

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 239**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/EP2014/000659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15135558**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14716752 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3116535**

54 Título: **Combinación de vacunación y agonistas de OX40**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2020

73 Titular/es:
CUREVAC AG (100.0%)
Paul-Ehrlich-Str. 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es:
FOTIN-MLECZEK, MARIOLA;
KALLEN, KARL-JOSEF y
SCHMOLLINGER, JAN C.

74 Agente/Representante:
BUENO FERRÁN , Ana María

ES 2 754 239 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 y agonistas de OX40

5 La presente invención se refiere a una combinación vacuna/agonista que comprende una vacuna de ARN comprendiendo al menos un antígeno tumoral y una composición que comprende al menos un agonista de OX40, donde el agonista de OX40 es un anticuerpo agonista dirigido contra OX40. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica y a un kit de partes que comprende dicha combinación vacuna/agonista. Adicionalmente, la presente invención se refiere a dicha combinación vacuna/agonista para uso médico, a la composición farmacéutica y al kit de partes que comprenden dicha combinación
10 vacuna/agonista, en particular para la prevención o tratamiento de enfermedades tumorales o cancerosas o de enfermedades infecciosas. Además, la presente invención se refiere a una vacuna de ARN para su uso terapéutico en combinación con un agonista de OX40 y a un agonista de OX40 para su uso terapéutico en combinación con una vacuna de ARN.

15 Tradicionalmente, la inmunoterapia contra el cáncer se ha centrado en la estimulación del sistema inmune mediante la vacunación o la inmunoterapia celular adoptiva con el fin de provocar una respuesta antitumoral. Este enfoque se basa en el supuesto de que las células tumorales expresan dianas antigénicas, pero en que las células T antitumorales no se activan lo suficiente. Por tanto, para solventar este problema, principalmente se ha intentado aumentar el reconocimiento de estas dianas antigénicas mediante la estimulación de rutas inmunes claves coestimuladoras positivas y rutas inmunes innatas (tales como los
20 receptores CD28, OX40 y TLR). La WO2013/143555 describe formulaciones farmacéuticas para el suministro de ARN codificador de antígenos a células presentadoras de antígenos. Además, se describen vacunas basadas en ARNm en Fotin-Mleczek et al. 2011 (Messenger RNA-based Vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity, Journal of Immunotherapy, Raven Press, New York, NY, US, vol. 34, nº 1, 1 enero 2011, páginas 1-15) y Fotin-Mleczek et al. 2012 (Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination
25 therapies supporting an improved therapeutic effect, Journal of Gene Medicin, John Wiley & Sons, Inc., US, vol. 14, nº 6, 1 junio 2012).

30 La activación de las células T naive requiere una fuerte interacción entre el antígeno peptídico del receptor de células T (TCR) y MHC, junto con el compromiso de moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígeno (APC). Las señales procedentes de CD28, una molécula coestimuladora expresada en células T naive, es indispensable para la función de las células T. Además de CD28, se requieren varias otras proteínas coestimuladoras, por ejemplo OX40, para generar respuestas inmunes óptimas después del encuentro con el antígeno.

35 OX40 (CD134) es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF (TNFRSF) y es principalmente expresado en las células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas. El receptor OX40 transmite una señal coestimuladora cuando está comprometido. El ligando para OX40 (OX40L, CD252) se expresa principalmente en APC, pero también en células no hematopoyéticas. La señalización de OX40 promueve señales coestimuladoras hacia las células T, lo que lleva a una mayor proliferación, supervivencia, función efectora y migración. En ratones transgénicos que sobreexpresan OX40L, se observó una mayor activación de células T y
40 respuestas mejoradas de las células T después de inmunización con hemocianina de lapa californiana, lo que sugiere que la expresión de OX40L es un factor limitante para la señalización de OX40 en las células T (Murata et al, 2002., J. Immunol. 169(8):4628-36). Por tanto, se ha planteado la hipótesis de que los agonistas de OX40 podrían mejorar la respuesta de las células T en ratones portadores de tumores (Moran et al., 2013., Curr. Opin. Immunol 25(2):230-7).

45 Diversos estudios describen el uso de anticuerpos dirigidos a OX40, solos o en combinación con otros anticuerpos inmunoestimuladores.

50 Los estudios iniciales donde se aplicaba la inyección de agonistas de OX40, por ejemplo anticuerpos anti-OX40 o proteínas de fusión de OX40L, a ratones portadores de tumores poco después de la inoculación tumoral demostraron una mejora en el porcentaje de supervivientes sin tumores en cuatro modelos tumorales diferentes (Weinberg et al, 2000, J. Immunol. 164(4):2160-9). Sin embargo, solo se demostró que los agonistas de OX40 eran efectivos en un programa de tratamiento profiláctico y no en programas de tratamiento terapéutico, es decir en el tratamiento de tumores establecidos, que se asemeja más a la situación de los ensayos clínicos.

55 En otro estudio, se ensayó una combinación de tres anticuerpos monoclonales inmunoestimuladores (anti-CD137 + anti-OX40 + anti-B7-H1) en un modelo de ratón transgénico de cáncer hepático donde el c-myc dirige la transformación y la ovoalbúmina citosólica es expresada en células tumorales como modelo

antigénico. A pesar del uso de la combinación de tres anticuerpos inmunoestimuladores, solo se logró una respuesta parcial en este modelo de carcinoma hepatocelular en el ratón (Morales-Kastresana et al., 2013, Clin. Cancer Res. 19(22):6151 -62).

5 Además, se reportó sobre la combinación de un anticuerpo anti-OX40 con otros anticuerpos inmunoestimuladores y junto con vacunación con péptidos (Gray et al., 2008, EUR. J. Immunol. 38(9):2499-511). Las combinaciones se ensayaron en ratones mediante transferencia de células T OT-I específicas de OVA, seguido de inmunización con un péptido derivado de OVA y uno o más anticuerpos inmunoestimuladores. La combinación de dos anticuerpos (por ejemplo anti-CD25, anti-CD40 y anti-OX40
10 junto con anti-4-1BB) y el péptido derivado de OVA aumentó la respuesta de OT-I aproximadamente cuatro veces en comparación con anti-4-1BB solo, mientras que el uso de cada anticuerpo solo con el péptido derivado de OVA era menos efectivo. En el modelo tumoral B16-F10, la combinación de dos anticuerpos (anti-4-11B/anti-OX40) protegió a los ratones mucho mejor que cualquier anticuerpo solo cuando se administró junto con la vacuna de péptido TRP-2. Por tanto, estos estudios demuestran que la combinación
15 de una vacuna peptídica y un único anticuerpo solo da como resultado una respuesta terapéutica por debajo de la óptima.

En otro estudio, se reportó sobre la combinación de un anticuerpo anti-OX40 agonista con una vacuna de células completas GM-CSF. En el modelo de ratón neu-N, que expresa la oncoproteína de rata HER-2/Neu, la combinación de la vacuna de células completas GM-CSF con el agonista anti-OX40 mAb (anti-OX40)
20 inducía efectivamente una respuesta duradera de las células T CD8 específicas de neu, a pesar de una tolerancia inmune al antígeno diana. Las células T CD8 específicas de tumor activadas demostraron una potente función efectora en ensayos *in vitro* e *in vivo* y eliminaron tumores establecidos en ratones neu-N. Este efecto observado dependía de la sobreexpresión inducida por GM-CSF de la expresión de OX40 de células T CD4 y CD8 poco después de la vacunación y de la persistencia dependiente de anti-OX40 de las células T CD8 específicas de neu, específicas para el epítipo inmunodominante RNEU420-429 (Murata et al., 2006, J. Immunol. 176(2):974-83).
25

Qian y col., en un modelo de ratón con mieloma MOPC-21 murino, pudieron demostrar que la vacuna murina ADN-DKK1 (fusión de DKK1 murina/defensina-2) era capaz de romper la tolerancia inmune, dado que la vacunación con ADN plasmídico que codifica un antígeno no fusionado no lo hacía. El efecto antitumoral resultante podía mejorarse combinando la vacuna de fusión con CpG como adyuvante y mediante la
30 combinación adicional con el anticuerpo anti-OX40 (Qian et al., 2012, Blood 119: 161-169).

La WO1999/42585 describe composiciones que contienen agentes de unión al receptor OX40 y métodos para mejorar las respuestas inmunes específicas de antígeno.

La WO2006/121810 describe proteínas de fusión triméricas OX40-inmunoglobulina y métodos para mejorar la respuesta inmune a un antígeno mediante la activación del receptor OX40 en células T.

35 En resumen, el uso de anticuerpos dirigidos a ciertas proteínas de superficie de las células T parece representar un enfoque prometedor en la mejora de la inmunoterapia contra el cáncer. Sin embargo, la monoterapia con un solo anticuerpo a menudo no conduce a la mejora esperada y la terapia de combinación con múltiples anticuerpos dirigida a varios receptores coestimuladores positivos y/o negativos puede conllevar complicaciones clínicas, por ejemplo toxicidad e inducción de enfermedades autoinmunes.

40 Por tanto, es objeto de la presente invención proporcionar medios seguros y efectivos para una terapia basada en moléculas inmunoestimulantes, en particular basadas en agonistas de OX40, en particular para la terapia tumoral, cancerosa y/o de enfermedades infecciosas.

El objeto subyacente a la presente invención se resuelve mediante el contenido de las reivindicaciones. En particular, el objeto de la invención se resuelve proporcionando una combinación vacuna/agonista que
45 comprende, como vacuna, una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN comprendiendo al menos un marco de lectura abierto que codifica al menos un antígeno tumoral y, como agonista, al menos un agonista OX40, donde el agonista OX40 es un anticuerpo agonista dirigido contra OX40. Además, el objeto se resuelve mediante una composición farmacéutica o un kit de partes que comprende la combinación vacuna/agonista o los respectivos componentes de la misma. Además, el objeto se resuelve mediante una
50 combinación de una vacuna de ARN con un agonista, en particular un agonista de OX40, para su uso en un método de tratamiento de enfermedades tumorales o cancerosas o de enfermedades infecciosas.

En aras de la claridad y la legibilidad, se proporcionan las siguientes definiciones. Cualquier característica técnica mencionada en estas definiciones puede leerse en todas y cada una de las realizaciones de la invención. Se pueden proporcionar definiciones y explicaciones adicionales específicamente en el contexto
55 de estas realizaciones.

5 Respuesta inmune: Una respuesta inmune típicamente puede ser una reacción específica del sistema inmune adaptativo a un antígeno particular (la llamada respuesta inmune específica o adaptativa) o una reacción inespecífica del sistema inmune innato (la llamada respuesta inmune innata o no específica). En esencia, la invención está asociada a reacciones específicas (respuestas inmunes adaptativas) del sistema inmunitario adaptativo. Sin embargo, esta respuesta específica puede ser respaldada por una reacción inespecífica adicional (respuesta inmune innata). Por tanto, la invención también se refiere a un compuesto, composición o combinación para la estimulación simultánea del sistema inmune innato y del adaptativo con el fin de provocar una respuesta inmune adaptativa eficiente.

10 Sistema inmunitario: El sistema inmunitario puede proteger a los organismos de infecciones. Cuando un patógeno logra atravesar una barrera física de un organismo y entra en éste, el sistema inmune innato proporciona una respuesta inmediata, aunque no específica. Cuando los patógenos evaden esta respuesta innata, los vertebrados poseen una segunda barrera protectora, el sistema inmunitario adaptativo. Así, el sistema inmune adapta su respuesta durante una infección para mejorar su reconocimiento del patógeno.
15 Esta respuesta mejorada se mantiene después de que el patógeno haya sido eliminado, en forma de una memoria inmunológica, y permite que el sistema inmunitario adaptativo realice ataques más rápidos y más fuertes cada vez que se encuentra con este patógeno. Así, el sistema inmune comprende el sistema inmune innato y el adaptativo. Cada una de estas dos partes contiene típicamente los llamados componentes humorales y celulares.

20 Respuesta inmune adaptativa: La respuesta inmune adaptativa típicamente se entiende como una respuesta específica de antígeno del sistema inmune. La especificidad de antígeno permite generar respuestas que se adaptan a patógenos específicos o a células infectadas por patógenos. Generalmente, la capacidad de montar estas respuestas personalizadas se mantiene en el cuerpo gracias a las "células de memoria". Cuando un patógeno infecta el cuerpo más de una vez, se utilizan estas células de memoria específicas para eliminarlo rápidamente. En este contexto, el primer paso de una respuesta inmune
25 adaptativa es la activación de células T específicas de antígeno naive o de diferentes células inmunes capaces de inducir una respuesta inmune específica de antígeno mediante células presentadoras de antígeno. Esto se produce en los tejidos y órganos linfoides, a través de los cuales pasan células T naive constantemente. Los tres tipos de células que pueden servir como células presentadoras de antígeno son las células dendríticas, los macrófagos y las células B. Cada una de estas células tiene una función distinta
30 en la provocación de respuestas inmunes. Las células dendríticas pueden absorber antígenos por fagocitosis y macropinocitosis y pueden ser estimuladas por ejemplo, por contacto con un antígeno extraño, para migrar al tejido linfóide local, donde se diferencian en células dendríticas maduras. Los macrófagos ingieren antígenos particulados, tales como bacterias, y son inducidos por agentes infecciosos u otros estímulos apropiados para expresar moléculas MHC. La capacidad única de las células B de unirse e internalizar antígenos de proteínas solubles a través de sus receptores también puede ser importante para inducir células T. Típicamente, las moléculas MHC son responsables de la presentación de un antígeno a las células T. Allí, la presentación del antígeno por las moléculas MHC conduce a la activación de las células T, lo que induce su proliferación y diferenciación en células T efectoras armadas. La función más importante
35 de las células T efectoras es la destrucción de células infectadas mediante las células T citotóxicas CD8+ y la activación de macrófagos por las células Th1, que juntas forman la inmunidad celular, y la activación de células B por las células Th2 y Th1 para producir diferentes clases de anticuerpos, lo que provoca la respuesta inmune humoral. Las células T reconocen un antígeno por sus receptores de células T, que no reconocen y se unen al antígeno directamente, sino que reconocen fragmentos peptídicos cortos, por ejemplo de antígenos proteicos derivados de patógenos, por ejemplo los llamados epítomos, que están unidos a las moléculas MHC sobre las superficies de otras células.
40
45

Sistema inmune adaptativo: En esencia, el sistema inmune adaptativo está dedicado a eliminar o prevenir el crecimiento de patógenos. En general, regula la respuesta inmune adaptativa proporcionando al sistema inmune vertebrado la capacidad de reconocer y recordar patógenos específicos (para generar inmunidad) y de montar ataques más fuertes cada vez que se encuentra el patógeno. El sistema es altamente adaptable
50 debido a la hipermutación somática (un proceso de mutaciones somáticas aceleradas) y a la recombinación V(D)J (una recombinación genética irreversible de segmentos génicos del receptor de antígeno). Este mecanismo permite que un pequeño número de genes genere una gran cantidad de receptores de antígeno diferentes, que luego se expresan de manera única en cada linfocito individual. Debido a que la reorganización del gen conduce a un cambio irreversible en el ADN de cada célula, toda la progenie (descendencia) de dicha célula heredará genes que codifican la misma especificidad del receptor, incluidas las células de memoria B y las células de memoria T, que son las claves en la inmunidad específica a largo
55 plazo.

Inmunidad celular/respuesta inmune 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
60

5 celular no se basa en anticuerpos, sino en la activación de las células del sistema inmune. Típicamente, una respuesta inmune celular puede caracterizarse, por ejemplo, por la activación de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno, que pueden inducir la apoptosis celular, por ejemplo células inmunes específicas tales como las células dendríticas u otras células, que muestran epítopos de antígenos extraños en su superficie. Dichas células pueden estar infectadas por virus o por bacterias intracelulares o pueden ser células cancerosas que presentan antígenos tumorales. Otras características pueden ser la activación de macrófagos y células asesinas naturales, lo que les permite destruir los patógenos y estimular las células para secretar diversas citoquinas que influyen en la función de otras células involucradas en las respuestas inmunes adaptativas e innatas.

10 Inmunidad humoral/respuesta inmune 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 inmune humoral puede caracterizarse típicamente, por ejemplo, por la activación de Th2 y la producción de citoquinas, la formación de un centro germinal y el cambio de isotipo, la maduración de afinidad y la generación de células de memoria. La inmunidad humoral también puede referirse típicamente a las funciones efectoras de los anticuerpos, incluyendo la neutralización de patógenos y toxinas, la activación clásica del complemento y la promoción de opsonina de fagocitosis y la eliminación de patógenos.

20 Sistema inmune innato: El sistema inmune innato, también conocido como sistema inmune no específico (o inespecífico), típicamente comprende células y mecanismos que defienden al huésped de una infección por otros organismos de manera no específica. Esto significa que las células del sistema innato pueden reconocer y responder a los patógenos de manera genérica, pero, a diferencia del sistema inmune adaptativo, no confiere inmunidad duradera o protectora al huésped. El sistema inmunitario innato puede ser activado, por ejemplo, por ligandos de receptores tipo Toll (TLR) u otras sustancias auxiliares, como lipopolisacáridos, TNF-alfa, ligando CD40 o citoquinas, monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, 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-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta, TNF-alfa, factores de crecimiento y hGH, los ligandos del receptor tipo Toll humano TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, un ligando del receptor tipo Toll murino TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, un ligando de un receptor tipo NOD, un ligando de un receptor tipo RIG-1, un ácido nucleico inmunoestimulador, un ARN inmunoestimulador (ARNis), un ADN-CpG, un agente antibacteriano o un agente antiviral. La combinación vacuna/agonista, la composición farmacéutica o el kit de partes según la presente invención pueden comprender una o más de tales sustancias. Típicamente, una respuesta del sistema inmune innato incluye el reclutamiento de células inmunes en sitios de infección mediante la producción de factores químicos, incluyendo los mediadores químicos especializados denominados citoquinas; la activación de la cascada del complemento; la identificación y eliminación de sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa por glóbulos blancos especializados; la activación del sistema inmune adaptativo y/o actuar como una barrera física y química frente a agentes infecciosos.

40 Componente adyuvante/adyuvante: en un sentido amplio, un adyuvante o un componente adyuvante amplio es típicamente un agente farmacológico y/o inmunológico que puede modificar, por ejemplo mejorar, el efecto de otros agentes tales como medicamentos o vacunas. Debe interpretarse en un sentido amplio y se refiere a un amplio espectro de sustancias. Típicamente, estas sustancias pueden aumentar la inmunogenicidad de los antígenos. Por ejemplo, los adyuvantes pueden ser reconocidos por el sistema inmune innato y, por ejemplo, pueden provocar una respuesta inmune innata. Los "adyuvantes" generalmente no provocan una respuesta inmune adaptativa. Así los "adyuvantes" no se califican como antígenos. Su modo de acción es diferenciable de los efectos desencadenados por los antígenos que resultan en una respuesta inmune adaptativa.

50 Antígeno: En el contexto de la presente invención, "antígeno" se refiere típicamente a una sustancia que puede ser reconocida por el sistema inmune, preferiblemente por el sistema inmune adaptativo, y es capaz de desencadenar una respuesta inmune específica de antígeno, por ejemplo por la formación de anticuerpos y/o células T específicas de antígeno, como parte de una respuesta inmune adaptativa. Típicamente, un antígeno puede ser o puede comprender un péptido o proteína que comprende al menos un epítipo y que puede ser presentador por MHC a las 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 como se define aquí. En este contexto, también los fragmentos, variantes y derivados de péptidos y proteínas que comprenden al menos un epítipo se entienden como antígenos. En el contexto de la presente descripción, son particularmente preferentes los antígenos tumorales y los antígenos patogénicos como se definen aquí.

Epítopo: Los epítopos (también denominados “determinantes de antígeno”) pueden distinguirse en epítopos de células T y epítopos de células B. Los epítopos de células T o partes de las proteínas en el contexto de la presente invención pueden comprender fragmentos preferiblemente con una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo fragmentos procesados y presentados por moléculas MHC de clase I que preferiblemente tienen una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9 o 10 (o incluso 11 o 12 aminoácidos), o fragmentos procesados y presentados por moléculas MHC de clase II que preferiblemente tienen una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, pudiendo seleccionarse estos fragmentos de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Típicamente, estos fragmentos son reconocidos por las células T en forma de un complejo consistente en el fragmento peptídico y una molécula MHC, es decir, los fragmentos generalmente no son reconocidos en su forma nativa. Los epítopos de células B son típicamente fragmentos ubicados en la superficie externa de antígenos de proteínas o péptidos (nativos) como se define aquí, preferiblemente que con 5 a 15 aminoácidos, más preferiblemente con 5 a 12 aminoácidos, incluso más preferiblemente con 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por anticuerpos, es decir, en su forma nativa.

Dichos epítopos de proteínas o péptidos pueden seleccionarse además de cualquiera de las variantes mencionadas aquí de tales proteínas o péptidos. En este contexto, los determinantes antigénicos pueden ser epítopos conformacionales o discontinuos que están compuestos por segmentos de las proteínas o péptidos como se definen aquí que son discontinuos en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos como se definen aquí, pero se unen en la estructura tridimensional o a epítopos continuos o lineales que están compuestos por una sola cadena polipeptídica.

Vacuna: Se entiende que una vacuna es 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 el antígeno o una molécula que comprende el antígeno. Por ejemplo, la vacuna puede comprender un ácido nucleico, tal como un ARN (por ejemplo una ARN-vacuna), que codifica un péptido o proteína que comprende el antígeno. El antígeno o inmunógeno puede derivarse de cualquier material adecuado para la vacunación. Por ejemplo, el antígeno o inmunógeno puede derivarse 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.

