



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 304 529**

⑤1 Int. Cl.:

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/66 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **03762622 .3**

⑧6 Fecha de presentación : **03.07.2003**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1521585**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2005**

⑤4 Título: **Immunoestimulación mediante RNA modificado químicamente.**

③0 Prioridad: **03.07.2002 DE 102 29 872**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

⑦3 Titular/es: **Curevac GmbH**
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE

⑦2 Inventor/es: **Hoerr, Ingmar;**
Von der Mülbe, Florian y
Pascolo, Steve

⑦4 Agente: **Gil Vega, Víctor**

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

Inmunoestimulación mediante RNA modificado químicamente.

5 La presente invención se refiere a la utilización de como mínimo un RNA de cadena simple modificado químicamente para la producción de un agente inmunoestimulador. La invención también se refiere a una vacuna que contiene como mínimo un antígeno junto con el agente inmunoestimulador. El agente inmunoestimulador según la invención y la vacuna según la invención se utilizan principalmente contra enfermedades infecciosas o enfermedades cancerosas.

10 El RNA desempeña un papel central en la expresión de la información genética en la célula en forma de RNAm, RNAt y RNAr. Sin embargo, en algunas investigaciones también se ha comprobado que el RNA participa como tal en la regulación de algunos procesos, en particular en el organismo de mamíferos. El RNA puede ejercer la función de sustancia mensajera de comunicación (Benner, FEBS Lett. 1988, 232: 225-228). También se ha descubierto un RNA
15 que presenta una gran homología con un RNAm normal, pero que no es traducido, sino que ejerce una función en la regulación intracelular (Brown *et al.*, Cell 1992, 71: 527-542). Este RNA con efecto regulador se caracteriza por una secuencia incompleta del sitio de unión de ribosomas (secuencia de Kozak: GCCGCCACCAUGG, en la que el AUG constituye el codón de iniciación (véase Kozak, Gene Expr. 1991, 1 (2): 117-125)), por la que se diferencia del RNAm (normal). Además se ha podido demostrar que esta clase de RNA regulador también está presente en células activadas
20 del sistema inmunológico, por ejemplo células CD4⁺T (Liu *et al.*, Genomics 1997, 39: 171-184).

Tanto la vacunación clásica como la vacunación genética tienen frecuentemente el problema de provocar sólo una respuesta inmune pequeña, y en consecuencia a menudo insuficiente, en el organismo a tratar o a vacunar. Por ello, con frecuencia a las vacunas se les añaden sustancias llamadas adyuvantes, es decir, sustancias que pueden aumentar una
25 respuesta inmune contra un antígeno y/o influir selectivamente en la misma. Algunos adyuvantes muy conocidos en el estado actual de la técnica son, por ejemplo, hidróxido de aluminio, el adyuvante de Freund y similares. Sin embargo, estos adyuvantes provocan efectos secundarios no deseados, por ejemplo irritaciones e inflamaciones muy dolorosas en el lugar de administración. También se observan efectos secundarios tóxicos, en particular necrosis tisulares. Por último, estos adyuvantes conocidos sólo provocan una estimulación insuficiente de la respuesta inmune celular, ya que
30 únicamente activan células B.

También se sabe que el DNA bacteriano tiene un efecto inmunoestimulador debido a la presencia de motivos CG no metilados, por lo que este DNA-CpG ha sido propuesto como medio inmunoestimulador por sí mismo y como adyuvante para vacunas; véase la patente US 5,663,153. Esta propiedad inmunoestimuladora del DNA también se
35 puede lograr a través de oligonucleótidos de DNA estabilizados mediante modificación con fosforotioato (patente US 6,239,116). Finalmente, la patente US 6,406,705 da a conocer composiciones de adyuvante que contienen una combinación sinérgica de un oligodesoxirribonucleótido-CpG y un adyuvante que no es ácido nucleico.

Sin embargo, la utilización de DNA como agente inmunoestimulador o como adyuvante en vacunas es desventajosa desde varios puntos de vista. El DNA se descompone en la corriente sanguínea a una velocidad relativamente lenta, por lo que al utilizar DNA inmunoestimulador se puede producir una formación de anticuerpos anti-DNA, como ha sido confirmado en el modelo animal con ratones (Gilkeson *et al.*, J. Clin. Invest. 1995, 95: 1398-1402). La posible persistencia del DNA en el organismo puede conducir a una sobreactivación del sistema inmunológico, que, como es sabido, en los ratones resulta en una esplenomegalia (Montheith *et al.*, Anticancer Drug Res. 1997, 12 (5): 421-
45 432). Además, el DNA puede interaccionar con el genoma huésped, en particular puede provocar mutaciones por integración en el genoma huésped. Por ejemplo, se puede producir una inserción del DNA introducido en un genoma intacto, lo que constituye una mutación que obstaculiza o elimina por completo la función del gen endógeno. Estos sucesos de integración pueden eliminar sistemas enzimáticos de vital importancia para la célula, y además existe el peligro de que la célula así modificada se transforme quedando en un estado degenerado si mediante la integración del
50 DNA extraño se modifica un gen decisivo para la regulación del crecimiento celular. Por ello, si se utiliza DNA como agente inmunoestimulador no se puede excluir el riesgo de cancerización.

Riedl *et al.* (J. Immunol 2002, 168(10): 4951-4959) manifiestan que un RNA unido a un dominio rico en Arg de la nucleocápsida HBcAg provoca una respuesta inmune mediada por Th1 contra HbcAg. El dominio rico en Arg de la
55 nucleocápsida presenta similitud con protaminas y se une a ácidos nucleicos de forma no específica.

El documento WO 03/028656 da a conocer una composición utilizada como adyuvante, que consiste en un inductor de interferón junto con una molécula inmunoestimuladora, siendo las moléculas inmunoestimuladoras moléculas de RNA de cadena doble.

60 Teplova *et al.* (Nature Structural Biology, vol. 6 (6) pp. 535-539, 1999) dan a conocer una molécula de RNA modificada con 12 pares de bases en estructura dúplex. La molécula de RNA dúplex dada a conocer en dicho documento afecta a una sustitución de metoxi-etilo.

65 Por último, Minks *et al.* (The Journal of Biological Chemistry, vol. 254(20) pp. 10181-10183, 1979) dan a conocer características de un RNA de cadena doble que puede activar una respuesta a interferón.

Por consiguiente, la presente invención tiene por objetivo crear un nuevo sistema para mejorar la inmunoestimulación en general y la vacunación en particular, que provoque una respuesta inmune especialmente eficaz en el paciente a tratar o a vacunar y que no obstante evite las desventajas de los inmunoestimuladores conocidos.

5 Este objetivo se resuelve mediante las formas de realización de la presente invención caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular, de acuerdo con la invención se utiliza como mínimo un RNA de cadena simple que presenta como mínimo una modificación química, consistiendo el RNA en 8 a 200 nucleótidos y conteniendo el RNA como mínimo
10 un análogo de nucleótidos naturales, para producir un agente inmunoestimulador. En términos generales, de acuerdo con la presente invención se da a conocer la utilización de este RNA modificado químicamente para la producción de un agente inmunoestimulador.

La presente invención se basa en la sorprendente constatación de que el RNA modificado químicamente activa
15 con especial intensidad células del sistema inmunológico (sobre todo células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas (DC), y también las células defensoras, por ejemplo en forma de células T), y de este modo estimula el sistema inmunológico de un organismo. La utilización según la invención del RNA modificado químicamente conduce en particular a un aumento de la liberación de citoquinas, por ejemplo interleuquinas, como IL-6, IL-12, etc.

Por ello, el agente inmunoestimulador de la presente invención se puede utilizar por ejemplo contra infecciones o enfermedades cancerosas, por ejemplo inyectándolo en el organismo infectado o en el propio tumor. Como ejemplos de enfermedades cancerosas tratables con el agente inmunoestimulador producido se pueden mencionar: melanoma maligno, carcinoma de colon, linfomas, sarcomas, carcinoma pulmonar de células pequeñas, blastomas, etc. Además,
25 el agente inmunoestimulador se utiliza ventajosamente contra enfermedades infecciosas (por ejemplo enfermedades infecciosas virales, como el SIDA (VIH), hepatitis A, B o C, herpes, herpes zoster (varicelas), rubéola (virus de la rubéola), fiebre amarilla, dengue, etc. (Flavivirus), gripe (Influenzavirus), enfermedades infecciosas hemorrágicas (virus de Marburg o virus Ebola), enfermedades infecciosas bacterianas, como la enfermedad de los legionarios (*Legionella*), úlcera de estómago (*Helicobacter*), cólera (*Vibrio*), infecciones por *E. coli*, infecciones por estafilococos, infecciones
30 por *Salmonella* o infecciones por estreptococos (tétanos), enfermedades infecciosas protozoológicas (malaria, enfermedad del sueño, leishmaniasis, toxoplasmosis, es decir, infecciones por *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, o infecciones fúngicas provocadas por ejemplo por *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* o *Candida albicans*).

La expresión “modificación química” significa que el RNA utilizado según la invención está modificado en comparación con las especies de RNA naturales mediante sustitución, adición o eliminación de uno o varios átomos o grupos de átomos.

La modificación química está configurada de tal modo que el RNA contiene como mínimo un análogo de nucleótidos naturales.

En una enumeración en modo alguna definitiva, como ejemplos de análogos de nucleótidos utilizables según la invención se pueden mencionar fosforamidatos, fosforotioatos, peptidonucleótidos, metil-fosfonatos, 7-deazaguanosina, 5-metil-citosina e inosina. La preparación de estos análogos es conocida por los especialistas y se da a conocer
45 por ejemplo en las patentes US 4,373,071, US 4,401,796, US 4,415,732, US 4,458,066, US 4,500,707, US 4,668,777, US 4,973,679, US 5,047,524, US 5,132,418, US 5,153,319, US 5,262,530 y 5,700,642. De forma especialmente preferente, el RNA consiste en análogos de nucleótido, por ejemplo los análogos anteriormente mencionados.

Otra modificación química puede consistir por ejemplo en la adición de una, así llamada, estructura “5'-Cap”, es decir, un nucleótido guanosina modificado, en particular m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G).

De acuerdo con la presente invención, el RNA modificado químicamente consiste en moléculas de RNA relativamente cortas formadas por 8 a aproximadamente 200 nucleótidos, de forma especialmente preferente 15 a aproximadamente 31 nucleótidos.

De acuerdo con la invención, el RNA utilizado como agente inmunoestimulador puede ser de cadena simple.

En ejemplos específicos de especies de RNA de cadena simple utilizables según la invención, el RNA presenta una de las siguientes secuencias: 5'-UCCAUGACGUUCCUGAUGCU-3', 5'-UCCAUGACGUUCCUGACGUU-3' o 5'-UCCAGGACUUCUCUCAGGUU-3'. En ese contexto, de forma especialmente preferente las especies de RNA de cadena simple están modificadas con fosforotioato.

En caso dado, el agente inmunoestimulador producido puede contener el RNA de cadena simple modificado químicamente junto con un soporte y/o vehículo farmacéuticamente compatible.

El agente inmunoestimulador producido puede contener uno o más adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad. En relación con la inmunoestimulación, de este modo preferentemente se logra un efecto sinérgico del RNA modificado químicamente según la invención y el adyuvante. Por “adyuvante” se ha de entender todo compuesto que favorezca

una respuesta inmune. A este respecto, en función de los diferentes tipos de adyuvantes pueden entrar en consideración diferentes mecanismos. Por ejemplo, una primera clase de adyuvantes adecuados está formada por compuestos que permiten la maduración de las DC, por ejemplo lipopolisacáridos, TNF- α o ligando CD40. En general, como adyuvante se puede utilizar cualquier agente del tipo de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, como GM-CFS, que influya en el sistema inmunológico y que permita aumentar y/o influir selectivamente en una respuesta inmune. En caso dado también se pueden utilizar oligonucleótidos-CpG, pero se han de ponderar los efectos secundarios que pueden aparecer en determinadas circunstancias, tal como se ha descrito más arriba. Sin embargo, debido a la presencia del agente inmunoestimulador producido utilizando el RNA de cadena simple modificado químicamente como inmunoestimulador primario, sólo es necesaria una cantidad relativamente pequeña de DNA-CpG (en comparación con una inmunoestimulación exclusivamente con DNA-CpG), por lo que un efecto sinérgico del agente inmunoestimulador producido y el DNA-CpG generalmente conduce a una valoración positiva de esta combinación. Algunos adyuvantes especialmente preferentes son citoquinas, como monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- γ , GM-CFS, LT- α o factores de crecimiento, por ejemplo hGH; otros adyuvantes conocidos preferentes son hidróxido de aluminio, el adyuvante de Freund y los péptidos o polipéptidos catiónicos estabilizadores mencionados más abajo, como protamina, y también polisacáridos catiónicos, en particular quitosana. También se pueden utilizar de forma especialmente adecuada lipopéptidos, como Pam3Cys, como adyuvantes en el agente inmunoestimulador de la presente invención; véase Deres *et al.*, Nature 1989, 342: 561-564.

