacenar y suministrar son preferentes compuestos catiónicos o policatiónicos como se definen arriba. Igualmente, el adyuvante se puede seleccionar del grupo consistente en, por ejemplo, compuestos catiónicos o policatiónicos como se definen arriba, quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, plurónicos, solución de alumbre, hidróxido de aluminio, ADJUMER™ (polifosfazeno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alumbre); gel de hidróxido de aluminio que adsorbe altamente la proteína; gel de hidróxido de aluminio de viscosidad baja; AF o SPT (emulsión de escualeno (5%), Tween 80 (0.2%), Plurónico L121 (1.25%), solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4); AVRIDINE™ (propanodiamina); BAY R1005™ (hidroacetato de (N-(2-deoxi-2-L-leucilaminob-D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoil-amida); CALCITRIOL™ (1-alfa,25-dihidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAP™ (nanopartículas de fosfato de calcio); holotoxina de cólera, proteína de fusión cólera-toxina-A1-proteína-A-D-fragmento, sub-unidad B de la toxina de cólera; CRL 1005 (copolímero de bloque P1205); liposomas que contienen citoquina; DDA (bromuro de dimetildioctadecilamonio); DHEA (dehidroepiandrosterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complejo DOC/alumbre (sal de sodio de ácido desoxicólico); adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; inulina gama; adyuvante Gerbu (mezcla de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D35-glutamina (GM DP), ii) cloruro de dimetildioctadecil-amonio (DDA), iii) complejo de sal de zinc-L-prolina (ZnPro-8); GM-CSF); GM DP (N-acetilglucosaminil-(b1-4)-N-acetilmuramil-L47 alanil-D-isoglutamina); imiquimod (1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-4-amina); ImmTher™ (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol-dipalmitato); DRVs (immunoliposomas preparadas de vesículas de

deshidratación-rehidratación); interferongama; interleucina-1beta; interleucina-2; interleucina-7; interleucina-12; ISCOMS™; ISCOPREP™ 7.0.3.; liposomas; LOXORIBINE™ (7-aili-8-oxoguanosina); adyuvante oral LT 5 (enterotoxina-prototoxina lábil *E.coli*); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59™; (emulsión de escualeno agua); MONTANIDE™ ISA 51 (adyuvante de Freund incompleto purificado); MONTANIDE™ ISA 720 (adyuvante de aceite metabolizable); MPL™ (lípidio 3-Q-desacil-4'-monofosforilo A); liposomas MTP-PE y MTP-PE ((N-acetil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosforiloxi))-etilamida, sal monosódica); MURAMETIDE™ (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH<sub>3</sub>); MURAPALMITINE™ y DMURAPALMITINE™ (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoil); NAGO (oxidasa neuraminidasa-galactosa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISV (vesículas de tensioactivo no iónico); PLEURAN™ (β-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico; microesferas/nanoesferas); PLURONIC™ L121; PMMA (polimetilmetacrilato); PODDS™ (microesferas proteinoides); derivados de polietilencarbamato; poli-rA; poli-rU (complejo de ácido poliadenílico-ácido poliuridílico); polisorbato 80 (Tween 80); cocleatos de proteína (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON™ (QS-21); Quil-A (saponina Quil-A); S-28463 (4-amino-otec-dimetil-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol); SAF-1™ ("formulación de adyuvante Syntex"); proteoliposomas Sendai y matrices de lípido que contienen Sendai; Span-85 (trioleato de sorbitano); Specol (emulsión de Marcol 52, Span 85 y Tween 85); escualeno o Robane® (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracosan y 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano); esteariltirosina (clorohidrato de octadeciltirosina); Theramid® (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Aladipalmitoxipropilamida); Teronil-MDP (Termurtide™ o [thr 1]-MDP; N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina); partículas Ty (Ty-VLPs o partículas tipo virus); liposomas Walter-Reed (liposomas que contienen lípido A adsorbido en hidróxido de aluminio), y lipopéptidos, que incluyen Pam3Cys, en particular sales de aluminio, tal como Adjuphos, Alhidrogel, Rehidragel; emulsiones, que incluyen CFA, SAF, IFA, MF59, Provac, TiterMax, Montanide, Vaxfectin; copolímeros, que incluyen Optivax (CRL1005), L121, Poloxamer4010), etc.; liposomas, que incluyen Recubiertos, cocleatos, que incluyen BIORAL; adyuvantes derivados de plantas, que incluyen QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; adyuvantes adecuados para la co-estimulación que incluyen Tomatina, biopolímeros, que incluyen PLG, PMM, Inulina, adyuvantes derivados de microbios, que incluyen Romurtide, DETOX, MPL, CWS, Manosa, secuencias de ácido nucleico CpG, CpG7909, ligandos de TLR humano 1-10, ligandos TLR de murino 1-13, ISS-1018, 35 IC31, Imidazoquinolinas, Ampligen, Ribi529, IMOxine, IRIVs, VLPs, toxina de cólera, toxina termoinestable, Pam3Cys, Flagellin, GPI de anclaje, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP; y adyuvantes adecuados como antagonistas que incluyen neuropéptido CGRP.

Un adyuvante se selecciona preferiblemente de adyuvantes que soportan la inducción de una respuesta inmunitaria Th1 o la maduración de células T naive, tal como GM-CSF, IL-12, IFNγ, cualquier ácido nucleico de adyuvante como se definió arriba, preferiblemente un ARN inmunoestimulador, ADN CpG, etc.