Vacuna de ARN: Una 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 descripción, la al menos una molécula de ARN comprendida en la vacuna es preferiblemente una molécula de ARN aislada. Este al menos un ARN es preferiblemente un ARN viral, un ARN autorreplicante (replicón) o, más preferiblemente, un ARNm. También se incluyen aquí híbridos de ARN/ADN, lo que significa que la al menos una molécula de ARN de la vacuna de ARN consiste parcialmente en ribonucleótidos y parcialmente en desoxirribonucleótidos. En este contexto, el al menos un ARN de la vacuna de ARN consiste en al menos un 50% de ribonucleótidos, más preferiblemente al menos un 60%, 70%, 80%, 90% y más preferiblemente un 100% de ribonucleótidos. En este contexto, el al menos un ARN de la vacuna de ARN también puede proporcionarse como un ARN o ARNm complejo, como una partícula viral y como una partícula de replicón como se define aquí.

Vacunación genética: La vacunación genética puede entenderse típicamente como la vacunación mediante la administración de una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno o un inmunógeno o fragmentos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede administrarse al cuerpo de un sujeto o a células aisladas de un sujeto. Con la transfección de ciertas células del cuerpo o con la transfección de células aisladas, el antígeno o inmunógeno puede ser expresado por esas células y posteriormente presentado al sistema inmune, provocando una respuesta inmune adaptativa, es decir, específica de antígeno. Por consiguiente, 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, lo que generalmente resulta en la transfección de células del sujeto *in vivo* o *in vitro*, b) la transcripción y/o traducción de la molécula de ácido nucleico introducida; y opcionalmente c) readministrar células aisladas transfectadas al sujeto, preferiblemente al paciente, cuando el ácido nucleico no se ha administrado directamente al paciente.

Ácido nucleico: El término ácido nucleico significa cualquier molécula de ADN o ARN y se usa como sinónimo de polinucleótido. Además, las modificaciones o derivados del ácido nucleico como se definen aquí están explícitamente incluidos en el término general “ácido nucleico”. Por ejemplo, el ácido nucleico peptídico (PNA) también se incluye en el término “ácido nucleico”.

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

5 ARN bi-/multi-cistrónico: Un 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 varios tripletes de nucleótidos (codones) que pueden ser traducidos en un péptido o proteína.

10 Estructura 5'-Cap: Una 5' Cap es típicamente un nucleótido modificado, en particular un nucleótido guanina, añadido al extremo 5' de una molécula de ARN. Preferiblemente, la 5'-Cap se añade empleando un enlace 5'-5' -trifosfato.

15 Secuencia poli(C): Una secuencia poli(C) es típicamente una secuencia larga de nucleótidos citosina, típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos de citidina, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de citidina, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 nucleótidos de citidina o incluso más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 o incluso de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos citidina. Una secuencia poli(C) puede ubicarse preferiblemente 3' a la región de codificación comprendida en el ácido nucleico.

20 Cola poli(A): Una cola poli(A), también llamada "cola 3'-poli(A)", es típicamente una secuencia larga de nucleótidos adenina, de hasta aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, por ejemplo de aproximadamente 25 a aproximadamente 400, preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 400, más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, incluso más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 250, con total preferencia de aproximadamente 60 a aproximadamente 250 nucleótidos adenosina, añadidos al extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico, preferiblemente un ARNm. Una cola poli(A) puede ubicarse preferiblemente 3' a la región de codificación comprendida en un ácido nucleico, por ejemplo un ARNm.

30 Ácido nucleico estabilizado: Típicamente, un ácido nucleico estabilizado puede ser esencialmente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo a la degradación por una exo- o endo-nucleasa) y/o a la degradación *ex vivo* (por ejemplo por el proceso de fabricación previo a la administración de la vacuna, por ejemplo durante la preparación de la solución de vacuna de ARN a administrar). Se puede lograr la estabilización del ARN, en particular del ARNm, por ejemplo, proporcionando una estructura 5'-Cap, una cola poli(A), una cola poli(C) y/o cualquier otra modificación de la UTR. También se puede conseguir por modificación del esqueleto, del azúcar, de bases y/o del contenido en G/C del ácido nucleico. En el contexto de la invención también son posibles otros métodos.

35 Modificación de un ácido nucleico (ácido nucleico modificado): Una modificación de una molécula de ácido nucleico, en particular de ARN o ARNm, puede contener modificaciones de esqueleto, de azúcar o de bases. Una modificación del esqueleto en relación con la presente invención es una modificación donde los fosfatos del esqueleto de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico se modifican químicamente. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos del ácido nucleico. Además, una modificación de bases en relación con la presente invención es una modificación química de los residuos 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 lipídica. Tal ácido nucleico modificado con lípidos típicamente comprende un ácido nucleico como se define aquí. Dicha molécula de ácido nucleico modificada con lípidos típicamente comprende además al menos un enlazador unido covalentemente a dicha molécula de ácido nucleico y al menos un lípido unido covalentemente al enlazador respectivo. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico modificada con lípidos comprende al menos una molécula de ácido nucleico como se define aquí y al menos un lípido (bifuncional) unido covalentemente (sin enlazador) a dicha molécula de ácido nucleico. Según una tercera alternativa, la molécula de ácido nucleico modificada con lípidos comprende una molécula de ácido nucleico como se define aquí, al menos un enlazador unido covalentemente a dicha molécula de ácido nucleico y al menos un lípido unido covalentemente al enlazador respectivo y también al menos un lípido (bifuncional) unido covalentemente (sin enlazador) a dicha molécula de ácido nucleico.

55 Una modificación de un ácido nucleico también puede comprender la modificación del contenido en G/C de la región de codificación de la molécula de ácido nucleico, en especial del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica para al menos un antígeno tumoral en la combinación vacuna/agonista de la invención. En este contexto, es particularmente preferente que el contenido en G/C de la región de codificación de la molécula de ácido nucleico esté incrementado en comparación con el contenido en G/C de la región de

codificación de su secuencia de codificación particular de tipo salvaje, es decir del ARN no modificado. La secuencia de aminoácidos codificada de la secuencia de ácido nucleico preferiblemente no está modificada en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje particular. La modificación del contenido en G/C de la molécula de ácido nucleico, en especial si la molécula de ácido nucleico está en forma de un ARNm o codifica un ARNm, se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región de ARNm a traducir es importante para la traducción eficiente de ese ARNm. Por tanto, la composición y la secuencia de varios nucleótidos es importante. En particular, las secuencias que tienen un mayor contenido de G (guanósina)/C (citósina) son más estables que las secuencias que tienen un mayor contenido de A (adenósina)/U (uracilo). Por tanto, los codones de la secuencia de codificación o del ARNm varían en comparación con su secuencia de codificación o ARNm de tipo salvaje al tiempo que mantienen la secuencia de aminoácidos traducida de modo que incluyen una mayor cantidad de nucleótidos G/C. En relación al hecho de que varios codones codifican para un mismo aminoácido (la llamada degeneración del código genético), se pueden determinar los codones más favorables para la estabilidad (el llamado uso alternativo de codones). Preferiblemente, el contenido en G/C de la región codificante de la molécula de ácido nucleico, en especial del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica para al menos un antígeno tumoral en la combinación vacuna/agonista de la invención, aumenta en al menos un 7%, más preferiblemente en al menos 15%, con particular preferencia en al menos un 20%, en comparación con el contenido en G/C de la región codificada del ARNm de tipo salvaje. Según una realización específica, al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, más preferiblemente al menos el 70%, incluso más preferiblemente al menos el 80% y con total preferencia al menos el 90%, el 95% o incluso el 100% de los codones sustituibles de la región que codifica una proteína o péptido como se define aquí o de su fragmento, variante y/o derivado o la secuencia completa de la secuencia de ARNm de tipo salvaje o la secuencia codificante están sustituidos, aumentando así el contenido en G/C de dicha secuencia. En este contexto, es particularmente preferente aumentar al máximo el contenido en G/C de la molécula de ácido nucleico, especialmente del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica para al menos un antígeno tumoral en la combinación vacuna/agonista de la invención (es decir, 100% de los codones sustituibles), en particular en la región que codifica una proteína, en comparación con la secuencia de tipo salvaje. Además, una modificación del ácido nucleico, especialmente del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica para al menos un antígeno tumoral en la combinación vacuna/agonista de la invención, se basa en el hallazgo de que la eficacia de traducción también está determinada por una frecuencia diferente en el ocurrencia de ARNt en las células. La frecuencia en la aparición de ARNt en una célula, y por tanto el uso de codones en dicha célula, depende de la especie de la que se deriva dicha célula. Por consiguiente, una célula de levadura generalmente presenta un uso de codón diferente que una célula de mamífero, tal como una célula humana. Así, si los denominados "codones raros" están presentes en mayor medida en la molécula de ácido nucleico (con respecto al sistema de expresión respectivo), especialmente si el ácido nucleico está en forma de un ARNm o codifica un ARNm, la correspondiente molécula de ácido nucleico modificado se traduce en un grado significativamente más pobre que en caso de estar presentes los codones que codifican ARNt relativamente "frecuentes". Por tanto, la región de codificación del ácido nucleico modificado, en particular del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral en la combinación vacuna/agonista de la invención, preferiblemente está modificada en comparación con la región correspondiente del ARNm o la secuencia de codificación de tipo salvaje de forma que al menos un codón de la secuencia de tipo salvaje que codifica un ARNt que es relativamente raro en la célula se intercambia por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y transporta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Gracias a esta modificación, las secuencias de la molécula de ácido nucleico, en particular del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral en la combinación vacuna/agonista de la invención, se modifican de manera que se insertan aquellos codones para los que están disponibles los ARNt que ocurren con frecuencia. En otras palabras, mediante esta modificación, todos los codones de la secuencia de tipo salvaje que codifican para un ARNt que es relativamente raro en la célula pueden intercambiarse en cada caso por un codón que codifica para un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y que, en cada caso, porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Tal ácido nucleico modificado preferiblemente se denomina aquí "ácido nucleico o ARN optimizado en codón". Los ARNt que ocurren con relativa frecuencia en la célula y cuáles, por el contrario, son relativamente raros son conocidos por el experto en la materia; véase por ejemplo Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11 (6): 660-666. Es particularmente preferente que una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína, en particular el al menos un ARN que codifica al menos un antígeno tumoral comprendido en la vacuna de ARN utilizada en la presente invención, sea un codón optimizado para el uso del codón humano. Los codones empleados por el aminoácido particular del ARNt que ocurre con más frecuencia, por ejemplo el codón Gly, que usa el ARNt que ocurre con mayor frecuencia en la célula (humana), son particularmente preferentes. En este contexto, es particularmente preferente enlazar el contenido secuencial de G/C que es incrementado, en particular maximizado, en la molécula de ácido nucleico modificado, en particular en el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral en la combinación vacuna/agonista de la invención, con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región codificante de la molécula de ácido nucleico. Esta realización preferente permite proporcionar un ácido

nucleico modificado y estabilizado (modificado) traducido de forma particularmente eficiente, en especial el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral en la combinación vacuna/agonista de la invención.

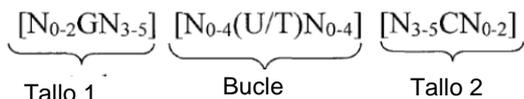
5 Derivado de una molécula de ácido nucleico: Un derivado de una molécula de ácido nucleico se define aquí de la misma manera que un ácido nucleico modificado, como se definió anteriormente.

Análogos de nucleótidos: Los análogos de nucleótidos son nucleótidos estructuralmente similares (análogos) a los nucleótidos naturales que incluyen modificaciones del esqueleto de fosfato, modificaciones de azúcar o modificaciones de nucleobase.

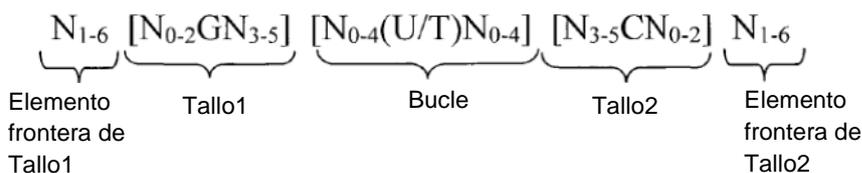
10 Modificación UTR: Una molécula de ácido nucleico, en especial si el ácido nucleico está en forma de una molécula de ácido nucleico codificante, en particular el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica al menos un antígeno tumoral de acuerdo con la invención, preferiblemente tiene al menos una secuencia 5' y/o 3' UTR modificada (modificación UTR). Estas secuencias incluidas en las regiones no traducidas 5' y/o 3' (UTR) pueden tener el efecto de aumentar la vida media del ácido nucleico en el citosol o pueden aumentar la traducción de la proteína o péptido codificados. Estas secuencias UTR pueden tener una identidad de secuencia del 100% con las secuencias naturales presentes en virus, bacterias y eucariotas, pero también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Pueden mencionarse las secuencias no traducidas (UTR) del gen de (alfa)-globina, por ejemplo, de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis* como ejemplos de secuencias estabilizadoras que pueden emplearse en un ácido nucleico estabilizado. Otro ejemplo de secuencia estabilizadora tiene la fórmula general (C/U)CCANxCCC(U/A)PyxUC(C/U)CC, que está contenida en la 3'UTR del ARN muy estable que codifica para la (alfa)-globina, colágeno tipo (I), 15-lipoxigenasa o para tirosina-hidroxilasa (véase Holcik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 a 2414). En el contexto de la presente invención es particularmente preferente la UTR mutada de (alfa)-globina que comprende la siguiente secuencia GCCCG₂TGGG CCTCCCAACG GGCCTCCTC CCCTCCTTGC ACCG (SEQ ID NO. 1) (el nucleótido subrayado muestra la mutación en comparación con la secuencia de tipo salvaje), que también se denomina aquí muag. Por supuesto, dichas secuencias UTR introducidas pueden usarse individualmente o en combinación entre sí y también en combinación con otras modificaciones de secuencia conocidas por el experto en la materia.

30 Tallo-bucle de histona: En el contexto de la presente invención, una secuencia tallo-bucle de histona se selecciona preferiblemente de al menos una de las siguientes fórmulas (I) o (II):

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



35 **fórmula (II)** (secuencia tallo-bucle con elementos frontera del tallo):



40 donde:
 elementos frontera del tallo1 o tallo2 N₁₋₆: 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 [N₀₋₂GN₃₋₅]: es complementaria inversa o complementaria parcialmente inversa con el elemento tallo2 y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N₀₋₂ 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;
 50 donde N₃₋₅ 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
 55 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;
- 5 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;
- 10 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;
- 15 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
- 20 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.

- 25 Síntesis de ácido nucleico: Las moléculas de ácido nucleico utilizadas de acuerdo con la invención como se definen aquí pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos tales como síntesis en fase sólida, propagación *in vivo* (por ejemplo, propagación *in vivo* de virus), así como métodos *in vitro*, como reacciones de transcripción *in vitro*.

- 30 Para la preparación de una molécula de ácido nucleico, especialmente si el ácido nucleico está en forma de un ARN o ARNm, por ejemplo puede transcribirse *in vitro* una molécula de ADN correspondiente. Esta plantilla de ADN comprende preferiblemente un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, seguido de la secuencia de nucleótidos deseada que codifica la molécula de ácido nucleico a preparar, por ejemplo ARNm, y una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN que constituye la plantilla del al menos un ARN de interés puede prepararse mediante
- 35 proliferación fermentativa y posterior aislamiento como parte de un plásmido, que puede replicarse en bacterias. Plásmidos que pueden citarse como adecuados para la presente invención son, por ejemplo, plásmidos pT7Ts (número de acceso de GenBank U26404; Lai et al., Development 1995, 121: 2349 a 2360), serie pGEM®, por ejemplo pGEM®-1 (número de acceso GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso GenBank X65327); véase también Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin y Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

- 40 ARN: ARN es la abreviatura usual del ácido ribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, es decir, un polímero consistente en nucleótidos. Estos nucleótidos son generalmente monómeros adenosin-monofosfato, uridin-monofosfato, guanosin-monofosfato y citidin-monofosfato que están unidos entre sí a lo largo del llamado esqueleto. El esqueleto está formado por enlaces fosfodiéster entre el azúcar de un primer residuo, esto es ribosa, y un grupo fosfato de un segundo monómero adyacente. La sucesión
- 45 específica de monómeros se denomina secuencia de ARN.

- ARN mensajero (ARNm): En las células eucariotas, la transcripción generalmente se lleva a cabo dentro del núcleo o las mitocondrias. *In vivo*, la transcripción de ADN normalmente da como resultado el llamado ARN prematuro, que debe procesarse en el llamado ARN mensajero, generalmente abreviado como ARNm. El procesamiento del ARN prematuro, por ejemplo en organismos eucariotas, comprende diversas
- 50 modificaciones postranscripcionales, tales como empalme, dotar de estructuras 5'-cap, poliadenilación, exportación desde el núcleo o la mitocondria y similares. La suma de estos procesos también se denomina maduración del ARN. El ARN mensajero maduro generalmente proporciona la secuencia de nucleótidos que puede ser traducida 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
- 55 secuencia poli(A). En el contexto de la presente invención, un ARNm también puede ser una molécula artificial, es decir, una molécula que no existe 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 tal combinación en la naturaleza.

Retrovirus: Un retrovirus es un ARN-virus que se duplica en una célula huésped utilizando la enzima transcriptasa inversa para producir un ADN a partir de su genoma de ARN. Luego, el ADN se incorpora al genoma del huésped mediante una enzima integrasa. Posteriormente, el virus se replica como parte del ADN de la célula huésped y luego se somete a los procesos habituales de transcripción y traducción para expresar los genes transportados por el virus. A menudo se han empleado lentivirus con fines de terapia génica. Por razones de seguridad, los vectores lentivirales normalmente no portan los genes necesarios para su replicación. Para producir un lentivirus, se transfectan varios plásmidos en una llamada línea celular de empaquetamiento, normalmente HEK 293. Uno o más plásmidos, generalmente conocidos como plásmidos de empaquetamiento, codifican las proteínas del virión, como la cápside y la transcriptasa inversa. Otro plásmido contiene el material genético para ser suministrado por el vector. Éste es transcrito para producir el genoma de ARN viral monocatenario que está empaquetado en el virión, el cual se emplea para infectar las células con fines de terapia génica o vacunación genética.

Virión: Partículas de virus (conocidas como viriones) que constan de dos o tres partes: i) el material genético (que comprende genes virales y genes heterólogos sustituidos opcionales) tanto de ADN como de ARN; ii) una cubierta proteica que protege estos genes; y, en algunos casos, iii) una envoltura lipídica que rodea la cubierta proteica cuando están fuera de una célula.

ARN autorreplicante (Replicones): El ARN autorreplicante es un vector de suministro basado en alfavirus que se han desarrollado a partir del virus Semliki Forest (SFV), el virus Sindbis (SIN) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). Los alfavirus son ARN-virus monocatenarios donde los genes heterólogos de interés pueden sustituir a los genes estructurales del alfavirus. Proporcionando genes estructurales *in trans*, el ARN replicón es empaquetado en partículas de replicón (RP), las cuales pueden emplearse con fines de terapia génica o 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 un ARNm para la traducción de las proteínas virales no estructurales (nsP) necesarias para el inicio de la amplificación del ARN viral. La replicación del ARN se produce mediante la síntesis de un intermedio de cadena completa y longitud completa que se usa como plantilla para la síntesis de ARN de longitud genómica adicional y para la transcripción de un ARN subgenómico de cadena positiva a partir de un promotor interno. Dicho ARN puede entonces considerarse un ARN autorreplicante, ya que las proteínas no estructurales responsables de la replicación (y la transcripción de genes heterólogos) todavía están presentes en dicho replicón. Dichos vectores de alfavirus se denominan "replicones".

Partícula de replicón: Una partícula de replicón consta de dos o tres partes: i) el material genético (= el replicón) (que comprende genes virales y genes heterólogos sustituidos opcionales) de ADN o ARN; ii) una cubierta proteica que protege estos genes; y, en algunos casos, iii) una envoltura lipídica que rodea la cubierta proteica cuando está 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. Se puede producir un ARN aislado por aislamiento y/o purificación de células o lisados celulares, o a partir de sistemas de transcripción *in vitro*. El término ARN aislado también incluye ARN complejado con componentes adicionales, por ejemplo péptidos, proteínas, portadores, etc., ARN empaquetado en partículas, como por ejemplo en partículas de replicón o de virus (viriones), y ARN contenido en una solución, que además del ARN, comprenden otros componentes, por ejemplo tampones, reactivos de estabilización, inhibidores de RNasa.

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

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

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

Fragmento de una secuencia: Un fragmento de una secuencia es típicamente una porción más corta de una secuencia de longitud completa de, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos. Por consiguiente, 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, tales como nucleótidos o aminoácidos, que corresponde a un tramo continuo de entidades en la molécula de la que se deriva el fragmento, que representa al menos un 5%, preferiblemente al menos un 20%, preferiblemente al menos un 30%, más preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, incluso más preferiblemente al menos un 60%, incluso más preferiblemente al menos un 70% y con total preferencia al menos un 80% de la molécula total (esto es, de longitud completa) de la que se deriva el fragmento. Así, por ejemplo, un fragmento de un antígeno de proteína o péptido corresponde preferiblemente a un tramo continuo de entidades del antígeno de proteína o péptido del que deriva el fragmento, que representa al menos un 5%, preferiblemente al menos un 20%, preferiblemente al menos un 30%, más preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, incluso más preferiblemente al menos un 60%, incluso más preferiblemente al menos un 70% y con total preferencia al menos un 80% de la proteína total (esto es, de longitud completa) o del antígeno péptido. Es particularmente preferente que el fragmento de una secuencia sea un fragmento funcional, es decir, que el fragmento cumpla una o más de las funciones de la secuencia de la cual se deriva el fragmento. Por ejemplo, un fragmento de una proteína o antígeno peptídico preferiblemente tiene al menos una función antigénica (por ejemplo, es capaz de provocar una reacción inmune específica contra al menos un determinante de antígeno de dicha proteína o antígeno peptídico) de la proteína o antígeno peptídico del fragmento del que se deriva.

