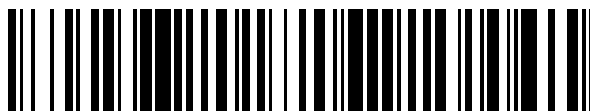


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 188**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 12002779 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2484770**

54 Título: **Complejos de ARN y péptidos catiónicos para transfección e inmunoestimulación**

30 Prioridad:

04.09.2007 WO PCT/EP2007/007702

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

26.06.2015

73 Titular/es:

**CUREVAC GMBH (100.0%)
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**FOTIN-MLECZEK, MARIOLA y
BAUMHOF, PATRICK**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 539 188 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

Complejos de ARN y péptidos catiónicos para transfección e inmunestimulación

5 La presente invención se refiere a un ARN de una sola hebra complejado inmunestimulador que comprende al menos un ARN (molécula) complejado con uno o más oligopéptidos, donde el oligopéptido tiene una longitud de 8 a 15 aminoácidos y la fórmula $(Arg)_i(Lys)_m(His)_n(Orn)_o(Xaa)_x$. Además, en la presente invención se describen composiciones farmacéuticas y kits que comprenden el ARN complejado de la invención, así como el uso del ARN de una sola hebra complejado inmunestimulador de la invención para modular, preferentemente para inducir o incrementar, una respuesta inmune.

10 La transfección de ácidos nucleicos en las células o tejidos de los pacientes mediante métodos de transferencia génica es un procedimiento principal en la medicina molecular y juega un papel crítico en la terapia y prevención de numerosas enfermedades. Los métodos de transfección de ácidos nucleicos pueden conducir a una estimulación inmune del tejido u organismo. Alternativa o adicionalmente, la transfección de ácidos nucleicos puede ser seguida por el procesamiento de la información codificada por los ácidos nucleicos introducidos, es decir, por la traducción de los polipéptidos o las proteínas deseados. El ADN o el ARN como ácidos nucleicos constituyen enfoques alternativos a la terapia génica. La transfección de ácidos nucleicos también puede conducir a una modulación, por ejemplo a la supresión o el incremento de la expresión génica, dependiendo del tipo de ácido nucleico transfectado. La transfección de estos ácidos nucleicos se lleva a cabo típicamente mediante métodos de transferencia génica.

15 Los métodos de transferencia génica en células o tejidos han sido intensamente estudiados en las últimas décadas, sin embargo con éxito limitado. Los métodos bien conocidos incluyen métodos físicos o fisicoquímicos, tales como inyección (directa) de ácidos nucleicos (desnudos) o transferencia génica biolística. La transferencia génica biolística (también conocida como bombardeo de partículas biolísticas) es un método desarrollado por la Universidad de Cornell que permite introducir material génico en tejidos o cultivos celulares. La transferencia génica biolística se lleva a cabo típicamente mediante el recubrimiento superficial con partículas metálicas, por ejemplo de oro o plata, disparando estas partículas metálicas, que comprenden ADN adsorbido, en las células empleando una pistola génica. Sin embargo, los métodos de transferencia génica biolística aún no han demostrado funcionar con el ARN, probablemente debido a su rápida degradación. Además, estos métodos no son adecuados para aplicaciones *in vivo*, lo que representa una gran limitación práctica.

20 Los métodos físicos o fisicoquímicos alternativos incluyen la electroporación *in vitro*. La electroporación *in vitro* se basa en el uso de corriente de alto voltaje para hacer que las membranas celulares sean permeables y permitan la introducción de nuevo ADN o ARN en la célula. Por tanto, normalmente las paredes celulares se debilitan antes de la transfección bien con compuestos químicos o bien con un proceso cuidadoso de congelación para hacerlos "electrocompetentes". Si las bacterias o células electrocompetentes (por ejemplo células eucarióticas) y el ADN (o el ARN) se mezclan conjuntamente, el plásmido puede transferirse a la célula empleando una descarga eléctrica para llevar el ADN (o el ARN) al interior de las células en la trayectoria de la descarga que cruza la cámara de reacción.

25 Otro método físico o fisicoquímico alternativo incluye el uso de nanoplejos (sistemas de nanopartículas), lipoplejos (sistemas liposomiales) o el uso de poliplejos o polímeros catiónicos. Tales nanoplejos (sistemas de nanopartículas) implican el uso de poliacrilatos, poliamidas, poliestireno, cianoacrilatos, polilactato (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), polietileno, etc. como sistemas vehículo para el transporte de los ácidos nucleicos al interior de células o tejidos. Los lipoplejos o los sistemas liposomiales implican típicamente el uso de lípidos catiónicos, los cuales son capaces de emular la membrana celular. Así, la parte cargada positivamente de los lípidos interactúa con la parte cargada negativamente de los ácidos nucleicos haciendo posible la fusión con la membrana celular. Los lipoplejos o sistemas liposomiales incluyen, por ejemplo, DOTMA, DOPE, DOSPA, DOTAP, DC-Chol, EDMPC, etc. Los poliplejos (polímeros catiónicos) típicamente forman un complejo con ácidos nucleicos cargados negativamente que lleva a una condensación de los ácidos nucleicos y los protege de la degradación. El transporte a las células usando poliplejos (polímeros catiónicos) se lleva a cabo típicamente vía una endocitosis mediada por receptor. De esta manera, el ADN está acoplado a una molécula distinta, tal como una transferrina, por ejemplo con el poliplejo poli-L-lisina (PLL), el cual se une a un receptor superficial y desencadena la endocitosis. Los poliplejos (polímeros catiónicos) incluyen, por ejemplo, poli-L-lisina (PLL), quitosano, polietilenoimina (PEI), metacrilato de poli(dimetilaminoetilo) (PD-MAEMA), poliamidoamina (PAMAM).

30 Otros métodos físicos o fisicoquímicos bien conocidos de transferencia génica en células u organismos incluyen aquellos tales como de transfección mediante virus. Como ejemplo particular, un virus ADN puede usarse como vehículo para el ADN. Debido a sus propiedades infecciosas, estos virus tienen una velocidad de transfección muy alta. Los virus típicamente empleados se modifican genéticamente de manera que no se forme partícula infecciosa funcional alguna en la célula transfectada. A pesar de esta precaución de

seguridad, sin embargo, no puede descartarse cierto riesgo de propagación incontrolada de los genes terapéuticamente activos introducidos y de los genes virales, por ejemplo, debido a posibles eventos de recombinación.

- 5 Más ventajoso en este contexto es el uso de las llamadas proteínas translocadoras o de dominios de transducción (PTDs) para el transporte de macromoléculas al interior de células o tejidos. Las proteínas translocadoras se consideran como un grupo de péptidos capaces de llevar a cabo el transporte de macromoléculas entre células (proteínas translocadoras), tales como VIH-tat (VIH), antennapedia (*Drosophila antennapedia*), HSV VP22 (*Herpes simplex*), FGF o lactoferrina, etc. Por el contrario, los dominios de transducción de proteínas (PTDs) se consideran como un grupo de péptidos capaces de dirigir las proteínas y
- 10 péptidos unidos covalentemente a estas secuencias dentro de una célula a través de la membrana celular (Leifert y Whitton: Translocatory proteins and protein transduction domains: a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms. Molecular Therapy vol. 8 No. 2003). Común a las proteínas translocadoras y a los PTDs es una región básica, la cual se considera como principalmente responsable del transporte de los péptidos de fusión, ya que es capaz de unir polianiones tales como ácidos nucleicos. Sin limitarse a éstos, los PTDs pueden actuar de forma similar a reactivos de transfección catiónica usando endocitosis adsorbente no saturable dependiente del receptor. Los PTDs se acoplan típicamente a proteínas o péptidos con el fin de llevar a cabo o incrementar una respuesta CTL cuando se administra una vacuna basada en péptidos (véase Melikov y Chernomordik, Arginine-rich cell penetrating peptides: from endosomal uptake to nuclear delivery, Cell. Mol. Life Sci. 2005).
- 20 A veces, los dominios de transducción de proteína (PTDs) se denominan también “péptidos penetrantes celulares” (CPPs) por su capacidad de penetrar la membrana celular y así llevar a cabo el transporte de macromoléculas al interior de las células. Los CPPs son péptidos pequeños, comprenden típicamente un alto contenido en aminoácidos básicos y tienen una longitud de 7 a 30 aminoácidos. Macromoléculas que han mostrado ser transportadas al interior de las células por medio de CPPs incluyen péptidos, así como ADN, ARNs o PNAs (ácidos nucleicos péptidos), uniéndose los CPPs típicamente a estas macromoléculas mediante un enlace covalente, y siendo transfectados en las células. Aunque los péptidos penetrantes de células (CPPs) se han empleado con éxito para mediar el suministro intracelular en una amplia variedad de moléculas de interés farmacológico tanto *in vitro* como *in vivo*, los mecanismos por los cuales ocurre la absorción celular aún siguen sin esclarecerse. El grupo de los CPPs es altamente diverso y está formado por
- 25 péptidos anfifáticos y helicoidales tales como transportano, penetratina, péptidos hidrófobos como MTS, VP22, MAP, KALA, PpTG20, péptidos ricos en prolina, péptidos MPG, Prep-1, L-oligómeros, péptidos de calcitonina o péptidos ricos en arginina catiónicos e hidrófilos, incluyendo CPPs ricos en arginina, que median la absorción celular de moléculas conjugadas (covalentemente) por la unión a proteoglicanos celulares, tales como el dominio de transducción de la proteína Tat de VIH-1 (Revisión: Deshayes y col., Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. Cell. Mol. Life Sci. 2005). En particular, los CPPs ricos en arginina se describen como vehículos para proteínas o ADN, por ejemplo ADN plásmido, etc., en las células. Las poliargininas también se pueden usar para el transporte de (macro)moléculas al interior de las células, comprendiendo típicamente una longitud de al menos 60 a 80 aminoácidos (en particular argininas), más típicamente de 1.000 a 15.000 aminoácidos, representando así un compuesto de alta masa molecular.
- 30 Incluso a pesar de que el mecanismo de absorción celular para los CPPs en general sigue sin esclarecerse, se sugiere la endocitosis como un mecanismo de absorción para la poli-arginina. La endocitosis es un proceso celular por el cual las macromoléculas pueden entrar en una célula sin pasar a través de su membrana, sugiriéndose tres mecanismos endocitóticos diferentes (endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina y/o endocitosis dependiente de F-actina, véase, por ejemplo, revisión: Melikov y Chernomordik, Arginine-rich cell penetrating peptides: from endosomal uptake to nuclear delivery, Cell. Mol. Life Sci. 2005). Sin limitarse a ninguna teoría particular, durante la endocitosis la macromolécula complejada con CPP se une primero a los glucosaminoglucanos (GAGs) de la superficie celular cargados negativamente, incluyendo heparanos (HS). Entonces, la macromolécula unida a CPP entra en la célula mediante endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina y/o endocitosis dependiente de F-actina, por ejemplo doblando la membrana alrededor de la macromolécula unida a CPP en el exterior de la célula. Esto resulta en la formación de una vesícula tipo saco en cuyo interior se incorpora la macromolécula unida a CPP. El tráfico de la macromolécula unida a CPP a través de endosomas tardíos y/o el aparato de Golgi y/o el retículo endoplásmico (ER) suministra la macromolécula unida al CPP al citoplasma, pudiendo esta etapa implicar una apertura inducida por CPP de los poros transitorios de la bicapa lipídica. Alternativamente, la macromolécula complejada con CPP puede ser transportada a otros lugares en
- 35 la célula, por ejemplo al endosoma, dependiendo del modo de acción requerido para el propósito específico. Como ejemplo, los receptores de TLR-7 TLR-8 se localizan en el endosoma. Así, la transfección de células con ARN inmunostimulador, que puede ser por ejemplo ligando de los receptores tipo Toll (TLRs) seleccionados de ligandos de TLR1-TLR13 (receptores tipo Toll: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13) pueden conducir al transporte a los endosomas y, dependiendo de la interacción específica y de los socios de interacción, por ejemplo a una
- 40 inmunostimulación por el ligando de ARN.