En una realización preferida adicional, también es posible que la combinación vacuna/inhibidor inventiva contenga también el ARN que proporciona el antígeno y los componentes adicionales del inhibidor de la ruta PD-1 seleccionados del grupo que comprende: antígenos adicionales o ácido nucleicos que proporcionan antígeno adicional; un agente inmunoterapéutico adicional; una o más sustancias auxiliares; o cualquier compuesto adicional que se conoce es inmunoestimulante debido a su afinidad de enlace (como ligandos) a receptores tipo Toll humanos; y/o un ácido nucleico adyuvante, preferiblemente un ARN inmunoestimulador (isARN).

En consecuencia, en otra realización preferida, la combinación vacuna/inhibidor inventiva además comprende al menos un adyuvante, una sustancia auxiliar seleccionada de lipopolisacáridos, TNF-alfa, ligando CD40, o citoquinas, monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimiocinas, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta, TNF-alfa, factores de crecimiento, y hGH, un ligando de receptor tipo Toll humano TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, un ligando de receptor tipo Toll de murino TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13, un ligando de un receptor tipo NOD, un ligando de un receptor tipo RIG-I, un ácido nucleico adyuvante, un ARN inmunoestimulador (isARN), un CpG-ADN, un agente antibacteriano o un agente anti-viral.

La combinación vacuna/inhibidor como se define de acuerdo con la presente invención además puede comprender aditivos o compuestos adicionales. Los aditivos adicionales que se pueden incluir en la combinación vacuna/inhibidor inventiva, tal como en la vacuna de ARN y/o en la composición que comprende un inhibidor de la ruta PD-1, son emulsionantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes que imparten sabor, portadores farmacéuticos; agentes de formación de comprimidos; estabilizadores; antioxidantes; conservadores, inhibidores de RNasa y/o un agente anti-bacteriano o un agente anti-viral.

La combinación vacuna/inhibidor inventiva típicamente comprende una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la combinación vacuna/inhibidor inventiva como se define aquí. Como se usa aquí, una "cantidad segura y efectiva" preferiblemente significa una cantidad de los componentes, preferiblemente de al menos un ARN que codifica al menos un antígeno y el inhibidor de la ruta PD-1, que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva o prevención de una enfermedad o trastorno como se define aquí. Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña para evitar efectos secundarios graves y para permitir una relación razonable

entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites típicamente se encuentra dentro del alcance del juicio médico sensato.

5 La combinación vacuna/inhibidor inventiva se puede administrar vía oral, parenteral, por aerosol de inhalación, vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por medio de un depósito implantado. El término parenteral como se usa aquí incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-nodal, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial y sublingual o técnicas de infusión. Preferiblemente la vacuna de ARN se administra por aplicación intradérmica o intramuscular y el inhibidor de la ruta PD-1 se administra preferiblemente por inyección intramuscular o intraperitoneal, más preferiblemente por infusión intravenosa, en caso de que sea en forma de un anticuerpo.

10 De acuerdo a un aspecto adicional, el objeto que subyace a la presente invención se resuelve mediante una composición farmacéutica que comprende una vacuna y un inhibidor, en particular, como vacuna, una vacuna de ARN que comprende al menos un ARNm que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno y, como inhibidor, una composición que comprende un inhibidor de la ruta PD-1, donde el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-L1, ambos preferiblemente como se definen anteriormente. Igualmente, la composición farmacéutica preferiblemente se formula y administra como se define arriba para los componentes de la combinación vacuna/inhibidor inventiva. Tal composición farmacéutica puede además comprender cualquier ingrediente como se define arriba para la combinación vacuna/inhibidor inventiva.

15 En consecuencia, la combinación de la vacuna de ARN y el inhibidor de la ruta PD-1 como se define de acuerdo con la presente invención puede presentarse ya sea como una composición, por ejemplo la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, o en más de una de las composiciones, por ejemplo como un kit de partes, donde los diferentes componentes forman diferentes partes de tal kit de partes. Estos diferentes componentes, tal como la vacuna y el inhibidor, se pueden formular en cada caso como una composición farmacéutica o como una composición como se define arriba. Preferiblemente, cada uno de las diferentes partes del kit comprende un componente diferente, por ejemplo una parte comprende la vacuna de ARN como se define aquí, una parte adicional comprende el inhibidor de la ruta PD-1 como se define aquí, etc.

20 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención también proporciona kits, particularmente kits de partes. Tales kits, particularmente kits de partes, típicamente comprenden como componentes solos o en combinación con componentes adicionales como se define aquí la vacuna de ARN que comprende al menos un ARNm que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno y, preferiblemente en una parte diferente del kit, un inhibidor de la ruta PD-1, siendo el inhibidor de la ruta PD-1 un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-L1, preferiblemente como se define aquí. La combinación vacuna/inhibidor inventiva como se define aquí, opcionalmente en combinación con componentes adicionales como se definen aquí, tal como un adyuvante adicional, puede presentarse en una o diferentes partes del kit. Como ejemplo, por ejemplo al menos una parte del kit puede comprender la vacuna de ARN que comprende el al menos un ARN que codifica al menos un antígeno como se define aquí, al menos una parte adicional del kit puede comprender el inhibidor de la ruta PD-1 como se define aquí y opcionalmente al menos una parte adicional del kit puede comprender un adyuvante adicional como se describe aquí. El kit o kit de partes además puede contener instrucciones técnicas con información sobre la administración y la dosificación de la combinación vacuna/inhibidor inventiva, la composición farmacéutica inventiva o de cualquiera de sus componentes o partes.