Fragmentos de proteínas: En el contexto de la presente invención, "fragmentos" de proteínas o péptidos, es decir, fragmentos de secuencias de aminoácidos, típicamente pueden comprender una secuencia de una proteína o péptido como se define aquí que, con respecto a su secuencia de aminoácidos (o su molécula de ácido nucleico codificante), está truncada en el N-terminal, el C-terminal y/o intrasecuencialmente en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína original (nativa) (o su molécula de ácido nucleico codificada). Así, tal truncamiento puede estar presente al nivel de aminoácidos o al nivel del ácido nucleico correspondiente. Una identidad de secuencia con respecto a tal fragmento como se define aquí puede así referirse preferiblemente a la proteína o péptido completo como se define aquí o a la molécula de ácido nucleico (codificante) completa de dicha proteína o péptido.

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

Transfección: El término "transfección" se refiere a la introducción de moléculas de ácido nucleico, tales como moléculas de ADN o ARN (por ejemplo, ARNm), en las células, preferiblemente en células eucariotas. En el contexto de la presente invención, el término "transfección" abarca cualquier método conocido por el experto de introducir moléculas de ácido nucleico, preferiblemente moléculas de ARN, en las células, preferiblemente en células eucariotas, tales como células de mamífero. Dichos métodos abarcan, por ejemplo, electroporación, lipofección, por ejemplo basada en lípidos catiónicos y/o liposomas, precipitación con fosfato de calcio, transfección basada en nanopartículas, transfección basada en virus o transfección basada en polímeros catiónicos, como DEAE-dextrano o polietilimina, etc.

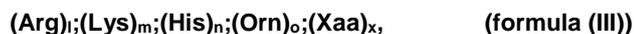
Vehículo: Un vehículo en el contexto de la invención puede ser típicamente un compuesto que facilita el transporte y/o la formación de complejos de otro compuesto (carga). Un vehículo puede estar asociado a su carga por interacción covalente o no covalente. Un vehículo puede transportar ácidos nucleicos, por ejemplo ARN o ADN, a las células diana. El vehículo puede ser, para algunas realizaciones, un compuesto catiónico o policatiónico o un vehículo polimérico como se define aquí. Un vehículo en el contexto de la presente invención preferiblemente es adecuado como vehículo para moléculas de ácido nucleico, por ejemplo para mediar la disolución en líquidos fisiológicamente aceptables, para el transporte y la absorción celular de las moléculas de ácido nucleico o un vector. Por consiguiente, un vehículo en el contexto de la presente invención puede ser un componente que puede ser adecuado para el depósito y suministro de una molécula o vector de ácido nucleico. Tales vehículos pueden ser, por ejemplo, vehículos catiónicos o policatiónicos o compuestos que pueden servir como agente de transfección o de complejación. Vehículos o vehículos poliméricos particularmente preferentes en este contexto son compuestos catiónicos o policatiónicos.

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

El término "compuesto catiónico o policatiónico" en el contexto de la presente invención preferentemente se refiere a compuestos que pueden emplearse como agentes de transfección o complejación, en particular de los ácidos nucleicos usados de acuerdo con la invención.

Compuestos catiónicos o policatiónicos de acuerdo con la invención que son agentes particularmente preferentes en este contexto incluyen protamina, nucleolina, espermina o espermidina u otros péptidos o proteínas catiónicos, tales como poli-L-lisina (PLL), poliarginina, polipéptidos básicos, péptidos penetrantes de células (CPP), incluyendo péptidos que se unen a VIH, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, penetratina, péptidos derivados de VP22 o análogos, HSV VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, péptido(s) MPG, Pep-1, oligómeros L, péptido(s) de calcitonina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, FGF, lactoferrina, transportano, buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP o histonas. La protamina es particularmente preferente.

Además, pueden seleccionarse proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos preferentes utilizados como agentes de transfección o complejación de las siguientes proteínas o péptidos con la siguiente fórmula total (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 Arg₇, Arg₈, Arg₉, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R, etc.

Además, compuestos catiónicos o policatiónicos preferentes que pueden usarse como agentes de transfección o 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-dimetilhidroxietil-amonio, DOTAP: dioleiloxi-3-(trimetilamonio)-propano, DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)-dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadeciloxipropil)(2-hidroxietil)]-dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oximetiloxi)etil]-trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisucciniloxi)etil]-trimetilamonio, oligofectamina, o polímeros catiónicos o policatiónicos, por ejemplo poliaminoácidos modificados, como β -aminoácido-polímeros o poliamidas invertidas, etc., polietilenos modificados, tal como PVP (poli(bromuro de N-etil-4-vinilpiridinio)), etc., acrilatos modificados, como pDMAEMA (poli(dimetilaminoetil 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., polimina(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.

5

Vehículo polimérico: Un vehículo polimérico es típicamente un vehículo formado por un polímero. Un vehículo polimérico en el contexto de la presente invención usado como agente de transfección o complejación podría ser un vehículo polimérico formado por componentes catiónicos reticulados con disulfuro. Los componentes catiónicos reticulados con disulfuro pueden ser iguales o diferentes entre sí. El vehículo polimérico también puede contener componentes adicionales. También es particularmente preferente que el vehículo polimérico comprenda mezclas de péptidos, proteínas o polímeros catiónicos y opcionalmente otros componentes como se definen aquí que están reticulados mediante enlaces disulfuro como se describe aquí.

10

En este contexto, componentes catiónicos que forman la base del vehículo polimérico por reticulación con disulfuro se seleccionan típicamente de cualquier péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico adecuado para este propósito, en particular cualquier péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico capaz de complejar un ácido nucleico como se define de acuerdo con la presente invención y así preferiblemente condensar el ácido nucleico. El péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico es preferiblemente una molécula lineal, sin embargo, también se pueden emplear péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos ramificados.

15

20

Cada proteína, péptido o polímero catiónico o policatiónico reticulado con disulfuro del vehículo polimérico, que puede usarse para formar complejos, por ejemplo con el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica para al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/agonista de la invención contiene al menos un grupo -SH, con mayor preferencia al menos un residuo cisteína o cualquier otro grupo químico que presente un grupo -SH capaz de formar un enlace disulfuro tras la condensación con al menos una proteína, péptido o polímero catiónico o policatiónico adicional como componente catiónico del vehículo polimérico como se menciona aquí.

25

Como se definió anteriormente, el vehículo polimérico, que puede usarse para formar complejos por ejemplo con el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/agonista de la invención puede estar formado por componentes catiónicos (o policatiónicos) disulfuro-reticulados.

30

Según una primera alternativa, al menos un componente catiónico (o policatiónico) del vehículo polimérico que puede usarse en este contexto puede seleccionarse de péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos. Tales péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos preferiblemente tienen una longitud de aproximadamente 3 a 100 aminoácidos, preferiblemente una longitud de aproximadamente 3 a 50 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de aproximadamente 3 a 25 aminoácidos, por ejemplo una longitud de aproximadamente 3 a 10, 5 a 15, 10 a 20 o 15 a 25 aminoácidos. Alternativa o adicionalmente, tales péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos pueden tener un peso molecular de aproximadamente 0,01 kDa a aproximadamente 100 kDa, incluyendo un peso molecular de aproximadamente 0,5 kDa a aproximadamente 100 kDa, preferiblemente de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, incluso más preferiblemente de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 30 kDa.

35

40

En el caso específico de que el componente catiónico del vehículo polimérico que puede usarse para formar complejos, por ejemplo con el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/agonista de la invención, comprenda un péptido o proteína catiónico o policatiónico, las propiedades catiónicas del péptido o proteína catiónico o policatiónico o de la totalidad el vehículo polimérico, si éste está compuesto en su totalidad por péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos, puede determinarse según su contenido en aminoácidos catiónicos. Preferiblemente, el contenido de aminoácidos catiónicos en el péptido o proteína catiónico o policatiónico y/o en el vehículo polimérico es al menos un 10%, 20% o 30%, preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, 60% o 70%, pero también preferiblemente al menos un 80%, 90%, o incluso un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, con mayor preferencia al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el rango de aproximadamente 10% a 90%, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 15% a 75%, incluso más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 20% a 50%, por ejemplo 20, 30, 40 o 50%, o en un rango formado por cualquiera de dos de los valores mencionados anteriormente, siempre que el contenido de todos los aminoácidos, por ejemplo de aminoácidos catiónicos, lipofílicos, hidrofílicos, aromáticos y otros, en el péptido o proteína catiónico o policatiónico, o en el vehículo polimérico completo, cuando el vehículo polimérico está compuesto de péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos en su totalidad, sea el 100%.

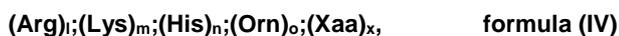
45

50

55

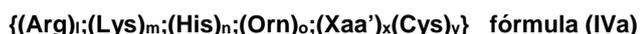
Preferiblemente, tales péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del vehículo polimérico, que comprenden o están adicionalmente modificados para comprender al menos un grupo -SH, se seleccionan, sin limitarse a, péptidos catiónicos o proteínas tales como protamina, nucleolina, espermina o espermidina, oligo o poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, oligo o poliarginina, péptidos penetrantes de células (CPP), CPP quiméricos, como transportano, o péptidos MPG, péptidos de unión a VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, miembros de la familia de la penetratina, por ejemplo penetratina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPP derivados antimicrobianos, por ejemplo buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, PpTG20, L-oliómeros, FGF, lactoferrina, histonas, péptidos derivados de VP22 o análogos, Pestivirus Erns, HSV, VP22 (Herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, oligómeros L, péptido(s) de calcitonina, etc.

Alternativa o adicionalmente, tales péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del vehículo polimérico, que comprenden o están adicionalmente modificados para comprender al menos un grupo -SH, se seleccionan, sin limitarse a, de los péptidos catiónicos siguientes con la siguiente fórmula suma (IV):



donde $l + m + n + o + x = 3-100$ 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, 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) represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa es cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= naturales) 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 puede estar dispuesto en cualquier lugar del péptido. En este contexto, se prefieren particularmente péptidos o proteínas catiónicos en el intervalo de 7-30 aminoácidos. Péptidos incluso más preferentes en esta fórmula son oligoargininas tales como Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₁₂, His₃Arg₉, Arg₉His₃, His₃Arg₉His₃, His₆Arg₉His₆, His₃Arg₄His₃, His₆Arg₄His₆, TyrSer₂Arg₉Ser₂Tyr, (ArgLysHis)₄, Tyr(ArgLysHis)₂Arg, etc.

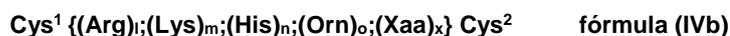
De acuerdo con otra realización preferente particular, el péptido o proteína catiónico o policatiónico del vehículo polimérico, cuando está definido según la fórmula $(\text{Arg})_l;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$ (fórmula (IV)) como se muestra arriba y que comprende o está además modificado para comprender al menos un grupo -SH, puede seleccionarse, sin limitarse a, de la subfórmula (IVa):



donde $(\text{Arg})_l;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o$; y x son como se definen aquí, Xaa' es cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= naturales) 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) represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido.

Esta realización puede aplicarse a situaciones donde el péptido o proteína catiónico o policatiónico del vehículo polimérico, por ejemplo cuando se define de acuerdo con la fórmula empírica $(\text{Arg})_l;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$ (fórmula (IV)) como se muestra arriba, comprende o ha sido modificado con al menos una cisteína como grupo -SH en el significado anterior, de modo 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 vehículo polimérico.

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



donde la fórmula empírica $\{(\text{Arg})_l;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x\}$ (fórmula (IV)) es como se define aquí y forma un núcleo de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula (semiempírica) (IV) y donde Cys¹ y Cys² son cisteínas proximales a o terminales a $(\text{Arg})_l;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$. Esta realización puede

5 aplicarse a situaciones en las que el péptido o proteína catiónico o policatiónico del vehículo polimérico que puede emplearse para complejar 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/agonista de la invención, por ejemplo cuando se define de acuerdo con la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ (fórmula (IV)) como se muestra arriba, se ha modificado con al menos dos cisteínas como grupo -SH en el significado anterior, de forma que el péptido catiónico o policatiónico del complejo vehículo polimérico de la invención porta al menos dos cisteínas (terminales) que son capaces de formar un enlace disulfuro con otros componentes del vehículo polimérico.

10 De acuerdo con una segunda alternativa, al menos un componente catiónico (o policatiónico) del vehículo polimérico puede seleccionarse 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 esté modificado para tener al menos un grupo -SH, que proporciona un enlace disulfuro que une el polímero catiónico o policatiónico con otro componente del vehículo polimérico como se define aquí. Por tanto, al igual que se define aquí, el vehículo polimérico puede comprender los mismos o diferentes polímeros
15 catiónicos o policatiónicos.

En el caso específico de que el componente catiónico del vehículo polimérico comprenda un polímero catiónico o policatiónico (no peptídico), las propiedades catiónicas del polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) pueden determinarse en función de su contenido en cargas catiónicas en comparación con las cargas totales de los componentes del polímero catiónico. Preferiblemente, el contenido de cargas catiónicas del polímero catiónico a pH (fisiológico) como se define aquí es de al menos un 10%, 20% o 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos un 50%, 60% o 70%, pero también preferiblemente al menos un 80%, 90%, o incluso un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, con mayor preferencia preferiblemente al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el rango de aproximadamente 10% a 90%, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 30% a 100%, incluso más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 50% a 100%, por ejemplo el 50, 60, 70, 80, 90 o 100%, o en un rango formado por cualesquiera dos de los valores mencionados anteriormente, siempre que el contenido de todas las cargas, por ejemplo cargas positivas y negativas, a pH (fisiológico) como se define aquí, de todo el polímero catiónico sea el 100%.

30 Preferiblemente, el componente catiónico (no peptídico) del vehículo polimérico representa un polímero catiónico o policatiónico típicamente con un peso molecular de aproximadamente 0,1 o 0,5 kDa a aproximadamente 100 kDa, preferiblemente de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 75 kDa, más preferiblemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, incluso más preferiblemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 30 kDa, o un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, incluso más preferiblemente de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 30 kDa. Además, el polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) típicamente tiene al menos un grupo -SH capaz de formar un enlace disulfuro tras la condensación con otros componentes catiónicos u otros componentes del vehículo polimérico como se definen aquí.

40 En el contexto anterior, el componente catiónico (no peptídico) del vehículo polimérico que puede usarse para complejar por ejemplo el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/agonista de la invención puede seleccionarse de acrilatos, acrilatos modificados, tales como pDMAEMA (poli(dimetilaminoetilmetilacrilato)), quitosanos, aziridinas o 2-etil-2-oxazolina (formando oligoetileniminas u oligoetileniminas modificadas), polímeros obtenidos por reacción de bisacrilatos con aminas formando oligo-beta-aminoésteres o poliamidoaminas, u otros polímeros como poliésteres, policarbonatos, etc. Cada molécula de estos polímeros catiónicos o policatiónicos (no peptídicos) típicamente tiene al menos un grupo -SH, pudiendo introducirse el al menos un grupo -SH en el polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) mediante modificaciones químicas, por ejemplo utilizando imonotiolano, ácido 3-tiopropiónico o introduciendo aminoácidos que presentan grupos -SH-, como cisteína o cualquier otro aminoácido (modificado). Tales grupos -SH son preferiblemente como ya se definió anteriormente.

50 De acuerdo con una realización particularmente preferente, el componente adicional que puede estar contenido en el vehículo polimérico, que puede usarse para modificar los diferentes péptidos catiónicos o policatiónicos (cortos) o los polímeros (no peptídicos) que forman la base para el vehículo polimérico o para las propiedades biofísicas/bioquímicas del vehículo polimérico como se define aquí, es un componente aminoácido (AA). Según la presente invención, el componente aminoácido (AA) comprende un número de aminoácidos preferiblemente en un rango de aproximadamente 1 a 100, preferiblemente en un rango de aproximadamente 1 a 50, más preferiblemente seleccionado de un número de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15-20, o de un rango formado por cualesquiera dos de los valores mencionados anteriormente. En este contexto, los aminoácidos del componente aminoácido (AA) se pueden seleccionar
55

independientemente uno de otro. Por ejemplo, si en el vehículo polimérico están presentes dos o más componentes (AA), éstos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

5 El componente aminoácido (AA) puede contener o puede estar flanqueado (por ejemplo, terminalmente) por un resto que contiene -SH, el cual permite introducir este componente (AA) vía un enlace disulfuro en el vehículo polimérico como se define aquí. En el caso específico en que el resto que contiene -SH sea una cisteína, el componente aminoácido (AA) también puede leerse como -Cys-(AA)-Cys-, donde Cys representa la cisteína y proporciona el grupo -SH necesario para el enlace disulfuro. El grupo que contiene -SH también se puede introducir en el componente aminoácido (AA) por cualquiera de las modificaciones o reacciones indicadas anteriormente para el componente catiónico o cualquiera de sus componentes.

10 Además, el componente aminoácido (AA) puede proporcionarse con dos grupos -SH (o incluso más), por ejemplo de la forma representada por la fórmula HS-(AA)-SH, para permitir la unión a dos funcionalidades vía enlaces disulfuro, por ejemplo cuando el componente aminoácido (AA) se usa como un enlazador entre dos componentes adicionales (por ejemplo, como un enlace entre dos polímeros catiónicos).

15 Alternativamente, el componente aminoácido (AA) puede proporcionarse con otras funcionalidades como ya se describió anteriormente para los otros componentes del vehículo polimérico, funcionalidades que permiten la unión del componente aminoácido (AA) a cualquiera de los componentes del vehículo polimérico.

20 Así, según la presente invención, el componente aminoácido (AA) del vehículo polimérico puede unirse a otros componentes del vehículo polimérico, el cual puede emplearse para complejar por ejemplo el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la vacuna/agonista de la invención con o sin emplear un enlace disulfuro.

De acuerdo con una alternativa adicional y particularmente preferente, el componente aminoácido (AA) puede usarse para modificar el vehículo polimérico, en particular el contenido de componentes catiónicos del vehículo polimérico como se definió anteriormente.

25 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 polar no cargado), un componente aminoácido lipofílico o un componente aminoácido básico débil.

30 Según otra alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un péptido señal o una secuencia señal, una señal o secuencia de localización, una señal o secuencia de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular (por ejemplo TAT), etc. Además, de acuerdo con otra alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un péptido o proteína funcional que puede modular la funcionalidad del vehículo polimérico en consecuencia. Tales péptidos o proteínas funcionales como componente aminoácido (AA) comprende preferiblemente cualquier péptido o proteína como se define aquí, por ejemplo como antígenos como se definen aquí. Según una alternativa, dichos péptidos o proteínas funcionales adicionales pueden comprender los llamados péptidos de penetración celular (CPP) o péptidos catiónicos de transporte.

40 Según 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. Son particularmente preferentes péptidos o proteínas seleccionados de proteínas o péptidos terapéuticamente activos, antígenos, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos patogénicos (por ejemplo, antígenos animales, antígenos virales, antígenos de protozoos, antígenos bacterianos), de anticuerpos, de proteínas o péptidos inmunoestimulantes, de receptores de células T específicas de antígeno, o de cualquier otra proteína o péptido adecuado para una aplicación (terapéutica) específica. Son particularmente preferentes los epítopos peptídicos de aquellos antígenos codificados por el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita.

45 El vehículo polimérico que puede usarse para complejar, por ejemplo, el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/agonista de la invención puede comprender al menos uno de los péptidos catiónicos o policatiónicos, proteínas o polímeros o componentes adicionales mencionados anteriormente, por ejemplo (AA), donde cualesquiera alternativas anteriores pueden combinarse entre sí, y puede obtenerse por polimerización en una reacción de condensación de polimerización vía sus grupos -SH.

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

L-P¹-S-[S-P²-S]_n-S-P³-L fórmula (V)

donde

5 P¹ y P³ son diferentes o idénticos y representan una cadena de polímero hidrofílico lineal o ramificada, cada P¹ y P³ tiene al menos una parte -SH- capaz de formar un enlace disulfuro por condensación con el componente P², o alternativamente con (AA), (AA)_x, o [(AA)_x]_z si tales componentes se usan como enlazante entre P¹ y P² o P³ y P² y/o con componentes adicionales (por ejemplo (AA), (AA)_x, [(AA)_x]_z o L), la cadena de polímero hidrofílico lineal o ramificada 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;

15 P² es una proteína o péptido catiónico o policatiónico, por ejemplo como se definió arriba para el vehículo 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 vehículo 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 P² al menos dos partes -SH capaces de formar un enlace disulfuro por condensación con componentes adicionales P² o componente(s) P¹ y/o P³ o alternativamente con componentes adicionales (por ejemplo (AA), (AA)_x, o [(AA)_x]_z);

30 -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 partes -SH- de cualquiera de los componentes P¹ y P², P² y P², o P² y P³, u opcionalmente de componentes adicionales como se definen aquí (por ejemplo L, (AA), (AA)_x, [(AA)_x]_z, etc.); la parte -SH- puede ser parte de la estructura de estos componentes o añadirse por una modificación como se define abajo;

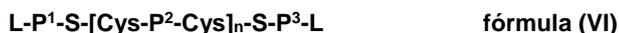
35 L es un ligando opcional, que puede estar o no presente, y se puede seleccionar independientemente de RGD, transferrina, folato, un péptido señal o secuencia señal, una secuencia o señal de localización, una secuencia o señal de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración 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.;

45 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.