Además de su utilización directa para iniciar una reacción inmune, por ejemplo contra un germen patógeno o contra un tumor, el agente inmunoestimulador también se puede utilizar ventajosamente para reforzar la respuesta inmune contra un antígeno. Por ello, el RNA modificado químicamente se puede utilizar para producir una vacuna en la que éste actúe como un adyuvante que favorece la respuesta inmune específica contra el antígeno o los antígenos correspondientes.

Por consiguiente, otro objeto de la presente invención consiste en una vacuna que contiene el RNA de cadena simple modificado químicamente anteriormente definido y como mínimo un antígeno.

En la vacunación "clásica", la vacuna según la invención o la vacuna a producir utilizando el RNA de cadena simple modificado químicamente contiene el propio o los propios antígenos. Por un "antígeno" se ha de entender toda estructura que pueda provocar la formación de anticuerpos y/o la activación de una respuesta inmune celular. Por consiguiente, de acuerdo con la invención los conceptos "antígeno" e "inmunógeno" se utilizan como sinónimos. Los antígenos son por ejemplo, péptidos, polipéptidos, por tanto también proteínas, células, extractos celulares, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, lípidos, glicolípidos e hidratos de carbono. Como antígenos entran en consideración, por ejemplo, antígenos tumorales, virales, bacterianos, fúngicos y protozoológicos. Son preferentes los antígenos de superficie de células tumorales y los antígenos de superficie, en particular formas segregadas, de patógenos virales, bacterianos, fúngicos o protozoológicos. Evidentemente, el antígeno también puede estar presente en la vacuna según la invención en forma de un hapteno acoplado a un vehículo adecuado. Los especialistas conocen vehículos adecuados, que incluyen por ejemplo albúmina sérica humana (HSA), polietilén-glicoles (PEG), y similares. El acoplamiento del hapteno al vehículo tiene lugar de acuerdo con procedimientos conocidos en el estado actual de la técnica, por ejemplo, en caso de un vehículo de polipéptido a través de un enlace de amida a un radical Lys.

En la vacunación genética con ayuda de la vacuna según la invención o la vacuna genética a producir utilizando el RNA modificado químicamente, la estimulación de una respuesta inmune tiene lugar mediante la introducción de la información genética para el antígeno o los antígenos (por consiguiente, en este caso un antígeno de péptido o de polipéptido) en forma de un ácido nucleico codificador de este antígeno, en particular un DNA o un RNA (preferentemente un RNAm), en el organismo o en la célula. El ácido nucleico contenido en la vacuna se traduce en el antígeno, es decir, se expresa el polipéptido codificado por el ácido nucleico o un péptido antigénico, con lo que se estimula una respuesta inmune dirigida contra este antígeno. Por ello, en la vacunación contra un germen patógeno, es decir, un virus, una bacteria o un germen protozoológico, preferentemente se utiliza un antígeno de superficie de un germen de este tipo para la vacunación con ayuda de la vacuna según la invención que contiene un ácido nucleico codificador del antígeno de superficie. En el caso de la utilización como vacuna genética para el tratamiento del cáncer, la respuesta inmune se logra a través de la introducción de la información genética para antígenos tumorales, en particular proteínas, que son expresados exclusivamente en células de cáncer, mediante la administración de una vacuna según la invención que contiene un ácido nucleico codificador de dicho antígeno de cáncer. De este modo, el antígeno o los antígenos de cáncer son expresados en el organismo, con lo que se provoca una respuesta inmune que está dirigida de forma eficaz contra las células cancerosas.

La vacuna según la invención entra en consideración principalmente para el tratamiento de enfermedades cancerosas. Preferentemente se utiliza un antígeno de superficie específico de tumor (TSSA) o un ácido nucleico que codifica un antígeno de este tipo. En consecuencia, la vacuna según la invención se puede utilizar para el tratamiento de las enfermedades cancerosas anteriormente mencionadas en relación con el agente inmunoestimulador según la invención. Los ejemplos específicos de antígenos tumorales utilizables según la invención en la vacuna son entre otros: 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, β -catenina/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (o hTRT), iGE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 minor bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2 y WT1.

La vacuna según la invención también se utiliza contra enfermedades infecciosas, en particular las infecciones anteriormente mencionadas en relación con el agente inmunoestimulador según la invención. En el caso de las enfermedades infecciosas, en la vacuna también se utilizan preferentemente los antígenos de superficie correspondientes con el potencial antigénico más fuerte o un ácido nucleico codificador de éstos. En el caso de los antígenos mencionados de gérmenes patógenos u organismos, en particular en caso de antígenos virales, típicamente se trata de una forma segregada de un antígeno de superficie. Además, de acuerdo con la invención preferentemente se utilizan poliepítopos o ácidos nucleicos codificadores de éstos, en particular RNAm, tratándose preferentemente de poliepítopos de los antígenos anteriormente mencionados, en particular antígenos de superficie de gérmenes patógenos u organismos o células tumorales, preferentemente formas de proteínas segregadas.

Por otra parte, un ácido nucleico codificador de como mínimo un antígeno, que puede estar contenido en la vacuna según la invención, además de la sección que codifica un péptido o polipéptido antigénico también puede contener como mínimo otra sección funcional que codifique por ejemplo una citoquina promotora de la respuesta inmune, *en particular* las citoquinas anteriormente mencionadas en relación con el “adyuvante”.

Como ya se ha mencionado, el ácido nucleico que codifica como mínimo un antígeno puede consistir en DNA o RNA. Para introducir la información genética para un antígeno en una célula o un organismo, en el caso de una vacuna de DNA según la invención generalmente se requiere un vector adecuado que contenga una sección que codifique el antígeno correspondiente. Como ejemplos específicos de este tipo de vectores se pueden mencionar los vectores de las series pVITRO, pVIVO, pVAC, pBOOST, etc. (InvivoGen, San Diego, CA USA), que se describen en la URL <http://www.invivo-gen.com>.

En relación con las vacunas de DNA según la invención se pueden mencionar diferentes procedimientos para la introducción del DNA en células, como por ejemplo transfección de fosfato cálcico, transfección de polipreno, fusión de protoplastos, electroporación, microinyección y lipofección, siendo especialmente preferente la lipofección.

Sin embargo, en caso de una vacuna de DNA es preferible utilizar virus de DNA como vehículo de DNA. Estos virus tienen la ventaja de que, debido a sus propiedades infecciosas, permiten alcanzar una tasa de transfección muy alta. Los virus utilizados se modifican genéticamente para que no se forme ninguna partícula infecciosa funcional en la célula transfectada.

Desde el punto de vista de la seguridad es preferible utilizar RNA como el ácido nucleico que codifica como mínimo un antígeno en la vacuna según la invención. Principalmente, el RNA no implica el peligro de ser integrado de forma estable en el genoma de la célula transfectada. Además, para lograr una transcripción eficaz no se requiere ninguna secuencia viral, como por ejemplo promotores. Por otra parte, el RNA se descompone *in vivo* con mucha más facilidad.

Probablemente a causa de la vida media relativamente corta del RNA en la circulación sanguínea en comparación con la del DNA, hasta ahora no se ha detectado ningún anticuerpo anti-RNA.

Por ello, de acuerdo con la invención el ácido nucleico que codifica como mínimo un antígeno es preferentemente un RNAm que contiene una sección que codifica como mínimo un antígeno de péptido o polipéptido.

Sin embargo, el RNA en solución es considerablemente más inestable que el DNA. La inestabilidad se debe a unas enzimas que descomponen el RNA, llamadas RNasas (ribonucleasas). La más mínima contaminación con ribonucleasas es suficiente para descomponer por completo el RNA en solución. Generalmente, esta contaminación con RNasa sólo se puede eliminar mediante tratamientos especiales, en particular con dietilpirocarbonato (DEPC). La descomposición natural de RNAm en el citoplasma de células presenta una regulación muy fina. A este respecto se conocen varios mecanismos. Por ejemplo, para un RNAm funcional la estructura terminal tiene una importancia decisiva. En el extremo 5' se encuentra la denominada “caperuza” (un nucleótido guanosina modificado) y en el extremo 3' una sucesión de hasta 200 nucleótidos adenosina (la llamada cola de poli-A). A través de estas estructuras el RNA es reconocido como RNAm y se regula la descomposición. Además existen otros procesos que estabilizan o desestabilizan el RNA. Muchos de estos procesos todavía son desconocidos, pero frecuentemente parece ser determinante una interacción entre el RNA y proteínas. Por ejemplo, recientemente se ha descrito un “mRNA-Surveillance-System” (sistema de vigilancia de RNAm) (Hellerin y Parker, Ann. Rev. Genet. 1999, 33: 229 a 260), en el que mediante determinadas interacciones de *feedback*-proteína en el citosol se reconoce RNAm incompleto o antisentido y se hace accesible para la descomposición, siendo realizada la mayor parte de estos procesos por exonucleasas.

Por ello es preferible estabilizar frente a la descomposición por RNasas tanto el RNA modificado químicamente según la invención como el RNA que codifica un antígeno, en particular RNAm, dado el caso presente en la vacuna.

La estabilización del RNA modificado químicamente y en caso dado del RNAm que codifica como mínimo un antígeno puede tener lugar por asociación o complejación o por unión del RNA modificado químicamente, o del RNAm en caso dado presente que codifica el antígeno, con un compuesto catiónico, en particular un compuesto policatiónico, por ejemplo una proteína o un péptido (poli)catiónico. En este contexto, en particular la utilización de protamina como proteína policatiónica de unión de ácido nucleico es especialmente eficaz. También se pueden utilizar otras proteínas o péptidos catiónicos, como poli-L-lisina o histonas. Este procedimiento para estabilizar el RNAm modificado está descrito en el documento EP-A-1083232, cuyo contenido publicado a este respecto está incluido

en toda su extensión en la presente invención. Otras sustancias catiónicas preferentes que pueden ser utilizadas para la estabilización del RNA modificado químicamente y/o del RNAm dado el caso contenido en la vacuna según la invención incluyen polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosana. La asociación o complejación con compuestos catiónicos también mejora la transferencia de las moléculas de RNA a las células a tratar o al organismo a tratar.

En las secuencias de RNAm eucariotas hay elementos de secuencia desestabilizadores (DSE) a los que se unen proteínas señal que regulan la descomposición enzimática del RNAm *in vivo*. Por consiguiente, para una estabilización adicional del RNAm contenido en la vacuna según la invención, en particular en el área que codifica como mínimo un antígeno, se llevan a cabo una o más modificaciones con respecto al área correspondiente del RNAm de tipo salvaje, de modo que ya no contenga ningún elemento de secuencia desestabilizador. Evidentemente, de acuerdo con la invención también es preferible eliminar los DSE del RNAm dado el caso presentes en las áreas no traducidas (3'- y/o 5'-UTR).

Del mismo modo, en relación con el agente inmunoestimulador según la invención también es preferible que la secuencia del RNA modificado químicamente contenido en el mismo no presente ninguna secuencia desestabilizadora de este tipo.

Estas DSE arriba mencionadas son por ejemplo secuencias ricas en AU ("AURES"), que están presentes en secciones de 3'-UTR de numerosos RNAm inestables (Caput *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670 a 1674). Por ello, las moléculas de RNA contenidas en la vacuna según la invención preferiblemente están modificadas con respecto al RNAm de tipo salvaje de tal modo que no presentan ninguna secuencia desestabilizadora de este tipo. Esto también es aplicable a los motivos de secuencia que son reconocidos por posibles endonucleasas, por ejemplo la secuencia GAACAAG, que está incluida en el segmento 3'UTR del gen que codifica el receptor de transferrina (Binder *et al.*, EMBO J. 1994, 13: 1969 a 1980). Preferentemente, estos motivos de secuencia también se eliminan en las moléculas de RNA modificadas químicamente del agente inmunoestimulador según la invención, o en el RNAm dado el caso presente en la vacuna según la invención.

Las moléculas de RNAm que pueden estar contenidas en la vacuna según la invención también presentan preferentemente una caperuza-5'. Como ejemplos de caperuzas se pueden mencionar de nuevo: m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp (5')A y G(5')ppp(5')G. Además, el RNAm también puede presentar análogos de nucleótidos naturales, tal como se ha explicado más arriba en relación con el RNA modificado químicamente.

De acuerdo con otra forma de realización preferente de la presente invención, el RNAm contiene una cola de poli-A de como mínimo 50 nucleótidos, preferentemente como mínimo 70 nucleótidos, preferiblemente como mínimo 100 nucleótidos, de forma especialmente preferente como mínimo 200 nucleótidos.

Para una traducción eficiente del RNAm que codifica como mínimo un antígeno también se requiere una unión eficaz de los ribosomas al sitio de unión de ribosomas (secuencia de Kozak: GCCGCCACCAUGG, el AUG constituye el codón de iniciación). A este respecto se ha comprobado que un contenido elevado de A/U alrededor de dicho sitio posibilita una unión más eficiente de los ribosomas al RNAm.