Los péptidos penetrantes de células (CPPs) tales como los definidos arriba son bien conocidos en la técnica y están ampliamente descritos. Sin embargo, el uso de estos CPPs (como vehículos) se establece para el transporte de péptidos, proteínas y ADN como carga, enlazándose típicamente los CPPs a moléculas de carga de forma covalente. Por el contrario, el transporte celular de moléculas de ARN usando CPPs sólo se ha demostrado en un número muy limitado de casos, en particular para secuencias de ARN cortas, por ejemplo secuencias de ARNs de doble hebra.

A modo de ejemplo, Futaki y col. (The Journal of Biological Chemistry, Vol.276, No.8, pág. 5836-5840, 2001) describen el uso de oligopéptidos vehículo $(Arg)_n$ de una longitud de 4-16 aminoácidos para la transferencia *in vitro* de péptidos de carga, enlazándose los péptidos vehículo covalentemente a los péptidos de carga. Se demostró una translocación óptima para $(Arg)_n$ con una longitud de 6 u 8 argininas, respectivamente.

Deshayes y col. (2005, citado arriba) también describieron péptidos de transporte trans-membrana o peptidomiméticos por CPPs. Deshayes y col. (2005, *supra*) describen el uso de oligopéptidos Arg_7 y Arg_9 para la transferencia *in vitro* de péptidos de carga y para la transferencia *in vivo* de proteínas de carga tales como ciclosporina o catalasa.

Para la transfección de células con macromoléculas, tales como ADN, péptidos o proteínas, en la técnica se han empleado polipéptidos de alto peso molecular tales como poli-L-argininas (por ejemplo, típicamente con un PM de alrededor de 5.000 Da a 15 kDa) o poli-L-lisinas (por ejemplo típicamente con un PM de aproximadamente 54 kDa), así como PEI (polietilenimina) de alto peso molecular (por ejemplo típicamente con un PM de aproximadamente 25 kDa) (véase también Bettinger y col., Nucleic Acids Research, vol. 29 No. 18 (2001)). Sin embargo, la poli-L-lisina y la PEI de alto peso molecular parecían no ser efectivas como moléculas vehículo. Además, cuando se emplearon poli-L-argininas de alto peso molecular a altas concentraciones, se observaron efectos tóxicos que llevaron a la activación del sistema de complemento. Así, se llevaron a cabo esfuerzos para desarrollar agentes de transfección de bajo peso molecular, tal como, por ejemplo, poli-argininas de bajo peso molecular. Sin embargo, estas poli-argininas de bajo peso molecular típicamente presentan una baja estabilidad para el complejo vehículo-carga, es decir, el complejo formado por, por ejemplo, una poli-arginina como vehículo y una molécula de ADN como carga. Así, McKenzie y col. (McKenzie y col., A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents, The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 14, 2000) intentaron incrementar la estabilidad de los complejos péptido-ADN reticulando estos péptidos, vía glutaraldehído, con el ADN, obteniendo así una base de Schiff. Sin embargo, esta reticulación daba como resultado una disociación extremadamente lenta del complejo en la célula y, en consecuencia, la expresión en el tiempo de la proteína codificada era extremadamente baja. Para evitar este problema, McKenzie y col. (2000, *supra*) introdujeron residuos cisteína en el vehículo de CPP que estabilizan el complejo por formación de enlaces disulfuro entre el CPP y el ADN. Con la transfección, estos enlaces disulfuro se rompen en la célula debido a las condiciones reductoras de su interior, dando como resultado una expresión incrementada de los péptidos codificados. Sin embargo, esta reticulación es laboriosa y puede provocar otras modificaciones no deseadas en el ADN.

Además, la PEI de bajo peso molecular (por ejemplo, típicamente con un PM de alrededor de 2.000 Da) y las poli-L-lisinas de bajo peso molecular (por ejemplo típicamente de un PM de alrededor de 3.400 Da) pueden emplearse para la transfección de estas macromoléculas tal como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, incluso a pesar de que se observó una transfección mejorada para la PEI o las poli-L-lisinas de bajo peso molecular en estos experimentos, la expresión no era detectable debido a la formación de complejos extremadamente estables de estas moléculas vehículo con el ADN. Como resultado, estas moléculas portadoras no parecían ser capaces de disociarse de su ADN complejado, una etapa necesaria para la traducción y la expresión de la proteína codificada (véase Bettinger y col. (2001), *supra*).

El transporte de ADN por CPPs fue demostrado además por Niidome y col. (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 24, pág. 15307-15312, 1997). Niidome y col. (1997, *supra*) describieron el uso de CPPs, en particular de péptidos alfa-helicoidales catiónicos con un contenido en arginina definido del 25% y una longitud de 12 ó 24 aminoácidos, respectivamente, para el transporte de ADN plásmido como carga. Como resultado, se encontró que los péptidos largos y/o hidrófobos pueden unirse fuertemente al ADN y afectar a su transporte a las células. Además, Niidome y col. (Bioconjugate Chem 1999, 10, 773-780) demostraron que aquellos péptidos con una longitud de 16 a 17 aminoácidos eran los más eficientes en el transporte de ADN plásmido. Sin embargo, cuando se usaban péptidos pequeños (por ejemplo de aproximadamente 12 aminoácidos) como CPPs, la eficiencia de la transfección del ADN en las células resultó significativamente reducida.

Para mejorar la eficiencia de la transfección celular de moléculas de arginina cortas, Futaki y col. (Bioconjugate Chem. 2001, 12, 1005-1011) emplearon oligopéptidos estearilados $(Arg)_n$ con una longitud de 4-16 aminoácidos. Estos oligopéptidos se usaron en experimentos de transfección en comparación con oligopéptidos no estearilados $(Arg)_n$ con una longitud de 4-16 aminoácidos y poli-arginina (PM 5.000-15.000) para la transferencia *in vitro* de ADN plásmido que codifica para la luciferasa. Así, los péptidos portadores

- usados para la transfección se mezclaron con ADN plásmido y formaron un complejo vehículo/carga. Se demostró una translocación óptima para una (Arg)_n estearilada con una longitud de 8 argininas, en tanto que aquellas argininas de una longitud de 6-7 y 9-15 argininas demostraron una actividad para el transporte celular significativamente menor. Más aún, la actividad de transporte de las argininas no esteariladas y la poli-arginina dió resultados deficientes, indicando pérdida de esta actividad cuando se usan tales péptidos vehículo. La diferencia observada en la eficiencia de la transfección demostrada por Futaki y col. (2001, *supra*) para péptidos portadores estearilados y no estearilados se debe entonces a la presencia de partes lipídicas, las cuales cambian significativamente las propiedades químicas de los CPPs empleados en estos experimentos.
- De acuerdo con Kim y col. (Kim y col., Basic peptide system for efficient delivery of foreign genes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1640 (2003) 129-136), se pueden emplear péptidos vehículo de arginina cortos, tales como (Arg)₉ a (Arg)₁₅ para la complejación y la transfección celular de ADN que codifica para la proteína fluorescente verde PEGFP-N3. Cuando se usaron argininas (Arg)₉ a (Arg)₁₅, se obtuvieron resultados óptimos con (Arg)₁₅ mostrando una eficiencia de transfección celular cada vez más alta a partir de (Arg)₉ a (Arg)₁₅. Estos resultados indican que pueden obtenerse las propiedades de transporte óptimas para transfectar células con ADN con un péptido portador (Arg)_n con n muy superior a 15. Sin embargo, Kim y col. (2003, *supra*) exclusivamente documentaron la aplicación de péptidos de arginina cortos con propósitos de transfección para moléculas de ADN como carga.
- Las células también pueden ser transfectadas usando CPPs en combinación con ARN. Sin embargo, sólo un pequeño número de ejemplos de trabajo se han llevado a cabo para el transporte celular de ARN, probablemente debido a su rápida degradación y baja estabilidad en complejo. Así, la transfección de ARN usando CPPs parece estar restringida a moléculas de ARN de doble hebra, más estables, tales como ARNsi. A modo de ejemplo, Tönges y col. (*RNA* (2006), 12:1431-1438) usaron octa-arginina (Arg)₈ estearilada para la transferencia *in vitro* de un ARNsi corto de doble hebra en células del hipocampo neuronal, donde la octa-arginina (Arg)₈ estearilada formaba un complejo con el ARNsi. En base a los resultados de Tönges y col. (2006, *supra*) el componente estearilo de los péptidos vehículo parece ser indispensable para el transporte de ARNsi o para el transporte de otras moléculas de ARN.
- Veldhoen y col. (2006) publicaron también el uso de CPPs específicos en un complejo no covalente para la transfección celular de secuencias de ARNsi cortas de doble hebra (Veldhoen y col., Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect, *Nucleic Acids Research* 2006). Los péptidos empleados por Veldhoen y col. (2006) fueron alfa-MPG (Ac-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRV-Cya) y alfa-MPG-mNLS (Ac-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKSKRV-Cya). Estos péptidos específicos se modificaron además con una parte acetilo (Ac) en el N-terminal y una parte cisteamida en el C-terminal. Veldhoen y col. (2006) fueron capaces de demostrar la transferencia celular de ARNsi de doble hebra con una longitud de aproximadamente 18 a 40 nucleótidos empleando los péptidos vehículo mencionados anteriormente.
- Resumiendo, el uso de CPPs u otros péptidos vehículo para el transporte celular de macromoléculas fue demostrado básicamente para péptidos y para moléculas de ADN. Muy pocas publicaciones específicas describen propiedades de penetración en las células de ARNsi de doble hebra.
- La transferencia de ARN representa una herramienta importante en la medicina molecular moderna y presenta propiedades superiores a las de la transfección celular de ADN, ya que las moléculas de ADN pueden conllevar serios problemas. Por ejemplo, la aplicación de moléculas de ADN tiene el riesgo de que dicho ADN se integre en el genoma del huésped. La integración de ADN extraño en el genoma del huésped puede influir en la expresión génica del huésped y puede desencadenar la expresión de un oncogen o la destrucción de un gen supresor tumoral. También puede ser inactivado un gen, y por tanto el producto génico, esencial para el huésped por la integración de ADN extraño en la región de codificación de tal gen. Existe un peligro particular cuando la integración del ADN tiene lugar en un gen implicado en la regulación del crecimiento celular. En este caso, la célula huésped puede entrar en un estado degenerado y llevar a un cáncer o a la formación de tumores. Esta integración no deseada en el ADN puede ser todavía más problemática cuando el ADN transfectado en la célula comprende un promotor potente, tal como el promotor de CMV viral. La integración de estos promotores en el genoma de la célula tratada puede llevar a cambios no deseados en la regulación de la expresión génica celular. Otra desventaja es que las moléculas de ADN permanecen en el núcleo de la célula durante un tiempo largo, ya sea como episoma o, como se mencionó, integradas en el genoma del huésped. Este fenómeno lleva tanto a la producción de proteína transgénica, que no está limitada o no puede limitarse en el tiempo, como al peligro de tolerancia asociada a esta proteína transgénica. Además por inyección de ADN puede desencadenarse el desarrollo de anticuerpos anti-ADN (Gilkeson y col., *J Clin Invest* 95, 1398-1402 (1995)) y la inducción de enfermedades autoinmunes. Todos estos riesgos enumerados están asociados a la aplicación de ADN. Por el contrario, no se produce cuando se emplea ARN, en particular ARNm, en lugar de ADN. Por ejemplo, el ARNm no se integra en el genoma del huésped, no se

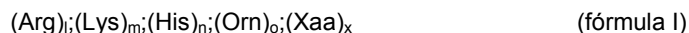
requieren secuencias virales, tales como promotores, etc., para la transfección efectiva, etc. Las desventajas del uso de ARN pueden deberse a su inestabilidad en comparación con el ADN (enzimas degradadoras de ARN, las llamadas RNAsas (ribonucleasas), en particular, pero también numerosos otros procesos que desestabilizan el ARN son responsables de la inestabilidad del ARN). Sin embargo, en la técnica ya se han descrito métodos para estabilizar el ARN, por ejemplo en WO 03/051401, WO 02/098443, WO 99/14346, EP-A-1083232, US 5.580.859 y US 6.214.804. También se han desarrollado métodos para proteger el ARN contra la degradación por ribonucleasas, ya sea usando liposomas (Martinon y col., Eur J Immunol 23, 1719-1722 (1993)) o la administración *in vivo* intra-citosólica del ácido nucleico con un dispositivo balístico (pistola génica) (Vassilev y col., Vaccine 19, 2012-2019 (2001)).