55 Cada uno de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ 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 P² o con componente el (AA) o (AA)_x, si se usa como enlazante entre P¹ y P² o P³ y P² como se define abajo y opcionalmente con un componente adicional, por ejemplo L y/o (AA) o (AA)_x, por ejemplo si existen dos o más porciones -SH-. Las siguientes subfórmulas "P¹-S-S-P²" y "P²-S-S-P³" dentro de la fórmula genérica (V) anterior (los corchetes se omiten para una mejor legibilidad), donde cualquiera de S, P¹ y P³ son como se definen aquí, típicamente representan una situación donde una parte -SH- de los polímeros hidrofílicos

P¹ y P³ se condensa con una parte -SH- del componente P² de la fórmula genérica (V) anterior, formando ambos azufres de estas partes -SH- un enlace disulfuro -S-S- como se define aquí en la fórmula (V). Estas partes -SH- son proporcionadas típicamente por cada uno de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³, por ejemplo mediante una cisteína interna o cualquier aminoácido adicional (modificado) o compuesto que tenga una parte -SH. En consecuencia, las subfórmulas "P¹-S-S-P²" y "P²-S-S-P³" también pueden escribirse como "P¹-Cys-Cys-P²" y "P²-Cys-Cys-P³", si la parte -SH- es proporcionada por una cisteína, donde el término Cys-Cys representa dos cisteínas unidas 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 partes -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 parte -SH- de la cisteína. Igualmente, los términos "-S-Cys" y "-Cys-S" indican un enlace disulfuro entre una parte que contiene -SH y una cisteína, que también puede escribirse como "-S-(S-Cys)" y "-(Cys-S)-S". Alternativamente, los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ se pueden modificar con una porción -SH, preferiblemente por reacción química con un compuesto que porta una porción -SH, de manera que cada uno de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ lleva al menos una de tales partes -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 P¹ y P³ como se definen aquí. Tales compuestos no amino se pueden enlazar a los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ de fórmula (VI) del vehículo 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 de 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_n (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 P¹ y P³. Como se define aquí, cada uno de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ 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)_x, anticuerpos, péptidos penetradores de la célula o péptidos potenciadores (por ejemplo TAT, KALA), etc.

En el contexto de la fórmula completa (V), el vehículo polimérico de la invención se puede definir preferiblemente de la siguiente manera:



donde L, P¹, P², P³ y n son como se definen aquí, S es azufre y cada Cys proporciona un resto -SH para el enlace disulfuro.

El componente aminoácido (AA) o (AA)_x en el vehículo polimérico de fórmula (V o VI), por ejemplo como se definió anteriormente para el vehículo polimérico formado por componentes catiónicos reticulados con disulfuro, también puede estar presente como un componente aminoácido repetitivo mixto [(AA)_x]_z, donde el número de componentes aminoácidos (AA) o (AA)_x está además definido por el entero z. En este contexto, z puede seleccionarse de un intervalo de aproximadamente 1 a 30, preferiblemente de un intervalo de aproximadamente 1 a 15, más preferiblemente de 1 a 10 o de 1 a 5 e incluso más preferiblemente de un número seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o puede seleccionarse de un rango formado por cualesquiera dos de los dos valores citados anteriormente.

De acuerdo con una alternativa específica y particularmente preferente, el componente aminoácido (AA) o (AA)_x, preferiblemente escrito como S-(AA)_x-S o [S-(AA)_x-S] puede emplearse para modificar el componente P², en particular el contenido de componente S- P²-S del componente repetitivo [S- P²-S]_n del vehículo polimérico de fórmula (V) anterior. Esto puede representarse, en el contexto del vehículo polimérico completo según la fórmula (VI), por ejemplo siguiendo la fórmula (VIa):



donde x, S, L, AA, P¹, P² y P³ preferiblemente son como se definen aquí. En la fórmula (VIa) anterior, cualquiera de los componentes individuales [S-P²-S] y [S-(AA)x-S] pueden estar presentes en cualquier orden en la subfórmula {[S-P²-S]_a[S-(AA)x-S]_b}. El número de componentes individuales [S-P²-S] y [S-(AA)x-S] en la subfórmula {[S-P²-S]_a[S-(AA)x-S]_b} está determinado por los enteros a y b, donde a + b = n. n es un entero y se define como anteriormente para la fórmula (V).

Según otra realización, el vehículo polimérico que puede emplearse para complejar por ejemplo el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/agonista de la invención o componentes individuales del mismo, por ejemplo los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos mencionados anteriormente u otros componentes, por ejemplo (AA), puede estar además modificado con un ligando, preferiblemente un carbohidrato, más preferiblemente un azúcar, incluso más preferiblemente manosa.

De acuerdo con una realización específica, el vehículo polimérico completo puede obtenerse mediante una condensación de polimerización (de al menos uno) de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos citados anteriormente u otros componentes, por ejemplo (AA), vía sus grupos -SH- en un primer paso y 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/agonista de la invención con dicho vehículo polimérico en un segundo paso. Por tanto, el vehículo polimérico puede contener un número de al menos uno o incluso más de los mismos o diferentes péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos definidos anteriormente u otros componentes, por ejemplo (AA), este número determinado preferentemente por el intervalo anterior.

De acuerdo con una realización específica alternativa, el vehículo polimérico que puede usarse para complejar por ejemplo el al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/agonista de la invención se obtiene mediante la condensación de polimerización de al menos uno de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos mencionados anteriormente u otros componentes, por ejemplo (AA), a través de sus grupos -SH-, de forma simultánea a la formación de complejos, por ejemplo del al menos un ARNm de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno tumoral o un ácido nucleico adyuvante en la combinación vacuna/agonista de la invención, con el vehículo polimérico (preparado *in situ*). Asimismo, el vehículo polimérico también puede contener aquí al menos uno o incluso más de los mismos péptidos catiónicos o policatiónicos, proteínas o polímeros o componentes adicionales definidos anteriormente, por ejemplo (AA), siendo su número determinado preferentemente por el intervalo anterior.

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 vehículo polimérico empleado como vehículo o como agente de complejación como se define aquí. En particular, cuando las propiedades catiónicas del compuesto 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 básicos y los residuos fosfato en el esqueleto de nucleótidos, considerando que los átomos de nitrógeno (cadena lateral) del compuesto catiónico o policatiónico o del vehículo polimérico contribuyen a las cargas positivas y el fosfato del esqueleto fosfato de la carga de ácido nucleico, por ejemplo del al menos un ARNm que codifica al menos un antígeno tumoral comprendido en la vacuna de ARN o en un adyuvante, contribuye a la carga negativa. En general, un fosfato proporciona una carga negativa, por ejemplo un nucleótido de la molécula de carga de ácido nucleico proporciona una carga negativa. Se puede calcular en base a que, por ejemplo, 1 µg de ARN típicamente contiene aproximadamente 3 nmol de residuos fosfato, siempre que el ARN tenga una distribución estadística de bases. Además, 1 nmol de péptido típicamente contiene aproximadamente x nmol de residuos nitrógeno, dependiendo del peso molecular y del número de sus aminoácidos (catiónicos).

Potencial zeta: El "potencial zeta" es un parámetro ampliamente utilizado para la carga eléctrica superficial de una partícula. En general, se determina moviendo la partícula cargada a través de 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 comprende, como vehículo o agente de complejación, un compuesto catiónico o policatiónico y/o un vehículo polimérico, y, como carga de ácido nucleico, el al menos un ARN que codifica al menos un antígeno de la vacuna de ARN o un ácido nucleico adyuvante. Así, en el contexto de la presente invención, la carga de una partícula se determina preferiblemente determinando el potencial zeta por el método de electroforesis láser Doppler usando un instrumento Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) a 25°C y un ángulo de dispersión de 173°. La carga superficial de una partícula dada también depende de la fuerza iónica de la matriz utilizada (por ejemplo, un tampón que contiene sal) y del pH de la solución. Por tanto, el potencial zeta real de un complejo dado a una relación carga (N/P) puede diferir ligeramente entre los diferentes tampones utilizados para la inyección. Para la medida, las partículas, tales como complejos que comprenden como vehículo o agente de complejación un compuesto catiónico o policatiónico y/o un vehículo polimérico y, como carga

de ácido nucleico al menos un ARN que codifica al menos un antígeno de la vacuna de ARN o ácido nucleico adyuvante como se describen aquí, se suspende preferiblemente en una solución Ringer Lactato. En una realización específica, la presente invención se refiere al uso de un complejo cargado negativamente en las condiciones de un tampón de inyección dado, preferiblemente en las condiciones de una solución Ringer Lactato, evaluado por su potencial Zeta. Una solución Ringer Lactato según la presente invención contiene preferiblemente 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, el cloruro, el potasio y el lactato generalmente provienen de NaCl (cloruro de sodio), $\text{NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$ (lactato de sodio), CaCl_2 (cloruro de calcio) y KCl (cloruro de potasio). La osmolaridad de la solución Ringer Lactato es 273 mOsm/l y el pH se ajusta a 6,5.

5 **10** Composición inmunoestimuladora: En el contexto de la descripción, una composición inmunoestimuladora puede entenderse típicamente como una composición que contiene al menos un componente capaz de inducir una respuesta inmune o de la cual se deriva un componente capaz de inducir una respuesta inmune. Dicha respuesta inmune puede ser preferiblemente una respuesta inmune innata o una combinación de una respuesta inmune adaptativa e innata. Preferiblemente, una composición inmunoestimuladora en el contexto de la invención contiene al menos una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante/adyuvante, en especial un ARN, por ejemplo una molécula de ARNm. El componente inmunoestimulador, tal como el ARNm, puede complejarse con un vehículo adecuado. Así, la composición inmunoestimuladora puede comprender un complejo ARNm/vehículo. Además, la composición inmunoestimuladora puede comprender un adyuvante y/o un vehículo adecuado para el componente inmunoestimulador, tal como el ARNm.

20 Ácido nucleico adyuvante: Un ácido nucleico adyuvante, tal como se usa aquí, preferiblemente se selecciona de ácidos nucleicos conocidos por unirse a los receptores TLR. Tal ácido nucleico adyuvante puede estar en forma de un ácido nucleico CpG (inmunoestimulador), en particular de CpG-ARN o CpG-ADN, que preferiblemente induce una respuesta inmune innata. Un ARN-CpG o un ADN-CpG usado de acuerdo con la invención puede ser un ADN-CpG monocatenario (ADN-CpGss), un ADN-CpG bicatenario (ADNs), un CpG-ARN monocatenario (CpG-ARNss) o un CpG-ARN bicatenario (CpG-ARNds). El ácido nucleico CpG usado según la invención está preferiblemente en forma de ARN-CpG, más preferiblemente en forma de ARN-CpG monocatenario (ARN-CpGss). También preferiblemente, tales ácidos nucleicos CpG tienen una longitud como la descrita anteriormente. Preferentemente, los motivos CpG no están metilados. Además, un ácido nucleico adyuvante tal como se usa aquí puede ser un ARN inmunoestimulador (ARNis) que, preferiblemente, provoca una respuesta inmune innata.

30 Preferentemente, un ácido nucleico adyuvante, preferiblemente un ARN inmunoestimulador (ARNis) como se usa aquí, puede comprender cualquier secuencia de ácido nucleico conocida por ser inmunoestimulante, incluyendo, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que representan y/o codifican ligandos de TLR, preferiblemente seleccionados de miembros de la familia TLR1 - TLR10 humana o de la familia murina TLR1 - TLR13, en especial seleccionados de los miembros de la familia (humana) TLR1 - TLR10, incluso más preferiblemente de TLR7 y TLR8, ligandos para receptores intracelulares para ARN (como RIG-I o MDA-5, etc.) (ver por ejemplo Meylan, E., Tschoopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. Mol. Cell 22, 561-569), o cualquier otra secuencia de ARN inmunoestimulante. Tal ácido nucleico adyuvante puede tener una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 40 5.000, de 5 a 5.000, o de 5 a 1.000, 5 a 500, 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30 nucleótidos.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, una secuencia de ácido nucleico adyuvante, en particular un ARNis como se usa aquí, puede consistir o comprender un ácido nucleico de fórmula (VII) u (VIII):

$G_l X_m G_n$, (fórmula (VII))

45 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;
50 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))

55 donde:
C es citosina, uracilo o un análogo de citosina o uracilo;

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

5 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.

10 Los ácidos nucleicos de fórmulas (VII) u (VIII), que pueden usarse como una secuencia de ácido nucleico adyuvante, en particular un ARNis, pueden ser moléculas de ácido nucleico relativamente cortas, con una longitud típica de aproximadamente 5 a 100 (pero también pueden de más de 100 nucleótidos para realizaciones específicas, por ejemplo de hasta 200 nucleótidos), de 5 a 90 o de 5 a 80 nucleótidos, preferentemente de una longitud de aproximadamente 5 a 70, más preferiblemente de aproximadamente 8 a 60, con mayor preferencia de aproximadamente 15 a 60 nucleótidos, más preferiblemente de 20 a 60, con total preferencia de 30 a 60 nucleótidos. Si el ácido nucleico de fórmula (VII) u (VIII) tiene una longitud máxima de, por ejemplo, 100 nucleótidos, m típicamente será ≤ 98. El número de nucleótidos G en el ácido nucleico de fórmula (I) viene determinado por l o n. l y n, independientemente uno del otro, son en cada caso un número entero de 1 a 40, donde, si l o n = 1, G es guanósina o un análogo de la misma y, si l o n > 1, al menos el 50% de los nucleótidos son guanósina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4, Gl o Gn pueden ser, por ejemplo, GUGU, GGUU, UGUG, UUGG, GUUG, GGGU, GGUG, GUGG, UGGG o GGGG, etc.; cuando l o n = 5, Gl o Gn pueden ser, por ejemplo, GGGUU, GGUGU, GUGGU, UGGGU, UGGUG, UGUGG, UUGGG, GUGUG, GGGGU, GGGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG o GGGGG, etc; etc. Un nucleótido adyacente a Xm en el ácido nucleico de fórmula (VII) según la invención preferiblemente no es uracilo. De manera similar, el número de nucleótidos C en el ácido nucleico de fórmula (VIII) según la invención está determinado por l o n. l y n, independientemente uno del otro, son en cada caso un número entero de 1 a 40, donde, si l o n = 1, C es citosina o un análogo de la misma, y, si l o n > 1, al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de las misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4, Cl o Cn pueden ser, por ejemplo, CUCU, CCUU, UCUC, UUCC, CUUC, CCCU, CCUC, CUCC, UCCC o CCCC, etc.; cuando l o n = 5, Cl o Cn pueden ser, por ejemplo, CCCUU, CCUCU, CUCCU, UCCCU, UCCUC, UCUCU, UCCCC, CUCUC, CCCCU, CCCUC, CCUCC, CUCCC, UCCCC o CCCCC, etc.; etc. Un nucleótido adyacente a Xm en el ácido nucleico de fórmula (VIII) según la invención preferiblemente no es uracilo. Preferentemente, para la fórmula (VII), cuando l o n > 1, al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los nucleótidos son guanósina o un análogo de la misma, como se definió anteriormente. Los nucleótidos restantes hasta el 100% (cuando la guanósina constituye menos del 100% de los nucleótidos) en las secuencias flanqueantes Gl y/o Gn son uracilo o un análogo del mismo, como se definió aquí anteriormente. También preferiblemente, l y n, independientemente uno del otro, son en cada caso un número entero de 2 a 30, más preferiblemente un número entero de 2 a 20 y aún más preferiblemente un número 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 preferente adicional, una secuencia de ácido nucleico adyuvante, en particular un ARNis como se usa aquí, puede consistir o comprender un ácido nucleico de fórmula (IX) o (X):

(NuG_lX_mG_nN_v)_a, (fórmula (IX))

45 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;

50 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 ácido 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 1a 15, más preferiblemente de 1 a 10;

55 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);

60 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 guanosina (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 $v = 0, u \geq 1$;

- 5 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:

- 10 C es citidina (citosina), uridina (uracilo) o un análogo de citidina (citosina) o uridina (uracilo), preferiblemente citidina (citosina) o un análogo de la misma;
 X es guanosina (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;
- 15 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 guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);
 a es un entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 15, más preferiblemente de 1 a 10;
- 20 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;
 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.
- 25 u, v pueden ser independientemente uno del otro un entero de 0 a 50, preferiblemente donde cuando $u = 0, v \geq 1$, o cuando $v = 0, u \geq 1$;

- 30 donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (X) 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.

- 35 Cualquiera de las definiciones dadas anteriormente para las fórmulas (VII) y (VIII), por ejemplo para los elementos N (es decir N_u y N_v) y X (X_m), en particular para la estructura núcleo como se definió anteriormente, así como para los enteros a, l, m, n, u y v, se aplican de manera similar a los elementos de las fórmulas (IX) y (X) correspondientes. La definición de los elementos frontera 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).

- 40 ARN inmunoestimulador: Un ARN inmunoestimulador (ARNis) en el contexto de la invención puede ser típicamente un ARN que es capaz de inducir una respuesta inmune innata. Normalmente, no tiene un marco de lectura abierto y, por tanto, no proporciona un péptido-antígeno o inmunógeno, pero provoca una respuesta inmune innata, por ejemplo por la unión a un tipo específico de receptor tipo Toll (TLR) o a otros receptores adecuados. Sin embargo, por supuesto, también los ARNm que tienen un marco de lectura abierto y codifican un péptido/proteína pueden inducir una respuesta inmune innata y, así, ser ARN inmunoestimuladores. Preferiblemente, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN monocatenario, bicatenario o parcialmente bicatenario, en especial un ARN monocatenario y/o un ARN circular o lineal, en particular un ARN lineal. Con especial preferencia, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN monocatenario (lineal). Incluso con mayor preferencia, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN no codificante (largo) (lineal) (monocatenario). En este contexto, es particularmente preferente que el ARNis porte un trifosfato en su extremo 5', que es el caso de un ARN transcrito *in vitro*. Un ARN inmunoestimulador también puede estar presente como un oligonucleótido de ARN corto como se define aquí. Un ARN inmunoestimulador como se usa aquí puede seleccionarse además de cualquier clase de moléculas de
- 45 ARN presente en la naturaleza o preparada sintéticamente y que puede inducir una respuesta inmune innata y pueden facilitar una respuesta inmune adaptativa inducida por un antígeno. Además, (clases de) moléculas de ARN inmunoestimulantes utilizadas como un compuesto adicional de la combinación vacuna/agonista de la invención, pueden incluir cualquier otro ARN capaz de provocar una respuesta inmune innata. Por ejemplo, dicho ARN inmunoestimulador puede incluir ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y ARN viral (ARNv). Tal ARN inmunoestimulador puede tener
- 50 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

Marco de lectura abierto: Un marco de lectura abierto (ORF) en el contexto de la invención puede ser típicamente una secuencia de varios tripletes de nucleótidos que pueden traducirse en un péptido o proteína. Un marco de lectura abierto preferiblemente contiene un codón de inicio, es decir, una combinación de tres nucleótidos seguidos que codifican generalmente para el aminoácido metionina (ATG o AUG), en su extremo 5', y seguidamente una región que generalmente tiene una longitud múltiplo de 3 nucleótidos. Un ORF preferiblemente termina en un codón de parada (por ejemplo TAA, TAG, TGA). Típicamente, éste es el único codón de parada del marco de lectura abierto. Así, un marco de lectura abierto en el contexto de la presente invención preferiblemente es una secuencia de nucleótidos consistente en varios nucleótidos que pueden dividirse entre tres, que comienza con un codón de inicio (por ejemplo ATG o AUG) y que preferiblemente termina en un codón de parada (por ejemplo TAA, TGA o TAG o UAA, UAG, UGA, respectivamente). El marco de lectura abierto puede estar aislado o incorporado en una secuencia de ácido nucleico más larga, por ejemplo en un vector o un ARNm. Un marco de lectura abierto también puede denominarse "región de codificación de proteínas" o "región de codificación".

Secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma): Una IRES puede funcionar como un único sitio de unión al ribosoma, pero también puede servir para proporcionar un ARN bi o incluso multicistrónico como se define aquí, que codifica varias proteínas o péptidos que serán traducidas por los ribosomas de forma independiente. Ejemplos de secuencias IRES que pueden usarse de acuerdo con la invención son aquellas de picornavirus (por ejemplo FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus del leucoma de ratón (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) o virus de la parálisis de grillo (CrPV).

Fragmento o parte de un antígeno (proteína / péptido): Los fragmentos o partes de un antígeno (proteína/péptido) en el contexto de la presente invención se entienden típicamente como péptidos correspondientes a una parte continua de la secuencia de aminoácidos de un antígeno (proteína/péptido), preferiblemente con una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo partes procesadas y presentadas por moléculas MHC de clase I, que preferiblemente tienen una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9 o 10 (o incluso 11 o 12 aminoácidos), o fragmentos procesados y presentados por moléculas MHC de clase II, preferiblemente de una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, pudiendo seleccionarse estos fragmentos de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son típicamente reconocidos por las células T en forma de un complejo consistente en el fragmento de péptido y una molécula MHC, es decir, los fragmentos generalmente 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 esos antígenos (proteína/péptido). Preferiblemente, los fragmentos o partes de antígeno (proteína/péptido) en el contexto de la invención son o comprenden epítopos o tienen características antigénicas, provocando una respuesta inmune adaptativa. Por tanto, los fragmentos de antígenos (proteína/péptido) pueden comprender al menos un epítipo de esos antígenos (proteína/péptido). Además, también se puede entender que los dominios de un antígeno (proteína/péptido), como el dominio extracelular, el dominio intracelular o el dominio transmembrana, y las versiones acortadas o truncadas de un antígeno (proteína/péptido) comprenden un fragmento de un antígeno (proteína/péptido).

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 original en una o más mutaciones, tales como una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos. 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. Las "variantes" de proteínas o péptidos tal como se definen en el contexto de la presente invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con su secuencia nativa, es decir, fisiológica no mutada. Esas secuencias de aminoácidos, así como sus secuencias de nucleótidos codificantes en particular, están dentro del término variantes como se define aquí. Las sustituciones donde los aminoácidos originados de la misma clase se intercambian entre sí se denominan sustituciones conservadoras. En particular, son aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales cargadas positiva o negativamente, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos cuyas cadenas laterales pueden formar puentes de hidrógeno, por ejemplo cadenas laterales con una función hidroxilo. Esto significa que, por ejemplo, un aminoácido con una cadena lateral polar es reemplazado por otro aminoácido que también tiene una cadena lateral polar, o, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrófoba se sustituye por otro aminoácido con una cadena lateral también hidrófoba (por ejemplo, serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Son posibles inserciones y sustituciones, en particular, en aquellas posiciones de secuencia que no causan una modificación de la estructura tridimensional o no afectan a la región de unión. Las modificaciones de una estructura tridimensional por inserción(es) o eliminación(es) se pueden determinar fácilmente, por ejemplo utilizando

espectroscopía CD (espectros de dicroísmo circular) Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, en: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al. (ed.), Elsevier, Amsterdam).