También es posible insertar en el RNAm que codifica como mínimo un antígeno uno o más, así llamados, IRES (en inglés "internal ribosomal entry side"). Un IRES puede actuar como único sitio de unión de ribosomas, pero también puede servir para la preparación de un RNAm que codifica varios péptidos o polipéptidos que han de ser traducidos independientemente entre sí por los ribosomas ("RNAm multicistrónico"). Las secuencias de IRES utilizables según la invención son por ejemplo las procedentes 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 fiebre porcina clásica (CSFV), virus del leucoma murino (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) o virus de la parálisis cricket (CrPV).

De acuerdo con otra forma realización preferente de la presente invención, el RNAm presenta en las áreas no traducidas en 5' y/o 3' secuencias estabilizadoras que pueden aumentar la vida media del RNAm en el citosol.

Las secuencias estabilizadoras pueden presentar una homología secuencia de un 100% con respecto a las secuencias naturales presentes en virus, bacterias y eucariotas, pero también pueden ser de índole parcial o totalmente sintética. Como ejemplos de secuencias estabilizadoras utilizables en la presente invención se pueden mencionar las secuencias no traducidas (UTR) del gen de β -globina, por ejemplo de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*. Otro ejemplo de una secuencia estabilizadora presenta la fórmula general (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC, que está incluida en el 3'UTR del RNAm muy estable que codifica α -globina, α -(I)-colágeno, 15-lipoxigenasa o tirosina-hidroxilasa (Holcik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410-2414).

Evidentemente, estas secuencias estabilizadoras se pueden utilizar de forma individual o en combinación entre sí, o también en combinación con otras secuencias estabilizadoras conocidas por los especialistas.

Para aumentar adicionalmente la eficacia de traducción del RNAm dado el caso contenido en la vacuna según la invención, el área que codifica como mínimo un antígeno (y también cualquier otra sección codificadora incluida en caso dado) puede presentar las modificaciones indicadas más abajo con respecto a un RNAm de tipo salvaje correspondiente, que pueden estar presentes de forma alternativa o en combinación.

ES 2 304 529 T3

Por una parte, el contenido de G/C del área del RNAm modificado que codifica el péptido o polipéptido puede ser mayor que el contenido de G/C del área codificadora del RNAm de tipo salvaje que codifica el péptido o polipéptido, permaneciendo inalterada la secuencia de aminoácidos codificadora con respecto al tipo salvaje.

5 Esta modificación se basa en el hecho de que para lograr una traducción eficaz de un RNAm es esencial la sucesión de secuencia del área a traducir del RNAm. En este contexto, la composición y la sucesión de los diferentes nucleótidos desempeñan un papel importante. Principalmente, las secuencias con un contenido elevado de G(guanosina)/C(citosina) son más estables que las secuencias con un contenido elevado de A(adenosina)/U(uracilo). Por consiguiente, de acuerdo con la invención, los codones se varían con respecto al RNAm de tipo salvaje de tal modo que aumente
10 su contenido de nucleótidos G/C, manteniendo la sucesión de aminoácidos traducida. Dado que varios codones codifican un mismo aminoácido (degeneración del código genético), se pueden determinar los codones favorables para la estabilidad (utilización de codones alternativa, en inglés “codon usage”).

Dependiendo del aminoácido a codificar por el RNAm, existen diferentes posibilidades de modificación de la
15 secuencia de RNAm con respecto a la secuencia de tipo salvaje. En el caso de los aminoácidos codificados por codones que contienen exclusivamente nucleótidos G o C, no se requiere ninguna modificación del codón. Por ejemplo, los codones para Pro (CCC o CCG), Arg (CGC o CGG), Ala (GCC o GCG) y Gly (GGC o GGG) no requieren ninguna modificación, ya que no hay presente ninguna A o U.

20 En los siguientes casos, los codones que contienen nucleótidos A y/o U se cambian mediante sustitución por otros codones que codifican los mismos aminoácidos pero que no contienen ninguna A y/o ninguna U, por ejemplo:

- los codones para Pro se pueden cambiar de CCU o CCA a CCC o CCG;
- 25 - los codones para Arg se pueden cambiar de CGU o CGA o AGA o AGG a CGC o CGG;
- los codones para Ala se pueden cambiar de GCU o GCA a GCC o GCG;
- los codones para Gly se pueden cambiar de GGU o GGA a GGC o GGG.

30

En otros casos no es posible eliminar nucleótidos A o U de los codones, pero si se puede reducir el contenido de A y U utilizando codones que contengan menos nucleótidos A y/o U, por ejemplo:

- 35 - los codones que codifican Phe se pueden cambiar de UUU a UUC;
- los codones que codifican Leu se pueden cambiar de UUA, CUU o CUA a CUC o CUG;
- los codones que codifican Ser se pueden cambiar de UCU o UCA o AGU a UCC, UCG o AGC;
- 40 - el codón que codifica Tyr se puede cambiar de UAU a UAC;
- el codón de terminación UAA se puede cambiar de UAG a UGA;
- 45 - el codón que codifica Cys se puede cambiar de UGU a UGC;
- el codón que codifica His se puede cambiar de CAU a CAC;
- el codón que codifica Gln se puede cambiar de CAA a CAG;
- 50 - los codones que codifican Ile se pueden cambiar de AUU o AUA a AUC;
- los codones que codifican Thr se pueden cambiar de ACU o ACA a ACC o ACG;
- 55 - el codón que codifica Asn se puede cambiar de AAU a AAC;
- el codón que codifica Lys se puede cambiar de AAA a AAG;
- los codones que codifican Val se pueden cambiar de GUU o GUA a GUC o GUG;
- 60 - el codón que codifica Asp se puede cambiar de GAU a GAC;
- el codón que codifica Glu se puede cambiar de GAA a GAG.

65

En cambio, en el caso de los codones para Met (AUG) y Trp (UGG) no existe ninguna posibilidad de modificación de la secuencia.

Evidentemente, las sustituciones anteriormente indicadas se pueden utilizar individualmente o en cualquier combinación posible para aumentar el contenido de G/C del RNAm modificado con respecto a la secuencia original. Por ejemplo, todos los codones para Thr presentes en la secuencia original (de tipo salvaje) se pueden cambiar a ACC (o ACG). Sin embargo, preferentemente se utilizan combinaciones de las posibilidades de sustitución anteriormente

5 mencionadas, por ejemplo:

- sustitución de todos los codones que codifican Thr en la secuencia original por ACC (o ACG) y sustitución de todos los codones que originalmente codifican Ser por UCC (o UCG o AGC);
- 10 - sustitución de todos los codones que codifican Ile en la secuencia original por AUC, sustitución de todos los codones que originalmente codifican Lys por AAG y sustitución de todos los codones que originalmente codifican Tyr por UAC;
- 15 - sustitución de todos los codones que codifican Val en la secuencia original por GUC (o GUG), sustitución de todos los codones que originalmente codifican Glu por GAG, sustitución de todos los codones que originalmente codifican Ala por GCC (o GCG) y sustitución de todos los codones que originalmente codifican Arg por CGC (o CGG);
- 20 - sustitución de todos los codones que codifican Val en la secuencia original por GUC (o GUG), sustitución de todos los codones que originalmente codifican Glu por GAG, sustitución de todos los codones que originalmente codifican Ala por GCC (o GCG), sustitución de todos los codones que originalmente codifican Gly por GGC (o GGG) y sustitución de todos los codones que originalmente codifican Asn por ACC;
- 25 - sustitución de todos los codones que codifican Val en la secuencia original por GUC (o GUG), sustitución de todos los codones que originalmente codifican Phe por UUC, sustitución de todos los codones que originalmente codifican Cys por UGC, sustitución de todos los codones que originalmente codifican Leu por CUG (o CUC), sustitución de todos los codones que originalmente codifican Gin por CAG y sustitución de todos los codones que originalmente codifican Pro por CCC (o CCG); etc.

30 Preferentemente, el contenido de G/C del área que codifica el péptido o polipéptido antigénico (o de cualquier otra sección presente en caso dado) del RNAm se incrementa como mínimo en un 7%, preferiblemente como mínimo en un 15%, de forma especialmente preferente como mínimo en un 20%, con respecto al contenido de G/C del área codificada del RNAm de tipo salvaje que codifica el péptido o polipéptido correspondiente.

35 En este contexto es especialmente preferente aumentar al máximo el contenido de G/C del RNAm modificado de este modo, principalmente en el área que codifica como mínimo un péptido o polipéptido antigénico, en comparación con la secuencia de tipo salvaje.

Otra modificación preferente de un RNAm dado el caso contenido en la vacuna caracterizada en la presente invención se basa en el conocimiento de que la eficacia de traducción también está determinada por la diferencia en la frecuencia de la presencia de RNAt en las células. Si una secuencia de RNA presenta un contenido elevado de los, así llamados, codones “raros”, el RNAm correspondiente se traduce de forma claramente peor que en caso de presencia de codones que codifican RNAt relativamente “frecuentes”.

45 Por consiguiente, de acuerdo con la invención, el área que codifica el antígeno (es decir, el péptido o polipéptido con efecto antigénico) del RNAm (que puede estar contenido en la vacuna) se modifica con respecto al área correspondiente del RNAm de tipo salvaje de tal modo que como mínimo un codón de la secuencia de tipo salvaje, que codifica un RNAt relativamente raro en la célula, se sustituye por un codón que codifica un RNAt que es relativamente frecuente en la célula y que porta el mismo aminoácido que el RNAt relativamente raro.

50 Mediante esta modificación, las secuencias de RNA se modifican de tal modo que se introducen codones para los que hay disponibles RNAt frecuentemente presentes.

Los especialistas saben qué RNAt son relativamente frecuentes en la célula y cuáles son relativamente raros; véase por ejemplo Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666.

De acuerdo con la invención, mediante esta modificación, todos los codones de la secuencia de tipo salvaje que codifican un RNAt relativamente raro en la célula pueden ser sustituidos en cada caso por un codón que codifica un RNAt que es relativamente frecuente en la célula y que porta el mismo aminoácido que el RNAt relativamente raro.

60 De forma especialmente preferente, la proporción de G/C secuencial aumentada en el RNAm tal como se ha descrito más arriba, en particular aumentada al máximo, se combina con los codones “frecuentes” sin modificar la secuencia de aminoácidos del péptido o polipéptido antigénico (uno o más) codificado por el área codificadora del RNAm. Esta forma de realización preferente pone a disposición un RNAm traducido y estabilizado de forma especialmente eficaz para la vacuna según la invención.

65 Preferentemente, además del RNA modificado químicamente en el caso del agente inmunoestimulador producido y además del agente inmunoestimulador en el caso de la vacuna según la invención, el agente inmunoestimulador y

la vacuna según la invención contienen un soporte farmacéuticamente compatible y/o un vehículo farmacéuticamente compatible. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980), cuyo contenido completo forma parte de la exposición de la presente invención, se dan a conocer métodos correspondientes para la formulación y producción adecuada del agente inmunoestimulador y de la vacuna según la invención. Para la administración parenteral, como sustancias de soporte entran en consideración por ejemplo agua estéril, soluciones de sal común estériles, polialquilén-glicoles, naftalenos hidrogenados y principalmente polímeros de lactida, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno biocompatibles. Los agentes inmunoestimuladores y vacunas según la invención pueden contener sustancias de relleno o sustancias como lactosa, manitol, sustancias para el enlace covalente de polímeros, como por ejemplo polietilén-glicol, en haptenos, péptidos o polipéptidos antigénicos según la invención, complejación con iones metálicos o inclusión de materiales en o sobre preparaciones especiales de compuestos poliméricos, como por ejemplo polilactato, ácido poliglicólico, hidrogel, o sobre liposomas, microemulsión, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, fragmentos de eritrocitos o esferoplastos. Las formas de realización correspondientes del agente inmunoestimulador y de la vacuna se eligen en función de comportamientos físicos, por ejemplo teniendo en cuenta la solubilidad, la estabilidad, la biodisponibilidad o la degradabilidad. La liberación controlada o constante de los componentes de principio activo según la invención en la vacuna o en el agente inmunoestimulador incluye formulaciones basadas en depósitos lipófilos (por ejemplo ácidos grasos, ceras o aceites). En el marco de la presente invención también se dan a conocer revestimientos de sustancias inmunoestimuladoras y sustancias de vacuna según la invención, o de composiciones que contienen estas sustancias, a saber: revestimientos con polímeros (por ejemplo poloxámeros o poloxaminas). Además, las sustancias o composiciones inmunoestimuladoras o de vacuna según la invención también pueden presentar revestimientos protectores, por ejemplo inhibidores de proteasa o amplificadores de permeabilidad. Los soportes preferentes son típicamente materiales de soporte acuosos, utilizándose agua para inyección (WFI) o agua tamponada con fosfato, citrato, HEPES o acetato, etc., y ajustándose el pH típicamente a un valor de 5,0 a 8,0, preferentemente de 6,5 a 7,5. Preferentemente, el soporte o el vehículo contendrán adicionalmente componentes salinos, por ejemplo cloruro sódico, cloruro potásico u otros componentes, que hacen que la solución por ejemplo se vuelva isotónica. Además de los componentes anteriormente mencionados, el soporte o el vehículo también pueden contener componentes adicionales, como albúmina sérica humana (HSA), polisorbato 80, azúcares o aminoácidos.