10 La WO 2007/069068 describe compuestos de fórmula $P-P^1-(O-CH_2-CH_2)_z-R^2-N$, abreviada como PLN, donde P es un péptido penetrante de células, N es un ácido nucleico y L es un conector que une P y N de forma covalente.

15 La WO 2006/046978 describe un método para transformar una célula que comprende poner en contacto la célula con un péptido catiónico y un ARN, donde el péptido catiónico y el ARN pueden formar un complejo no covalente. Se proporcionan estos complejos oligonucleótidos para la transformación de antígenos presentes en la célula con el fin de fabricar vacunas, por ejemplo para obtener una respuesta inmune específica (adaptativa).

20 Debido a que las moléculas de ARN como tales proporcionan propiedades ventajosas sobre las de ADN, como se ha indicado, el objeto de la presente invención es proporcionar un vehículo adecuado y eficiente para el transporte de ARN de una sola hebra inmunoestimulador en las células. Así, la presente invención proporciona una solución que permite la transfección de células con un ARN de una sola hebra inmunoestimulador de forma eficiente.

25 Este objeto de la presente invención se logra mediante las realizaciones de la presente invención tal como se caracterizan en las reivindicaciones. En particular, este objeto se consigue mediante un ARN monohebra inmunoestimulador complejo que comprende al menos un ARN (molécula) complejo con uno o más oligopéptidos, que no se enlazan de forma covalente al ARN y donde la proporción nitrógeno/fosfato (ratio N/P) está en el intervalo de 0,5-50, teniendo el oligopéptido una longitud de 8 a 15 aminoácidos, y donde el al menos un oligopéptido contiene "l" residuos de Arg, "m" residuos de Lys, "n" residuos de His, "o" residuos de Orn y "x" residuos de Xaa situados en cualquier orden dentro del al menos un oligopéptido con la siguiente fórmula empírica:



donde

- $l + m + n + o + x = 8-15$, y
- l, m, n u o, independientemente entre sí, pueden ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, siempre que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos 50% de todos los aminoácidos de los oligopéptidos; y
- Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de entre aminoácidos nativos o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y
- x puede ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, siempre que el contenido total de Xaa no exceda 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido, por ejemplo no más del 40% o del 30% de todos los aminoácidos del oligopéptido.

45 En el contexto de la presente invención, un ARN complejo debe entenderse como un ARN (molécula) tal como se define aquí, preferentemente un ARNm, que está complejo con el uno o más oligopéptidos de fórmula empírica $(Arg)_l;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, formándose un complejo no covalente entre el ARN y los oligopéptidos. Aquí, "no covalente" significa que se forma una asociación reversible entre el ARN y el oligopéptido mediante interacciones no covalentes de estas moléculas, asociándose las moléculas conjuntamente mediante cualquier tipo de interacción electrónica que no sea un enlace covalente, por ejemplo mediante enlaces de Van der Waals, esto es por una atracción electrostática débil que se origina a partir de una fuerza de atracción no específica de las moléculas complejadas. La asociación de un ARN y al menos un oligopéptido está en equilibrio con la disociación de tal complejo. Intracelularmente, sin aludir a teoría particular alguna, el equilibrio parece estar desplazado hacia el ARN y los oligopéptidos disociados.

55 El al menos un oligopéptido del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención tiene una longitud de 8 a 15 aminoácidos, preferentemente de 8 a 14, 8 a 13, 8 a 12 ó 9 a 12 ó 9 a 11 aminoácidos, en especial de 8 a 10, 9 a 11, 10 a 12, 11 a 13, 12 a 14 ó 13 a 15 aminoácidos, en particular se selecciona a partir de un péptido de la fórmula anterior con una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 aminoácidos.

El oligopéptido del ARN monohebra inmunoestimuladorio complejado según la presente invención tiene la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ como se ha definido anteriormente, donde $l+m+n+o+x = 8-15$, y l, m, n, u, o , independientemente entre sí, pueden ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, o cualquier intervalo formado por dos de estos valores, siempre que el contenido total de Arg, Lys, His y/u Orn (aminoácidos básicos) represente al menos el 50% (por ejemplo al menos el 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 ó 59%) o al menos el 60% (por ejemplo al menos el 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 ó 69%), al menos el 70% (por ejemplo al menos el 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 ó 79%), al menos el 80% (por ejemplo al menos el 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 u 89%), al menos el 90% (por ejemplo al menos el 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99%) o incluso el 100% de todos los aminoácidos del oligopéptido del ARN complejado según la presente invención. Los aminoácidos Arg, Lys, His y Orn (código de tres letras) deben entenderse como los aminoácidos arginina, lisina, histidina y ornitina, respectivamente. En este contexto, la ornitina es un aminoácido cuya estructura es $NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CHNH_2-COOH$. La ornitina fue incorporada artificialmente como el 21avo aminoácido y no pertenece a los 20 aminoácidos que "ocurren nativamente" en el sentido de que la ornitina no es un aminoácido codificado por ADN y, en consecuencia, no está implicada en la síntesis de proteínas primarias. Sin embargo, la ornitina es provista por la reacción enzimática que se inicia a partir de L-arginina. Se cree que no es parte del código genético porque los polipéptidos que contienen ornitinas no protegidas sufren una lactamización espontánea. La ornitina debe considerarse como un aminoácido básico, ya que es uno de los productos de la reacción de la enzima arginasa en L-arginina para dar urea.

De acuerdo a otra realización preferente, los aminoácidos (individuales) del oligopéptido del ARN monohebra inmunoestimuladorio complejado de la presente invención, de fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ (fórmula I) como se ha indicado, pueden ocurrir en cualquier frecuencia, tal como se ha definido para la fórmula empírica; es decir, cada aminoácido básico (así como Xaa) puede ocurrir en la fórmula empírica definida arriba dentro de los valores o intervalos definidos, pudiendo formarse cualquier intervalo a partir de dos de los valores definidos. Sin embargo, es particularmente preferente que el contenido del aminoácido básico Arg en la fórmula empírica anterior seade al menos el 10%, en especial de al menos 20%, con especial preferencia de al menos el 30%, 40% o incluso el 50%, con muy particular preferencia de al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% con respecto a la fórmula empírica completa. De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el contenido de aminoácido básico Lys en dicha fórmula empírica es de al menos el 10%, en especial de al menos el 20%, con especial preferencia de al menos el 30%, 40% o incluso el 50%, con muy particular preferencia de al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% con respecto a la fórmula empírica completa. De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el contenido de aminoácido básico His en la fórmula empírica citada es de al menos el 10%, en especial de al menos el 20%, con especial preferencia de al menos el 30%, 40% o incluso el 50%, y con muy particular preferencia de al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% con respecto a la fórmula empírica completa. De acuerdo con otra realización particularmente preferente, el contenido de aminoácido básico Orn en la fórmula empírica es de al menos el 10%, en especial de al menos el 20%, con especial preferencia de al menos el 30%, 40% o incluso 50%, con muy particular preferencia de al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100% con respecto a la fórmula empírica completa. Cualquiera de los contenidos definidos, valores o intervalos para los aminoácidos básicos Arg, Lys, His y/u Orn como los definidos también se pueden combinar entre sí, preferentemente llevando a un contenido total de aminoácidos básicos para el oligopéptido del ARN monohebra inmunoestimuladorio complejado de la presente invención de al menos el 50% (al menos el 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 ó 59%), de al menos el 60% (al menos el 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 ó 69%), al menos el 70% (al menos el 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 ó 79%), al menos el 80% (al menos el 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 u 89%), al menos el 90% (al menos el 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99%) o incluso el 100%, como se definió inicialmente.

Los aminoácidos de la fórmula anterior $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, es decir, Arg, Lys, His y/u Orn pueden además seleccionarse de entre aminoácidos Arg, Lys, His y Orn nativos (= que ocurren naturalmente) o de aminoácidos no nativos (= no ocurren naturalmente) derivados de los mismos. Como aminoácido no nativo (= no ocurre naturalmente) derivado de los aminoácidos Arg, Lys, His y Orn se puede emplear cualquier derivado conocido de estos aminoácidos modificado químicamente, siempre que estos derivados no sean tóxicos para las células u organismos, cuando se proporcionan con el oligopéptido anterior (tales derivados de aminoácidos son comercializados por diferentes compañías, por ejemplo Sigma Aldrich (véase <http://www.sigmaaldrich.com>)).

Además, el oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejado de la presente invención puede contener un aminoácido Xaa en la fórmula empírica anterior $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, que puede ser cualquier aminoácido seleccionado de entre aminoácidos nativos (= que ocurren naturalmente) o no nativos (= que no ocurren naturalmente) excepto Arg, Lys, His u Orn. Preferentemente, Xaa se selecciona, sin limitarse a, de entre aminoácidos neutros que ocurren naturalmente (e hidrófobos), esto es aminoácidos con cadenas laterales neutras (e hidrófobas) tales como alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), prolina (Pro), triptófano (Trp), fenilalanina (Phe) o metionina (Met), y/o de entre aminoácidos neutros (o polares) que ocurren naturalmente, es decir aminoácidos que pueden tener cadenas laterales neutras (y

polares) tales como glicina (Gly), serina (Ser), treonina (Thr), tirosina (Tyr), cisteína (Cys), asparagina (Asn) o glutamina (Glu) y/o de entre aminoácidos ácidos que ocurran naturalmente, es decir aminoácidos con cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico (Asp) o ácido glutámico (Glu). Preferentemente, el oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejo de la presente invención puede contener un aminoácido Xaa en la fórmula empírica citada $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ seleccionado de entre aminoácidos que no tengan cadena lateral ácida. Con especial preferencia, Xaa en la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra, es decir aminoácidos con cadena lateral neutra (e hidrófoba) y/o aminoácidos con cadena lateral neutra (y polar) como los definidos arriba. Además, puede emplearse cualquier derivado de aminoácido conocido para Xaa en la fórmula empírica anterior $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, es decir, aminoácidos químicamente modificados, siempre que estos derivados no sean tóxicos para las células u organismos cuando sean provistos con el oligopéptido anterior (tales derivados de aminoácidos son comercializados por diferentes compañías, por ejemplo Sigma Aldrich (véase <http://www.sigmaaldrich.com>)). El contenido de Xaa presente típicamente en la fórmula anterior es del 0-30%, 0-40% o 0-50% de todos los aminoácidos de la secuencia de oligopéptidos completa, es decir el contenido total de Xaa no puede exceder el 30%, 40% o 50% de todos los aminoácidos de la secuencia de oligopéptidos completa, preferentemente no puede exceder el 20%, en especial no excede el 10% y en particular no excede el 5% de todos los aminoácidos de la secuencia de oligopéptidos completa. Así, "x" en la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ mostrada puede ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, siempre que el contenido de Xaa no exceda el valor indicado del 30% (o menos), el 40% o el 50% de todos los aminoácidos completos del oligopéptido del ARN complejo.