30 La combinación vacuna/inhibidor inventiva, la composición farmacéutica inventiva o el kit de partes inventivo que comprende la vacuna de ARN y un inhibidor de la ruta PD-1 se pueden usar para el ser humano y también con propósitos médicos veterinarios, preferiblemente para propósitos médicos humanos.

35 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se dirige al primer uso médico de la combinación vacuna/inhibidor inventiva, la composición farmacéutica inventiva y el kit de partes inventivo que comprende la vacuna de ARN y un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en las reivindicaciones. En consecuencia, la combinación vacuna/inhibidor inventiva, la composición farmacéutica inventiva y el kit de partes inventivo que comprende la vacuna de ARN y un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en las reivindicaciones se puede usar como medicamento.

40 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se dirige al segundo uso médico de la combinación vacuna/inhibidor inventiva, la composición farmacéutica inventiva y el kit de partes inventivo que comprende la vacuna de ARN y un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en las reivindicaciones. Por tanto, la combinación vacuna/inhibidor inventiva, la composición farmacéutica inventiva y el kit de partes inventivo que comprende la vacuna de ARN y un inhibidor de la ruta PD-1 como se definen en las reivindicaciones se pueden usar para el tratamiento y/o la mejora de diversas enfermedades, en particular cáncer y enfermedades tumorales y enfermedades infecciosas como se definen aquí.

45 El cáncer o las enfermedades tumorales en este contexto preferiblemente incluyen, por ejemplo, melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas renales, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer pancreático,

5 cáncer de hígado, carcinomas mamarios (= cáncer de mama), cáncer uterino, cáncer cervical, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus tal como, por ejemplo, carcinomas inducidos por virus de papiloma (por ejemplo carcinoma cervical = cáncer cervical), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus de herpes (por ejemplo linfoma de Burkitt, linfoma de célula B inducido por EBV), tumores inducidos por hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1- y HTLV-2-, neuroma acústico, carcinomas de pulmón (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas de pulmón de célula pequeña, cáncer faríngeo, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma rectal, astrocitoma, tumores del cerebro, retinoblastoma, basalioma, metástasos cerebrales, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer pancreático, cáncer testicular, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, tumor de hipófisis, 10 Micosis fungoide, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer renal, timoma, carcinoma de corpus, cáncer de hueso, linfomas de no Hodgkin, cáncer uretral, síndrome CUP, tumores de cabeza y cuello, oligodendroglioma, cáncer de vulva, cáncer intestinal, carcinoma de colon, carcinoma esofágico (= cáncer de esófago), implicación de la verruga, tumores del intestino delgado, craneofaringiomas, carcinoma de ovario, tumores genitales, cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma pancreático (= cáncer pancreático), carcinoma endometrial, metástasis hepáticas, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumor de párpado, cáncer de próstata (=tumores de próstata), etc. En realizaciones específicas, el tratamiento de cáncer de pulmón (por ejemplo cáncer de pulmón de células no pequeñas o de células pequeñas) o el cáncer de próstata es particularmente preferido.