El modo de administración y la dosificación del agente inmunoestimulador producido y de la vacuna según la invención dependen de la enfermedad a tratar, en caso dado del estado de avance de la misma, del antígeno (en el caso de la vacuna) y también del peso corporal, la edad y el sexo del paciente.

Por consiguiente, en estas formulaciones, la concentración del RNA modificado químicamente y también del ácido nucleico codificador dado el caso contenido en la vacuna puede variar dentro de amplios márgenes: de 1 μg a 100 mg/ml. El agente inmunoestimulador producido y la vacuna según la invención se administran al paciente preferentemente por vía parenteral, por ejemplo intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular. También es posible administrar el agente inmunoestimulador o la vacuna por vía tópica u oral.

Las figuras muestran:

- La figura 1 muestra resultados de la estimulación de la maduración de células dendríticas (DC) de ratones mediante RNA modificado químicamente según la invención en comparación con RNAm, RNAm asociado con protamina y DNA. Las DC de ratón se estimularon con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAm (pp65 para RNAm-pp65, β -Gal para RNAm- β -galactosidasa), RNAm estabilizado mediante protamina (protamina+pp65, protamina+ β -Gal); DNA (CpG DNA 1668, DNA 1982 y CpG DNA 1826) y RNA modificado con fosforotioato (RNA 1668, RNA 1982 y RNA 1826), y la activación de DC se determinó a través de la medición de la liberación de IL-12 (figura 1A) e IL-6 (figura 1B) mediante ELISA con citoquina. Como controles negativos en las dos series de ensayos se utilizaron respectivamente medio sin sondas de ácido nucleico y medio con protamina añadida. Como comparación positiva se utilizó lipopolisacárido (LPS). Los oligodesoxirribonucleótidos (ODN) CpG DNA 1668 y CpG DNA 1626 contienen en cada caso un motivo CpG. Se sabe que estos ODN provocan una estimulación de DC (véase patente US 5,663,153). El ODN DNA 1982 presenta la misma secuencia que el CpG DNA 1826, excepto que el motivo CpG ha sido eliminado mediante una sustitución de C detrás de G. La secuencia de los oligorribonucleótidos CpG RNA 1668, RNA 1982 y CpG RNA 1826 según la invención estabilizados mediante fosforotioato corresponde a la de los ODN comparativos arriba mencionados con el mismo número de identificación. En comparación con el RNAm normal, las especies de RNAm estabilizadas con protamina sólo muestran una activación débil de las DC. En comparación, en los dos experimentos con los oligorribonucleótidos modificados con fosforotioato según la invención se provoca una liberación de interleuquina mucho más fuerte, cuyos valores son comparables a los del control positivo (LPS). En comparación con el mRNA asociado con protamina, en el caso de la estimulación mediante oligorribonucleótidos modificados con fosforotioato se produjo una liberación de IL-12 o IL-6 más de dos veces mayor. Además, esta liberación de interleuquina sorprendentemente grande debido a los oligorribonucleótidos según la invención es independiente de los motivos CpG, como muestra la comparación del oligorribonucleótido modificado con fosforotioato según la invención RNA 1982 con el ODN DNA 1982. El ODN DNA 1982 no provoca ninguna liberación de interleuquina en las DC, mientras que el RNA 1982 produce una liberación de interleuquina que en el caso de la IL-12 es comparable con el control positivo LPS y en el caso de la IL-6 incluso lo supera.

- La figura 2 muestra los resultados de la determinación de la expresión de un marcador de activación de superficie (CD86) en DC que habían sido tratadas con las sondas tal como se ha descrito más arriba en relación con la figura 1. Para determinar la expresión del CD86, 3 días después del tratamiento de las DC con las sondas indicadas una parte

de las DC se marcó con un anticuerpo monoclonal específico anti-CD86 y la proporción porcentual de las células que expresaban CD86 se determinó mediante citometría de flujo. Sólo se observó una expresión de CD86 significativa en el caso de los ODN comparativos, que presentan un motivo CpG, y de las especies de RNA modificadas con fosforotioato según la invención. Sin embargo, todos los valores de los estimulantes de ácido nucleico eran claramente inferiores a los del control positivo (LPS). Además, la determinación de CD86 confirma que, al contrario que las especies de DNA, la activación de DC provocada mediante RNA modificado con fosforotioato según la invención es independiente de los motivos CpG: mientras que el ODN libre de CpG DNA 1982 no provoca ninguna expresión de CD86, en el caso del oligorribonucleótido modificado con fosforotioato RNA 1982 se detectó una expresión de CD86 en un 5% de las DC.

- La figura 3 muestra los resultados de una prueba de reacción alogénica utilizando DC, que se activaron *in vitro* con las sondas indicadas en el eje "x" (véase también la figura 1). Tres días después de la estimulación, las DC se añadieron a células de bazo frescas de un animal alogénico y seis días más tarde se utilizaron en una prueba de citotoxicidad, en la que se midió la liberación de ^{51}Cr en células diana (P 815) en comparación con células de control (EL 4). Las células diana o células de control se dispusieron en placas en una cantidad constante y después se incubaron en cada caso con tres diluciones diferentes de las células de bazo cocultivadas con las DC (células efectoras), de modo que se obtuvo una proporción de células efectoras (E) con respecto a células diana (o células de control) (T) de 41:1, 9:1 ó 2:1, respectivamente. En el eje "y" se indica la destrucción específica en porcentaje, que se calcula de la siguiente manera: $[(\text{radiactividad liberada medida} - \text{radiactividad liberada espontánea}) / (\text{liberación máxima de radiactividad} - \text{radiactividad liberada espontánea})] \times 100$. Con la dilución más baja, las DC estimuladas con RNAm- β -galactosidasa asociado con protamina sólo logran provocar una destrucción de células diana a través de las células efectoras con un 20% de especificidad. En cambio, con la dilución más baja, las DC estimuladas mediante oligorribonucleótido modificado con fosforotioato provocan una destrucción de las células diana a través de las células efectoras con una especificidad de casi un 60%, es decir, aproximadamente el triple. Este valor es comparable con el del control positivo (LPS) y un ODN comparativo que contiene un motivo CpG (CpG DNA 1668). En cambio, un ODN sin motivo CpG (DNA 1982) es inactivo, lo que confirma los resultados de los experimentos anteriores de acuerdo con la figura 1 y la figura 2. El RNAm-pp65 (sin protamina), el RNAm- β -galactosidasa (sin protamina) y la protamina y el medio solos no provocan ninguna destrucción específica.

- La figura 4 muestra los resultados de la estimulación de la maduración de células dendríticas (DC) de ratones B6 en comparación con ratones MyD88-Knock-Out mediante oligorribonucleótidos modificados químicamente según la invención y ODN comparativo. Como control negativo se utilizó la estimulación únicamente con el medio. La estimulación se llevó a cabo tal como se ha descrito más arriba en relación con la figura 1 y la activación de DC se determinó a través de la medición de la liberación de IL-12 (figura 4A) e IL-6 (figura 4B) mediante ELISA con citoquina. En el eje "y" de la figura 4A está representada la concentración de IL-12 en ng/ml, mientras que en el eje "y" de la figura 4B está representada la absorción a 405 nm (valor máximo de absorción del reactivo de detección), que es directamente proporcional a la concentración de interleuquina. En los ratones MyD88 está eliminada la proteína MyD88, una proteína de la cascada de señales de los, así llamados, "toll-like receptors" (TLR). Por ejemplo, se sabe que el TLR-9 interviene en la activación de DC por DNA-CpG. Las DC de ratones de tipo salvaje B6 son activadas por los oligorribonucleótidos modificados con fosforotioato según la invención CpG RNA 1688 y RNA 1982, y también, conforme a lo esperado, por el ODN comparativo CpG DNA 1668. Por otra parte, el ODN DNA 1982 (sin motivo CpG) es ineficaz. En cambio, ninguna de las sondas puede provocar una liberación digna de mención de IL-12 o IL-6 en DC de ratones MyD88. Por ello, parece que la MyD88 es necesaria para la activación de DC mediante los oligorribonucleótidos modificados químicamente según la invención y mediante CpG-ODN.

- La figura 5 muestra los resultados de la estimulación de DC mediante el oligorribonucleótido modificado químicamente según la invención RNA 1982 y dos ODN comparativos que, antes de ser utilizados para la activación de DC, se incubaron durante 2, 26 ó 72 horas a 37°C con un medio que no estaba libre de RNasa. Como comparación, en cada caso se utilizó una sonda sin incubación previa ($t=0$). Las sondas identificadas con "1:1" estaban diluidas 1:1 con tampón en comparación con las otras sondas respectivas. La activación de DC se midió de nuevo a través de la determinación de la liberación de IL-12 (figura 5A) e IL-6 (figura 5B) mediante ELISA con citoquina. La activación de DC mediante DNA-CpG es independiente de una incubación previa con medio. Conforme a lo esperado, el ODN comparativo sin motivo CpG no provoca ninguna liberación de interleuquina. En el caso del oligorribonucleótido según la invención RNA 1982 se mide una clara liberación de interleuquina sin incubación con medio ($t=0$). En el ensayo de estimulación con el oligorribonucleótido según la invención, después de 2 horas de incubación a 37°C con un medio no libre de RNasa ya no se observa ninguna liberación de interleuquina digna de mención.

- La figura 6 muestra el resultado de un experimento similar al representado en la figura 5B, pero en este caso se registró una evolución temporal más precisa del efecto de la descomposición de RNA en la estimulación de DC: el oligorribonucleótido modificado químicamente según la invención RNA 1982 se utilizó de nuevo para la estimulación de DC, y la activación de DC se determinó a través de la medición de la liberación de IL-6. Antes de la estimulación, el oligorribonucleótido se incubó durante 15, 30, 45 ó 60 minutos con medio no libre de RNasa, tal como se ha descrito más arriba en relación con la figura 5. Como comparación se utilizó de nuevo una sonda no incubada con el medio ($t=0$). Como control positivo se utilizó el ODN CpG DNA 1668 y como control negativo se utilizó el medio solo. Sin una incubación previa con medio no libre de RNasa se produce de nuevo una fuerte activación de DC por el RNA modificado químicamente según la invención, como demuestra la concentración de IL-6 de más de 5 ng/ml. Este valor baja a algo más de 2 ng/ml en un plazo de una hora de incubación bajo condiciones de degradación de RNA. Esto demuestra que, aunque el RNA modificado químicamente se descompone bajo condiciones fisiológicas mucho

más rápidamente que las especies de DNA, la duración de su vida media es claramente suficiente para que se pueda desarrollar el efecto inmunoestimulador según la invención.

- La figura 7 muestra los resultados de la estimulación de la proliferación de células B de ratón con ribonucleótidos modificados con fosforotioato según la invención (CpG RNA 1668, CpG RNA 1826 y RNA 1982) en comparación con especies de DNA (con motivo CpG: CpG DNA 1668 y CpG DNA 1826; sin motivo CpG: DNA 1982). Como control se utilizó medio solo sin sonda de ácido nucleico. Los ODN con motivo CpG produjeron una proliferación muy alta de células B con casi un 90% de células B proliferantes. El ODN DNA 1982 (sin motivo CpG), que había resultado inactivo con respecto a la estimulación de DC (véanse las figuras 1 a 5), también provocó una proliferación moderada de células B (casi un 20% de células proliferantes). En cambio, la estimulación de las células B mediante los oligorribonucleótidos modificados químicamente según la invención condujo a una proporción porcentual de células B proliferantes que correspondía aproximadamente a la del control negativo o que era incluso inferior a ésta (en todos los caso < 10% de células proliferantes).

- La figura 8 muestra los resultados de una investigación *in vivo* de los efectos que tiene el RNA modificado químicamente según la invención, en comparación con el DNA, en el bazo de ratones. A los ratones se les inyectó por vía subcutánea la especie de ácido nucleico correspondiente junto con una mezcla de antígenos (péptido TPHAR-GL ("TPH") + β -galactosidasa (" β -Gal"). Diez días después se extirpó el bazo de los ratones y se pesó. En el eje "y" está representado el peso del bazo en g. Las barras muestran en cada caso el valor medio de dos experimentos independientes. Mientras que en el caso de los ratones tratados con el RNA modificado químicamente según la invención + mezcla de antígenos, el peso del bazo permanece inalterado con aproximadamente 0,08 g en comparación con el control (PBS), en los ratones que habían recibido una inyección de DNA + mezcla de antígenos se observa una esplenomegalia pronunciada, que se manifiesta en un peso medio del bazo de más de 0,1 g.