Típicamente, los aminoácidos Arg, Lys, His, Orn y Xaa del oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejo de la presente invención, de fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, pueden disponerse en cualquier posición de la secuencia de oligopéptidos. En consecuencia, la fórmula empírica (I) no determina un orden específico para los aminoácidos, sino que intenta reflejar el tipo de aminoácidos y su frecuencia de ocurrencia en el péptido, indicando que la cadena de péptidos contiene un número de l residuos de Arg, m residuos de Lys, n residuos de His, o residuos de Orn y x residuos de Xaa, sin especificar orden alguno para estos residuos dentro de la cadena de péptidos.

Sin embargo, se prefiere que el oligopéptido anterior comprenda aminoácidos en uno o preferentemente en ambos extremos terminales que no incluyan una cadena lateral ácida. Con especial preferencia, la secuencia de oligopéptidos anterior comprende aminoácidos neutros o básicos en uno o preferentemente en ambos extremos terminales, con particular preferencia aminoácidos básicos en uno o ambos extremos terminales. En otra realización preferente, el oligopéptido de la fórmula general indicada contiene al menos dos, en especial al menos tres, al menos cuatro o incluso al menos cinco residuos básicos terminales, en particular Arg, Orn o Lys en cada terminal. De acuerdo con otra realización preferente, el oligopéptido de la fórmula general indicadapreferentementeno incluye ningún aminoácido catiónico (es decir, ningún Arg, Orn o Lys) en uno o preferentemente en ambos extremos terminales, en particular ningún aminoácido catiónico (es decir, ningún Arg, Orn o Lys) en ambos extremos terminales. En otras palabras, uno o muy preferiblemente ambos extremos terminales del oligopéptido de la fórmula general dada pueden comprender cualquier aminoácido no catiónico como el definido aquí siempre quedicho aminoácido no catiónico se seleccione de entre un aminoácido distinto de Arg, Orn o Lys o cualquier variante o derivado de estos aminoácidos catiónicos. Los extremos terminales pueden comprender, por ejemplo, uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o incluso más residuos no catiónicos básicos como los definidos comenzando desde el extremo N- y/o C-terminal de la secuencia particular.

De acuerdo aún con otra realización preferente, uno o ambos extremos terminales del oligopéptido del ARNmonohebra estimuladorio complejo de la presente invención pueden comprender al menos un residuo histidina en uno o ambos de sus extremos terminales, por ejemplo, el oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejo de la presente invención puede comprender uno, dos, tres o más residuos histidina en orden consecutivo en uno o ambos extremos terminales siempre que la longitud total del oligopéptido se limite a 8 a 15 aminoácidos, tal como se ha definido anteriormente.

Además, los residuos Xaa del oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejo de la presente invención están típicamente separados unos de otros por al menos un Arg, Lys, His u Orn. Esta separación de los residuos Xaa preferentemente evita clusters de aminoácidos no básicos en el oligopéptido, ya que tales clusters no básicos pueden reducir las propiedades ventajosas del oligopéptido como péptido vehículo para el ARN complejo de acuerdo con la presente invención.

Sin embargo, los residuos aminoácidos básicos del oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejo de la fórmula dada se seleccionan de entre Arg, Lys, His u Orn como se han definido y ocurren típicamente en un cluster de al menos dos, preferentemente de al menos 3, 4, 5 o incluso 6 o más aminoácidos básicos como los aquí definidos. De acuerdo con una realización particularmente preferente, estos clusters pueden comprender también 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o incluso 15 aminoácidos. Talcluster

de aminoácidos básicos, de preferencia un cluster de al menos 3, 4, 5 o incluso 6 o más aminoácidos básicos, preferentemente crea una superficie o zona de unión básica dentro del oligopéptido, lo cual proporciona propiedades ventajosas al oligopéptido como péptido vehículo para el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de acuerdo con la presente invención.

- 5 Según otra realización preferente, el oligopéptido de ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención, de fórmula empírica $(Arg)_i(Lys)_m(His)_n(Orn)_o(Xaa)_x$ (fórmula I) como se ha indicado, puede seleccionarse, sin limitación, de entre el siguiente subgrupo de fórmulas:
- 10 $Arg_8, Arg_9, Arg_{10}, Arg_{11}, Arg_{12}, Arg_{13}, Arg_{14}, Arg_{15}$, (SEQ ID NOs: 1-8);
 $Lys_8, Lys_9, Lys_{10}, Lys_{11}, Lys_{12}, Lys_{13}, Lys_{14}, Lys_{15}$, (SEQ ID NOs: 9-16);
 $His_8, His_9, His_{10}, His_{11}, His_{12}, His_{13}, His_{14}, His_{15}$, (SEQ ID NOs: 17-24);
 $Orn_8, Orn_9, Orn_{10}, Orn_{11}, Orn_{12}, Orn_{13}, Orn_{14}, Orn_{15}$, (SEQ ID NOs: 25-32).

- De acuerdo con otra realización preferente, el oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención, de fórmula empírica $(Arg)_i(Lys)_m(His)_n(Orn)_o(Xaa)_x$ (fórmula I), puede seleccionarse, sin limitarse a, de entre el siguiente subgrupo. Este subgrupo define oligopéptidos de la invención específicos ilustrativos, que corresponden a la fórmula empírica I definida arriba, donde las siguientes fórmulas (al igual que con la fórmula empírica (I)) no especifican un orden para los aminoácidos, sino que intenta reflejar fórmulas empíricas especificando exclusivamente el (número de) aminoácidos como componentes del péptido respectivo. Así, la fórmula empírica $Arg_{(7-14)}Lys_1$ indica que los péptidos de esta fórmula contienen de 7 a 14 residuos de Arg y 1 residuo de Lys en cualquier orden. Si los péptidos contienen 7 residuos de Arg y 1 residuo de Lys, todas las variantes con 7 residuos de Arg y 1 residuo de Lys están incluidas. Por tanto, el residuo Lys puede estar en cualquier lugar de la secuencia de 8 aminoácidos de longitud compuesta por 7 residuos de Arg y 1 de Lys. El subgrupo preferentemente comprende:
- 15
20

$Arg_{(7-14)}Lys_1, Arg_{(7-14)}His_1, Arg_{(7-14)}Orn_1, Lys_{(7-14)}His_1, Lys_{(7-14)}Orn_1, His_{(7-14)}Orn_1;$
 $Arg_{(6-13)}Lys_2, Arg_{(6-13)}His_2, Arg_{(6-13)}Orn_2, Lys_{(6-13)}His_2, Lys_{(6-13)}Orn_2, His_{(6-13)}Orn_2;$
 $Arg_{(5-12)}Lys_3, Arg_{(5-12)}His_3, Arg_{(5-12)}Orn_3, Lys_{(5-12)}His_3, Lys_{(5-12)}Orn_3, His_{(5-12)}Orn_3;$
 $Arg_{(4-11)}Lys_4, Arg_{(4-11)}His_4, Arg_{(4-11)}Orn_4, Lys_{(4-11)}His_4, Lys_{(4-11)}Orn_4, His_{(4-11)}Orn_4;$
 $Arg_{(3-10)}Lys_5, Arg_{(3-10)}His_5, Arg_{(3-10)}Orn_5, Lys_{(3-10)}His_5, Lys_{(3-10)}Orn_5, His_{(3-10)}Orn_5;$
 $Arg_{(2-9)}Lys_6, Arg_{(2-9)}His_6, Arg_{(2-9)}Orn_6, Lys_{(2-9)}His_6, Lys_{(2-9)}Orn_6, His_{(2-9)}Orn_6;$
 $Arg_{(1-8)}Lys_7, Arg_{(1-8)}His_7, Arg_{(1-8)}Orn_7, Lys_{(1-8)}His_7, Lys_{(1-8)}Orn_7, His_{(1-8)}Orn_7;$
 $Arg_{(6-13)}Lys_1His_1, Arg_{(6-13)}Lys_1Orn_1, Arg_{(6-13)}His_1Orn_1, Arg_1Lys_{(6-13)}His_1, Arg_1Lys_{(6-13)}Orn_1, Lys_{(6-13)}His_1Orn_1,$
 $Arg_1Lys_1His_{(6-13)}, Arg_1His_{(6-13)}Orn_1, Lys_1His_{(6-13)}Orn_1;$
 $Arg_{(5-12)}Lys_2His_1, Arg_{(5-12)}Lys_1His_2, Arg_{(5-12)}Lys_2Orn_1, Arg_{(5-12)}Lys_1Orn_2, Arg_{(5-2)}His_2Orn_1, Arg_{(5-12)}His_1Orn_2,$
 $Arg_2Lys_{(5-12)}His_1, Arg_1Lys_{(5-12)}His_2, Arg_2Lys_{(5-12)}Orn_1, Arg_1Lys_{(5-12)}Orn_2, Lys_{(5-12)}His_2Orn_1, Lys_{(5-12)}His_1Orn_2,$
 $Arg_2Lys_2His_{(5-12)}, Arg_1Lys_2His_{(5-12)}, Arg_2His_{(5-12)}Orn_1, Arg_1His_{(5-12)}Orn_2, Lys_2His_{(5-12)}Orn_1, Lys_1His_{(5-12)}Orn_2;$
 $Arg_{(4-11)}Lys_3His_1, Arg_{(4-11)}Lys_2His_2, Arg_{(4-11)}Lys_1His_3, Arg_{(4-11)}Lys_3Orn_1, Arg_{(4-11)}Lys_2Orn_2, Arg_{(4-11)}Lys_1Orn_3,$
 $Arg_{(4-11)}His_3Orn_1, Arg_{(4-11)}His_2Orn_2, Arg_{(4-11)}His_1Orn_3, Arg_3Lys_{(4-11)}His_1, Arg_2Lys_{(4-11)}His_2, Arg_1Lys_{(4-11)}His_3,$
 $Arg_3Lys_{(4-11)}Orn_1, Arg_2Lys_{(4-11)}Orn_2, Arg_1Lys_{(4-11)}Orn_3, Lys_{(4-11)}His_3Orn_1, Lys_{(4-11)}His_2Orn_2, Lys_{(4-11)}His_1Orn_3,$
 $Arg_3Lys_1His_{(4-11)}, Arg_2Lys_2His_{(4-11)}, Arg_1Lys_3His_{(4-11)}, Arg_3His_{(4-11)}Orn_1, Arg_2His_{(4-11)}Orn_2, Arg_1His_{(4-11)}Orn_3,$
 $Lys_3His_{(4-11)}Orn_1, Lys_2His_{(4-11)}Orn_2, Lys_1His_{(4-11)}Orn_3;$
 $Arg_{(3-10)}Lys_4His_1, Arg_{(3-10)}Lys_3His_2, Arg_{(3-10)}Lys_2His_3, Arg_{(3-10)}Lys_1His_4, Arg_{(3-10)}Lys_4Orn_1, Arg_{(3-10)}Lys_3Orn_2,$
 $Arg_{(3-10)}Lys_2Orn_3, Arg_{(3-10)}Lys_1Orn_4, Arg_{(3-10)}His_4Orn_1, Arg_{(3-10)}His_3Orn_2, Arg_{(3-10)}His_2Orn_3, Arg_{(3-10)}His_1Orn_4,$
 $Arg_4Lys_{(3-10)}His_1, Arg_3Lys_{(3-10)}His_2, Arg_2Lys_{(3-10)}His_3, Arg_1Lys_{(3-10)}His_4, Arg_4Lys_{(3-10)}Orn_1, Arg_3Lys_{(3-10)}Orn_2,$
 $Arg_2Lys_{(3-10)}Orn_3, Arg_1Lys_{(3-10)}Orn_4, Lys_{(3-10)}His_4Orn_1, Lys_{(3-10)}His_3Orn_2, Lys_{(3-10)}His_2Orn_3, Lys_{(3-10)}His_1Orn_4,$
 $Arg_4Lys_1His_{(3-10)}, Arg_3Lys_2His_{(3-10)}, Arg_2Lys_3His_{(3-10)}, Arg_1Lys_4His_{(3-10)}, Arg_4His_{(3-10)}Orn_1, Arg_3His_{(3-10)}Orn_2,$
 $Arg_2His_{(3-10)}Orn_3, Arg_1His_{(3-10)}Orn_4, Lys_4His_{(3-10)}Orn_1, Lys_3His_{(3-10)}Orn_2, Lys_2His_{(3-10)}Orn_3, Lys_1His_{(3-10)}Orn_4;$