20 Las enfermedades infecciosas en este contexto preferiblemente incluyen enfermedades infecciosas virales, bacterianas o protozoarias. Tales enfermedades infecciosas, preferiblemente enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o protozoarias) típicamente se seleccionan de la lista consistente en infecciones por Acinetobacter, enfermedad Africana del sueño (tripanosomiasis Africana), SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida), Amoebiasis, Anaplasmosis, Ántrax, Apendicitis, infecciones por Arcanobacterium haemolyticum, Fiebre hemorrágica argentina, Ascariasis, Aspergilosis, infecciones por Astrovirus, pie de atleta, Babesiosis, infecciones de Bacillus cereus, Meningitis bacteriana, 25 Neumonía bacteriana, Vaginosis bacteriana (BV), infecciones Bacteroides, Balantidiasis, infecciones de Baylisascaris, Bilharziosis, infecciones por virus BK, Piedra negra, infecciones por Blastocystis, Blastomycosis, fiebre hemorrágica Boliviana, infecciones por Borrelia (Borreliosis), Botulismo (y botulismo infantil), Tenia bovina, fiebre hemorrágica de Brasil, Brucelosis, infecciones por Burkholderia, úlcera de Buruli, infecciones por Calicivirus (Norovirus y Sapovirus), Campilobacteriosis, Candidiasis (Candidosis), Infecciones de tenia canina, Enfermedad por arañazo de gato, Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana), Chancroide, Varicela, infecciones por Chlamidia, infecciones por Chlamydia trachomatis, infecciones por Chlamydomydia pneumoniae, Cólera, Cromoblastomycosis, Bubo climático, Clonorchiasis, infecciones por Clostridium difficile, Coccidiodomycosis, resfriado, Fiebre de colorado (CTF), Resfriado común (Rinofaringitis viral aguda; Coriza aguda), Acuminata del condiloma, Conjuntivitis, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHF), Criptococosis, Criptosporidiosis, Larva cutánea migrans (CLM), 35 Leishmaniosis cutánea, Ciclosporiosis, Cisticercosis, infecciones por Citomegalovirus, Fiebre del dengue, Dermatofitosis, Dientamoebiasis, Difteria, Difilobotriasis, Donovanosis, Dracunculiasis, Meningoencefalitis de verano temprana (FSME), Fiebre hemorrágica de ébola, Equinococosis, Ehiriquiosis, Enterobiasis (Infecciones de oxiuro), infecciones de Enterococcus, infecciones de Enterovirus, Tifus epidérmico, Epiglotitis, Mononucleosis infecciosa de Epstein-Barr, Eritema infeccioso (Quinta enfermedad), Exantema súbito, Fasciolopsiasis, Fasciolosis, Insomnio familiar fatal (FFI), Quinta enfermedad, Filariasis, Intoxicación por pescado (Ciguatera), Tenia de pescado, Gripe, Intoxicación alimentaria por Clostridium perfringens, Tenia de zorro, Infecciones amebicas disipadas, infecciones por Fusobacterium, Gangrena gaseosa, Geotricosis, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), Giardiasis, Muermo, Gnatostomiasis, Gonorrea, Granuloma inguinal (Donovanosis), Infecciones estreptocócicas del grupo A, Infecciones estreptocócicas del grupo B, infecciones por Haemophilus influenzae, Fiebre aftosa de la mano (HFMD), Síndrome pulmonar por Hantavirus (HPS), infecciones por Helicobacter pylori, Síndrome hemolítico-urémico (HUS), Fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS), infecciones por Henipavirus, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D, Hepatitis E, Herpes simple, Herpes simple tipo I, Herpes simple tipo II, Herpes zoster, Histoplasmosis, verrugas Hollow, Infecciones del anquilostoma, Infecciones de bocavirus humanos, Ehrlichiosis ewingii humano, Anaplasmosis granulocítica humana (HGA), Infecciones por metapneumovirus humano, Ehrlichiosis monocítica humana, infecciones por Virus de papiloma humano (HPV), 50 Infecciones por virus de parainfluenza humano, Himenolepiasis, Influenza, Isosporiasis, Encefalitis Japonesa, enfermedad de Kawasaki, Queratitis, infecciones por Kingella kingae, Kuru, Lambliasis (Giardiasis), fiebre de Lassa, Legionelosis (Enfermedad del legionario, fiebre de Pontiac), Leishmaniasis, Lepra, Leptospirosis, Piojos, Listeriosis, borreliosis de Lyme, enfermedad de Lyme, Filariasis linfática (Elefantiasis), Coriomeningitis linfocítica, Malaria, fiebre hemorrágica de Marburg (MHF), virus de Marburg, Sarampión, Melioidosis (enfermedad de Whitmore), Meningitis, Enfermedad meningocócica, Metagonimiasis, Microsporidiosis, Tenia miniatura, Aborto (inflamación de próstata), Molluscum contagiosum (MC), Mononucleosis, Paperas, Tifus de murino (Tifus endémico), Mictoma, Mycoplasma hominis, Neumonía por micoplasma, Myiasis, Dermatitis por pañal, Conjuntivitis neonatal (Oftalmía neonatal), Sepsis neonatal (Corioamnionitis), Nocardiosis, Noma, infecciones por virus Norwalk, Oncocercosis (Ceguera de los ríos), Osteomielitis, Otitis media, Paracoccidiodomycosis (Blastomycosis sudamericana), Paragonimiasis, Paratifoidea, Pasteurellosis, 60 Pediculosis capitis (piojos de cabeza), Pediculosis corporis (piojos de cuerpo), Pediculosis pubis (piojos púbicos, Piojos de cangrejo), Enfermedad inflamatoria pélvica (PID), Tosferina (Tos ferina), Fiebre glandular de Pfeiffer, Plaga, Infecciones neumocócicas, Neumonía Pneumocystis (PCP), Neumonía, Polio (cojera infantil), Poliomielitis, Tenia porcina, infecciones por Prevotella, Meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), Leucoencefalopatía multifocal progresiva, Pseudo-grupa,

5 Psitacosis, fiebre Q, fiebre de Conejo, Rabia, Fiebre por mordedura de rata, síndrome de Reiter, infecciones por virus sincitial Respiratorio (RSV), Rinosporidiosis, Infecciones por rinovirus, infecciones por Rickettsial, Rickettsialpox, Fiebre del valle de Rift (RVF), Fiebre manchada montañosa rocosa (RMSF), infecciones por Rotavirus, Rubéola, Salmonella paratifoidea, Salmonella tífus, Salmonelosis, SARS (Síndrome respiratorio agudo grave), Sarna, Escarlatina, Esquistosomiasis (Bilharziosis), Tífus de matorrales, Sepsis, Shigelosis (Disentería bacilar), Herpes, Viruela (Variola), Chancro blando, Esporotricosis, Intoxicación alimentaria estafilocócica, Infecciones por estafilococos, Estrongiloidiasis, Sífilis, Teniasis, Tétanos, Fiebre de tres días, Encefalitis transmitida por garrapatas, Tiña de la barba (hormigeo de Barber), Tinea capitis (Tiña del cuero cabelludo), Tinea corporis (Tiña del cuerpo), Tinea cruris (Tiña inguinal), Tinea manuum (Tiña de la mano), Tinea nigra, Tinea pedis (pie de atleta), Tinea unguium (Onicomycosis), Tinea versicolor (Pitiriasis versicolor), 10 Toxocariasis (Larva Migrans Ocular (OLM) y Larva Migrans Visceral (VLM)), Toxoplasmosis, Triquinosis, Tricomoniasis, Tricuriasis (Infecciones por triquina), Influenza de halucinógenos, Tripanosomiasis (enfermedad del sueño), enfermedad de Tsutsugamushi, Tuberculosis, Tularemia, Tífus, fiebre Tífus, infecciones por Ureaplasma urealyticum, Vaginitis (Colpitis), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob Variante (vCJD, nvCJD), Encefalitis equina Venezolana, fiebre hemorrágica Venezolana, neumonía Viral, Leishmaniosis Visceral, Verrugas, Fiebre del Nilo Occidental, Encefalitis equina occidental, 15 piedra blanca (Tiña blanca), Tos ferina, Manchas por hongo de levadura, Fiebre amarilla, infecciones por Yersinia pseudotuberculosis, Yersiniosis, y Cigomicosis.