Los siguientes ejemplos explican más detalladamente la presente invención.

Ejemplos

Para la realización de los ejemplos se utilizaron los siguientes materiales y métodos.

1. Cultivo celular

Las células dendríticas (DC) se obtuvieron mediante lavado de la médula de la pata trasera de ratones BLAB/c, B6 o MyD88-Knock-Out con medio, tratamiento con solución de Gey (para la lisis de los glóbulos rojos) y filtración a través de un tamiz celular. Después, las células se incubaron durante 6 días en IMDM que contenía 10% suero bovino fetal inactivado con calor (FCS; de PAN), 2 mM L-glutamina (de Bio Whittaker), 10 mg/ml de estreptomicina, 10 U/ml de penicilina (PEN-STREP, de Bio Whittaker) y 51 U/ml de GM-CFS (denominado en lo sucesivo "medio completo"), en placas de cultivo con 24 pocillos. El medio se retiró después de dos y después de cuatro días y en cada caso se añadió un volumen equivalente de medio fresco, que contenía la concentración de GM-CFS anteriormente indicada.

2. Activación de las DC

Seis días después, las DC se trasladaron a una placa de cultivo con 96 pocillos, introduciéndose en cada pocillo 200.000 células en 200 μ l de medio completo. Las sondas de ácido nucleico (DNA, RNA modificado químicamente, RNAm o RNA estabilizado con protamina) se añadieron en una concentración de 10 μ g/ml.

3. Condiciones de descomposición de RNA

En cada caso, 5 μ l de las sondas de ácido nucleico correspondiente (2 μ g/ μ l DNA, RNA no modificado o RNA modificado químicamente según la invención) se incubaron en 500 μ l de medio completo durante 2, 26 ó 72 horas, o durante 15, 30, 45 ó 60 minutos, a 37°C. Como control se utilizó una sonda no incubada (t=0). A continuación se estimularon DC con sondas tal como se describe más arriba en el punto 2.

4. ELISA con citoquina

Diecisiete horas después de la adición del estimulante correspondiente se retiraron 100 μ l del sobrenadante y se añadieron 100 μ l de medio fresco. Las placas ELISA (Nunc Maxisorb) se revistieron durante la noche con anticuerpos capturadores (Pharmigen) en tampón de unión (0,02% NaN₃, 15 mM Na₂CO₃, 15 mM NaHCO₃, pH 9,7). Los sitios de unión no específica se saturaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), que contenía un 1% de albúmina de suero bovino (BSA). Después, en cada uno de estos pocillos así tratados se dispusieron 100 μ l del sobrenadante de cultivo celular y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Se añadió anticuerpo biotinilado después de 4 pasos de lavado con PBS, que contenía un 0,05% de Tween-20. La reacción de detección se inició mediante adición de peroxidasa de rábano acoplada con estreptavidina (HRP-estreptavidina) y el substrato ABTS (medición de la absorción a 405 nm).

5. Citometría de flujo

Para la citometría de flujo monocromática se incubaron 2×10^5 células durante 20 minutos a 4°C en PBS, que contenía 10% FCS, anticuerpos anti-CD86 monoclonales conjugados con FITC (Becton Dickinson) en la concentración adecuada. Después de dos lavados y fijación en 1% formaldehído, las células se analizaron con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) y el software CellQuestPro.

6. Prueba de reacción alogénica mediante liberación de ^{51}Cr

Unas células de bazo de ratones B6 (C57b16, H-2^a-haplotipo) se incubaron durante 5 días con las DC de ratones BLAB/c estimuladas de acuerdo con el anterior punto 2 (H-2^a-haplotipo) en una proporción de 1:3, y se utilizaron como células efectoras.

En cada caso 5.000 células EL-4 (como control) o células P815 (como células diana) se cultivaron en placas de 96 pocillos en IMDM con 10% FCS y se cargaron durante una hora con ^{51}Cr . Las células marcadas con ^{51}Cr se incubaron con las células efectoras durante 5 horas (volumen final 200 μl). En cada caso se analizaron 3 proporciones diferentes entre las células efectoras o células de control y las células diana (E/T): E/T = 41, 9 ó 2. Para determinar la destrucción específica se tomaron 50 μl del sobrenadante y se midió la radiactividad utilizando una placa de escintilación de fases sólidas (Luma Plate-96, Packard) y un contador de escintilaciones para placas de microtitulación (1450 Microbeta Plus). La proporción porcentual de la liberación de ^{51}Cr se determinó a partir de la cantidad del ^{51}Cr (A) liberado en el medio y se comparó con la liberación espontánea de ^{51}Cr de células diana (B) y el contenido total de ^{51}Cr de células diana (C), que se lisaron con 1% Triton-X-100, resultando la destrucción específica de la siguiente fórmula: % destrucción = $[(A - B)/(C - B)] \times 100$.

7. Prueba de proliferación de células B

Las células de bazo frescas de un ratón se lavaron dos veces con 10 ml de PBS y se recogieron en PBS en una concentración de 1×10^7 células/ml. Se añadió CSFE (marcado con FITC) en una concentración final de 500 nM y se incubó durante 3 minutos. A continuación se lavó dos veces con medio. En cada caso se analizó en el citómetro de flujo (FACScalibur; Becton Dickinson) una muestra sin teñir y una muestra teñida. A 200.000 células/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fondo en forma de U) en 200 μl de medio se le añadió DNA CpG o RNA en una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El cuarto día después de la estimulación, las células se tiñeron con V220 CyChrome y CD 69 PE se analizaron en el FACS.

8. Análisis *in vivo* de la esplenomegalia

50 μg de RNA modificado químicamente u ODN comparativo, junto con una mezcla de antígenos (100 μg de péptido TPHARGL + 100 μg de b-galactosidasa) en 200 μl de PBS en cada caso, se inyectaron por vía subcutánea en ratones BALB/c (para cada sonda se utilizaron dos ratones). Diez días después se extirpó el bazo de los ratones y se pesó.

9. Secuencias de los ácidos nucleicos utilizados

Oligodesoxirribonucleótidos (ODN):

CpG DNA 1668: 5'-TCCATGACGTTCTCTGATGCT-3'

CpG DNA 1826: 5'-TCCATGACGTTCTCTGACGTT-3'

DNA 1982: 5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3'

Oligorribonucleótidos (modificados con fosforotioato):

CpG RNA 1668: 5'-UCCAUGACGUUCCUGAUGCU-3'

CpG RNA 1826: 5'-UCCAUGACGUUCCUGACGUU-3'

RNA 1982: 5'-UCCAGGACUUCUCUCAGGUU-3'

Ejemplo 1

Con el fin de determinar el poder de diferentes especies de ácido nucleico para la estimulación de la maduración de DC, se obtuvieron DC de ratones BALB/c y se trataron con los oligonucleótidos indicados más arriba en el punto 6. Como sonda adicional se utilizó en cada caso RNAm- β -galactosidasa estabilizado con protamina y RNA-pp65. La

liberación de IL-12 o IL-6 por las DC estimuladas se determinó mediante ELISA. La estimulación de DC mediante RNAm asociando con protamina dio como resultado una liberación débil de interleuquina. En cambio, la liberación de interleuquina provocada por las especies de RNA modificadas con fosforotioato según la invención era considerablemente mayor e incluso era comparable a la del control positivo (estimulación por LPS) (figuras 1A y 1B). Las ODN comparativas, que contenían un motivo CpG, mostraban la liberación esperada de interleuquina por las DC, sin embargo, la liberación de interleuquina era claramente inferior al valor producido por la secuencia correspondiente a la especie de RNA según la invención (figuras 1A y 1B).

Para confirmar la inducción de la maduración de las DC demostrada mediante el ELISA con citoquina, la expresión de un marcador de superficie específico para DC maduras (CD86) se determinó mediante citometría de flujo. Las especies de RNA modificadas con fosforotioato según la invención podían provocar una clara expresión de CD86 (figura 2), pero no el RNAm o el RNAm asociado con protamina.

Ejemplo 2

También se comprobó si las DC activadas mediante las especies de RNA modificadas químicamente, que tienen efecto inmunoestimulador, son capaces de provocar una respuesta inmune en un sistema alogénico (figura 3). Para ello, las células de bazo de ratón (B6) se activaron con las DC estimuladas y se juntaron como células efectoras con células diana alogénicas (P815), determinándose la destrucción de las células diana con ayuda de una prueba de liberación de ⁵¹Cr. En cada caso, tres diluciones diferentes de células efectoras se pusieron en contacto con una cantidad constante de células diana.

De acuerdo con ello, en comparación con el RNAm estabilizado con protamina, el RNA modificado con fosforotioato es mucho más capaz de provocar la maduración de DC en células activadas que pueden iniciar una respuesta inmune por células efectoras. Sorprendentemente se puede comprobar que las DC activadas por RNA modificado con fosforotioato pueden provocar una respuesta inmune igual de fuerte que la provocada por ODN que presentan motivos CpG.

Ejemplo 3

Es sabido que el TLR-9 (en inglés: "toll-like receptor 9") interviene en la activación de DC por CpG-DN (Kaisho *et al.*, Trends Immunol. 2001, 22 (2): 78-83). Por ello se investigó si la cascada de señales de TLR también interviene en la activación de DC provocada por el RNA modificado químicamente, que tiene efecto inmunoestimulador. Para ello, sobre la base de la liberación de IL-12 e IL-6, la activación de DC de ratones de tipo salvaje B6 se comparó con la activación de DC de ratones B6, que carecen de la proteína MyD88. La MyD88 interviene en la cascada de señales de TLR-9. El alto nivel de liberación de IL-12 e IL-6 de las DC de los ratones de tipo salvaje B6 confirmaba los resultados del ejemplo 1 (véanse las figuras 4A y B, barras negras). En cambio, la estimulación de DC de ratones MyD88-Knock-Out con las mismas sondas no condujo a ninguna activación (véanse las figuras 4A y B, barras blancas). Estos resultados demuestran que la MyD88, y en consecuencia la cascada de señales de TLR-9, es necesaria tanto para la activación de DC por DNA-CpG como para la activación de DC por RNA modificado químicamente.

Ejemplo 4

Con el fin de investigar si el RNA modificado químicamente según la invención está sometido a una descomposición continua y, en consecuencia, no existe ningún riesgo de persistencia en el organismo, se incubaron oligorribonucleótidos según la invención bajo condiciones de degradación de RNA (37°C, medio no tratado, es decir, no libre de RNasa) durante 2, 26 o 72 horas, y después se llevó a cabo la prueba de estimulación con DC. Después de dos horas de incubación bajo condiciones de degradación de RNA ya no se observaba ninguna activación de las DC por el RNA modificado químicamente según la invención, como demuestra la falta de liberación de IL-12 (figura 5A) e IL-6 (figura 5B). En cambio, la incubación previa de especies de DNA-CpG no tiene ninguna influencia en su eficacia para la activación de las DC. Esto demuestra que el RNA modificado químicamente según la invención se descompone después de un tiempo relativamente corto, lo que evita una persistencia en el organismo que sí se puede producir en el caso del DNA.

Sin embargo, el RNA modificado químicamente no se descompone tan rápidamente como para que no pueda desarrollar su efecto inmunoestimulador. Para demostrarlo se repitió el experimento anterior con un oligorribonucleótido modificado con fosforotioato según la invención (RNA 1982), pero la incubación bajo condiciones de degradación de RNA se llevó a cabo sólo durante 15, 30, 45 y 60 minutos. Como demuestra la liberación de IL-6 por las DC que se estimularon a continuación, después de una hora de incubación bajo condiciones de degradación de RNA también se producía una clara activación de DC (figura 6).

Ejemplo 5

La inducción de una esplenomegalia, que se ha de atribuir esencialmente a una fuerte activación de la proliferación de células B, constituye un obstáculo esencial para la utilización de DNA-CpG como adyuvante inmunomodulador en vacunas (véase más arriba Monteith *et al.*). Por ello, mediante una prueba de proliferación de células B se comprobó si el RNA modificado químicamente según la invención tenía algún efecto en la proliferación de células B. Como era de esperar, en la prueba de proliferación de células B se detectó una proporción alta de células proliferantes en el caso de

la estimulación con DNA-CpG. En cambio, sorprendentemente, el RNA modificado químicamente según la invención (independientemente de los eventuales motivos de CpG presentes en la secuencia) era completamente inactivo a este respecto (figura 7).