Además, las variantes de proteínas o péptidos como se definen aquí, que pueden estar codificadas 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 provocar una alteración de la secuencia de aminoácidos respectiva de la proteína o péptido, es decir, la secuencia de aminoácidos o al menos parte de la misma puede no diferir de la secuencia original en una o más mutaciones dentro del significado anterior.

Para determinar el porcentaje en el 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 vehículo polimérico como se define aquí o las secuencias de aminoácidos en sí mismas pueden alinearse para ser comparadas posteriormente entre sí. Así, por ejemplo una posición de una primera secuencia se puede comparar con la posición correspondiente de la segunda secuencia. Si una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo componente (residuo) que en esa posición en la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esa posición. Si este no es el caso, las secuencias difieren en esa posición. Si se producen inserciones en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, se pueden insertar espacios en la primera secuencia para permitir una alineación adicional. Si se producen eliminaciones en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, se pueden insertar espacios en la segunda secuencia para permitir una alineación adicional. El porcentaje al que dos secuencias son idénticas es entonces función del número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones, incluyendo aquellas posiciones que solo están ocupadas en una secuencia. El porcentaje al cual dos secuencias son idénticas se puede determinar usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente, pero no limitativo, de algoritmo matemático que puede usarse 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 está integrado en el programa BLAST. Este programa puede identificar secuencias que son idénticas a las secuencias de la presente invención hasta cierto punto. Una "variante" de una proteína o péptido puede tener al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de aminoácidos en un tramo de 10, 20, 30, 50, 75 o 100 aminoácidos de dicha proteína o péptido, preferiblemente con respecto a la secuencia de longitud completa de la que se deriva la 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 nucleótidos en un tramo de 10, 20, 30, 50, 75 o 100 nucleótidos de dicha secuencia de ácido nucleico, preferiblemente con respecto a la secuencia de longitud completa de la que se deriva la variante.

Derivado de una proteína o péptido: Típicamente, se entiende por derivado de un péptido o proteína una molécula que se deriva de otra molécula, como dicho péptido o proteína. Un "derivado" de un péptido o proteína también abarca fusiones que comprenden un péptido o proteína tal como se usan en la presente invención. Por ejemplo, la fusión comprende una etiqueta, por ejemplo un epítipo, tal como 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 suficiente para inducir un efecto farmacéutico, tal como una respuesta inmune, alterar un nivel patológico de un péptido o proteína expresados o sustituir un carencia de un producto génico, por ejemplo en 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.

OX40: Los términos OX40 y receptor OX40 se usan aquí indistintamente (también conocidos como CD134, ACT-4 y ACT35). OX40 es miembro de la superfamilia de receptores TNFR y es expresado en la superficie de los linfocitos T activados por antígeno CD4+ y CD8+ de mamíferos.

Ligando OX40: Tal como se usa aquí, el término ligando OX40 (OX40L, también conocido como gp34, ACT-4-L y CD252) es una proteína que interactúa específicamente con el receptor OX40. El término OX40L incluye el ligando OX40 completo, el ligando OX40 soluble y las proteínas de fusión que comprenden una porción funcionalmente activa del ligando OX40 unida covalentemente a un segundo resto, por ejemplo, a un dominio de proteína. También se incluyen dentro de la definición de OX40L las variantes que varían en la secuencia de aminoácidos del OX40L natural, pero que conservan la capacidad de unirse específicamente

al receptor OX40. Además, se incluyen dentro de la definición de OX40L las variantes que mejoran la actividad biológica de OX40.

Agonista: Tal como se usa aquí, un agonista, por ejemplo un agonista de OX40, es una molécula que induce o mejora la actividad biológica de su diana, por ejemplo OX40.

- 5 Agonista de OX40: En el contexto de la presente descripción, un agonista de OX40 es una molécula que induce o potencia la actividad biológica de OX40, por ejemplo la transducción de señal mediada por OX40. Preferentemente, un agonista de OX40 se define aquí como una molécula de unión capaz de unirse específicamente a OX40. Por tanto, el agonista de OX40 puede ser cualquier agonista que se una a OX40 y sea capaz de estimular la señalización de OX40. En este contexto, el agonista de OX40 puede ser un anticuerpo agonista de unión a OX40. Este anticuerpo agonista también puede estar codificado por un ácido nucleico. Dichos anticuerpos codificados se denominan también "intracuerpos", como se define aquí. Además, el agonista de OX40 puede ser un aptámero capaz de unirse a OX40. Además, el agonista de OX40 puede ser un ligando de OX40 como se definió anteriormente, que también puede estar codificado por un ácido nucleico. Además, un agonista de OX40 puede ser un agonista de molécula pequeña capaz de unirse a OX40, por ejemplo un péptido de unión a OX40 o a una pequeña molécula orgánica.

Molécula de unión: En su sentido más amplio, una molécula de unión o una molécula de unión a antígeno se refiere a una molécula que se une específicamente a una diana, por ejemplo al receptor OX40. En un aspecto, una molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 20 Molécula de unión a OX40: Una molécula de unión a OX40 tal como se describe aquí es un agente que se une a OX40 presente en la superficie de las células T de mamífero, tales como células T CD4+ activadas. Tal y como se usa aquí, el término molécula de unión a OX40 incluye anticuerpos anti-OX40, aptámeros, OX40L y moléculas pequeñas.

- 25 Aptámero: Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN monohebra que pueden unirse a moléculas de casi todas las clases. Su estructura terciaria definida y rígida permite un reconocimiento molecular específico y altamente afín de diversas dianas. Los aptámeros se pueden desarrollar mediante un proceso denominado SELEX™ (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). El proceso SELEX™ es un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con una unión altamente específica a moléculas diana (US 5.475.096 y US 5.270.163). Cada ligando de ácido nucleico identificado por SELEX™, esto es cada aptámero, es un ligando específico de un compuesto o molécula diana determinada. El proceso SELEX™ se basa en la visión única de que los ácidos nucleicos tienen capacidad suficiente para formar diversas estructuras bidimensionales y tridimensionales y la suficiente versatilidad química disponible dentro de sus monómeros como para actuar como ligandos (es decir, para formar pares de unión específicos) con virtualmente cualquier compuesto químico, ya sea monomérico o polimérico. Pueden servir como dianas moléculas de cualquier tamaño o composición. Los aptámeros pueden ser agonistas. Tal como se usa aquí, un agonista es una molécula que induce o potencia la actividad biológica de su diana. Por ejemplo, el aptámero agonista se une a un receptor y altera el estado del receptor, dando como resultado la transducción de señales y una respuesta biológica mejorada.

- 40 En general, los aptámeros comprenden preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos, preparándose fácilmente oligonucleótidos de una longitud dentro de estos intervalos mediante técnicas convencionales. Opcionalmente, los aptámeros pueden comprender además un mínimo de aproximadamente 6 nucleótidos, preferiblemente 10 y con mayor preferencia 14 o 15 nucleótidos, necesarios para permitir la unión específica.

- 45 El aptámero agonista puede comprender bases de ácido nucleico modificadas (por ejemplo, nucleótidos modificados), por ejemplo, para mejorar la farmacocinética y/o la estabilidad (por ejemplo, frente a nucleasas) cuando se administra *in vivo*. Por ejemplo, es sabido que las purinas modificadas incluyen, pero no se limitan a, 2'-O-metil-nucleótidos; y que las pirimidinas modificadas incluyen, pero no se limitan a, 2'-desoxi-2'-fluoro-nucleótidos o 2'-desoxi-2'-fluoroarabino-nucleótidos. Así, las modificaciones químicas de los nucleótidos para los aptámeros agonistas pueden incluir, sin limitación, enlaces internucleotídicos fosforotioato, 2'-desoxirribonucleótidos, 2'-O-metil-ribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro-ribonucleótidos, 4'-tio-ribonucleótidos, 2'-O-trifluorometil-nucleótidos, 2'-O-etil-trifluorometoxi-nucleótidos, 2'-O-difluorometoxi-etoxi-nucleótidos, L-nucleótidos y 5-C-metil-nucleótidos.

- 55 Ya se han descrito métodos para generar aptámeros activadores del receptor OX40 y su uso como agonistas de OX40 (WO2008/048685). Un informe reciente demuestra que los aptámeros seleccionados contra OX40 humano (hOX40) pueden unirse específicamente a hOX40 en las células T activadas y pueden

transformarse por ingeniería en una molécula agonista estimuladora (Pratico et al., 2013. Nucleic Acid Ther. 23(1):35-43).

Anticuerpo: Se pueden seleccionar los anticuerpos de cualquier anticuerpo, por ejemplo cualquier anticuerpo producido de forma recombinante o natural conocido en la técnica, en particular anticuerpos adecuados para fines terapéuticos, diagnósticos o científicos, en particular dirigidos contra OX40. Aquí, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales y policlonales (incluyendo anticuerpos antagonistas y de bloqueo o neutralizantes) y especies de anticuerpos con especificidad poliepitópica. De acuerdo con la invención, "anticuerpo" típicamente comprende cualquier anticuerpo conocido en la técnica (por ejemplo anticuerpos IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), tales como anticuerpos naturales, anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped, anticuerpos aislados e identificados a partir de anticuerpos naturales o anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped y producidos recombinantemente por métodos biomoleculares conocidos en la técnica, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, intracuerpos, es decir, anticuerpos expresados en células y opcionalmente localizados en compartimentos celulares específicos, y fragmentos y variantes de los anticuerpos mencionados anteriormente. En general, un anticuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada que tienen dominios variables y constantes. La cadena ligera consiste en un dominio variable N-terminal, VL, y un dominio constante C-terminal, CL. Por el contrario, 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. De acuerdo con la presente invención, también pueden emplearse anticuerpos de cadena sencilla.

Preferentemente, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos de longitud completa, es decir, anticuerpos compuestos de las cadenas pesadas y ligeras completas, como se describió anteriormente. Sin embargo, de acuerdo con la invención, también pueden emplearse derivados de anticuerpos, tales como fragmentos de anticuerpos, variantes o aductos, como agonistas de OX40. Los fragmentos de anticuerpos se pueden seleccionar de entre los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Facb, pFc', Fd y Fv de los anticuerpos mencionados (de longitud completa). En general, los fragmentos de anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un fragmento Fab ("fragmento de unión a antígeno") se compone de un dominio constante y uno variable en cada una de las cadenas pesada y ligera. Los dos dominios variables se unen al epítipo sobre antígenos específicos. Las dos cadenas están unidas por un enlace disulfuro. Un fragmento scFv ("fragmento variable de cadena sencilla"), por ejemplo, consiste típicamente en los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas. Los dominios están unidos por un enlace artificial, en general un enlace polipeptídico, tal como un péptido compuesto por 15-25 residuos glicina, prolina y/o serina.

Anticuerpo policlonal: Típicamente, anticuerpo policlonal se refiere a mezclas de anticuerpos dirigidos a antígenos específicos o inmunógenos o epítopos de una proteína que se generaron por inmunización de un organismo huésped, como un mamífero, por ejemplo incluyendo cabras, vacas, cerdos, perros, gatos, burros, monos, simios, roedores como ratones, hámsteres y conejos. Los anticuerpos policlonales generalmente no son idénticos y, por tanto, habitualmente reconocen diferentes epítopos o regiones del mismo antígeno. Por tanto, en este caso, típicamente se usará una mezcla o una composición de diferentes anticuerpos, cada anticuerpo dirigido a antígenos o inmunógenos o epítopos específicos de una proteína, en particular dirigidos a OX40.

Anticuerpo monoclonal: El término "anticuerpo monoclonal" aquí se refiere típicamente a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en niveles menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen a un único sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige a un único determinante en el antígeno. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales como se definieron anteriormente pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975), o mediante métodos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en la patente US nº 4.816.567. Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de librerías de fagos generadas por las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature, 348: 552-554 (1990), por ejemplo.

Según Kohler y Milstein, se inyecta un inmunógeno (antígeno) de interés en un huésped, tal como un ratón, y se recolectan los linfocitos de células B producidos en respuesta al inmunógeno después de un período de tiempo. Las células B se combinan con células de mieloma de ratón y se introducen en un medio que permite que las células B se fusionen con las células de mieloma, produciendo hibridomas. Estas células fusionadas (hibridomas) se disponen en pocillos individuales de placas de microtitulación y se cultivan para producir anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se ensayan para determinar cuáles son adecuados para detectar el antígeno de interés. Después seleccionarse, los anticuerpos monoclonales

pueden crecer en cultivos celulares o se inyectan los hibridomas en ratones. En el contexto de la presente invención, son particularmente preferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra OX40.

5 Anticuerpos quiméricos: Los anticuerpos quiméricos que pueden usarse como agonistas de OX40 según la invención son preferiblemente anticuerpos donde los dominios constantes de un anticuerpo descrito anteriormente son reemplazados por secuencias de anticuerpos de otros organismos, preferiblemente secuencias humanas.

Anticuerpos humanizados: Los anticuerpos (no humanos) humanizados que pueden usarse como agonistas de OX40 según la invención son anticuerpos donde los dominios constantes y variables (excepto para los dominios hipervariables) de un anticuerpo son reemplazados por secuencias humanas.

10 Anticuerpos humanos: Los anticuerpos humanos pueden aislarse de tejidos humanos o de organismos huésped no humanos inmunizados que son transgénicos para el locus del gen IgG humano. Además, se pueden proporcionar anticuerpos humanos mediante el uso de una presentación en fagos.

15 Anticuerpos biespecíficos: Anticuerpos biespecíficos en el contexto de la invención son preferiblemente anticuerpos que actúan como un adaptador entre un efector y una diana respectiva mediante dos dominios Fa/b diferentes, por ejemplo con el fin de reclutar moléculas efectoras como toxinas, medicamentos, citoquinas, etc., dirigidas a células efectoras como CTL, células NK, macrófagos, granulocitos, etc. (para una revisión ver: Kontermann R.E., Acta Pharmacol. Sin, 2005, 26(1): 1-9). En general, los anticuerpos biespecíficos como se describen aquí están configurados para reconocer mediante dos dominios diferentes Fa/b, por ejemplo dos antígenos diferentes, inmunógenos, epítopos, fármacos, células (o receptores en las
20 células) u otras moléculas (o estructuras) como se describió anteriormente. La biespecificidad significa que las regiones de unión a antígeno de los anticuerpos son específicas para dos epítopos diferentes. Por tanto, se pueden unir diferentes antígenos, inmunógenos o epítopos, etc., lo que, opcionalmente, permite una interacción directa de los dos componentes. Por ejemplo, diferentes células como las células efectoras y las células diana pueden estar unidas mediante un anticuerpo biespecífico. La presente invención abarca,
25 pero no se limita a, anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen, por un lado, a un antígeno soluble y, por otro lado, a un antígeno o receptor, por ejemplo OX40, en la superficie de una célula, por ejemplo una célula T.

30 Intracuerpos: Los intracuerpos pueden ser anticuerpos como se definió anteriormente. Estos anticuerpos son anticuerpos expresados intracelularmente y, por tanto, pueden estar codificados por ácidos nucleicos para su uso en la expresión de anticuerpos codificados. Así, los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, preferiblemente como se definió anteriormente, en particular un anticuerpo dirigido contra OX40 se puede usar como agonistas de OX40 de acuerdo con la presente invención.

La presente descripción proporciona (en realizaciones reivindicadas y no reivindicadas) una combinación vacuna/agonista que comprende:

- 35
- i) como vacuna, una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica al menos un antígeno, y
 - ii) como agonista, una composición que comprende un agonista OX40.

Según un primer aspecto, el objeto que subyace a la presente invención se soluciona mediante una combinación vacuna/agonista que comprende:

- 40
- i) como vacuna, una vacuna de ARN que comprende al menos un ARNm que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica al menos un antígeno tumoral, y
 - ii) como agonista, una composición que comprende un agonista OX40, siendo el agonista OX40 un anticuerpo agonista dirigido contra OX40.

45 Tal como se describe aquí, el término "combinación vacuna/agonista" significa preferiblemente una presencia combinada de una vacuna de ARN que comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica al menos un antígeno tumoral y una composición que comprende al menos un agonista de OX40. Así, esta combinación vacuna/agonista puede existir como una composición que comprende todos estos componentes en una y la misma mezcla (por ejemplo en una composición farmacéutica), o como un kit de partes donde los diferentes componentes forman diferentes
50 partes de tal kit de partes. Preferentemente, esta combinación vacuna/agonista permite provocar una respuesta inmune adaptativa (y opcionalmente una respuesta inmune innata) en un paciente a tratar, preferiblemente un mamífero, mediante el uso de, como 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 (en una realización no reivindicada) al

5 menos un antígeno patógeno. El agonista de la combinación vacuna/agonista de la invención, preferiblemente un agonista de OX40, puede mejorar la señalización de OX40, mejorando preferiblemente la transducción de la señal mediada por el receptor OX40. Así, la administración de la vacuna y el agonista puede producirse de forma simultánea u escalonada en el tiempo, ya sea en el mismo sitio de administración o en diferentes sitios de administración, como se detalla más adelante. Dicha combinación vacuna/agonista puede inducir una respuesta inmune activa y evitar así, por ejemplo, el crecimiento tumoral o inducir la regresión tumoral. La combinación vacuna/agonista aquí descrita es, por tanto, adecuada para estimular eficazmente las respuestas inmunes específicas de antígeno contra células infectadas por cáncer y patógenos. Más precisamente, la combinación vacuna/agonista aquí descrita es particularmente adecuada para el tratamiento de enfermedades tumorales e infecciosas que pueden estar asociadas con una sobreexpresión de OX40 y para mejorar además la respuesta inmune contra tales células tumorales e infectadas.

15 Así, la invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la combinación de una vacuna de ARN y un agonista de OX40 muestra una inhibición extremadamente ventajosa del crecimiento tumoral, lo que resulta en una mayor supervivencia, que no podría esperarse de la técnica anterior. Por tanto, el tratamiento combinado con una vacuna de ARN, por ejemplo que codifica para de un antígeno tumoral (vacuna activa), y con un agonista dirigido al receptor OX40 podría disminuir en gran medida el impacto nocivo de una enfermedad a tratar, por ejemplo la tasa de crecimiento de un tumor. En este contexto, los inventores han encontrado que, sorprendentemente, el tratamiento con una vacuna de ARN que comprende un ARN que codifica un antígeno tumoral en combinación con un agonista OX40, donde el agonista de OX40 es un anticuerpo agonista dirigido contra OX40, inhibía de forma inesperada el crecimiento tumoral, lo que resultaba en una mayor supervivencia de los ratones con tumores inducidos.

20 Como primer componente, la combinación vacuna/agonista aquí descrita 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 al menos un antígeno, preferiblemente un antígeno tumoral o un antígeno patógeno.

Tal como se describe aquí, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista preferentemente comprende al menos un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica al menos un antígeno como se define aquí.

30 El al menos un ARN de la vacuna de ARN puede seleccionarse de cualquier ARN adecuado para codificar una secuencia de aminoácidos, preferiblemente de un ARN mensajero (ARNm).

Sin embargo, otras formas de ARN también pueden encontrar su aplicación para llevar a cabo las enseñanzas de la presente invención. Por ejemplo, el ARN puede ser un ARN derivado de virus, tal como ARN retroviral, o un replicón de ARN como se define aquí, por ejemplo derivado de un alfavirus.

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

40 Además, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita puede ser un ARN mono- o bi-catenario (que también puede considerarse como una molécula de ARN debido a la asociación no covalente de dos cadenas moléculas de ARN monocatenarias) o un ARN de parcialmente de cadena doble o simple, que son al menos parcialmente autocomplementarios. Ambas moléculas de ARN parcialmente de cadena doble o parcialmente de cadena simple están formadas típicamente por una molécula de ARN de cadena sencilla más larga y más corta o por dos moléculas de ARN monocatenario, que tienen aproximadamente la misma longitud, siendo una molécula de ARN monocatenario en parte complementaria a la otra molécula de ARN monocatenaria y formando ambas una molécula de ARN bicatenario en esta región, es decir un ARN parcialmente bicatenario o parcialmente monocatenario. Preferiblemente, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista puede ser un ARN monocatenario. Además, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista 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/agonista puede ser un ARN lineal monocatenario.

50 Preferentemente, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita comprende una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 20.000, o de 100 a aproximadamente 20.000 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 20.000 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000, incluso con mayor preferencia de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000.

De acuerdo con el primer aspecto, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto codifica para al menos un antígeno tumoral. En este contexto, los antígenos tumorales se localizan preferiblemente en la superficie de la célula tumoral. Los antígenos tumorales también pueden seleccionarse de proteínas que están sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con una célula normal (por ejemplo células no tumorales). Además, los antígenos tumorales también incluyen antígenos expresados en células que no son (no eran) (u originalmente no en sí mismas) degeneradas, sino que están asociadas al supuesto tumor. Antígenos que están unidos a vasos que suministran a tumores o a su (re)formación, en particular aquellos asociados a la neovascularización, por ejemplo factores de crecimiento, tales como VEGF, bFGF, etc., también se incluyen aquí. Los antígenos asociados a tumores incluyen además antígenos de células o tejidos que típicamente están embebidos en el tumor. Además, algunas sustancias, generalmente proteínas o péptidos, se expresan en pacientes que padecen una enfermedad cancerosa, diagnosticada o no, y se producen en concentraciones aumentadas en los fluidos corporales de dichos pacientes. Estas sustancias también se conocen como "antígenos tumorales"; sin embargo, no son antígenos en el sentido estricto de una sustancia que induce una respuesta inmune. La clase de antígenos tumorales se puede dividir en antígenos específicos de tumor (TSA) y antígenos asociados a tumor (TAA). Los TSA solo pueden expresarse por células tumorales y nunca por células "sanas" normales. Suelen ser el resultado de una mutación específica de tumor. Los TAA, más comunes, generalmente se expresan tanto en células tumorales como en células sanas. Estos antígenos son reconocidos y la célula que expresa el antígeno puede ser destruida por las células T citotóxicas. Además, los antígenos tumorales también pueden aparecer en la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado. En este caso, pueden ser reconocidos por anticuerpos.