Son particularmente preferentes enfermedades, particularmente cáncer o enfermedades tumorales, asociadas a una sobre-expresión de al menos un miembro de la ruta PD-1, preferiblemente el receptor PD-1 y/o sus ligandos PD-L1 y PD-L2.

20 En este contexto, es particularmente preferente el tratamiento de melanoma, glioblastoma, y carcinoma de páncreas, pulmón, mama, colon, ovario, y células renales, cánceres uroteliales, carcinomas de célula escamosa de la cabeza y cuello y carcinoma hepatocelular que se asocia a una sobreexpresión de PD-L1. Es especialmente preferente el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o de células pequeñas asociado a una sobreexpresión de cualquier miembro de la ruta PD-1, particularmente de PD-1 o PD-L1.

25 En otra realización el tratamiento de cáncer o enfermedades tumorales asociado a ninguna o a una baja expresión de al menos un miembro de la ruta PD-1, preferiblemente el receptor PD-1 y/o sus ligandos PD-L1 y PD-L2, es particularmente preferente. En este contexto, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/inhibidor inventiva es capaz de inducir la expresión de al menos un miembro de la ruta PD-1, por ejemplo PD-L1, en el paciente a tratar y, por tanto, de permitir la actividad terapéutica del inhibidor PD-1.

30 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en las reivindicaciones para su uso en terapia en combinación con una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno como se define en las reivindicaciones, por ejemplo para su uso en un método de tratamiento o prevención de tumores y/o enfermedades de cáncer o enfermedades infecciosas como se definen aquí.

35 De acuerdo a todavía otro aspecto, la presente invención proporciona una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno como se define en las reivindicaciones para su uso en terapia en combinación con un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en las reivindicaciones, por ejemplo para su uso en un método de tratamiento o prevención de tumor y/o enfermedades de cáncer o enfermedades infecciosas como se definen aquí.

40 Además, se describe aquí un método para transfectar y/o tratar una célula, un tejido o un organismo, aplicando o administrando la combinación vacuna/inhibidor inventiva particularmente con propósitos terapéuticos. En este contexto, típicamente después de preparar la combinación vacuna/inhibidor inventiva, la combinación vacuna/inhibidor inventiva se administra preferiblemente a una célula, un tejido o un organismo, preferiblemente usando cualquiera de los modos de administración aquí descritos. El método para transfectar y/o tratar una célula se puede llevar a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. 45

También se describe aquí un método de tratamiento no reivindicado que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno como se definió arriba en combinación con una composición que comprende un inhibidor de ruta PD-1 como se definió arriba.

50 El método no reivindicado preferentemente comprende la transfección de células aisladas *in vitro*. Así, las células usadas son preferiblemente humanas o animales, particularmente células de un cultivo celular primario, que luego se vuelven a transferir a un humano o animal. Antes de la transfección, estas células típicamente se aíslan del paciente a tratar y se cultivan.

El método de tratamiento no reivindicado preferentemente no comprende la transfección de células aisladas *in vitro*. En este caso, la vacuna de ARN como se definió arriba administrada al sujeto que la necesita no comprende células aisladas transfectadas con al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno comprendido en la vacuna de ARN.

- 5 En la presente invención, si no se indica lo contrario, diferentes rasgos de alternativas y realizaciones se pueden combinar unos con otros. En el contexto de la presente invención, el término “que comprende” se puede sustituir por el término “que consiste en”, donde sea aplicable.

### Breve descripción de las figuras

- 10 Las figuras mostradas a continuación son meramente ilustrativas y describen más detalladamente la invención. Estas figuras no se consideran limitativas de la presente invención.

Figura 1: La vacuna de ARN (OVA-RNActive R1710) actúa sinérgicamente con anticuerpos anti-PD-1. Ratones C57 BL/6 fueron tratado vía subcutánea con  $3 \times 10^5$  células tumorales syngenic E.G7-OVA el día 0 y después se trataron o bien con una vacuna OVA RNActive (32 mg) sola o en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 o un control IgG (100 mg i.p.) de acuerdo con la forma indicada.

- 15 Figura 2: Proporción de supervivencia de ratones con tumores E.G7-OVA tratados con diferentes terapias. De acuerdo con el ejemplo 2, los ratones fueron tratados bien con una vacuna OVA RNActive bien con anticuerpos anti PD-1, individualmente o en combinación.

Figura 3: Secuencia de ARNm optimizada en G/C de R1710 que codifican ovoalbúmina de *Gallus gallus* comprendida en la vacuna OVA RNActive.

### 20 Ejemplos

Los ejemplos mostrados a continuación son meramente ilustrativos y describen la presente invención de manera detallada. Estos ejemplos no se interpretarán como limitativos de la presente invención.

#### Ejemplo 1: Preparación de la vacuna de ARNm

##### 1. Preparación de constructos de ADN y ARNm

- 25 Para los presentes ejemplos, se preparó una secuencia de ADN que codifica ARNm de ovoalbúmina de *Gallus gallus* (R1710) y se usó para las reacciones de transcripción *in vitro* posteriores.

De acuerdo con una primera preparación, se preparó la secuencia de ADN que codifica para el ARNm. El constructo se preparó modificando la secuencia de codificación tipo natural introduciendo una secuencia optimizada en GC para la estabilización, seguido por una secuencia de estabilización derivada de alfa-globina-3'-UTR (muag (alfa-globin-3'-UTR mutada)), un tramo de 64 adenosinas (secuencia poli-A), un tramo de 30 citosinas (secuencia poli-C) y un bucle tallo de histona. En la SEQ ID NO: 2 (ver Figura 3), se muestra la secuencia de ARNm correspondiente.