5 Para confirmar *in vivo* esta propiedad sorprendentemente positiva del RNA modificado químicamente según la invención se preparó una vacuna de prueba, que contenía un oligorribonucleótico de fosforotioato según la invención (RNA 1982) y una mezcla de antígenos formada por un péptido y β -galactosidasa, y se inyectó en ratones por vía subcutánea. Como comparación se utilizó una vacuna de prueba de DNA correspondiente, que contenía la misma mezcla de antígenos junto con un ODN-CpG (CpG DNA 1826). Diez días después se extirpó el bazo de los ratones y se pesó. En comparación con el control negativo (PBS), en los ratones tratados con la vacuna de prueba de DNA se produjo un aumento significativo del peso del bazo. En cambio, en los ratones tratados con la vacuna de prueba de RNA según la invención no se detectó ninguna esplenomegalia, ya que en este caso el peso del bazo no había variado con respecto al control negativo (figura 8). Estos resultados demuestran que con la utilización según la invención del RNA modificado químicamente como agente inmunoestimulador o como adyuvante en vacunas no se produce ningún efecto secundario relacionado con una proliferación no deseada de células B.

En conjunto se puede constatar que el RNA modificado químicamente provoca la maduración de DC *in vitro*. Los ejemplos anteriores prueban que el RNA modificado químicamente, en este caso en forma de oligorribonucleótidos de cadena simple sintéticos cortos (por ejemplo 20-meros) (que están modificados con fosforotioato), activa DC inmaduras provocando así su maduración, tal como se demuestra mediante la determinación de la liberación específica de citoquina (figura 1) y la expresión de marcadores de activación de superficie (figura 2). La activación de DC provocada por el RNA modificado químicamente es claramente más fuerte que la provocada por una mezcla de RNAm y el compuesto policatiónico protamina, que, como es sabido, se asocia con el RNA y de este modo lo protege frente a nucleasas. Las DC maduras mediante la estimulación con RNA de cadena simple modificado químicamente según la invención pueden iniciar una respuesta inmune a través de células efectoras, como demuestra una prueba de liberación de Cr⁵¹ en un sistema alogénico (figura 3). La activación de DC a través del RNA modificado químicamente según la invención tiene lugar probablemente a través de una cadena de señales mediada por TLR (figura 4).

Como es sabido, el DNA bacteriano tiene un efecto inmunoestimulador a causa de la presencia de motivos CG no metilados; véase la patente US 5,663,153. Esta propiedad del DNA se puede simular en oligonucleótidos de DNA estabilizados mediante modificación con fosforotioato (patente US 6,239,116). También es sabido que el RNA complejo por proteínas con carga positiva presenta un efecto inmunoestimulador (Riedl *et al.*, 2002, véase más arriba). Mediante la presente invención se ha podido demostrar que el RNA de cadena simple modificado químicamente es un agente inmunoestimulador mucho más eficaz que otros RNA, por ejemplo los complejados con protamina. A diferencia del DNA, con los oligonucleótidos de RNA modificados químicamente de este tipo no se requiere ningún motivo de CpG. Al contrario que los ribonucleótidos 20-meros, los nucleótidos de fosforotioato (no mostrados) no tienen efecto inmunoestimulador.

Sin embargo, el RNA inmunoestimulador de cadena simple modificado químicamente de la presente invención es superior al DNA inmunoestimulador principalmente porque el RNA se descompone más rápidamente y en consecuencia es eliminado del cuerpo del paciente, con lo que se reduce o evita el riesgo de persistencia y de la provocación de efectos secundarios graves (figuras 5 y 6). Por ejemplo, la utilización de DNA inmunoestimulador como adyuvante para vacunas puede provocar la formación de anticuerpos anti-DNA, el DNA puede persistir en el organismo, lo que puede conducir por ejemplo a una sobreactivación del sistema inmunológico, que, como es sabido, en los ratones resulta en una esplenomegalia (Montheith *et al.*, 1997, véase más arriba). La esplenomegalia provocada por adyuvantes de DNA se debe esencialmente a una estimulación de la proliferación de células B, que no se produce en el caso de los adyuvantes de RNA según la invención (figuras 7 y 8). Además, el DNA puede interactuar con el genoma huésped, principalmente puede provocar mutaciones por integración en el genoma huésped. Todos estos riesgos pueden ser evitados mediante la utilización del RNA de cadena simple modificado químicamente para la producción de agentes inmunoestimuladores o vacunas, en particular para la vacunación o el tratamiento contra enfermedades cancerosas o infecciosas, lográndose una inmunoestimulación mejor o comparable.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de como mínimo un RNA de cadena simple que presenta como mínimo una modificación química, consistiendo el RNA en 8 a 200 nucleótidos y conteniendo el RNA como mínimo un análogo de nucleótidos naturales, para la producción de un agente inmunoestimulador.
2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el RNA consiste en análogos de nucleótido.
3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el análogo se selecciona entre fosforotioatos, fosforamidatos, peptidonucleótidos, metil-fosfonatos, 7-deazaguanosina, 5-metil-citosina e inosina.
4. Utilización según la reivindicación 3, **caracterizada** porque el análogo es un fosforotioato.
5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque el RNA consiste en 15 a 31 nucleótidos.
6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque el RNA presenta la secuencia
- 5'-UCCAUGACGUUCCUGAUGCU-3',
- 5'-UCCAGGACUUCUCUCAGGUU-3' o
- 5'-UCCAUGACGUUCCUGACGUU-3'.
7. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque el RNA está asociado o complejoado con un compuesto policatiónico.
8. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque el agente inmunoestimulador contiene como mínimo otro adyuvante.
9. Utilización según la reivindicación 8, **caracterizada** porque el adyuvante se selecciona entre citoquinas, lipopéptidos y oligonucleótidos-CpG.
10. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 9, que también incluye un soporte farmacéuticamente compatible y/o un vehículo farmacéuticamente compatible.
11. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de un agente inmunoestimulador para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas o enfermedades cancerosas.
12. Vacuna que contiene como mínimo un RNA de cadena simple que presenta como mínimo una modificación química, consistiendo el RNA en 8 a 200 nucleótidos y conteniendo el RNA como mínimo un análogo de nucleótidos naturales, y como mínimo un antígeno.
13. Vacuna según la reivindicación 12, **caracterizada** porque el antígeno se selecciona entre péptidos, polipéptidos, células, extractos celulares, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, lípidos, glicolípidos e hidratos de carbono.
14. Vacuna según la reivindicación 13, **caracterizada** porque el antígeno de péptido o polipéptido está presente en forma de un ácido nucleico codificador del mismo.
15. Vacuna según la reivindicación 14, **caracterizada** porque el ácido nucleico es un RNAm.
16. Vacuna según la reivindicación 14, **caracterizada** porque el RNAm está estabilizado y/u optimizado en traducción.
17. Vacuna según una de las reivindicaciones 12 a 16, **caracterizada** porque el antígeno se selecciona entre antígenos tumorales y antígenos de virus, bacterias, hongos y protozoos.
18. Vacuna según la reivindicación 17, **caracterizada** porque el antígeno viral, bacteriano, fúngico o protozoológico procede de una proteína segregada.
19. Vacuna según la reivindicación 17 ó 18, **caracterizada** porque el antígeno es un poliepitopo de antígenos tumorales y antígenos de virus, bacterias, hongos o protozoos.
20. Utilización de una vacuna según una de las reivindicaciones 12 a 19 para la producción de un agente para la vacunación contra enfermedades infecciosas o enfermedades cancerosas.