Además, los antígenos asociados a tumores pueden clasificarse como antígenos específicos de tejido, también llamados antígenos específicos de melanocitos, antígenos de cáncer de testículo y antígenos específicos de tumor. Los antígenos de cáncer de testículo se entienden típicamente como péptidos o proteínas de genes asociados a la línea germinal que pueden activarse en una amplia variedad de tumores. Los antígenos de cáncer de testículo humano pueden subdividirse en antígenos codificados en el cromosoma X, los llamados antígenos CT-X, y antígenos no codificados en el cromosoma X, los llamados antígenos CT no X. Los antígenos de cáncer de testículo codificados 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 pueden caracterizarse por un dominio de homología MAGE compartido (MHD). Cada uno de estos antígenos, es decir, antígenos específicos de melanocitos, antígenos de cáncer de testículo y antígenos específicos de tumor, pueden provocar respuestas inmunitarias celulares y humorales autólogas. Por consiguiente, el antígeno tumoral codificado por el ARN comprendido en la vacuna de ARN utilizada en la presente invención preferiblemente es un antígeno específico de melanocitos, un antígeno de cáncer de testículo o un antígeno específico de tumor, preferiblemente puede ser un antígeno CT-X, un antígeno CT no X, un compañero de unión para un antígeno CT-X o un compañero de unión para un antígeno CT no X o un antígeno específico de tumor, más preferiblemente un antígeno CT-X, un compañero de unión para un antígeno X CT-antigen o un antígeno tumoral específico.

Antígenos tumorales particularmente preferentes según la presente invención se seleccionan de la lista consistente en 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-ctinina-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, cathepsina B, cathepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína similar a la coactosina, colágeno XXIII, COX- 2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201-R171, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, hom eobox NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1 R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmaduro, calicreína-2, calicreína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGE-L2, mamaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína de matriz 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, antígeno MN/CA IX, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-B, NY- ESO-1, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, pi 5, p190 minor bcr-abl, 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, prosteína, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-

JC, Virus Junin, *Kingella kingae*, *Klebsiella granulomatis*, Kuru prion, virus Lassa, *Legionella pneumophila*, género *Leishmania*, género *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Machupo, *Malassezia* spp, virus Marburg, virus de sarampión, *Metagonimus*, *Metagonim*, *Metagonim* y *Metagonim* phylum, virus del molusco contagioso (MCV), virus de las paperas, *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 *Orthomyxoviridae* (influenza), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paragonimus* spp, *Paragonimus westermani*, Parvovirus B19, género *Pasteurella*, género *Plasmodium*, *Pneumocystis jirovecii*, virus de la polio, virus de la rabia, virus sincitial respiratorio (RSV), Rinovirus, rinovirus, *Rickettsia akari*, género *Rickettsia*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, virus de la fiebre del Valle del Rift, Rotavirus, virus de la rubéola, virus sabia, género *Salmonella*, *Sarcoptes scabiei*, *Sarcoptes scabiei*, coronavirus SARS, género *Schistosoma* género *Shigella*, virus Sin Nombre, Hantavirus, *Sporothrix schenckii*, género *Staphylococcus*, género *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Strongyloides stercoralis*, género *Taenia*, *Taenia solium*, virus de la encefalitis de la garrapata (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 de la varicela zoster (VZV), virus de la varicela zoster (VZV), *Variola major* o *Variola minor*, prión vCJD, virus de la encefalitis equina venezolana, *Vibrio cholerae*, virus del oeste del Nilo, virus de la encefalitis equina del oeste, *Wuchereria bancrofti*, virus de la fibre amarilla, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*.

En este contexto, son particularmente preferentes antígenos de patógenos seleccionados entre el virus de la influenza, el virus sincitial respiratorio (RSV), el virus del herpes simple (HSV), el virus del papiloma humano (VPH), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Plasmodium*, *Staphylococcus aureus*, virus del Dengue, *Chlamydia trachomatis*, citomegalovirus (CMV), virus de la hepatitis B (HBV), *Mycobacterium tuberculosis*, virus de la rabia y virus de la fiebre amarilla.

El al menos un ARN de la vacuna de ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica al menos un antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente descripción puede aparecer como un ARN mono, di o incluso multicistrónico, es decir, un ARN que contiene el marco de lectura abierto de una, dos o más proteínas o péptidos. Dichos marcos de lectura abiertos en el ARN di- o incluso multicistrónico pueden estar separados por al menos una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), por ejemplo como se describe aquí, o por péptidos señal que inducen la escisión del polipéptido resultante que comprende varias proteínas o péptidos.

El al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita se puede estabilizar para evitar la inestabilidad y la degradación (rápida) del ARN mediante diversos enfoques. Esta inestabilidad del ARN se debe típicamente a las enzimas que degradan el ARN, "ARNasas" (ribonucleasas), pudiendo a menudo la contaminación con tales ribonucleasas degradar completamente el ARN en solución. Así, la degradación natural del ARN en el citoplasma celular está finamente regulada y, generalmente, la contaminación con ARNasas puede eliminarse por un tratamiento especial antes del uso de dichas composiciones, en particular con pirocarbonato de dietilo (DEPC). En este contexto, en la técnica anterior se conocen diversos mecanismos de degradación natural que también pueden utilizarse. Por ejemplo, la estructura terminal típicamente tiene una importancia crítica, en particular para un ARNm. Como ejemplo, en el extremo 5' de los ARNm de origen natural generalmente hay una estructura denominada cap, que es un nucleótido de guanosina modificado, también llamada 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/agonista comprende al menos uno de los siguientes elementos estructurales: una secuencia 5' y/o 3'-UTR, preferiblemente una modificación 5' y/o 3'-UTR, una estructura 5'-Cap, una secuencia poli(C), una cola poli-A y/o una señal de poliadenilación, preferiblemente como se define aquí.

En otra realización, el al menos un ARN de la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita comprende preferiblemente al menos dos de los siguientes elementos estructurales: una secuencia 5' y/o 3'-UTR, preferiblemente una modificación 5' y/o 3'-UTR (por ejemplo, la secuencia mutada de la 3'-UTR del gen de (alfa)globina (muag)); una estructura tallo-bucle de histona, preferiblemente un 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 una determinada estructura 5'-Cap y un tallo-bucle de histona y, potencialmente, una cola poli-A.

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/agonista aquí descrita tenga la siguiente estructura en la dirección 5' a 3':

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

10 En otra realización preferida particular, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita tiene la siguiente estructura en la dirección 5' a 3':

- 15
- a) una secuencia 5'-UTR opcional que comprende una modificación UTR;
 - b) un marco de lectura abierto que codifica un antígeno como se definió anteriormente;
 - c) una secuencia 3'-UTR que comprende una modificación UTR;
 - d) una secuencia poli(A);
 - e) una secuencia poli(C); y
 - f) al menos un tallo-bucle de histona.

20 Para mejorar adicionalmente la resistencia a, por ejemplo, la degradación *in vivo* (por ejemplo por una exo-endo-nucleasa), el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita puede proporcionarse como un ácido nucleico estabilizado, por ejemplo en forma de un ácido nucleico modificado como se define aquí. De acuerdo con otra realización de la invención, es entonces preferente que el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista esté estabilizado, preferiblemente mediante modificaciones de esqueleto, modificaciones de azúcar y/o modificaciones de bases, en especial mediante modificación del contenido en G/C como se define aquí. Todas estas modificaciones pueden introducirse en el al menos un ARN sin afectar la función del ARN a ser traducido en el antígeno, a ser transcrito de forma inversa o a ser replicado.

Según otra realización, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita puede modificarse y, por tanto, estabilizarse, modificando el contenido en G (guanósina)/C (citósina) del ARNm, preferiblemente de su marco de lectura abierto.

30 Aquí, el contenido en G/C del al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita está particularmente aumentado en comparación con el contenido en G/C del marco de lectura abierto de su marco de lectura abierto particular de tipo salvaje, es decir, 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 la combinación vacuna/agonista de ARN preferiblemente no está modificada en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada de tipo salvaje particular del marco de lectura abierto.

40 De acuerdo con otra realización, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita está optimizado para la traducción (optimizado con codón) como se define aquí, preferiblemente optimizado para la traducción reemplazando codones para los ARNt menos frecuentes de un aminoácido dado por codones para los ARNt más frecuentes del aminoácido respectivo.

45 En este contexto, es particularmente preferente vincular el contenido secuencial de G/C que está incrementado, en particular maximizado, en el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita 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.

50 En el contexto de la presente descripción, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista se puede preparar usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos, por ejemplo síntesis en fase sólida, así como de 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 tales como el ARN autoamplificador basado en un genoma de alfavirus pueden producirse construyendo plásmidos de ADN que codifican el ARN autoamplificador utilizando técnicas moleculares estándar. El ADN linealizado se transcribe *in vitro* mediante, por ejemplo, la ARN polimerasa T7 y el ARN resultante se introduce en las células, por ejemplo mediante electroporación. La producción de partículas de replicón se puede evaluar en ensayos de

empaquetamiento, donde el replicón transcrito *in vitro* y el ARN auxiliar defectuoso se cotransfectan en células (Perri et al., 2003. J. Virol. 77(19):10394- 403).

5 En otra realización, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita comprende una pluralidad o más de uno, preferiblemente de 2 a 10, más preferiblemente de 2 a 5, con total preferencia de 2 a 4 moléculas de ARN como se define aquí. Estas vacunas de ARN comprenden más de una molécula de ARN, que codifican preferiblemente diferentes péptidos o proteínas que comprenden preferiblemente diferentes antígenos tumorales o antígenos patógenos.

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

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

25 En otra realización preferida adicional, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita que comprende una pluralidad (esto es 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, en particular para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) comprende al menos:

- a) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde dicho péptido o proteína codificado comprende el antígeno tumoral NY-ESO-1, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- 30 d) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde dicho péptido o proteína codificado comprende el antígeno tumoral MAGE-C1, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- e) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde dicho péptido o proteína codificado comprende el antígeno tumoral MAGE-C2, o un fragmento, variante o derivado del mismo;
- f) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde dicho péptido o proteína codificado comprende el antígeno tumoral Survivina, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- 35 g) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde dicho péptido o proteína codificado comprende el antígeno tumoral 5T4, o un fragmento, variante o derivado del mismo; y
- h) una molécula de ARN que codifica al menos un péptido o proteína, donde dicho péptido o proteína codificado comprende el antígeno tumoral MUC-1, o un fragmento, variante o derivado del mismo.

40 De acuerdo con una realización, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita puede administrarse desnudo sin estar asociado con ningún otro vehículo, agente de transfección o de complejación para aumentar la eficiencia de la transfección y/o las propiedades inmunoestimuladoras del al menos un ARN.

45 En una realización preferente, el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita puede formularse junto con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un vehículo polimérico como se define aquí. Por consiguiente, en una realización específica, es preferente que el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista esté asociado o complejado con un compuesto catiónico o policatiónico o con un vehículo polimérico como se definen aquí, opcionalmente en una relación en peso seleccionada

50 de un intervalo de aproximadamente 6:1 (p/p) a aproximadamente 0,25:1 (p/p), más preferiblemente de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 0,5:1 (p/p), incluso más preferiblemente de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p) o de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/ p) y con total preferencia una relación de aproximadamente 3:1 (p/p) a

55 aproximadamente 2:1 (p/p) ARN:compuesto catiónico o policatiónico y/o vehículo 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 están en un rango de aproximadamente 0,1, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 o 2 a 20, preferiblemente en un rango de aproximadamente 0,2 (0,5 o 0,75 o 1,0) a 12, más preferiblemente en una

relación N/P de aproximadamente 0,4 (0,75 o 1,0) a 10, e incluso más preferiblemente en una relación N/P de aproximadamente 0,4 (0,75 o 1,0) a 5. Con total preferencia, la relación N/P está en una proporción entre 0,1 y 0,9.

5 En este contexto, es preferible que el compuesto catiónico o policatiónico o el vehículo polimérico utilizado como vehículo o agente de complejación y el al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista como se definen aquí se proporcionen en una relación N/P de al menos aproximadamente 1 o, preferiblemente, en un rango de aproximadamente 1 a 20, para aplicaciones *in vitro* (por ejemplo en caso de células extraídas del paciente, se tratarían *in vitro* con la composición farmacéutica aquí descrita y se administrarían posteriormente al paciente).

10 Para aplicaciones *in vivo*, es preferente una relación N/P de al menos 0,1 (0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6), preferiblemente un rango de aproximadamente 0,1 (0,2, 0,3, 0,4, 0,5 o 0,6) a 1,5. Es especialmente preferente un rango de la relación N/P de 0,1 o 0,2 a 0,9 o de 0,5 a 0,9.

15 La relación N/P influye significativamente en la carga superficial del complejo resultante consistente en compuestos catiónicos o policatiónicos o de un vehículo polimérico y una carga de ácido nucleico, por ejemplo el al menos un ARN que codifica al menos un antígeno comprendido en la vacuna de ARN o de un ácido nucleico adyuvante. Así, es preferente que el complejo de carga de soporte polimérico resultante tenga carga positiva para aplicaciones *in vitro* y carga negativa o neutra para aplicaciones *in vivo*. La carga superficial del complejo de carga polimérico transportador resultante puede indicarse como potencial zeta, que puede medirse mediante el método de electroforesis Doppler usando un Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

20

El al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno en la combinación vacuna/agonista aquí descrita también puede estar asociado con un vehículo, un agente de transfección o un agente complejante para aumentar la eficacia de transfección y/o las propiedades inmunoestimuladoras del al menos un ARN.

25 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/agonista aquí descrita esté complejado, al menos parcialmente, con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un vehículo polimérico, preferiblemente proteínas o péptidos catiónicos. Parcialmente significa que solo parte del al menos un ARN está complejado con un compuesto catiónico y que el resto del al menos un ARN de la vacuna de ARN comprendido en la combinación vacuna/agonista está en forma no complejada ("libre" o "desnudo"). Preferiblemente, la relación ARN complejo:ARN no complejado en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista se selecciona en un intervalo de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 1:10 (p/p), más preferiblemente en un rango de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:8 (p/p), incluso más preferiblemente en un rango de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:5 (p/p) o 1:3 (p/p), y, con total preferencia, la proporción ARN complejo:ARN libre en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista se selecciona de una proporción de aproximadamente 1:1 (p/p).

30

35

El al menos un ARN complejado en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita se prepara preferiblemente, de acuerdo con un primer paso, complejando el al menos un ARN con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un vehículo polimérico, preferiblemente como se define aquí, en una proporción específica, para formar un complejo estable. En este contexto, es altamente preferible que no quede ningún compuesto catiónico o policatiónico o vehículo polimérico libre o solo una cantidad insignificamente pequeña del mismo en el componente del ARN complejado después de complejar el ARN. Por consiguiente, la proporción entre el ARN y el compuesto catiónico o policatiónico y/o vehículo polimérico en el componente del ARN complejado se selecciona típicamente en un intervalo en que el ARN está completamente complejado y no hay compuesto catiónico o policatiónico o vehículo polimérico libre o solo una cantidad insignificamente pequeña de los mismos permanece en la composición.

40

45

Preferentemente, la relación entre el al menos un ARN (por ejemplo ARNm) que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica al menos un antígeno para el compuesto catiónico o policatiónico y/o el vehículo polimérico, preferiblemente como se define aquí, se selecciona de un intervalo de aproximadamente 6:1 (p/p) a aproximadamente 0,25:1 (p/p), más preferiblemente de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 0,5:1 (p/p), incluso más preferiblemente de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p) o de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p), y con total preferencia una relación de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 2:1 (p/p). Alternativamente, la relación entre el ARN y el compuesto catiónico o policatiónico y/o vehículo polimérico, preferiblemente como se define aquí, en el componente del ARN complejado también se puede calcular sobre la base de la relación nitrógeno/fosfato (ratio N/P) de todo el complejo. En el contexto de la presente invención, una relación N/P está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,1-10, preferiblemente en un

50

55

5 intervalo de aproximadamente 0,3-4 y con mayor preferencia en un intervalo de aproximadamente 0,5-2 o 0,7-2 con respecto a la relación compuesto catiónico o policatiónico y/o vehículo polimérico:ARN, preferiblemente como se define aquí, en el complejo, y con total preferencia en un rango de aproximadamente 0,7-1,5, 0,5-1 o 0,7-1, e incluso más preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 0,3-0,9 o 0,5-0,9, siempre que el compuesto catiónico o policatiónico en el complejo sea una proteína o péptido catiónico o policatiónico y/o el vehículo polimérico como se definió anteriormente. En esta realización específica, el ARN complejado también se incluye en el término "componente adyuvante".

10 En otra realización, el al menos un ARN que proporciona antígeno en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita como se definió anteriormente puede formularse junto con un adyuvante. Tal adyuvante puede ser preferiblemente un ácido nucleico adicional que no codifica un antígeno adicional. pero que puede estimular una respuesta inmune no específica, es decir, una respuesta inmune innata, al interactuar con cualquier parte del sistema inmune innato. Tal ácido nucleico que estimula una respuesta inmune inespecífica se denomina aquí "ácido nucleico adyuvante".

15 En este contexto, un ácido nucleico adyuvante comprende o consiste preferiblemente en un oligo- o polinucleótido; más preferiblemente un ácido nucleico adyuvante que comprende o que consiste en un ARN o un ADN; incluso más preferiblemente, dicho ácido nucleico adyuvante que comprende o que consiste en un ARN o un ADN está complejado con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un vehículo polimérico como se define aquí; opcionalmente en una relación en peso seleccionada de un rango de aproximadamente 6:1 (p/p) a aproximadamente 0,25:1 (p/p), más preferiblemente de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 0,5:1 (p/p), incluso más preferiblemente de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p:p) o de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p), y con total preferencia una relación de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 2:1 (p/p) ácido nucleico adyuvante:compuesto catiónico o policatiónico y/o un vehículo polimérico; u opcionalmente en una relación nitrógeno/fosfato entre el compuesto catiónico o policatiónico y/o vehículo polimérico y el ácido nucleico adyuvante en el intervalo de aproximadamente 0,1-10, preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 0,3-4, lo más preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 0,7-1 o 0,5-1, e incluso con mayor preferencia en un rango de aproximadamente 0,3-0,9 o 0,5-0,9. Dicho ácido nucleico adyuvante complejado también se incluye en el término "componente adyuvante":

30 En el caso específico de que se pretenda la inducción de IFN- α , una relación N/P de al menos 0,1 (0,2, 0,3, 0,4, 0,5 o 0,6) o un rango de relación N/P de 0,1 a 1 es preferente, en especial un rango de relación N/P de 0,1 o 0,2 a 0,9 o un rango de relación N/P de 0,5 a 0,9. De lo contrario, si se pretendiera la inducción de TNF α , es particularmente preferente una relación N/P de 1 a 20.

35 En otras palabras, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita puede comprender el al menos un ARN que codifica al menos un antígeno y un ácido nucleico adicional que actúa como adyuvante, que se denomina ácido nucleico adyuvante. Por supuesto, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista no se limita a comprender solo un ácido nucleico adyuvante, sino que puede comprender varios de estos ácidos nucleicos diferentes. Ambos tipos de ácido nucleico, el ARN que codifica el antígeno y el ácido nucleico adyuvante, pueden formar complejos, independientemente entre sí, con un vehículo como se define aquí. Por tanto, un compuesto catiónico o policatiónico y/o un vehículo polimérico utilizado para formar complejos con al menos un ARN de la vacuna de ARN que codifica al menos un antígeno o con el ácido nucleico adyuvante pueden seleccionarse de cualquier compuesto catiónico o policatiónico y/o vehículo polimérico como se definen aquí.

45 En caso de que la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista (o la combinación vacuna/agonista) aquí descrita comprenda un ARN que proporciona un antígeno y además un ácido nucleico adyuvante, la respuesta inmune que se provoca mediante la administración de dicha vacuna comprende la activación de ambos partes del sistema inmunitario, el sistema inmunitario adaptativo y el sistema inmunitario innato.

50 Un factor sustancial para una respuesta inmune adaptativa adecuada es la estimulación de diferentes subpoblaciones de células T. Los linfocitos T generalmente se dividen en dos subpoblaciones, las células T-helper 1, en las siguientes células Th1, y las células T-helper 2, en las siguientes células Th2, con las que 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 inmune celular por la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otro lado, principalmente se destinan a la eliminación extracelular de patógenos y promueven la respuesta inmune humoral por la estimulación de células B, para la conversión en células plasmáticas y la formación de anticuerpos (por ejemplo contra antígenos). Las dos poblaciones de células T-helper difieren en el patrón de las proteínas efectoras (citoquinas) producidas por ellas.

55

La relación célula Th1/célula Th2 es de gran importancia en la inducción y mantenimiento de una respuesta inmune adaptativa. En relación con la presente invención, la relación célula Th1/célula Th2 de la respuesta inmune (adaptativa) se desplaza preferiblemente en la dirección hacia la respuesta celular (respuesta Th1) y se induce así una respuesta inmune celular. La estimulación de esta respuesta del sistema inmune adaptativo es provocada principalmente por la traducción del ARN que proporciona el antígeno y la presencia resultante de los antígenos peptídicos o proteicos dentro del organismo.