##### 30 2. Transcripción *in vitro*

El respectivo plásmido de ADN preparado según el Ejemplo 1 se transcribió *in vitro* usando polimerasa T7. Posteriormente el ARNm se purificó usando PureMessenger® (CureVac, Tübingen, Germany).

##### 35 3. Reactivos

Reactivo de formación de complejo: protamina

##### 4. Preparación de la vacuna

- 40 El ARNm de R1710 se complejó con protamina por la adición de protamina al ARNm en la relación (1:2) (p/p) (componente adyuvante). Después de la incubación durante 10 min, se agregó la misma cantidad de ARNm de R1710 libre usado como ARN que proporciona el antígeno.

Vacuna OVA-RNActive (R1710): comprende un componente adyuvante que consiste en ARNm que codifica para ovoalbúmina de *Gallus gallus* (R1710) según la SEQ ID NO. 2, formada por complejo con protamina en una relación 2:1

(p/p) y ARNm libre que proporciona el antígeno que codifica para la ovoalbúmina de *Gallus gallus* (R1710) según la SEQ ID NO. (relación 1:1; ARN complejo: ARN libre).

**Ejemplo 2: Combinación de un anticuerpo anti-PD1 y una vacuna de ARN**

5 El día cero, se implantó subcutáneamente a ratones C57BL/6 (flanco derecho)  $3 \times 10^5$  células E.G.7-OVA por ratón (volumen 100  $\mu$ l en PBS). La E.G.7-OVA es una línea celular de linfoma de células T de ratón que expresa establemente ovoalbúmina de *Gallus gallus* (OVA). La vacunación intradérmica con la vacuna de ARN que comprende ARNm OVA R1720 (32  $\mu$ g/ratón/día de vacunación) (de acuerdo al Ejemplo 1) o Ringer-lactato (RiLa) como solución tampón control y  
 10 tratamiento con los anticuerpos monoclonales anti-PD-1/CD279 (100  $\mu$ g i.p.) o un control isotipo de acuerdo a la Tabla 1 comenzó el día 4 y se repitió los días 7, 11, 14, 18 y 21. Los animales recibieron la inyección de anticuerpo en la mañana y se vacunaron en la tarde con un mínimo de cuatro horas entre los tratamientos.

Tabla 1: Grupos de animales

Grupo	Número de ratones	ARN Inyectado por día de vacunación y ratón	Anticuerpo inyectado por día de tratamto. y ratón
A	10	100% solución tampón Lactato Ringer (RiLa)	---
B	10	32 $\mu$ g	---
C	6	---	100 $\mu$ g anti-PD-1
D	6	32 $\mu$ g	100 $\mu$ g anti-PD-1
E	6	32 $\mu$ g	100 $\mu$ g control-IgG2a

El anticuerpo anti-PD-1/CD279 (clon RMP1-14, IgG2a de rata) y el anticuerpo de control de isotipo (clon 2A3, IgG2a de rata) se adquirieron de BioXCell (West Lebanon, NH, USA).

15 El crecimiento tumoral se vigiló midiendo el tamaño del tumor en 2 dimensiones (longitud y ancho) usando un calibrador (a partir del día 4). El volumen del tumor se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = \text{longitud(mm)} \times \pi \times \text{ancho}^2(\text{mm}^2) / 6$$

20 Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. Como se puede ver en la Figura 1, la vacuna de OVA ARNm (OVA-RNActive R1710) sola o en combinación con control-IgG retarda el crecimiento del tumor por aproximadamente 5 días en comparación con el grupo control tratado con solución tampón. El tratamiento con anticuerpo anti-PD-1 solo fue comparable con la vacunación sola, mientras que la aplicación simultánea de la combinación vacuna de ARN/anti-PD-1 lleva a una inhibición del crecimiento tumoral significativa,  
 25 indicando un efecto sinérgico. Las líneas representan el desarrollo del volumen del tumor medio y las barras de error el SEM. El análisis estadístico se realizó con Anova de 2 vías con post-prueba Bonferroni.

Como se puede ver en la Figura 2, la administración de la vacuna de ARNm OVA (OVA-RNActive R1710) o anticuerpo anti-PD-1 solo ya tenía un efecto significativo en la supervivencia, mientras que la aplicación simultánea de la combinación  
 30 vacuna de ARN/anti-PD-1 lleva a un 50% de supervivencia (3 de 6 animales), indicando un efecto sinérgico.