Fig. 1A

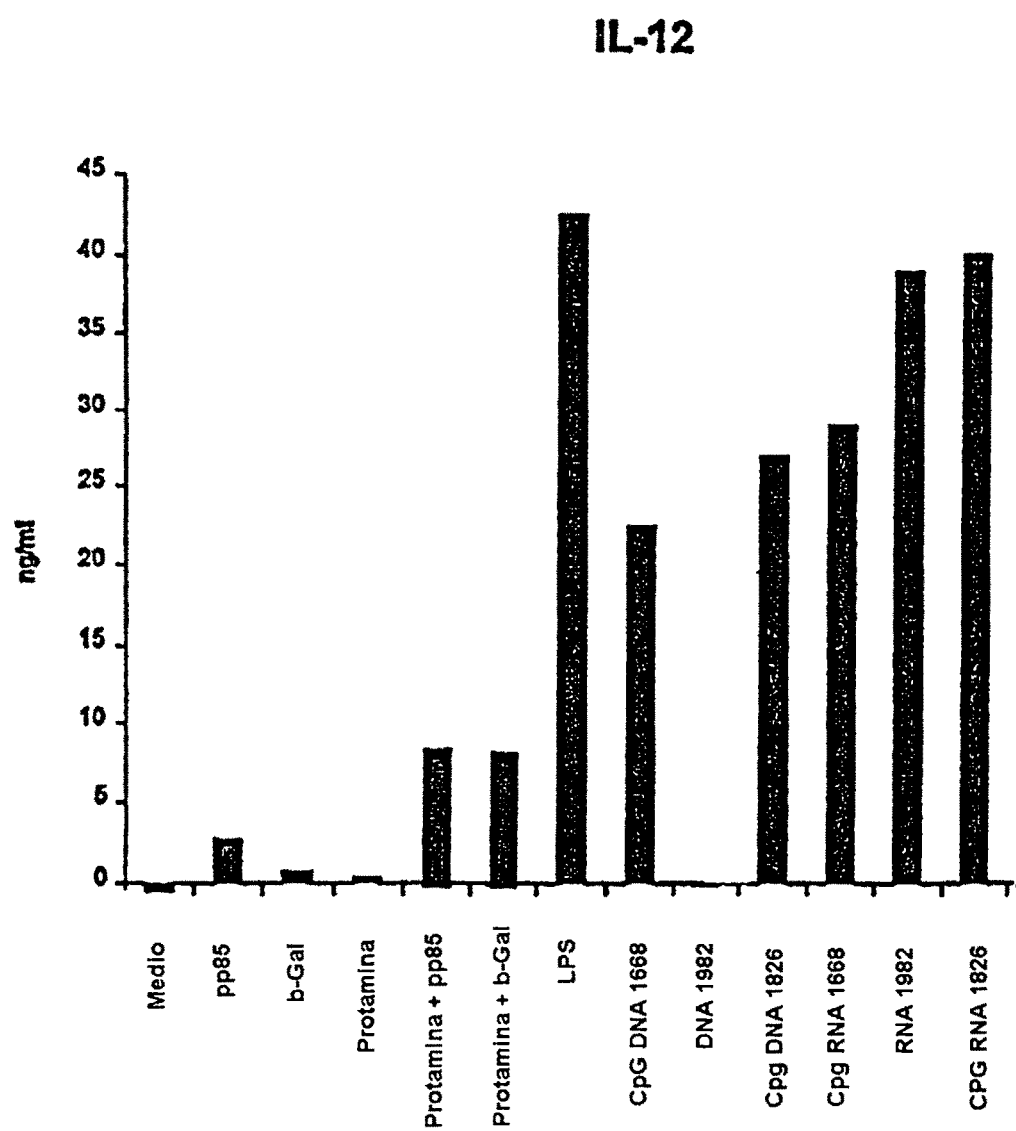


Fig. 1B

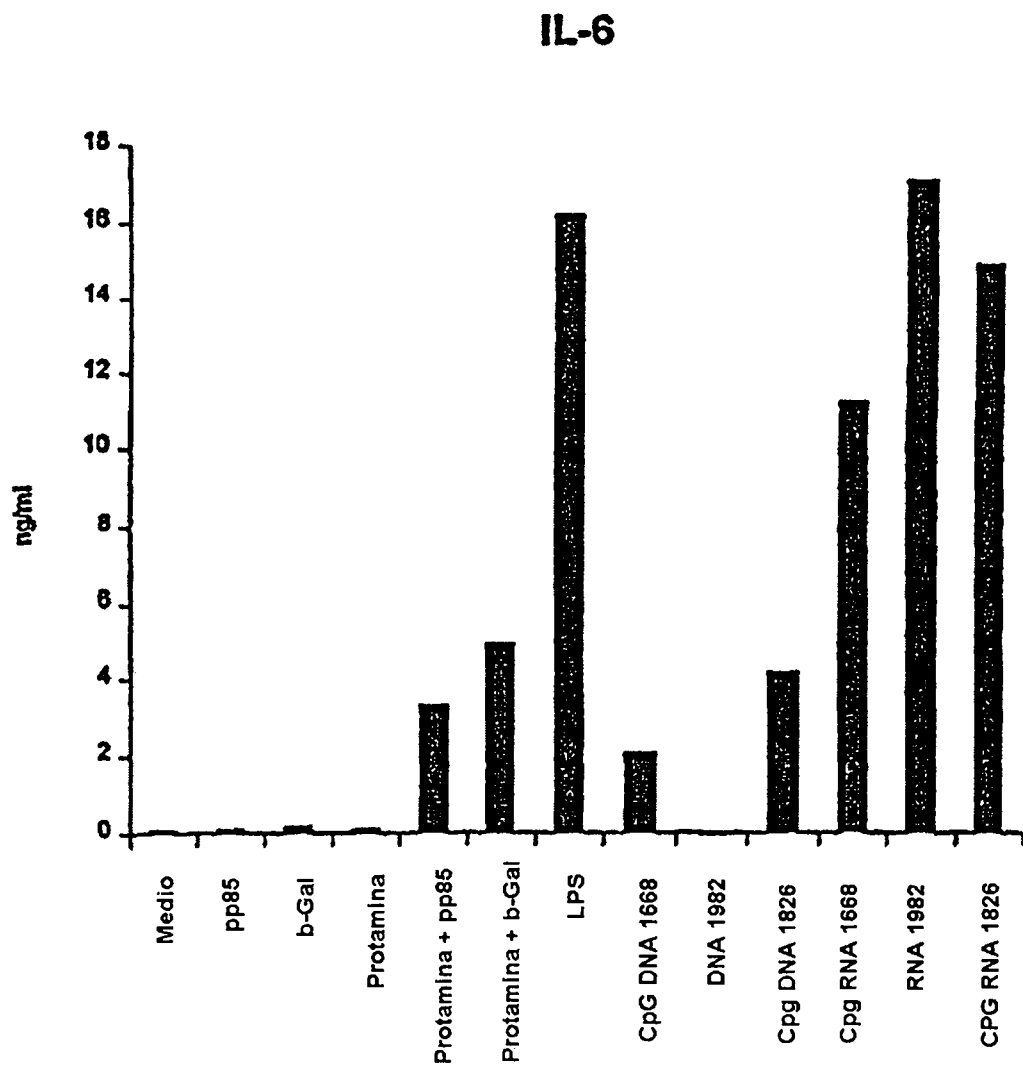


Fig. 2

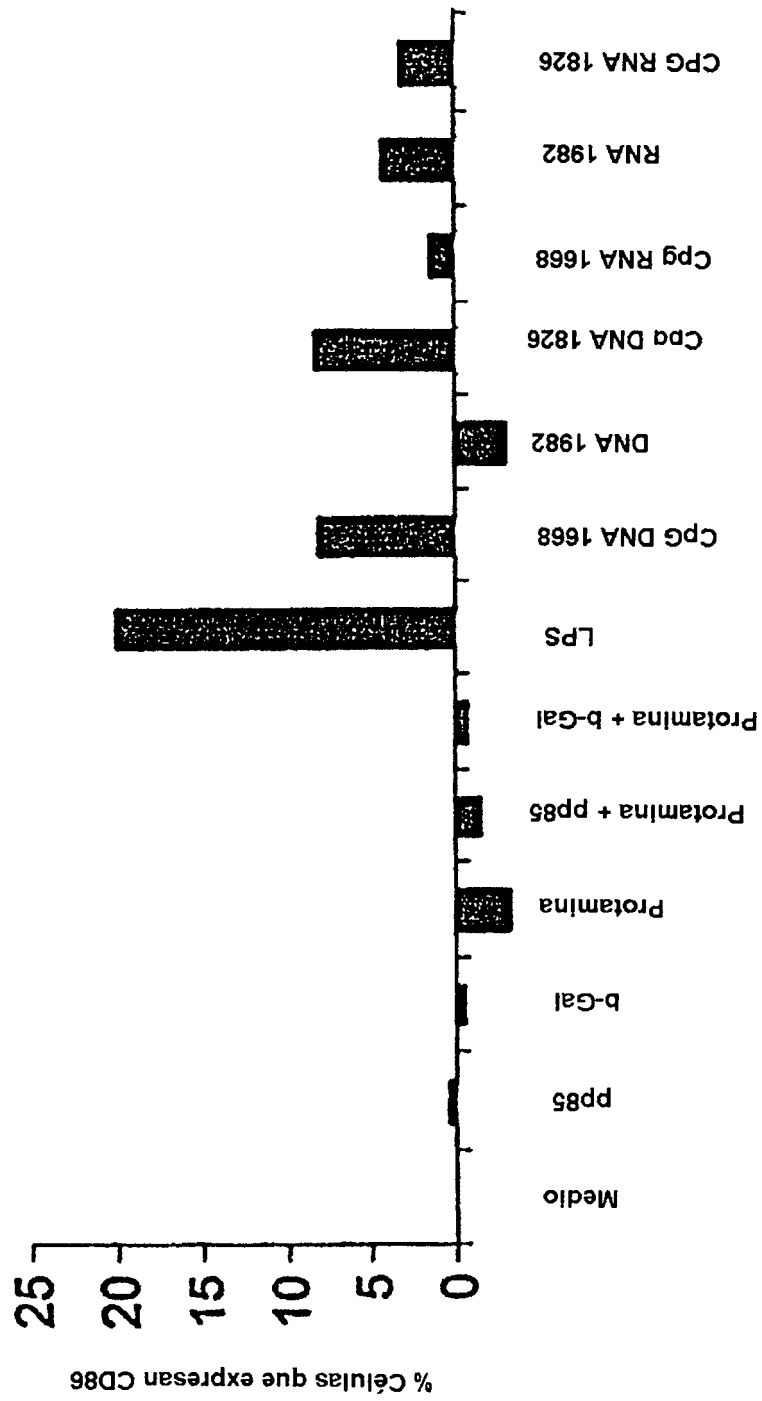


Fig. 3

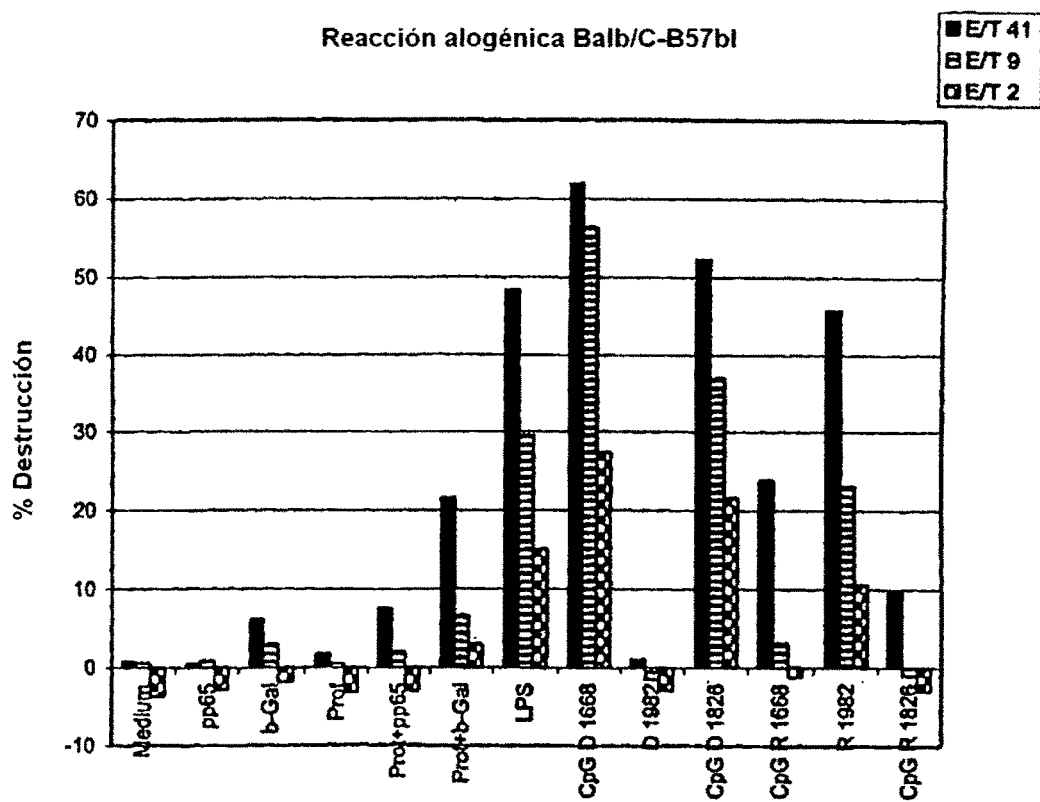


Fig. 4A

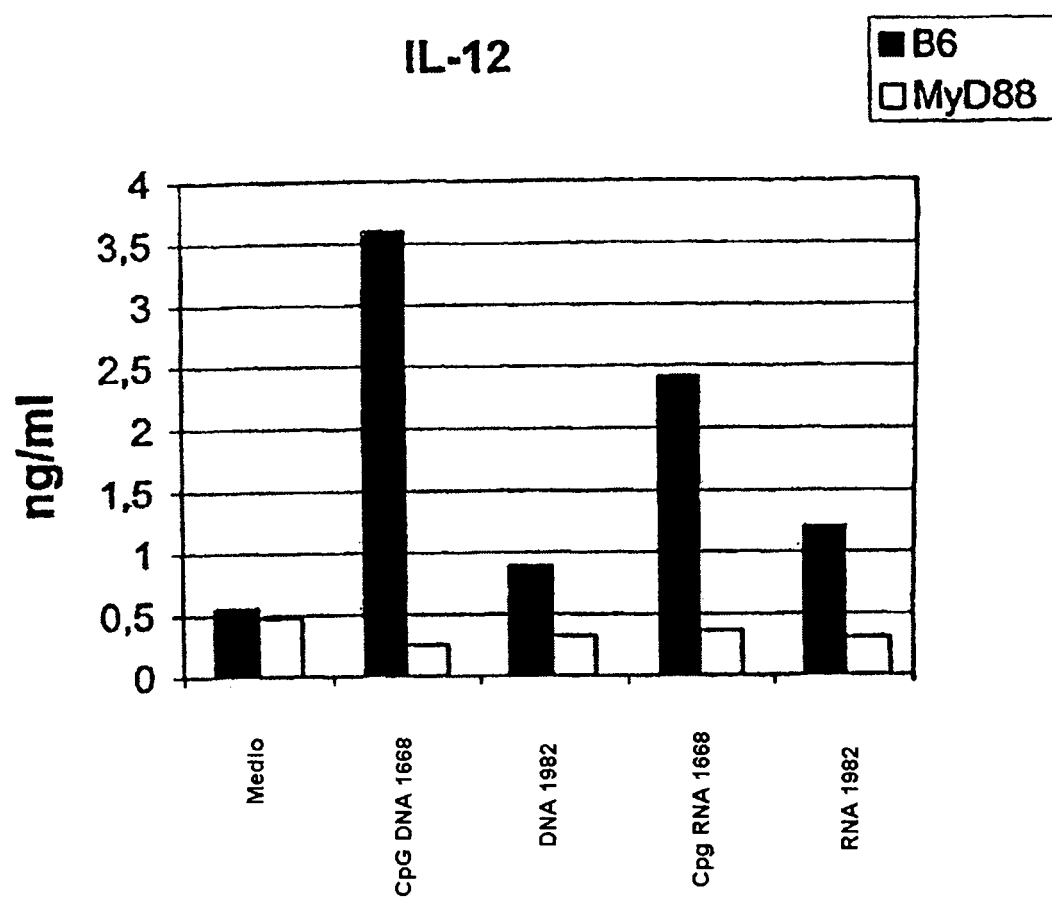