Arg₍₂₋₉₎Lys₅His₁, Arg₍₂₋₉₎Lys₄His₂, Arg₍₂₋₉₎Lys₃His₃, Arg₍₂₋₉₎Lys₂His₄, Arg₍₂₋₉₎Lys₁His₅, Arg₍₂₋₉₎Lys₅Orn₁,
 Arg₍₂₋₉₎Lys₄Orn₂, Arg₍₂₋₉₎Lys₃Orn₃, Arg₍₂₋₉₎Lys₂Orn₄, Arg₍₂₋₉₎Lys₁Orn₅, Arg₍₂₋₉₎His₅Orn₁, Arg₍₂₋₉₎His₄Orn₂,
 Arg₍₂₋₉₎His₃Orn₃, Arg₍₂₋₉₎His₂Orn₄, Arg₍₂₋₉₎His₁Orn₅, Arg₅Lys₍₂₋₉₎His₁, Arg₄Lys₍₂₋₉₎His₂, Arg₃Lys₍₂₋₉₎His₃,
 Arg₂Lys₍₂₋₉₎His₄, Arg₁Lys₍₂₋₉₎His₅, Arg₅Lys₍₂₋₉₎Orn₁, Arg₄Lys₍₂₋₉₎Orn₂, Arg₃Lys₍₂₋₉₎Orn₃, Arg₂Lys₍₂₋₉₎Orn₄,
 Arg₁Lys₍₂₋₉₎Orn₅, Lys₍₂₋₉₎His₅Orn₁, Lys₍₂₋₉₎His₄Orn₂, Lys₍₂₋₉₎His₃Orn₃, Lys₍₂₋₉₎His₂Orn₄, Lys₍₂₋₉₎His₁Orn₅,
 Arg₅Lys₁His₍₂₋₉₎, Arg₄Lys₂His₍₂₋₉₎, Arg₃Lys₃His₍₂₋₉₎, Arg₂Lys₄His₍₂₋₉₎, Arg₁Lys₅His₍₂₋₉₎, Arg₅His₍₂₋₉₎Orn₁,
 Arg₄His₍₂₋₉₎Orn₂, Arg₃His₍₂₋₉₎Orn₃, Arg₂His₍₂₋₉₎Orn₄, Arg₁His₍₂₋₉₎Orn₅, Lys₅His₍₂₋₉₎Orn₁, Lys₄His₍₂₋₉₎Orn₂,
 Lys₃His₍₂₋₉₎Orn₃, Lys₂His₍₂₋₉₎Orn₄, Lys₁His₍₂₋₉₎Orn₅;

Arg₍₁₋₈₎Lys₆His₁, Arg₍₁₋₈₎Lys₅His₂, Arg₍₁₋₈₎Lys₄His₃, Arg₍₁₋₈₎Lys₃His₄, Arg₍₁₋₈₎Lys₂His₅, Arg₍₁₋₈₎Lys₁His₆,
 Arg₍₁₋₈₎Lys₆Orn₁, Arg₍₁₋₈₎Lys₅Orn₂, Arg₍₁₋₈₎Lys₄Orn₃, Arg₍₁₋₈₎Lys₃Orn₄, Arg₍₁₋₈₎Lys₂Orn₅, Arg₍₁₋₈₎Lys₁Orn₆,
 Arg₍₁₋₈₎His₆Orn₁, Arg₍₁₋₈₎His₅Orn₂, Arg₍₁₋₈₎His₄Orn₃, Arg₍₁₋₈₎His₃Orn₄, Arg₍₁₋₈₎His₂Orn₅, Arg₍₁₋₈₎His₁Orn₆,
 Arg₆Lys₍₁₋₈₎His₁, Arg₅Lys₍₁₋₈₎His₂, Arg₄Lys₍₁₋₈₎His₃, Arg₃Lys₍₁₋₈₎His₄, Arg₂Lys₍₁₋₈₎His₅, Arg₁Lys₍₁₋₈₎His₆,
 Arg₆Lys₍₁₋₈₎Orn₁, Arg₅Lys₍₁₋₈₎Orn₂, Arg₄Lys₍₁₋₈₎Orn₃, Arg₃Lys₍₁₋₈₎Orn₄, Arg₂Lys₍₁₋₈₎Orn₅, Arg₁Lys₍₁₋₈₎Orn₆,
 Lys₍₁₋₈₎His₆Orn₁, Lys₍₁₋₈₎His₅Orn₂, Lys₍₁₋₈₎His₄Orn₃, Lys₍₁₋₈₎His₃Orn₄, Lys₍₁₋₈₎His₂Orn₅, Lys₍₁₋₈₎His₁Orn₆,
 Arg₆Lys₁His₍₁₋₈₎, Arg₅Lys₂His₍₁₋₈₎, Arg₄Lys₃His₍₁₋₈₎, Arg₃Lys₄His₍₁₋₈₎, Arg₂Lys₅His₍₁₋₈₎, Arg₁Lys₆His₍₁₋₈₎,
 Arg₆His₍₁₋₈₎Orn₁, Arg₅His₍₁₋₈₎Orn₂, Arg₄His₍₁₋₈₎Orn₃, Arg₃His₍₁₋₈₎Orn₄, Arg₂His₍₁₋₈₎Orn₅, Arg₁His₍₁₋₈₎Orn₆,
 Lys₆His₍₁₋₈₎Orn₁, Lys₅His₍₁₋₈₎Orn₂, Lys₄His₍₁₋₈₎Orn₃, Lys₃His₍₁₋₈₎Orn₄, Lys₂His₍₁₋₈₎Orn₅, Lys₁His₍₁₋₈₎Orn₆;

Arg₍₅₋₁₂₎Lys₁His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₅₋₁₂₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₅₋₁₂₎Orn₁, Arg₁Lys₁His₁Orn₍₅₋₁₂₎;

Arg₍₄₋₁₁₎Lys₂His₁Orn₁, Arg₍₄₋₁₁₎Lys₁His₂Orn₁, Arg₍₄₋₁₁₎Lys₁His₁Orn₂, Arg₂Lys₍₄₋₁₁₎His₁Orn₁,

Arg₁Lys₍₄₋₁₁₎His₂Orn₁, Arg₁Lys₍₄₋₁₁₎His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His₍₄₋₁₁₎Orn₁, Arg₁Lys₂His₍₄₋₁₁₎Orn₁,

Arg₁Lys₁His₍₄₋₁₁₎Orn₂, Arg₂Lys₁His₁Orn₍₄₋₁₁₎, Arg₁Lys₂His₁Orn₍₄₋₁₁₎, Arg₁Lys₁His₂Orn₍₄₋₁₁₎;

Arg₍₃₋₁₀₎Lys₃His₁Orn₁, Arg₍₃₋₁₀₎Lys₂His₂Orn₁, Arg₍₃₋₁₀₎Lys₂His₁Orn₂, Arg₍₃₋₁₀₎Lys₁His₂Orn₂, Arg₍₃₋₁₀₎Lys₁His₁Orn₃,
 Arg₃Lys₍₃₋₁₀₎His₁Orn₁, Arg₂Lys₍₃₋₁₀₎His₂Orn₁, Arg₂Lys₍₃₋₁₀₎His₁Orn₂, Arg₁Lys₍₃₋₁₀₎His₂Orn₂, Arg₁Lys₍₃₋₁₀₎His₁Orn₃,
 Arg₃Lys₁His₍₃₋₁₀₎Orn₁, Arg₂Lys₂His₍₃₋₁₀₎Orn₁, Arg₂Lys₁His₍₃₋₁₀₎Orn₂, Arg₁Lys₂His₍₃₋₁₀₎Orn₂, Arg₁Lys₁His₍₃₋₁₀₎Orn₃,
 Arg₃Lys₁His₁Orn₍₃₋₁₀₎, Arg₂Lys₂His₁Orn₍₃₋₁₀₎, Arg₂Lys₁His₂Orn₍₃₋₁₀₎, Arg₁Lys₂His₂Orn₍₃₋₁₀₎, Arg₁Lys₁His₃Orn₍₃₋₁₀₎;

Arg₍₂₋₉₎Lys₄His₁Orn₁, Arg₍₂₋₉₎Lys₁His₁Orn₁, Arg₍₂₋₉₎Lys₁His₁Orn₄, Arg₍₂₋₉₎Lys₃His₂Orn₁, Arg₍₂₋₉₎Lys₃His₁Orn₂,
 Arg₍₂₋₉₎Lys₂His₃Orn₁, Arg₍₂₋₉₎Lys₂His₁Orn₃, Arg₍₂₋₉₎Lys₁His₂Orn₃, Arg₍₂₋₉₎Lys₁His₃Orn₂, Arg₍₂₋₉₎Lys₂His₂Orn₂,
 Arg₄Lys₍₂₋₉₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₂₋₉₎His₄Orn₁, Arg₁Lys₍₂₋₉₎His₁Orn₄, Arg₃Lys₍₂₋₉₎His₂Orn₁, Arg₃Lys₍₂₋₉₎His₁Orn₂,
 Arg₂Lys₍₂₋₉₎His₃Orn₁, Arg₂Lys₍₂₋₉₎His₁Orn₃, Arg₁Lys₍₂₋₉₎His₂Orn₃, Arg₁Lys₍₂₋₉₎His₃Orn₂, Arg₂Lys₍₂₋₉₎His₂Orn₂,
 Arg₄Lys₁His₍₂₋₉₎Orn₁, Arg₁Lys₄His₍₂₋₉₎Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₂₋₉₎Orn₄, Arg₃Lys₂His₍₂₋₉₎Orn₁, Arg₃Lys₁His₍₂₋₉₎Orn₂,
 Arg₂Lys₃His₍₂₋₉₎Orn₁, Arg₂Lys₁His₍₂₋₉₎Orn₃, Arg₁Lys₂His₍₂₋₉₎Orn₃, Arg₁Lys₃His₍₂₋₉₎Orn₂, Arg₂Lys₂His₍₂₋₉₎Orn₂,
 Arg₄Lys₁His₁Orn₍₂₋₉₎, Arg₁Lys₄His₁Orn₍₂₋₉₎, Arg₁Lys₁His₄Orn₍₂₋₉₎, Arg₃Lys₂His₁Orn₍₂₋₉₎, Arg₃Lys₁His₂Orn₍₂₋₉₎,
 Arg₂Lys₃His₁Orn₍₂₋₉₎, Arg₂Lys₁His₃Orn₍₂₋₉₎, Arg₁Lys₂His₃Orn₍₂₋₉₎, Arg₁Lys₃His₂Orn₍₂₋₉₎, Arg₂Lys₂His₂Orn₍₂₋₉₎;