**REIVINDICACIONES**

1. Combinación de vacuna/inhibidor, que comprende:
  - 5 i) como vacuna, una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN, donde dicho al menos un ARN es un ARNm, que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno y
  - ii) como inhibidor, una composición que comprende un inhibidor de la ruta PD-1, donde el inhibidor de la ruta PD-1 es un anticuerpo antagonista dirigido contra PD-L1.
- 10 2. Combinación según la reivindicación 1, donde el anticuerpo dirigido contra PD-L1 es MDX-1105/BMS-936559, MPDL3280A/RG7446 (atezolizumab) o MEDI4736 (durva/umab).
3. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, donde el al menos un ARN de la vacuna de ARN es un ARN aislado.
4. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, donde el al menos un ARN de la vacuna de ARN es un ARN estabilizado.
- 15 5. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el al menos un ARN de la vacuna de ARN está al menos parcialmente G/C-modificado.
6. Combinación según la reivindicación 5, donde el contenido en G/C del al menos un marco de lectura abierto del al menos un ARN de la vacuna de ARN está aumentado en comparación con el marco de lectura abierto de tipo natural.
- 20 7. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el al menos un ARN de la vacuna de ARN comprende una región optimizada por codón.
8. Combinación según la reivindicación 7, donde el al menos un marco de lectura abierto del al menos un ARN de la vacuna de ARN está optimizado por codón.
- 25 9. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el al menos un ARN de la vacuna de ARN está complejado con un portador.
10. Combinación según la reivindicación 9, donde el portador es un compuesto catiónico o policatiónico o un portador polimérico.
11. Combinación según la reivindicación 10, donde el portador es protamina.
12. Composición farmacéutica, que comprende:
  - 30 i) una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y
  - ii) un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
13. Kit de partes que comprende:
  - 35 i) una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y
  - ii) un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
14. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, composición farmacéutica según la reivindicación 12, kit de partes según la reivindicación 13 para uso médico.
- 40 15. Combinación según la reivindicación 14, para su uso en un método para prevenir o tratar un tumor o una enfermedad de cáncer o una enfermedad infecciosa.
16. Combinación o kit de partes para su uso médico según la reivindicación 14 o 15, donde el inhibidor de la ruta PD-1 y la vacuna de ARN son para administrarse a un paciente que lo necesita de forma secuencial o simultánea.
17. Combinación o kit de partes para su uso según la reivindicación 16, donde el inhibidor de la ruta PD-1 y la vacuna

de ARN son para administrarse a un sujeto que lo necesita por diferentes vías de administración.

18. Inhibidor de la ruta PD-1 como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en terapia en combinación con una vacuna de ARN como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
  19. Vacuna de ARN como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en terapia en combinación con un inhibidor de la ruta PD-1 como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 5

Inhibición de crecimiento tumoral E.G7-OVA tras vacunación con OVA-RNActive y tratamiento ant-PD-1

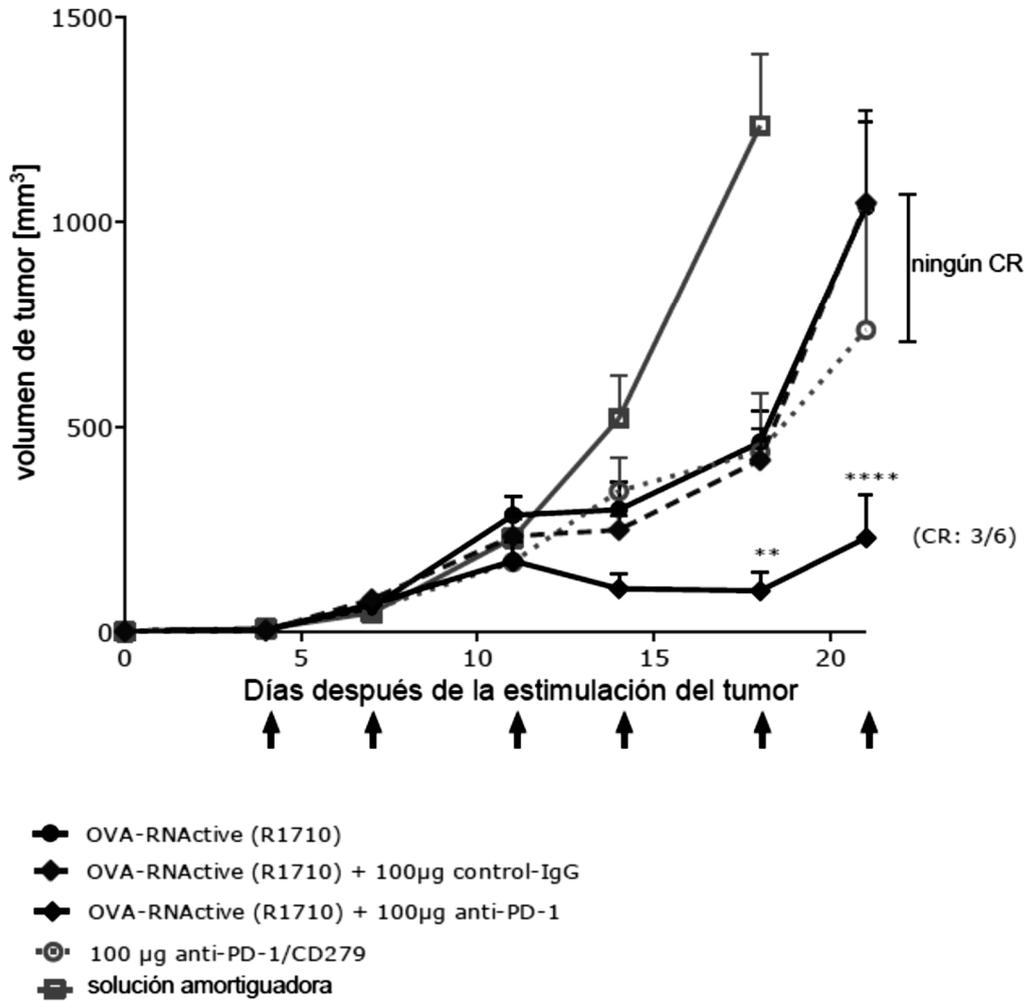


Fig. 1

Ratios de supervivencia de ratones portadores de tumores E.G7-OVA tratados con diferentes terapias