Fig. 4B

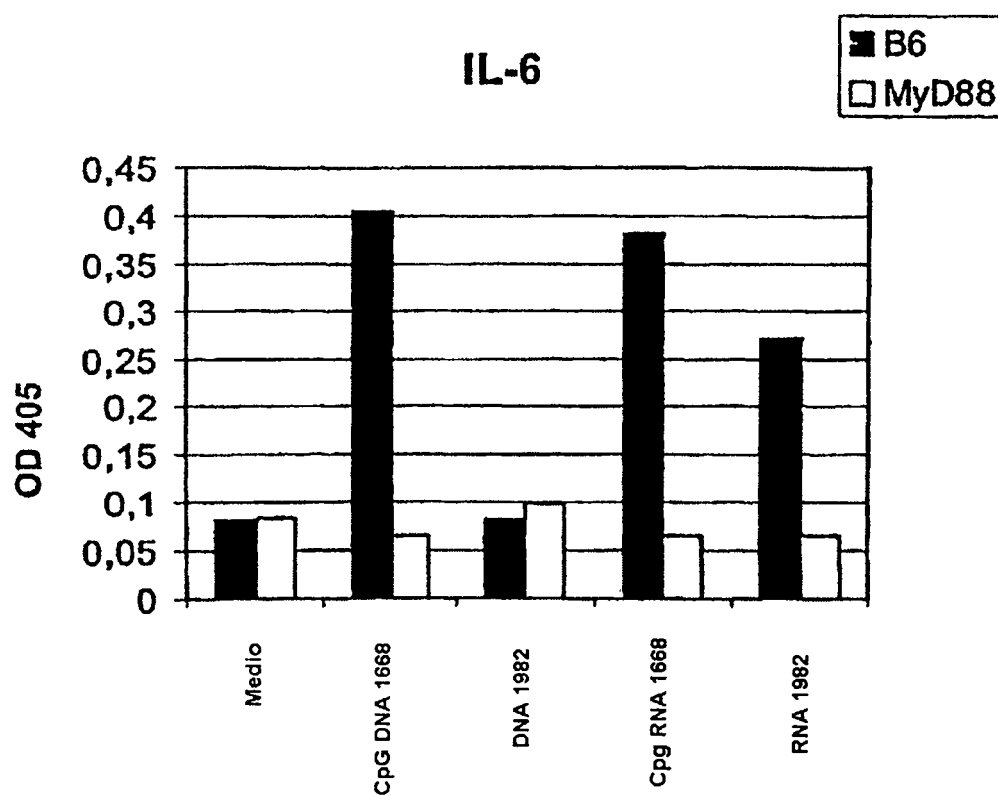


Fig. 5A

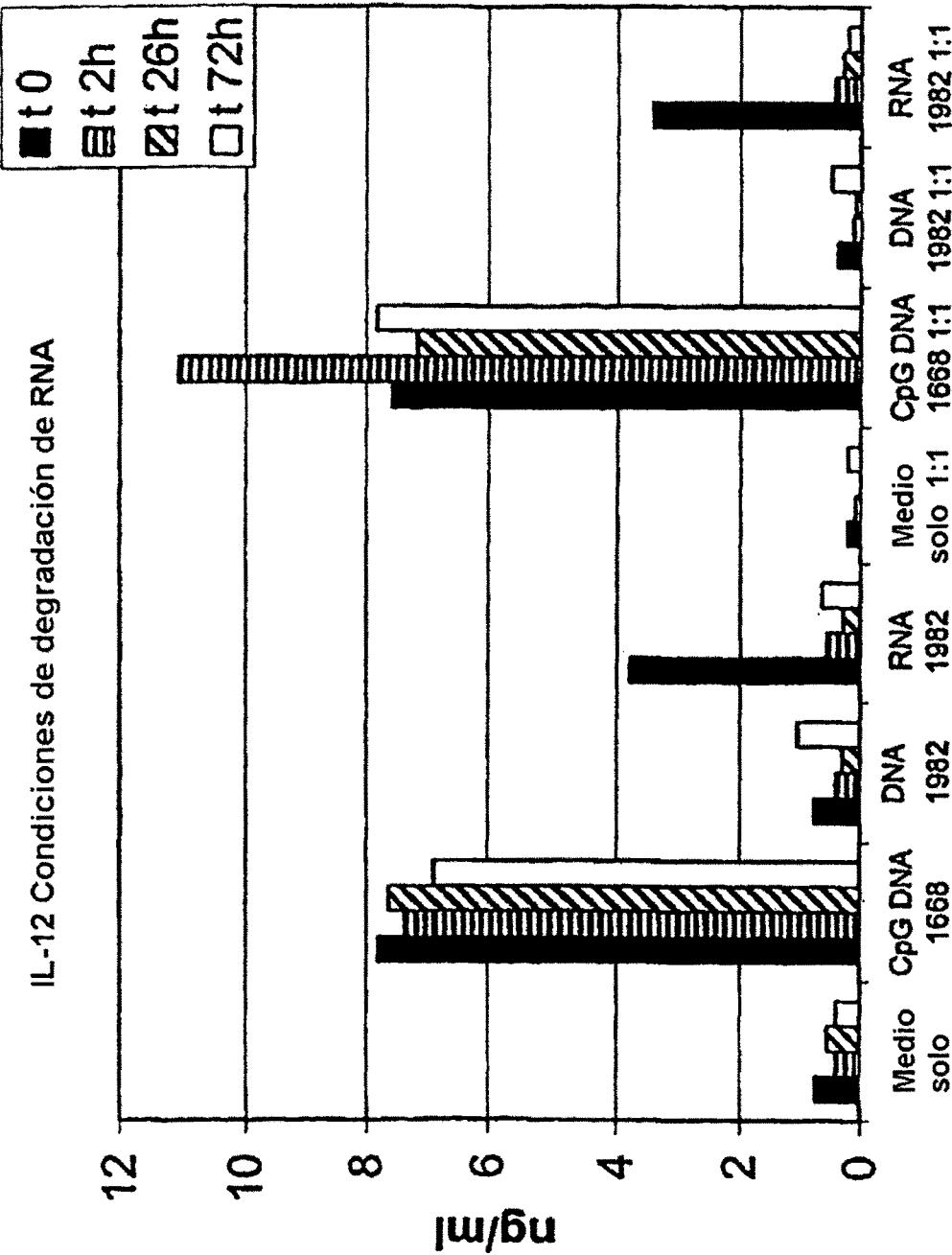


Fig. 5B

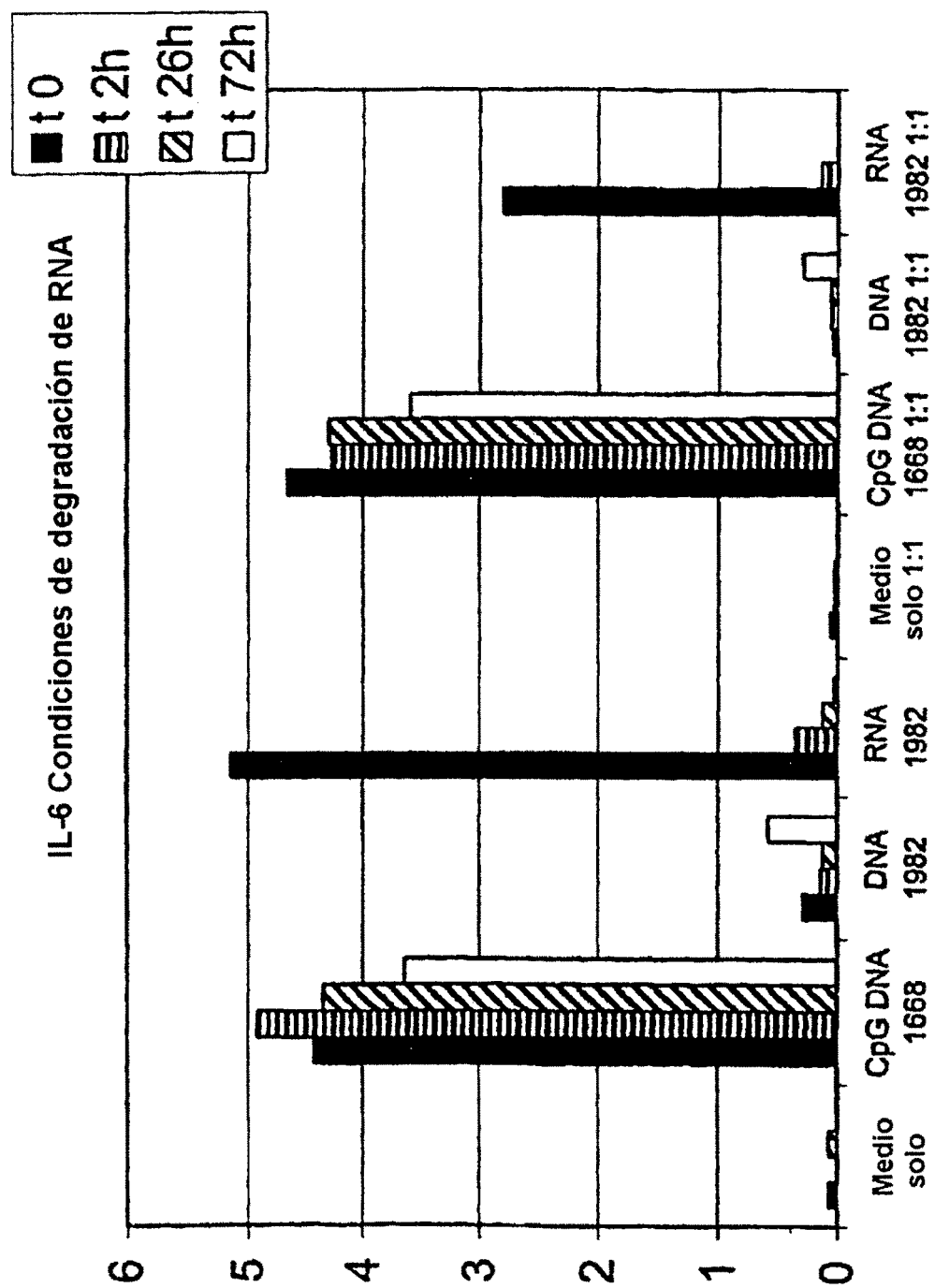


Fig. 6

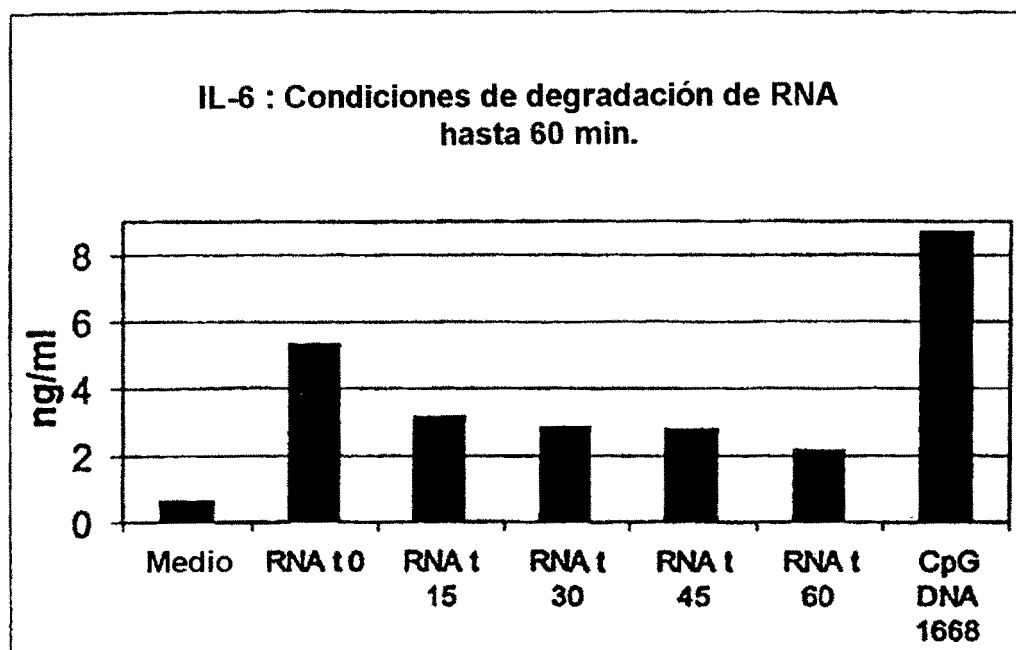


Fig. 7

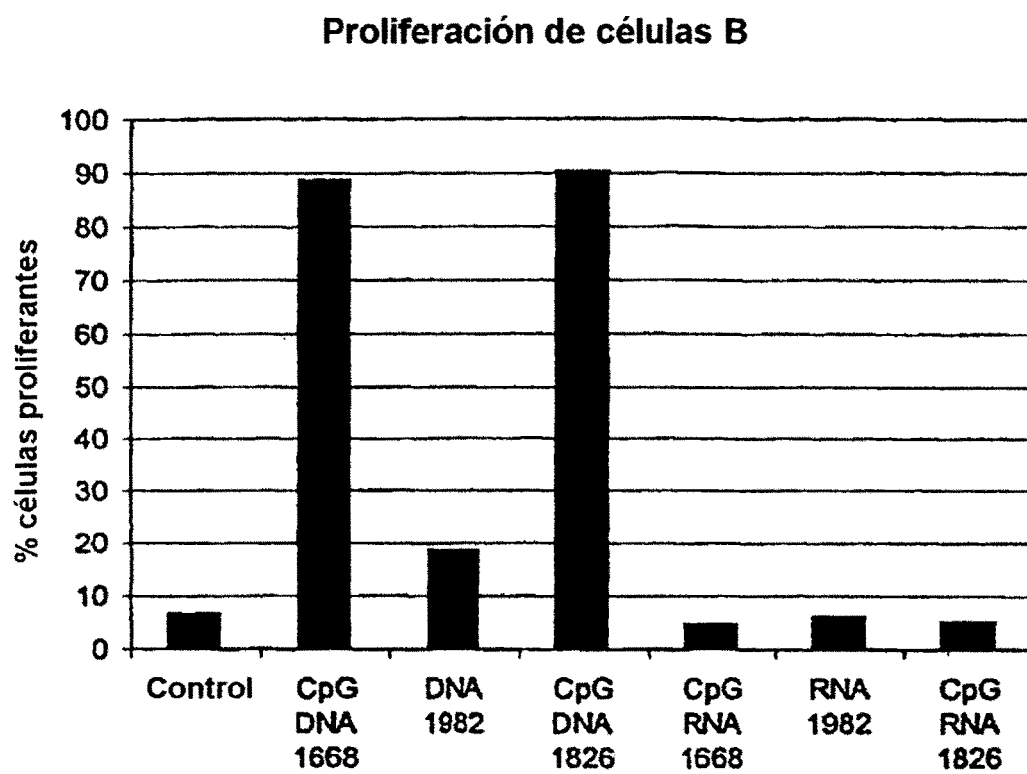


Fig. 8