El sistema inmune innato que puede reforzar dicha respuesta inmune adaptativa y que puede inducir o apoyar un cambio hacia una respuesta Th1 puede ser activado por ligandos de los receptores tipo Toll (TLR). Los TLR son una familia de polipéptidos del receptor de reconocimiento de patrones altamente conservados (PRR) que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y juegan un papel crítico en la inmunidad innata en los mamíferos. Actualmente se han identificado al menos trece miembros de la familia, denominados TLR1-TLR13 (receptores tipo Toll: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13). Además, se han identificado varios ligandos TLR específicos. Se ha encontrado, por ejemplo, que el ADN bacteriano no metilado y sus análogos sintéticos (ADN CpG) son ligandos para TLR9 (Hemmi H et al. (2000) Nature 408: 740-5; Bauer S y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9237-42). Además, se ha informado 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, pudiendo estos diversos ARN inmunoestimuladores, por ejemplo, estimular TLR3, TLR7 o TLR8, o receptores intracelulares como RIG-I, MDA-5, etc.

En el contexto de la invención, puede proporcionarse la activación del sistema inmune innato por un ácido nucleico adyuvante, preferiblemente un ARN inmunoestimulador (ARNis) como se define aquí comprendido en la combinación vacuna/agonista aquí descrita, preferiblemente comprendido en la vacuna de ARN

Así, en una realización preferente adicional de la invención, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita se formula para comprender

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

En este contexto, es particularmente preferente que el componente adyuvante opcionalmente comprendido comprenda el mismo ARN que el contenido en la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista como ARN que proporciona el antígeno, por ejemplo ARNm que codifica al menos un antígeno.

Además, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista puede comprender componentes adicionales para facilitar la administración y la absorción de los componentes de la vacuna de ARN. Dichos componentes adicionales pueden ser portadores o vehículos apropiados, o por ejemplo adyuvantes adicionales para reforzar cualquier respuesta inmune tal como se define aquí.

Según otra realización, los componentes de la vacuna de ARN, por ejemplo el al menos un ARN que codifica al menos un antígeno y un componente adyuvante, de la combinación vacuna/agonista pueden formularse juntos o por separado, en la misma o diferentes composiciones.

Como segundo componente, la combinación vacuna/agonista aquí descrita incluye, como agonista, una composición que comprende un agonista OX40 dirigido al receptor OX40.

OX40 (también conocido como CD134, ACT-4 y ACT35) es una glucoproteína de aproximadamente 50 kD y es una proteína transmembrana tipo I de 249 aminoácidos con una cola citoplasmática de 49 aminoácidos y un dominio extracelular de 86 aminoácidos. OX40 tiene tres dominios completos y uno truncado rico en cisteína que son característicos de la superfamilia de receptores de TNF.

El ligando OX40 (OX40L, también conocido como gp34, ACT-4-L y CD252) es una glucoproteína de tipo II con una cola citoplasmática de 23 aminoácidos y un dominio extracelular de 133 aminoácidos. Se expresa como un trímero y tiene un dominio de homología de TNF. La interacción de OX40 y OX40L proporciona una señal coestimuladora crucial para las células T. La señalización OX40 promueve señales

coestimuladoras a las células T que conduce a una mayor proliferación, supervivencia, función efectora y migración.

5 El papel de OX40 en la mejora de la activación y proliferación de las células T sugiere que esta proteína puede servir como diana terapéutica en el tratamiento de la inflamación, el cáncer o las enfermedades infecciosas. Dependiendo del resultado terapéutico deseado, se requiere una sobre o una sub-modulación de OX40. La sobre-modulación del sistema inmune es particularmente necesaria en el tratamiento de cánceres e infecciones crónicas. Esto se puede lograr, por ejemplo, mejorando la actividad de OX40 mediante el contacto de OX40 con agonistas de OX40. En este contexto, el agonista de OX40 puede eliminar la disfunción de las células T que resulta de la señalización insuficiente de OX40 y, por tanto, puede restaurar o mejorar la función de las células T (por ejemplo su proliferación, supervivencia y función efectora).

En el contexto de la presente descripción, el agonista de OX40 es una molécula de unión que se une específicamente a OX40. La molécula de unión a OX40 como se describe aquí es capaz de unirse al OX40 presente en la superficie de las células T de mamífero.

15 En el contexto de la presente descripción, la molécula de unión que se une específicamente a OX40 puede ser, en realizaciones específicas, un anticuerpo, en particular un anticuerpo agonista o un anticuerpo agonista codificado por un ácido nucleico, un aptámero, un péptido o una proteína que comprende un ligando OX40 o un ligando OX40 codificado por un ácido nucleico o un agonista de molécula pequeña capaz de mejorar la señalización OX40.

20 Por tanto, en una realización preferente, el agonista de OX40 es un anticuerpo agonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo agonista codificado por un ácido nucleico o un fragmento de unión a antígeno del mismo, dirigido contra OX40, preferiblemente un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de OX40 y así induce o mejora la señalización de OX40.

25 En las WO1995/021251, WO1995/012673 y WO1995/21915 se describen agonistas de OX40 y anticuerpos monoclonales anti-OX40.

Es particularmente preferente el anticuerpo anti-OX40 9B12, un anticuerpo monoclonal anti-OX40 murino dirigido contra el dominio extracelular de OX40 humano (Weinberg et al, 2006. J. Immunother. 29(6):575-585).

Además, son particularmente preferentes los anticuerpos anti-OX40 humanizados.

30 En otra realización preferente, la proteína que comprende un ligando OX40 o un ligando OX40 codificado por ácido nucleico es una proteína de fusión de un fragmento del ligando OX40.

En este contexto, una realización particularmente preferida es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de OX40L o un fragmento del mismo capaz de unirse a OX40. En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende una porción Fc de una inmunoglobulina.

35 En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende un dominio de trimerización TRAF2, un dominio de trimerización de Matrilin-4 o una combinación de los mismos, preferiblemente la proteína de fusión FC ILZ-40L.

40 En el documento US 6.312.700 se describen proteínas de fusión de OX40L donde uno o más dominios de OX40L están unidos covalentemente a uno o más dominios de otras proteínas que pueden usarse como agonistas de OX40. Se han descrito proteínas de fusión OX40L que se autoensamblan en una proteína de fusión OX40L multimérica (por ejemplo, trimérica) (WO2006/121 81 0). El dominio de trimerización puede ser un dominio de cremallera de isoleucina u otra estructura polipeptídica en espiral enrollada, por ejemplo un dominio de trimerización TRAF2, un dominio de trimerización Matrilin-4 o combinaciones de los mismos. Las proteínas de fusión multiméricas OX40L pueden exhibir una mayor eficacia para mejorar las respuestas inmunes específicas de antígeno debido a su alta estabilidad.

45 En el contexto de la presente descripción, la administración de la vacuna y el agonista puede llevarse a cabo de forma simultánea o escalonada en el tiempo, ya sea en el mismo sitio de administración o en diferentes sitios de administración, como se describe más adelante.

50 Para garantizar que los mecanismos separados provocados por la vacuna de ARN y el agonista de OX40 no se vean influenciados negativamente entre sí, el agonista de OX40 y la vacuna de ARN se administran preferiblemente separados en el tiempo (de manera escalonada en el tiempo), es decir, secuencialmente,

y/o se administran en diferentes sitios de administración. Esto significa que la vacuna de ARN puede administrarse por ejemplo, antes, a la vez o después que el agonista OX40, o viceversa. Alternativa o adicionalmente, la vacuna de ARN y el agonista de OX40 se pueden administrar en diferentes sitios de administración, o en el mismo sitio de administración, preferiblemente cuando se administra de manera escalonada en el tiempo. De acuerdo con una realización particularmente preferida, la vacuna de ARN debe administrarse primero y el agonista OX40 debe administrarse después de la vacuna de ARN. Este procedimiento asegura que las células inmunes, como las células presentadoras de antígeno y las células T, ya hayan encontrado el antígeno antes de que el agonista OX40 estimule el sistema inmunitario, incluso aunque se haya realizado una administración concurrente o una administración donde se administra el agonista OX40 antes que la vacuna de ARN se pueden conseguir los mismos resultados, o al menos comparables.

Por consiguiente, en una realización adicional, la combinación vacuna/agonista aquí descrita comprende además un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

Sin embargo, también pueden emplearse uno o más cargas o diluyentes sólidos o líquidos compatibles o compuestos encapsulantes adecuados para la administración a un paciente a tratar, en la combinación vacuna/agonista aquí descrita. El término "compatible", tal como se usa aquí, significa que estos componentes de la combinación vacuna/agonista son capaces de mezclarse con la vacuna de ARN y/o el agonista OX40 de manera que no se produzca una interacción que reduzca sustancialmente la efectividad farmacéutica de la combinación vacuna/agonista bajo las condiciones de uso típicas.

Además, la combinación vacuna/agonista aquí descrita puede comprender uno o más adyuvantes adicionales adecuados para iniciar o aumentar una respuesta inmune del sistema inmune innato, es decir, una respuesta inmune no específica, en particular uniéndose a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En otras palabras, cuando se administra, la vacuna de ARN preferiblemente provoca una respuesta inmune innata debido al adyuvante opcionalmente contenido en la misma. Sin embargo, el adyuvante también puede ser parte de otro componente de la combinación vacuna/agonista que de la vacuna de ARN. Preferiblemente, dicho adyuvante puede seleccionarse de un adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, es decir, apoyando la inducción de una respuesta inmune innata en un mamífero, por ejemplo un ácido nucleico adyuvante o un componente adyuvante como se definió anteriormente o un adyuvante como se define a continuación.

Así, dicho adyuvante también puede seleccionarse de cualquier adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, es decir, apoyar la inducción de una respuesta inmune innata en un mamífero y/o adecuado para el depósito y suministro de los componentes de la combinación vacuna/agonista aquí descrita. Son preferentes como adyuvantes adecuados para el depósito y suministro los compuestos catiónicos o policatiónicos como se definieron anteriormente. Igualmente, el adyuvante puede seleccionarse del grupo consistente en, por ejemplo, compuestos catiónicos o policatiónicos como se definió anteriormente, de quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, pluronics, solución de alumbre, hidróxido de aluminio, ADJUMERTM (polifosfaceno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alumbre); gel de hidróxido de aluminio sumamente absorbente de proteínas; gel de hidróxido de aluminio de baja viscosidad; AF o SPT (emulsión de escualeno (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%), solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4); AVRIDINETM (propanodiamina); BAY R1005TM ((hidroacetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilaminob-D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoilamida); CALCITRIOLTM (1-alfa,25-dihidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de calcio); holotoxina de cólera, proteína de fusión de cólera toxina-A1-proteína-A-fragmento D, subunidad B de la toxina de cólera; CRL 1005 (copolímero de bloques P1205); liposomas que contienen citoquinas; DDA (bromuro de dimetildiodecadiamonio); DHEA (deshidroepiandrosterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complejo

- de DOC/alumbre (sal de sodio de ácido desoxicólico); adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; inulina-gamma; adyuvante Gerbu (mezcla de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D35 glutamina (GMDP), ii) cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA), iii) complejo de sal de zinc L-prolina (ZnPro-8); GM-CSF); GMDP (N-acetilglucosaminil-(b14)-N-acetilmuramil-L47-alanil-D-isoglutamina); imiquimod (1-(2-metipropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinoline-4-amina); ImmTher™ (dipalmitato de N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRV's (inmunoliposomas preparados de vesículas de deshidratación-rehidratación); interferón gamma; interleucina-1beta; interleucina-2; interleucina-7; interleucina-12; ISCOMS™; ISCOPREP 7.0.3.™; liposomas; LOXORIBINE™ (7-aliil-8-oxoguanosina); adyuvante oral LT 5 (enterotoxina-prototoxina lábil de E.coli); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59™; (emulsión de agua de escualeno); MONTANIDE™ ISA 51 (adyuvante de Freund incompleto purificado); MONTANIDE ISA 720™ (adyuvante de aceite metabolizable); MPL™ (lípidio A de 3-Q-desacil-4'-monofosforilo); MTP-PE y liposomas MTP-PE ((N-acetil-L alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosforilo))-etilamida, sal de monosodio); MURAMETIDE™ (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH3); MURAPALMITINE™ y DMURAPALMITINE™ (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoil); NAGO (neuraminidasa-galactosa-oxidasa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISVs (vesículas de agentes tensioactivos no iónicos); PLEURANT™ (β-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico; microesferas/nanoesferas); PLURONIC L121™; PMMA (polimetilmetacrilato); PODDSTM (microesferas proteinoides); derivados de polietilencarbamato; poli-rA; poli-rU (complejo de ácido poliadenílico-ácido poliuridílico); polisorbato 80 (Tween 80); cocleatos proteínicos (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON™ (QS-21); Quil-A (saponina de QuilA); S-28463 (4-amino-otec-dimetil-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol); SAF-1™ ("formulación adyuvante Syntex"); proteoliposomas Sendai y matrices lipídicas que contienen Sendai; Span-85 (triolato de sorbitan); 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 (clorhidrato de octadeciltirosina); Theramid™ (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Aladipalmitoxipropilamida); Teronil-MDP (Termurtide™ o [thr 1]-MDP; N-acetilmuramil-treonil-D-isoglutamina); partículas de Ty (Ty-VLPs o partículas similares a virus); liposomas Walter-Reed (liposomas que contienen lípido A adsorbido en hidróxido de aluminio), y lipopéptidos, incluyendo Pam3Cys, en particular sales de aluminio, tales como Adju-phos, Alhydrogel, Rehydragel; emulsiones, incluyendo CFA, SAF, IFA, MF59, Provac, TiterMax, Montanida, Vaxfectina; copolímeros, incluyendo Optivax (CRL1005), L121, Poloaxmer4010), etc.; liposomas, incluyendo Stealth, cocleatos, incluyendo BIORAL; adyuvantes derivados de plantas, incluyendo QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; adyuvantes adecuados para la coestimulación incluyendo Tomatina, biopolímeros, incluyendo PLG, PMM, Inulina, adyuvantes derivados de microbios, incluyendo Romurtida, DETOX, MPL, CWS, Manosa, secuencia de ácido nucleico CpG, CpG7909, ligandos de TLR 1-10 humanos, ligandos de TLR 1-13 de murino, ISS-1018, 35 IC31, Imidazoquinolinas, Ampligen, Ribis29, IMOXine, IRIVs, VLPs, toxina de cólera, toxina lábil térmica, Pam3Cys, Flagelina, anclaje GPI, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP; y adyuvantes adecuados como antagonistas incluyendo neuropéptido de CGRP.
- 40 El adyuvante se selecciona preferiblemente de adyuvantes que apoyan la inducción de una respuesta inmune Th1 o la maduración de células T naive, tales como GM-CSF, IL-12, IFNγ, cualquier ácido nucleico adyuvante como se definió anteriormente, preferiblemente un ARN inmunoestimulador, ADN CpG, etc.
- 45 En una realización preferente adicional, también es posible que la combinación vacuna/agonista aquí descrita contenga, además del ARN que proporciona el antígeno y el agonista OX40, componentes adicionales que se seleccionan del grupo que comprende: antígenos adicionales o ácidos nucleicos que proporcionan antígeno adicionales; un agente inmunoterapéutico adicional; una o más sustancias auxiliares; o cualquier otro compuesto conocido por ser inmunoestimulante debido a su afinidad de unión (como ligando) a los receptores humanos tipo Toll; y/o un ácido nucleico adyuvante, preferiblemente un ARN inmunoestimulador (ARNis).
- 50 Por consiguiente, en otra realización preferida, la combinación vacuna/agonista aquí descrita comprende además al menos un adyuvante, una sustancia auxiliar seleccionada de lipopolisacáridos, TNF-alfa, ligando CD40 o citoquinas, monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, 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-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT- beta, TNF-alfa, factores de crecimiento y hGH, un ligando del receptor tipo Toll humano TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, un ligando del receptor tipo Toll murino TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13, un ligando de un receptor similar a NOD, un ligando de un receptor similar a RIG-I, un ácido nucleico adyuvante, un ARN inmunoestimulador (ARNis), un ADN-CpG, un agente antibacteriano o un agente antiviral

La combinación vacuna/agonista como se describe aquí puede comprender además aditivos adicionales o compuestos adicionales. Otros aditivos que pueden incluirse en la combinación vacuna/agonista, como en la vacuna de ARN y/o en la composición que comprende un agonista OX40, son emulsionantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes que imparten sabor, vehículos farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizadores; antioxidantes conservantes, inhibidores de ARNasas y/o un agente antibacteriano o antiviral.

La combinación vacuna/agonista típicamente comprende una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la combinación vacuna/agonista como se define aquí. Tal como se usa en este documento, una "cantidad segura y efectiva" significa preferiblemente una cantidad de los componentes, preferiblemente del al menos un ARN que codifica al menos un antígeno y el agonista de OX40, que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva o para prevenir una enfermedad o trastorno como se define aquí. Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios graves y permitir una relación sensata entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites generalmente se encuentra dentro del alcance del juicio médico sensato.

La combinación vacuna/agonista aquí descrita se puede administrar vía oral, parenteral, por pulverización inhalación, vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término parenteral, como se usa aquí, incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intra-nodal, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonal, intraperitoneal, intracardial, intraarterial y sublingual o técnicas de infusión. Preferiblemente, la vacuna de ARN se administra por aplicación intradérmica o intramuscular y el agonista OX40 se administra preferiblemente por inyección intramuscular o intraperitoneal, más preferiblemente por infusión intravenosa, en caso de que esté en forma de un anticuerpo.

Según un aspecto adicional, el objeto subyacente a la presente invención se resuelve mediante una composición farmacéutica que comprende una vacuna y un agonista, en particular, como vacuna, 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, y, como agonista, una composición que comprende un agonista OX40, ambos preferiblemente como se definieron anteriormente. Asimismo, la composición farmacéutica se formula y administra preferiblemente como se definió anteriormente para los componentes de la combinación vacuna/agonista. Tal composición farmacéutica puede comprender además cualquier ingrediente como se definió anteriormente para la combinación vacuna/agonista.

Por consiguiente, la combinación de la vacuna de ARN y el agonista de OX40 como se define de acuerdo con la presente descripción puede presentarse como una composición, por ejemplo la composición farmacéutica aquí descrita, o puede presentarse como más de una composición, por ejemplo como un kit de partes donde los diferentes componentes conforman las diferentes partes de dicho kit de partes. Estos diferentes componentes, tales como la vacuna y el agonista, pueden formularse cada uno como una composición farmacéutica o como una composición como se definió anteriormente. Preferiblemente, cada una de las diferentes partes del kit comprende un componente diferente, por ejemplo una parte comprende la vacuna de ARN como se define aquí, otra parte comprende el agonista OX40 como se define aquí.

Así, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona kits, en particular kits de partes. Dichos kits, en particular kits de partes, típicamente comprenden, como componentes solos o en combinación con componentes adicionales como se definen aquí, 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 y, preferiblemente en una parte diferente del kit, un agonista de OX40 como se define aquí. La combinación vacuna/agonista como se define aquí, opcionalmente en combinación con componentes adicionales como se definen aquí, tal como un adyuvante adicional, puede estar presente 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 al menos un ARN que codifica al menos un antígeno como se define aquí, al menos otra parte del kit puede comprender el agonista OX40 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 puede contener además instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosificación de la combinación vacuna/agonista, de la composición farmacéutica o de cualquiera de sus componentes o partes.

La combinación vacuna/agonista, la composición farmacéutica o el kit de partes aquí descritos que comprenden una vacuna de ARN y un agonista OX40 pueden usarse para fines médicos humanos y también veterinarios, preferiblemente con fines médicos humanos.

Por tanto, un aspecto adicional aquí descrito es el primer uso médico de la combinación vacuna/agonista, de la composición farmacéutica y del kit de partes aquí descritos, que comprenden una vacuna de ARN y

Clostridium perfringens, tenia Fox, infecciones por amebas libres, infecciones por Fusobacterium, gangrena gaseosa, geotricosis, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), giardiasis, muermo, gnatostomiasis, gonorrea, granuloma inguinal (Donovanosis), infecciones por estreptococos del Grupo A, infecciones por estreptococos del Grupo B, infecciones por Haemophilus influenzae, enfermedad de manos,

5
 pies y boca (HFMD), síndrome pulmonar por hantavirus (HPS), infecciones por Helicobacter pylori, síndrome urémico hemolítico (SUH), 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 huecas, infecciones por anquilostomas, infecciones por bocavirus humano, Erliquiosis ewingii humana, anaplasmosis granulocítica humana (HGA), infecciones por metapneumovirus humano, Ehrliquiosis monocítica humana, infecciones por virus del papiloma humano (VPH), infecciones por el virus de la parainfluenza humana, himenolepiasis, 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 hemorragia de Marburg (MHF), virus Marburg, sarampión, melioidosis (enfermedad de Whitmore), meningitis, enfermedad meningocócica, metagonimiasis, microsporidiosis, tenia en miniatura, miscarriage (inflamación de la próstata), Moluscum contagiosum (MC), mononucleosis, paperas, tifus murino (tifus endémico), micetoma, Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumonia, miasis, dermatitis del pañal/compresa, conjuntivitis neonatal (oftalmia neonatal), sepsis neonatal (corioamnionitis), nocardiosis, noma, infecciones por el virus Norwalk, oncocercosis (ceguera de los ríos), osteomielitis, otitis media, paracoccidiodomicosis (ascomicosis de América del Sur), paragonimiasis, paratífus, pasteurellosis, Pediculosis capitis (piojos de la cabeza), pediculosis corporis (piojo del cuerpo), pediculosis pubis (piojo púbico, ladilla), enfermedad inflamatoria pélvica (EPI), pertusis (tos ferina), fiebre glandular de Pfeiffer, peste, infecciones por neumococos, neumonía por Pneumocystis (PCP),

10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45

neumonía, poliomielititis (cojera infantil), poliomielititis, tenia porcina, infecciones por Prevotella, meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), leucoencefalopatía multifocal progresiva, pseudocroup, psitacosis, fiebre Q, fiebre del conejo, rabia, fiebre por mordedura de rata, síndrome de Reiter, infecciones por el virus sincitial respiratorio (VSR), rinosporidiosis, infecciones por rinovirus, infecciones por rickettsia, fiebre del Valle del Rift (RVF), fiebre manchada de las montañas Rocosas (RMSF), infecciones por rotavirus, rubéola, Salmonella paratyphus, Salmonella typhus, salmonelosis, SARS (síndrome respiratorio agudo severo), sarna, escarlatina, esquistosomiasis (bilharziosis), tifus por ácaros, sepsis, Shigellosis (disentería bacilar), herpes zóster, viruela (Variola), chancro blando, esporotricosis, intoxicación alimentaria por estafilococos, infecciones por estafilococos, estrongiloidiasis, sífilis, teniasis, tétanos, fiebre de los tres días, encefalitis transmitida por garrapatas, Tinea barbae (tiña de la barba), 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 (onicomicosis), Tinea versicolor (Pitiriasis versicolor), Toxocariasis (Larva Migrans Ocular (OLM) y Larva Migrans Visceral (VLM)), Toxoplasmosis, Triquinelosis, Tricomoniasis, Tricuriasis (infecciones por tricocéfalo), Tripper, Tripanosomiasis (enfermedad del sueño), enfermedad de Tsutsugamushi, tuberculosis, tularemia, tifus, fiebre tifoidea, infecciones por Ureaplasma urealyticum, vaginitis (colpitis), variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, nvCJD), encefalitis equina venezolana, fiebre hemorrágica venezolana, neumonía viral, leishmaniosis visceral, verrugas, fiebre del Nilo occidental, encefalitis equina occidental, piedra blanca (tiña blanca), tos ferina, manchas de hongos de levadura, fiebre amarilla, infecciones por Yersinia pseudotuberculosis, yersiniosis y cigomicosis.