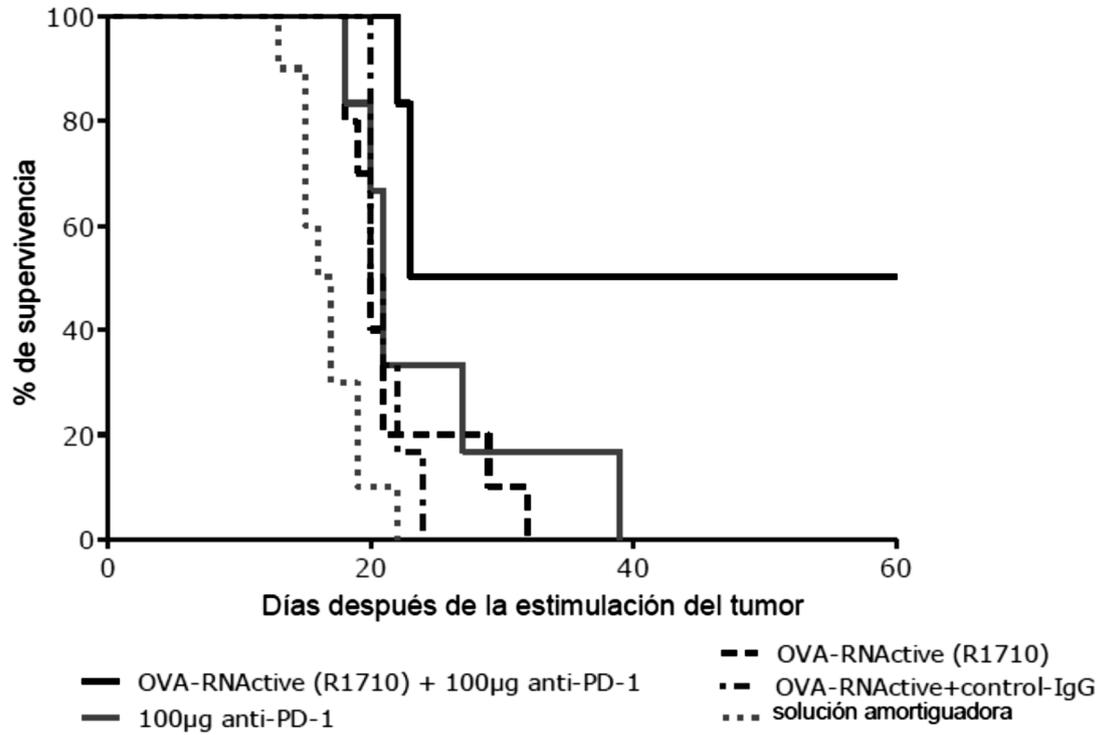


Fig. 2

**R1710:**

GGGAGAAAGCUUACCAUGGGCAGCAUCGGGGCCGCGUCGAUGGAGUUCUG  
CUUCGACGUGUUCAAGGAGCUGAAGGUCCACCACGCCAACGAGAACAUCU  
UCUACUGCCCGAUCGCCAUAUGAGCGCGCUCGCCAUGGUGUACCUGGGC  
GCCAAGGACAGCACCCGGACGCAGAUCAACAAGGUGGUCCGCUUCGACAA  
GCUGCCCGGCUUCGGGGACUCGAUCGAGGCGCAGUGCGGCACCAGCGUGA  
ACGUGCACAGCUCGCUCGCCGGACAUCUGAACCAGAUACCAAGCCGAAC  
GACGUCUACAGCUUCAGCCUGGCCUCGCGGCUCUACGCCGAGGAGCGCUA  
CCCGAUCCUGCCCGAGUACCUGCAGUGCGUGAAGGAGCUCUACCGGGGCG  
GGCUGGAGCCGAUCAACUUCAGACGGCGGCCGACCAGGCCCGGGAGCUG  
AUCAACAGCUGGGUGGAGAGCCAGACCAACGGCAUCAUCCGCAACGUCCU  
CCAGCCGUCGAGCGUGGACAGCCAGACCGCGAUGGUGCUGGUAACGCCA  
UCGUGUUCAAGGGCCUGUGGGAGAAGACGUUCAAGGACGAGGACACCCAG  
GCCAUGCCCUUCCGGGUGACCGAGCAGGAGUCGAAGCCGGUCCAGAUGAU  
GUACCAGAUCCGGCUCUUCGGGUGGGCAGCAUGGCCAGCGAGAAGAUGA  
AGAUCUGGAGCUGCCGUUCGCCUCGGGCACGAUGAGCAUGCUCGUGCUG  
CUGCCCGACGAGGUCAGCGGCCUCGAGCAGCUGGAGUCGAUCAUCAACUU  
CGAGAAGCUGACCGAGUGGACCAGCAGCAACGUGAUGGAGGAGCGCAAGA  
UCAAGGUGUACCUCGCCGGAUGAAGAUGGAGGAGAAGUACAACCUGACG  
UCGGUCCUGAUGGCGAUGGGGAUCACCGACGUGUUCAGCAGCUCGGCCAA  
CCUCAGCGGCAUCAGCUCGGCCGAGAGCCUGAAGAUCAGCCAGGCGGUGC  
ACGCCGCCACGCGGAGAUCAACGAGGCCGGCCGGGAGGUCGUGGGGUCG  
GCCGAGGCGGGCGUGGACGCCGCCAGCGUCAGCGAGGAGUUCGCGCGGA  
CCACCCGUUCUGUUCUGCAUCAAGCACAUCCGCCACCAACGCCGUGCUCU  
UCUUCGGCCGGUGCGUGUCGCCUCGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGC  
CCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCCUCCCUCCUUGCACCGAGAUUAAU  
AAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC  
AAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 3