Arg₍₁₋₈₎Lys₅His₁Orn₁, Arg₍₁₋₈₎Lys₁His₅Orn₁, Arg₍₁₋₈₎Lys₁His₁Orn₅, Arg₍₁₋₈₎Lys₄His₂Orn₁, Arg₍₁₋₈₎Lys₂His₄Orn₁,
 Arg₍₁₋₈₎Lys₂His₁Orn₄, Arg₍₁₋₈₎Lys₁His₂Orn₄, Arg₍₁₋₈₎Lys₁His₄Orn₂, Arg₍₁₋₈₎Lys₄His₁Orn₂, Arg₍₁₋₈₎Lys₃His₃Orn₁,
 Arg₍₁₋₈₎Lys₃His₁Orn₃, Arg₍₁₋₈₎Lys₁His₃Orn₃, Arg₅Lys₍₁₋₈₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₁₋₈₎His₅Orn₁, Arg₁Lys₍₁₋₈₎His₁Orn₅,
 Arg₄Lys₍₁₋₈₎His₂Orn₁, Arg₂Lys₍₁₋₈₎His₄Orn₁, Arg₂Lys₍₁₋₈₎His₁Orn₄, Arg₁Lys₍₁₋₈₎His₂Orn₄, Arg₁Lys₍₁₋₈₎His₄Orn₂,
 Arg₄Lys₍₁₋₈₎His₁Orn₂, Arg₃Lys₍₁₋₈₎His₃Orn₁, Arg₃Lys₍₁₋₈₎His₁Orn₃, Arg₁Lys₍₁₋₈₎His₃Orn₃, Arg₅Lys₁His₍₁₋₈₎Orn₁,
 Arg₁Lys₅His₍₁₋₈₎Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₁₋₈₎Orn₅, Arg₄Lys₂His₍₁₋₈₎Orn₁, Arg₂Lys₄His₍₁₋₈₎Orn₁, Arg₂Lys₁His₍₁₋₈₎Orn₄,
 Arg₁Lys₂His₍₁₋₈₎Orn₄, Arg₁Lys₄His₍₁₋₈₎Orn₂, Arg₄Lys₁His₍₁₋₈₎Orn₂, Arg₃Lys₃His₍₁₋₈₎Orn₁, Arg₃Lys₁His₍₁₋₈₎Orn₃,
 Arg₁Lys₃His₍₁₋₈₎Orn₃, Arg₅Lys₁His₁Orn₍₁₋₈₎, Arg₁Lys₅His₁Orn₍₁₋₈₎, Arg₁Lys₁His₅Orn₍₁₋₈₎, Arg₄Lys₂His₁Orn₍₁₋₈₎,
 Arg₂Lys₄His₁Orn₍₁₋₈₎, Arg₂Lys₁His₄Orn₍₁₋₈₎, Arg₁Lys₂His₄Orn₍₁₋₈₎, Arg₁Lys₄His₂Orn₍₁₋₈₎, Arg₄Lys₁His₂Orn₍₁₋₈₎,
 Arg₃Lys₃His₁Orn₍₁₋₈₎, Arg₃Lys₁His₃Orn₍₁₋₈₎, Arg₁Lys₃His₃Orn₍₁₋₈₎;

5 De acuerdo con una realización preferente, el oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejo de la presente invención, de fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x, se selecciona de entre el grupo consistente en: Arg₈, Arg₉, Arg₁₀, Arg₁₁, Arg₁₂, Arg₁₃, Arg₁₄, Arg₁₅, (SEQ ID NOS: 1-8); Lys₈, Lys₉, Lys₁₀, Lys₁₁, Lys₁₂, Lys₁₃, Lys₁₄, Lys₁₅, (SEQ ID NOS: 9-16); His₈, His₉, His₁₀, His₁₁, His₁₂, His₁₃, His₁₄, His₁₅, (SEQ ID NOS: 17-24); o Orn₈, Orn₉, Orn₁₀, Orn₁₁, Orn₁₂, Orn₁₃, Orn₁₄, Orn₁₅, (SEQ ID NOS: 25-32).

10 De acuerdo con otra realización preferente, el oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejo de la presente invención, de fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x, se selecciona de entre el grupo consistente en las fórmulas generales Arg₉ (también llamada R9), Arg₉His₃ (también llamada

R9H3), His₃Arg₉His₃ (también llamada H3R9H3), TyrSerSerArg₉SerSerTyr (también llamada YSSR9SSY), His₃Arg₉SerSerTyr (también llamada H3R9SSY), (ArgLysHis)₄ (también llamada (RKH)₄), Tyr(ArgLysHis)₂Arg (también llamada Y(RKH)₂R). Con especial preferencia, estas fórmulas generales se definen como sigue:

Arg ₉ :	Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg (SEQ ID NO: 2)
Arg ₉ His ₃ :	Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His-His-His (SEQ ID NO: 39)
His ₃ Arg ₉ His ₃ :	His-His-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His-His-His (SEQ ID NO: 40)
TyrSerSerArg ₉ SerSerTyr:	Tyr-Ser-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr (SEQ ID NO: 41)
His ₃ Arg ₉ SerSerTyr:	His-His-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr (SEQ ID NO: 42)
(ArgLysHis) ₄ :	Arg-Lys-His-Arg-Lys-His-Arg-Lys-His-Arg-Lys-His (SEQ ID NO: 43)
Tyr(ArgLysHis) ₂ Arg:	Tyr-Arg-Lys-His-Arg-Lys-His-Arg (SEQ ID NO: 44).

5

El al menos un oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejado (molécula) de la presente invención, de fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x como se ha indicado, puede modificarse adicionalmente. Modificaciones en el contexto de la presente invención comprenden típicamente cualquier modificación adecuada para péptidos, siempre que estas modificaciones no interfieran con la capacidad de transfección del ARN complejado resultante.

10

Así, modificaciones típicas pueden incluir, por ejemplo, el uso de aminoácidos modificados como los definidos anteriormente. Además, los residuos aminoácido terminales del oligopéptido, de fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x mostrada, con sus grupos carboxi (terminal C) y amino (terminal N) (así como grupos de cadena lateral aminoácido carboxi o amida, véase arriba) pueden estar presentes en su forma protegida (por ejemplo, el terminal C protegido por un grupo amida) y/o no protegida, usando grupos protectores amino o carboxilo adecuados. Asimismo, también pueden emplearse sales de adición con ácidos del oligopéptido de la fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x mostrada. Las sales de adición con ácidos comunes son sales de halo ácidos, esto es de HBr, HI, o preferiblemente de HCl.

15

La PEGilación de los grupos carboxilo de la cadena terminal o lateral o del grupo épsilon-amino de la lisina del oligopéptido de la fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x mostrada confiere resistencia frente a la aglomeración y degradación de suero y también está dentro del alcance de la presente invención.

20

El al menos un oligopéptido de ARN monohebra inmunoestimuladorio complejado (molécula) de la presente invención, de fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x, puede además modificarse para unirse a o acoplarse a al menos un ligando específico, donde el al menos un ligando específico puede unirse a o acoplarse con uno o ambos extremos terminales del oligopéptido. El o los ligandos específicos unidos a o acoplados a uno o ambos extremos terminales del oligopéptido pueden ser idénticos o diferentes y pueden seleccionarse de entre cualquier compuesto capaz de unirse a o interactuar con un receptor o una proteína o un complejo proteína/receptor, por ejemplo en la superficie celular, o, por ejemplo, sin limitarse a, péptido RGD, transferrina o manosa, etc.

25

Otras modificaciones preferentes que resultan en derivados del oligopéptido de la fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x mostrada se basan en carbohidratos y/o lípidos que pueden unirse covalentemente al oligopéptido. Se prefiere acoplar carbohidratos y/o lípidos a la serina, la treonina, la asparagina, la glutamina o la tirosina o al glutamato o aspartato mediante sus partes de cadena lateral reactivas. Alternativamente, los carbohidratos y/o lípidos también pueden enlazarse a las partes terminales del oligopéptido aquí definido. Además, el oligopéptido puede acoplarse a una porción de péptido o proteína funcionalmente diferente que puede estabilizarlo y/o que puede servir para mejorar las propiedades de transporte del oligopéptido en los fluidos corporales, en particular en la sangre. Péptidos o proteínas adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, entre albúmina, transferrina, etc., que pueden acoplarse directamente al oligopéptido de la fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x mostrada o bien hacerlo mediante secuencia enlazante peptídica u orgánica. Preferentemente, estos péptidos o proteínas se enlazan a uno de los terminales del oligopéptido.

35

40

En este contexto, debe apuntarse que una modificación del oligopéptido de la fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x mostrada con lípidos típicamente no incluye el uso de ácidos grasos (saturados o insaturados), particularmente no incluye el uso de ácidos grasos de cadena larga (saturados o insaturados) (en particular con una longitud de cadena >C₁₂, >C₁₄ o >C₁₆). Así, en el contexto de la presente invención, la modificación del oligopéptido de la fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x mostrada con ácidos grasos no forma parte integrante de la presente invención. Sin embargo, si finalmente se emplean ácidos grasos para modificar el péptido vehículo, éstos pueden seleccionarse entonces, sin limitarse a, de entre el grupo que comprende, por ejemplo, ácido graso butanoico (ácido graso butírico), ácido graso pentanoico (ácido graso valérico), ácido graso hexanoico (ácido graso caproico), ácido graso octanoico (ácido

45

50

graso caprílico), ácido graso nonanoico (ácido graso pelargónico), ácido graso decanoico (ácido graso cáprico), ácido graso dodecanoico (ácido graso láurico), ácido graso tetradecanoico (ácido graso mirístico), ácido graso hexadecanoico (ácido graso palmítico), ácido graso heptadecanoico (ácido graso margárico (datúrico)), ácido graso octadecanoico (ácido graso esteárico), ácido graso eicosanoico (ácido graso araquídico), ácido graso docosanoico (ácido graso behénico), ácido graso tetracosanoico (ácido graso lignocérico), ácido graso hexacosanoico (ácido graso cerótico), ácido graso heptacosanoico (ácido graso carbocérico), ácido graso octacosanoico (ácido graso montánico), ácido graso triacontanoico (ácido graso melísico), ácido graso dotriacontanoico (ácido graso lacceroico), ácido graso tritriacontanoico (ácido graso ceromelísico (psílico)), ácido graso tetratriacontanoico (ácido graso gédico), ácido graso pentatriacontanoico (ácido graso ceroplástico), etc., o sus análogos no saturados. Como ejemplo particular, la presente invención típicamente no incluye el uso de ácido graso octadecanoico (ácido graso esteárico) o sus análogos insaturados para modificar los péptidos vehículo de la fórmula I, es decir, ningún oligopéptido estearilado de fórmula I puede usarse aquí para la complejación del componente de ARN del complejo de la invención.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, para evitar el problema de la degradación del oligopéptido de fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, se emplea un isómero retro-inverso del oligopéptido anterior compuesto de aminoácidos D o al menos compuesto parcialmente de aminoácidos D. El término "isómero retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal donde la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada residuo de aminoácido está invertida (véase, por ejemplo, Jameson y col., *Nature*, 368, 744-746 (1994); Brady y col., *Nature*, 368, 692-693 (1994)). Con respecto al péptido de origen, el péptido retro-inverso se ensambla en el orden de aminoácidos inverso, típicamente con derivados de aminoácidos F-moc. Típicamente, los péptidos crudos pueden purificarse mediante HPLC de fase inversa.