45 Son particularmente preferentes aquellas enfermedades, en particular cáncer o enfermedades tumorales, que están asociadas a una menor expresión de OX40L en comparación con los individuos normales.

50 En este contexto, es particularmente preferente es el tratamiento del melanoma, el glioblastoma y los carcinomas de páncreas, pulmón, mama, colon, ovario y células renales, cánceres uroteliales, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y carcinoma hepatocelular que están asociados a una baja expresión de OX40L en comparación con individuos sanos. Es totalmente preferente el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o el cáncer de pulmón de células pequeñas asociado a una menor expresión de OX40L en comparación con individuos sanos.

55 En otra realización, el tratamiento del cáncer o de las enfermedades tumorales asociadas a la ausencia o a la baja expresión de OX40 y/o OX40L. En este contexto, la vacuna de ARN de la combinación vacuna/agonista aquí descrita es capaz de inducir la expresión de OX40 y/o OX40L en el paciente a tratar y, por tanto, facilita la actividad terapéutica del agonista de OX40.

60 Según otro aspecto, la presente descripción proporciona un agonista de OX40 como se definió anteriormente 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 al menos un antígeno como se definió anteriormente, por ejemplo para su uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedades tumorales y/o cancerosas o de enfermedades infecciosas como se definen aquí.

Según otro aspecto más, la presente descripción proporciona 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 como se definió anteriormente para su uso en terapia en combinación con un agonista de OX40 como se definió anteriormente, por ejemplo para su uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedades tumorales y/o cancerosas o de enfermedades infecciosas como se definen aquí.

Además, otro aspecto adicional aquí descrito se refiere a un método para transfectar y/o tratar una célula, un tejido o un organismo, aplicando o administrando así la combinación inventiva vacuna/agonista particularmente con fines terapéuticos. En este contexto, típicamente después de preparar la combinación vacuna/agonista aquí descrita, la combinación vacuna/agonista preferiblemente se administra a una célula, tejido u organismo, preferentemente mediante cualquiera de los modos de administración aquí descritos. El método para transfectar y/o tratar una célula puede llevarse a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Por tanto, la presente descripción también proporciona 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 como se definió anteriormente en combinación con una composición que comprende un agonista de OX40 como se definió anteriormente para su uso en un método de tratamiento que comprende la administración a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de dicha vacuna de ARN en combinación con dicha composición que comprende el agonista de OX40.

En una realización preferente, el método comprende la transfección *in vitro* de células aisladas. Por tanto, las células utilizadas preferiblemente son células humanas o animales, en particular células de un cultivo celular primario que luego se transfieren a un humano o animal. Antes de la transfección, estas células típicamente se aíslan del paciente para ser tratadas y cultivadas.

En la presente descripción, si no se indica lo contrario, se pueden combinar entre sí diferentes características de alternativas y realizaciones. En el contexto de la presente descripción, el término "que comprende" puede sustituirse por el término "consistente en", cuando sea aplicable.

25 Breve descripción de las figuras.

Las figuras que se muestran a continuación son meramente ilustrativas y describen la presente invención de forma adicional. Estas figuras no se deben interpretar como limitativas de la presente invención a las mismas.

30 Figura 1: La combinación de la vacuna de ARN (OVA-RNActive R1 710) con el anticuerpo anti-OX40 retrasa significativamente el crecimiento tumoral. Ratones C57 BL/6 se expusieron vía subcutánea a 3×10^3 células tumorales singénicas E.G7- OVA el día 0 y luego se trataron con la vacuna activa OVA RNActive (32 µg/ratón/día de vacunación, i.d.) sola o en combinación con 250 µg de anticuerpo anti-OX40 (i.p.) o 250 µg de anticuerpo de control IgG (ip) de acuerdo con el programa indicado. Los ratones inyectados con tampón de inyección Ringer Lactato (RiLa) sirvieron como controles.

35 Figura 2: Proporción de supervivencia de ratones con tumores E.G7-OVA tratados con diferentes terapias. De acuerdo con el Ejemplo 2, los ratones se trataron con la vacuna OVA-ARNctive o con el anticuerpo anti-OX40 solo o en combinación. Los ratones inyectados con tampón de inyección Ringer Lactato (RiLa) sirvieron como controles.

40 Figura 3: Secuencia de ARNm optimizada en G/C de R170 que codifica para la ovoalbúmina de Gallus gallus comprendida en la vacuna OVA-ARNctive.

Ejemplos

Los ejemplos mostrados a continuación son meramente ilustrativos y describen la presente invención de forma adicional. Estos ejemplos no se interpretarán como limitativos de la presente invención a los mismos.

45 Ejemplo 1: Preparación de la vacuna de ARNm

1 . Preparación de constructos de ADN y ARNm

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

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

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 utilizando PureMessenger® (CureVac, Tubingen, Alemania).

3. *Reactivos*

Reactivo de complejación: protamina.

4. *Preparación de la vacuna.*

El ARNm R1710 se complejó con protamina por adición de protamina al ARNm en la proporción (1:2) (p/p) (componente adyuvante). Después de incubación durante 10 minutos, se añadió la misma cantidad de ARNm libre R1710 utilizado como ARN que proporciona el antígeno.

Vacuna OVA-ARNctive (R1710): comprende un componente adyuvante consistente en un ARNm que codifica la ovoalbúmina de Gallus gallus (R1710) de acuerdo con la SEQ ID NO. 2 complejado con protamina en una proporción 2:1 (p/p) y el ARNm libre de antígeno que codifica la ovoalbúmina de Gallus gallus (R1710) de acuerdo con la SEQ ID NO. 2 (relación 1:1; ARN complejado:ARN libre).

Ejemplo 2: combinación de una vacuna de ARN y un anticuerpo anti-OX40

En el día cero, a los ratones C57BI76 se les implantó vía subcutánea (flanco derecho) 3×10^5 células E.G7-OVA por ratón (volumen 100 μ l en PBS). E.G7-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 OVA mRNA R1720 (32 μ g/ratón/día de vacunación) (según el Ejemplo 1) o Ringer-Lactato (RiLa) como tampón de control y tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-OX40 (250 μ g i.p.) o un anticuerpo de control de isotipo IgG1 según la Tabla 1 comenzó el día 3 y se repitió los días 6, 10, 13, 17, 20 y 24. Los animales recibieron la inyección de anticuerpos por la mañana y fueron vacunados por la tarde con un mínimo de cuatro horas entre los tratamientos.

Tabla 1: grupos de animales

Grupo	Nº de ratones	ARN inyectado por vacunación día y ratón	Anticuerpo inyectado por día de tratamiento y ratón
A	8	80% tampón Ringer-Lactato (RiLa)	--
B	6	32 μ g	--
C	6	--	250 μ g anti-OX40 (OX86)
D	6	32 μ g	250 μ g anti-OX40 (OX86)
E	6	32 μ g	250 μ g control IgG1 (RTK2071)

USA anti-OX40 (OX-86, IgG1 de rata) se adquirió de Aldevron (Freiburg, Alemania). El anticuerpo de control de isotipo (RTK2071, IgG1 de rata) se adquirió de Biolegend (San Diego, CA, USA). El crecimiento del tumor se controló midiendo el tamaño del tumor en 2 dimensiones (largo y ancho) con un calibrador (comenzando el día 4). El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$volumen (mm^3) = \frac{longitud (mm) \times \pi \times ancho^2 (mm^2)}{6}$$

Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2.

Como se puede ver en la Figura 1, la vacuna ARNm OVA (OVA-RNActive R1710) sola o en combinación con control-IgG retrasó el crecimiento tumoral en comparación con el grupo control tratado con tampón. El tratamiento con el anticuerpo anti-OX40 solo fue menos efectivo que la vacunación sola, mientras que la aplicación simultánea de la combinación de la vacuna ARN/anti-OX40 condujo a una inhibición significativa

del crecimiento tumoral. Las líneas representan el desarrollo del volumen tumoral medio y las barras de error del SEM. El análisis estadístico se basó en la prueba ANOVA de 2 vías (**: $p < 0,01$).

5 Como se puede ver en la Figura 2, el tratamiento con el anticuerpo anti-OX40 solo (tiempo de supervivencia medio 17,5 días) o la vacuna ARNm OVA sola (tiempo de supervivencia medio 24 días) ya tenía un valor significativo ($p^* = 0,0310$ Log-rank (Ensayo de Mantel-Cox) sobre la supervivencia en comparación con los ratones tratados con tampón (tiempo medio de supervivencia 13 días), mientras que la aplicación simultánea de la combinación de la vacuna ARN/anti-OX40 resultó en una supervivencia aún más larga (tiempo medio de supervivencia 30,5 días).

REIVINDICACIONES

1. Combinación de vacuna/agonista que comprende:
 - i) como vacuna, una vacuna de ARN que comprende al menos un ARNm que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno tumoral y
 - 5 ii) como agonista, una composición que comprende un agonista de OX40,

donde el agonista de OX40 es un anticuerpo agonista dirigido contra OX40.
2. Combinación según la reivindicación 1, donde el anticuerpo agonista dirigido contra OX40 es el anticuerpo monoclonal 9B12.
3. Combinación según la reivindicación 1 o 2, donde el al menos un ARNm de la vacuna de ARN es un ARNm aislado.
- 10 4. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el al menos un ARNm de la 5
5. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el al menos un ARNm de la vacuna de ARN está al menos parcialmente modificado en G/C, preferentemente donde el contenido en G/C del al menos un marco de lectura abierto del al menos un ARNm de la vacuna de ARN está aumentado en comparación con el marco de lectura abierto de tipo salvaje.
- 15 6. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el al menos un ARNm de la vacuna de ARN comprende una región optimizada en codón, preferentemente donde el al menos un marco de lectura abierto del al menos un ARNm de la vacuna de ARN está optimizado en codón.
7. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el al menos un ARNm de la vacuna de ARN está complejado con un vehículo.
- 20 8. Combinación según la reivindicación 7, donde el vehículo es un compuesto catiónico o policatiónico o un vehículo polimérico, preferentemente protamina.
9. Composición farmacéutica que comprende:
 - i) una vacuna de ARN que comprende al menos un ARNm que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno tumoral como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y
 - 25 ii) un agonista de OX40 como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
10. Kit de partes que comprende:
 - i) una vacuna de ARN que comprende al menos un ARNm que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para al menos un antígeno tumoral como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y
 - 30 ii) un agonista de OX40 como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 11. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, composición farmacéutica según la reivindicación 9, kit de partes según la reivindicación 10 para uso médico.
12. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, composición farmacéutica según la reivindicación 9, kit de partes según la reivindicación 10 para su uso en un método de tratamiento o prevención de enfermedades cancerosas o tumorales.
- 40 13. Combinación o kit de partes para su uso según la reivindicación 11 o 12, donde el agonista de OX40 y la vacuna de ARN son para su administración de forma secuencial a un paciente que lo necesite.
- 45 14. Combinación o kit de partes para su uso según la reivindicación 11 o 12, donde el agonista de OX40 y la vacuna de ARN son para su administración de forma concurrente a un sujeto que lo necesite.

15. Combinación o kit de partes para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde el agonista y la vacuna de ARN son para su administración a un sujeto que lo necesite por diferentes vías de administración.
- 5 16. Agonista de OX40 como se refine en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en terapia en combinación con una vacuna de ARN tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
17. Vacuna de ARN como se refine en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en terapia en combinación con un agonista de OX40 tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

10

Curso temporal del crecimiento de tumor E.G7-OVA bajo vacunación terapéutica

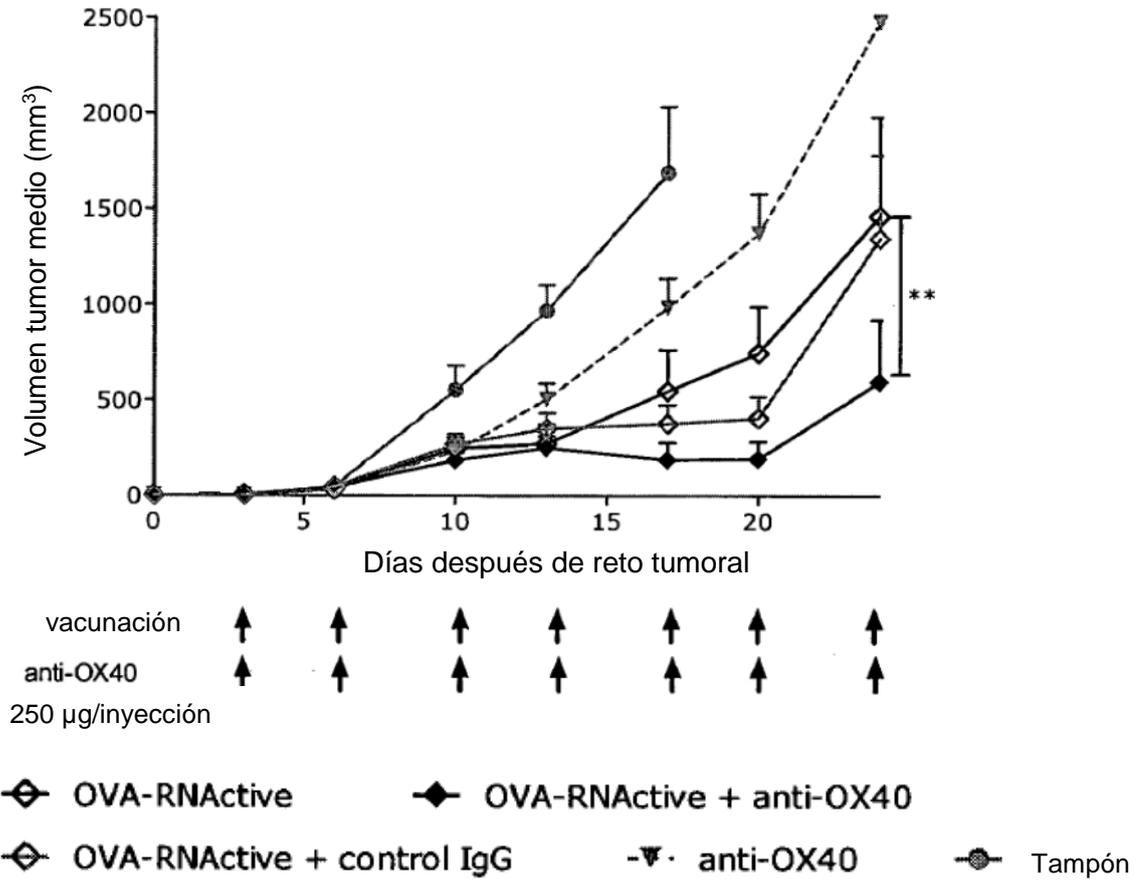


Fig. 1

Supervivencia de los ratones con tumores E.G7-OVA

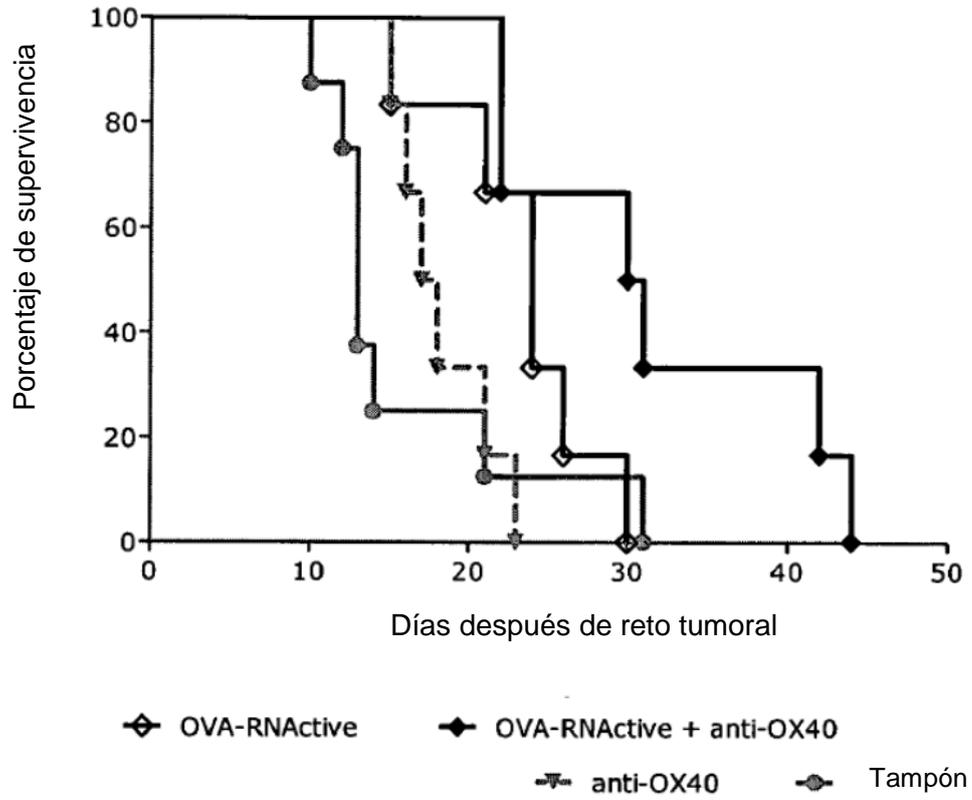


Fig. 2

R1710:

GGGAGAAAGCUUACCAUGGGCAGCAUCGGGGCCGCGUCGAUGGAGUUCUG
CUUCGACGUGUUCAAGGAGCUGAAGGUCCACCACGCCAACGAGAACAUCU
UCUACUGCCCGAUCGCCAUAUGAGCGCGCUCGCCAUGGUGUACCUUGGGC
GCCAAGGACAGCACCCGGACGCAGAUCAACAAGGUGGUCCGCUUCGACAA
GCUGCCCGGCUUCGGGGACUCGAUCGAGGCGCAGUGCGGCACCAGCGUGA
ACGUGCACAGCUCGCUCGGGACAUCUGAACCAGAUACCAAGCCGAAC
GACGUCUACAGCUUCAGCCUGGCCUCGCGGCUCUACGCCGAGGAGCGCUA
CCCGAUCCUGCCCGAGUACCUGCAGUGCGUGAAGGAGCUCUACCGGGGCG
GGCUGGAGCCGAUCAACUUCAGACGGCGGCCGACCAGGCCCGGGAGCUG
AUCAACAGCUGGGUGGAGAGCCAGACCAACGGCAUCAUCCGCAACGUCCU
CCAGCCGUCGAGCGUGGACAGCCAGACCGC GAUGGUGCUGGUCAACGCCA
UCGUGUUCAAGGGCCUGUGGGAGAAGACGUUCAAGGACGAGGACACCCAG
GCCAUGCCCUUCCGGGUGACCGAGCAGGAGUCGAAGCCGGUCCAGAU GAU
GUACCAGAUCCGGGCUCUUCGGGUGGGCGAGCAUGGCCAGCGAGAAGAUGA
AGAUCUGGAGCUGCCGUUCGCCUCGGGCACGAUGAGCAUGCUCGUGCUG
CUGCCCGACGAGGUCAGCGGCCUCGAGCAGCUGGAGUCGAUCAUCAACU
CGAGAAGCUGACCGAGUGGACCAGCAGCAACGUGAUGGAGGAGCGCAAGA
UCAAGGUGUACCUCGCGGAUGAAGAUGGAGGAGAAGUACAACCUGACG
UCGGUCCUGAUGGCGAUGGGGAUCACCGACGUGUUCAGCAGCUCGGCCAA
CCUCAGCGGCAUCAGCUCGGCCGAGAGCCUGAAGAUCAGCCAGGCGGUGC
ACGCCGCCACGCGGAGAUCAACGAGGCCGGCCGGGAGGUCGUGGGGUCG
GCCGAGGCGGGCGUGGACGCCGCCAGCGUCAGCGAGGAGUUCGCGCGGA
CCACCCGUUCCUGUUCUGCAUCAAGCACAUCGCCACCAACGCCGUGCUCU
UCUUCGGCCGGUGCGUGUCGCCUGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGC
CCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCUCCCCUCCUUGCACCGAGAUUAAU
AAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
AAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 3