Otras modificaciones que se pueden introducir en el oligopéptido de la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ mostrada se refieren a modificaciones en el esqueleto peptídico. Preferentemente, los oligopéptidos modificados son de armazones miméticos. Su esqueleto es diferente del que ocurre naturalmente, mientras que sus estructuras de cadena lateral son idénticas con los oligopéptidos o sus fragmentos, variantes o derivados. En general, los miméticos estructurales presentan una modificación en uno o más de los miembros de la cadena del esqueleto (NH, CH, CO), ya sea como sustitución (preferente) o como inserción. Los sustituyentes son, por ejemplo, (I)-O-, -S- o -CH₂- en lugar de -NH-; (II)-N-, C-alquilo- o -BH- en lugar de -CHR- y (III)-CS-, -CH₂-, -SO_n-, -P=O(OH)- o -B(OH)- en lugar de -CO-. Un péptido mimético de un oligopéptido, con la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ aquí definida, puede ser una combinación de cada una de estas modificaciones. En particular, las modificaciones de cada uno de los grupos I, II y III pueden combinarse. En un péptido mimético, cada elemento de la cadena del esqueleto puede modificarse o alternativamente sólo número de miembros de la cadena pueden intercambiarse por una porción que no ocurre naturalmente. De preferencia, en todos los miembros de la cadena del esqueleto de un oligopéptido de fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, cada -NH-, -CHR- o CO pueden cambiarse por otro grupo que no ocurre naturalmente. En caso de que el enlace amida (-NH-CO) del esqueleto del oligopéptido esté sustituido (en la molécula completa o al menos en una sola posición), las porciones sustituyentes preferentes son bioisostéricas, por ejemplo, enlaces amida retro-inversos (-CO-NH-), hidroxiletileno (-CH(OH)-CH₂-), alqueno (CH₂=CH-), carba (CH₂-CH₂-) y/o -P=O(OH)-CH₂-. Alternativamente, puede sucederse un alargamiento de la cadena del esqueleto debido a inserciones en un mimético estructural del oligopéptido de fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, por ejemplo con porciones que flanquean el átomo C-alfa. En cada lado del átomo C-alfa, se puede insertar por ejemplo -O-, -S-, -CH-, -NH-.

Es particularmente preferente el esqueleto peptídico de oligocarbamato del oligopéptido de la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ aquí definida. Así, el enlace amida puede reemplazarse por una parte carbamato. Los aminoalquilcarbonatos monoméricos N-protectados son accesibles vía los aminoácidos o aminoalcoholes correspondientes. Éstos se convierten en ésteres activos, por ejemplo p-nitrofenil éster, usando la porción F-moc o un grupo nitroariloxycarbonilo fotosensible mediante síntesis en fase sólida.

El ARN monohebra inmunoestimuladorio complejado de la presente invención comprende además al menos un ARN (molécula) adecuado para la transfección, donde dicho al menos un ARN (molécula) está complejado con uno o más oligopéptidos de fórmula empírica I $((Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x)$, como se ha descrito anteriormente.

El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimuladorio complejado de la presente invención puede tener cualquier longitud (preferentemente dependiendo del tipo de ARN que será aplicado como ARN complejado de acuerdo con la presente invención). Sin limitación, el al menos un ARN (molécula) puede tener una longitud de 5 a 20.000 nucleótidos, preferentemente de 5a 10.000 o de 300 a 10.000 nucleótidos, con especial preferencia de 5 a 5.000 nucleótidos, y con total preferencia de 20 a 5.000, de 50 a 5.000, de 100 a 5.000 o de 300 a 10.000 nucleótidos, dependiendo del tipo de ARN a transfectar (véase la descripción posterior).

El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede ser cualquier ARN, preferentemente, sin limitarse a, un oligonucleótido de ARN corto (longitud preferente de 5 a 80 o en especial de 20 a 80 nucleótidos), un ARN codificador, un ARN inmunoestimulador, un ARNsi, un ARN antisentido o regulador de la expresión, ribozimas o aptámeros. El

5 ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede también ser un ARN circular o lineal, preferentemente lineal. Con especial preferencia, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede ser un ARN de una sola hebra lineal. El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede ser un ARN ribosómico (ARNr), de transferencia (ARNt),

10 mensajero (ARNm) o viral (ARNv), preferentemente un ARNm. La presente invención permite que todas estas moléculas de ARN sean transfectadas en la célula. En este contexto, un ARNm es típicamente un ARN compuesto por varios elementos estructurales, por ejemplo una región 5'-UTR opcional, un sitio de unión ribosómica aguas arriba seguido por una región codificadora, una región 3'-UTR opcional, que puede estar seguida de una cola poli-A (y/o una cola poli-C). Un ARNm puede ocurrir como un ARN mono-, di- o incluso multicistónico, es decir, un ARN que porte las secuencias de codificación de una, dos o más proteínas. Estas

15 secuencias codificadoras del ARNm di- o incluso multicistónico pueden estar separadas por al menos una secuencia IRES, por ejemplo, como la aquí definida.

Oligonucleótidos de ARN cortos

El al menos un ARN (molécula) de ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede ser un oligonucleótido de ARN corto. En el contexto de la presente invención, los oligonucleótidos de ARN cortos pueden comprender cualquier ARN como el definido anteriormente. Preferentemente, el oligonucleótido de ARN corto puede ser un oligonucleótido de ARN de una sola hebra lineal.

Preferentemente, los oligonucleótidos de ARN cortos aquí empleados comprenden una longitud tal como la definida en general para las moléculas de ARN, en especial una longitud de 5 a 100, de 5 a 50 o de 5 a 30, o,

25 alternativamente, una longitud de 20 a 100, de 20 a 80 o incluso en particular de 20 a 60 nucleótidos. Los oligonucleótidos de ARN cortos pueden emplearse con diversos fines, por ejemplo para la estimulación inmune (no específica) o para reducir/suprimir la transcripción/traducción de genes.

ARN de codificación

El al menos un ARN (molécula) de ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede ser un ARN de codificación. El ARN de codificación del ARN complejo de la presente invención puede ser cualquier ARN tal como el definido anteriormente. Preferentemente, el ARN de codificación puede ser un ARN circular o lineal, en especial lineal. En particular, el ARN de codificación puede ser un ARN de una sola hebra lineal. Con especial preferencia, el ARN de codificación puede ser un ARN mensajero (ARNm) monohebra lineal.

El ARN de codificación puede codificar además para una proteína o un péptido, el cual puede seleccionarse de entre, sin limitarse a, por ejemplo, proteínas o péptidos terapéuticamente activos, antígenos tumorales, anticuerpos, proteínas inmunoestimuladoras o péptidos, etc., o cualquier otra proteína o péptido adecuado para una aplicación (terapéutica) específica donde el al menos un ARN (molécula) que codifica para la proteína debe ser transportado al interior de una célula, un tejido o un organismo, siendo la proteína expresada subsecuentemente en esta célula, tejido u organismo.

40

En este contexto, las proteínas terapéuticamente activas pueden seleccionarse de entre cualquier proteína recombinante o aislada conocida el experto en la materia. Sin limitación, proteínas terapéuticamente activas codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido se pueden seleccionar de entre factores apoptóticos o proteínas relacionadas con la apoptosis, incluyendo AIF, Apaf por ejemplo Apaf-1, Apaf-2, Apaf-3, o APO-2 (L), APO-3 (L), Apopain, Bad, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-x_s, bik, CAD, Calpaína, Caspasa, por ejemplo Caspasa-1, Caspasa-2, Caspasa-3, Caspasa-4, Caspasa-5, Caspasa-6, Caspasa-7, Caspasa-8, Caspasa-9, Caspasa-10, Caspasa-11, ced-3, ced-9, c-Jun, c-Myc, crm A, citocromo C, CdR1, DcR1, DD, DED, DISC, DNA-PKc_β, DR3, DR4, DR5, FADD/MORT-1, FAK, Fas (Fas-ligando CD95/fas (receptor)), FLICE/MACH, FLIP, fodrina, fos, G-Actina, Gas-2, gelsolina, granzima A/B, ICAD, ICE, JNK, lamina A/B, MAP, MCL-1, Mdm-2, MEKK-1, MORT-1, NEDD, NF-_{kappa}B, NuMa, p53, PAK-2, PARP, perforina, PITSLRE, PKC delta, pRb, presenilina, prICE, RAIDD, Ras, RIP, esfingomielinasa, timidinaquinasa de herpes simple, TRADD, TRAF2, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, transglutaminasa, etc.

45

Las proteínas terapéuticamente activas codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido también pueden seleccionarse de entre proteínas recombinantes, incluyendo proteínas seleccionadas del grupo consistente en OATL3, OFC3, OPA3, OPD2, 4-1BBL, 5T4, 6Cquina, 707-AP, 9D7, A2M, AA, AAAS, AACT, AASS, ABAT, ABCA1, ABCA4, ABCB1, ABCB11, ABCB2, ABCB4, ABCB7, ABCC2, ABCC6, ABCC8, ABCD1, ABCD3, ABCG5, ABCG8, ABL1, ABO, ABR

55

ACAA1, ACACA, ACADL, ACADM, ACADS, ACADVL, ACAT1, ACCPN, ACE, ACHE, ACHM3, ACHM1,
 ACLS, ACPI, ACTA1, ACTC, ACTN4, ACVRL1, AD2, ADA, ADAMTS13, ADAMTS2, ADFN, ADH1B, ADH1C,
 ADLDH3A2, ADRB2, ADRB3, ADSL, AEZ, AFA, AFD1, AFP, AGA, AGL, AGMX2, AGPS, AGS1, AGT,
 5 AGTR1, AGXT, AH02, AHCY, AHDS, AHHR, AHSG, AIC, AIED, AIH2, AIH3, AIM-2, AIPL1, AIRE, AK1,
 ALAD, ALAS2, ALB, HPG1, ALDH2, ALDH3A2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH1A1, ALDOA, ALDOB, ALMS1,
 ALPL, ALPP, ALS2, ALX4, AMACR, AMBP, AMCD, AMCD1, AMCN, AMELX, AMELY, AMGL, AMH, AMHR2,
 AMPD3, AMPD1, AMT, ANC, ANCR, ANK1, ANOP1, AOM, APOA4, APOC2, APOC3, AP3B1, APC, aPKC,
 APOA2, APOA1, APOB, APOC3, APOC2, APOE, APOH, APP, APRT, APS1, AQP2, AR, ARAF1, ARG1,
 10 ARHGEF12, ARMET, ARSA, ARSB, ARSC2, ARSE, ART-4, ARTC1/m, ARTS, ARVD1, ARX, AS, ASAH,
 ASAT, ASD1, ASL, ASMD, ASMT, ASNS, ASPA, ASS, ASSP2, ASSP5, ASSP6, AT3, ATD, ATHS, ATM,
 ATP2A1, ATP2A2, ATP2C1, ATP6B1, ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ATPSK2, ATRX, ATXN1, ATXN2, ATXN3,
 AUTS1, AVMD, AVP, AVPR2, AVSD1, AXIN1, AXIN2, AZF2, B2M, B4GALT7, B7H4, BAGE, BAGE-1, BAX,
 BBS2, BBS3, BBS4, BCA225, BCAA, BCH, BCHE, BCKDHA, BCKDHB, BCL10, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6,
 BCPM, BCR, BCR/ABL, BDC, BDE, BDMF, BDMR, BEST1, beta-Catenina/nn, BF, BFHD, BFC, BFL6,
 15 BFSP2, BGLAP, BGN, BHD, BHR1, BING-4, BIRC5, BJS, BLM, BLMH, BLNK, BMPR2, BPGM, BRAF,
 BRCA1, BRCA1/m, BRCA2, BRCA2/m, BRCD2, BRCD1, BRDT, BSCL, BSCL2, BTAA, BTD, BTK, BUB1,
 BWS, BZX, COL2A1, COL6A1, C1NH, C1QA, C1QB, C1QG, C1S, C2, C3, C4A, C4B, C5, C6, C7, C7orf2,
 C8A, C8B, C9, CA125, CA15-3/CA 27-29, CA195, CA19-9, CA72-4, CA2, CA242, CA50, CABYR, CACD,
 CACNA2D1, CACNA1A, CACNA1F, CACNA1S, CACNB2, CACNB4, CAGE, CA1, CALB3, CALCA, CALCR,
 20 CALM, CALR, CAM43, CAMEL, CAP-1, CAPN3, CARD15, CASP-5/m, CASP-8, CASP-8/m, CASR, CAT,
 CATM, CAV3, CB1, CBBM, CBS, CCA1, CCAL2, CCAL1, CCAT, CCL-1, CCL-11, CCL-12, CCL-13, CCL-14,
 CCL-15, CCL-16, CCL-17, CCL-18, CCL-19, CCL-2, CCL-20, CCL-21, CCL-22, CCL-23, CCL-24, CCL-25,
 CCL-27, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-7, CCL-8, CCM1, CCNB1, CCND1, CCO, CCR2, CCR5, CCT, CCV,
 CCZS, CD1, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD27L, cD3, CD30, CD30, CD30L, CD33, CD36, CD3E,
 25 CD3G, CD3Z, CD4, CD40, CD4OL, CD44, CD44v, CD44v6, CD52, CD55, CD56, CD59, CD80, CD86,
 CDAN1, CDAN2, CDAN3, CDC27, CDC27/m, CDC2L1, CDH1, CDK4, CDK4/m, CDKN1C, CDKN2A,
 CDKN2A/m, CDKN1A, CDKN1C, CDL1, CDPD1, CDR1, CEA, CEACAM1, CEACAM5, CECR, CECR9,
 CEPA, CETP, CFNS, CFTR, CGF1, CHAC, CHED2, CHED1, CHEK2, CHM, CHML, CHR39C, CHRNA4,
 CHRNA1, CHRN1, CHRNE, CHS, CHS1, CHST6, CHX10, CIAS1, CIDX, CKN1, CLA2, CLA3, CLA1,
 30 CLCA2, CLCN1, CLCN5, CLCNKB, CLDN16, CLP, CLN2, CLN3, CLN4, CLN5, CLN6, CLN8, C1QA, C1QB,
 C1QG, C1R, CLS, CMCWTD, CMDJ, CMD1A, CMD1B, CMH2, MH3, CMH6, CMKBR2, CMKBR5, CML28,
 CML66, CMM, CMT2B, CMT2D, CMT4A, CMT1A, CMTX2, CMTX3, C-MYC, CNA1, CND, CNGA3, CNGA1,
 CNGB3, CNSN, CNTF, COA-1/m, COCH, COD2, COD1, COH1, COL10A, COL2A2, COL11A2, COL17A1,
 COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL6A1,
 35 COL6A2, COL6A3, COL7A1, COL8A2, COL9A2, COL9A3, COL11A1, COL1A2, COL23A1, COL1A1, COLQ,
 COMP, COMT, CORD5, CORD1, COX10, COX-2, CP, CPB2, CPO, CPP, CPS1, CPT2, CPT1A, CPX, CRAT,
 CRB1, CRBM, CREBBP, CRH, CRHBP, CRS, CRV, CRX, CRYAB, CRYBA1, CRYBB2, CRYGA, CRYGC,
 CRYGD, CSA, CSE, CSF1R, CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, CSF1R, CST3, CSTB, CT, CT7, CT-9/BRD6,
 CTA1, CTACK, CTEN, CTH, CTHM, CTLA4, CTM, CTNNB1, CTNS, CTPA, CTSB, CTSC, CTSK, CTSL,
 40 CTS1, CUBN, CVD1, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL16, CXCL2, CXCL3,
 CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CYB5, CYBA, CYBB, CYBB5, CYFRA 21-1, CYLD,
 CYLD1, CYMD, CYP11B1, CYP11B2, CYP17, CYP17A1, CYP19, CYP19A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP21A2,
 CYP27A1, CYP27B1, CYP2A6, CYP2C, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D, CYP2D6, CYP2D7P1, CYP3A4,
 CYP7B1, CYPB1, CYP11B1, CYP1A1, CYP1B1, CYRAA, D40, DADI, DAM, DAM-10/MAGE-B1, DAM-
 45 6/MAGE-B2, DAX1, DAZ, DBA, DBH, DBI, DBT, DCC, DC-CK1, DCK, DCR, DCX, DDB 1, DDB2, DDIT3,
 DDU, DECR1, DEK-CAN, DEM, DES, DF, DFN2, DFN4, DFN6, DFNA4, DFNA5, DFN5, DGCR, DHCR7,
 DHFR, DHOF, DHS, DIA1, DIAPH2, DIAPH1, DIH1, DIO1, DISC1, DKC1, DLAT, DLD, DLL3, DLX3, DMBT1,
 DMD, DM1, DMPK, DMWD, DNAI1, DNASE1, DNMT3B, DPEP1, DPYD, DPYS, DRD2, DRD4, DRPLA,
 DSCR1, DSG1, DSP, DSPP, DSS, DTDP2, DTR, DURS1, DWS, DYS, DYSF, DYT2, DYT3, DYT4, DYT2,
 50 DYT1, DYX1, EBAF, EBM, EBNA, EBP, EBR3, EBS1, ECA1, ECB2, ECE1, ECGF1, ECT, ED2, ED4, EDA,
 EDAR, ECA1, EDN3, EDNRB, EEC1, EEF1A1 L14, EEGV1, EFEMP1, EFTUD2/m, EGFR, EGFR/Her1, EGI,
 EGR2, EIF2AK3, eIF4G, EKV, EI IS, ELA2, ELF2, ELF2M, ELK1, ELN, ELONG, EMD, EML1, EMMPRIN,
 EMX2, ENA-78, ENAM, END3, ENG, ENO1, ENPP1, ENUR2, ENUR1, EOS, EP300, EPB41, EPB42,
 EPCAM, EPD, EphA1, EphA2, EphA3, EfrinaA2, EfrinaA3, EPHX1, EPM2A, EPO, EPOR, EPX, ERBB2,
 55 ERCC2 ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERVR, ESR1, ETFA, ETFB, ETFDH, ETM1, ETV6-AML1, ETV1,
 EVC, EVR2, EVR1, EWSR1, EXT2, EXT3, EXT1, EYA1, EYCL2, EYCL3, EYCL1, EZH2, F10, F11, F12,
 F13A1, F13B, F2, F5, F5F8D, F7, F8, F8C, F9, FABP2, FACL6, FAH, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2,
 FANCF, FasL, FBN2, FBN1, FBP1, FCG3RA, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCHL, FCMD, FCP1, FDP5L5,
 FECH, FEO, FEOM1, FES, FGA, FGB, FGD1, FGF2, FGF23, FGF5, FGFR2, FGFR3, FGFR1, FGG, FGS1,
 60 FH, FIC1, FIH, F2, FKBP6, FLNA, FLT4, FMO3, FMO4, FMR2, FMR1, FN, FN1/m, FOXC1, FOXE1, FOXL2,
 FOXO1A, FPDMM, FPF, Era-1, FRAXF, FRDA, FSHB, FSHMD1A, FSHR, FTH1, FTHL17, FTL, FTZF1,
 FUCA1, FUT2, FUT6, FUT1, FY, G250, G250/CAIX, G6PC, G6PD, G6PT1, G6PT2, GAA, GABRA3, GAGE-1,
 GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GALC, GALE, GALK1, GALNS, GALT,
 GAMT, GAN, GAST, GASTRINA17, GATA3, GATA, GBA, GBE, GC, GCDH, GCGR, GCH1, GCK, GCP-2,
 65 GCS1, G-CSF, GCSH, GCSL, GCY, GDEP, GDF5, GDI1, GDNF, GDXY, GFAP, GFND, GGCX, GGT1, GH2,
 GH1, GHR, GHRHR, GHS, GIF, GINGF, GIP, GJA3, GJA8, GJB2, GJB3, GJB6, GJB1, GK, GLA, GLB,

GLB1, GLC3B, GLC1B, GLC1C, GLDC, GLI3, GLP1, GLRA1, GLUD1, GM1 (fuc-GM1), GM2A, GM-CSF, GMPR, GNAI2, GNAS, GNAT1, GNB3, GNE, GNPTA, GNRH, GNRH1, GNRHR, GNS, GnT-V, gp100, GP1BA, GP1BB, GP9, GPC3, GPD2, GPDS1, GPI, GP1BA, GPN1LW, GPNMB/m, GPSC, GPX1, GRHPR, GRK1, GRO, GRO, GRO, GRPR, GSE, GSM1, GSN, GSR, GSS, GTD, GTS, GUCA1A, GUCY2D, GULOP, GUSB, GUSM, GUST, GYPA, GYPC, GYS1, GYS2, HOKPP2, HOMG2, HADHA, HADHB, HAGE, HAGH, HAL, HAST-2, HB1, HBA2, HBA1, HBB, HBBP1, HBD, HBE1, HBG2, HBG1, HBHR, HBP1, HBQ1, HBZ, HBZP, HCA, HCC-1, HCC-4, HCF2, HCG, HCL2, HCL1, HCR, HCVS, HD, HPN, HER2, HER2/NEU, HER3, HERV-K-MEL, HESX1, HEXA, HEXB, HF1, HFE, HF1, HGD, HHC2, HHC3, HHG, HK1 HLA-A, HLA-A*0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HLA-DPB1 HLA-DRA, HLCS, HLXB9, HMBS, HMGA2, HMGCL, HMI, HMN2, HMOX1, HMS1 HMW-MAA, HND, HNE, HNF4A, HOAC, HOMEBOX NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HOXA1 HOXD13, HP, HPC1, HPD, HPE2, HPE1, HPFH, HPFH2, HPRT1, HPS1, HPT, HPV-E6, HPV-E7, HR, HRAS, HRD, HRG, HRPT2, HRPT1, HRX, HSD11B2, HSD17B3, HSD17B4, HSD3B2, HSD3B3, HSN1, HSP70-2M, HSPG2, HST-2, HTC2, HTC1, hTERT, HTN3, HTR2C, HVBS6, HVBS1, HVEC, HV1S, HYAL1, HYR, 1-309, IAB, IBGC1, IBM2, ICAM1, ICAM3, iCE, ICHQ, ICR5, ICR1, ICS 1, IDDM2, IDDM1, IDS, IDUA, IF, IFNa/b, IFNGR1, IGAD1, IGER, IGF-1R, IGF2R, IGF1, IGH, IGHC, IGHG2, IGHG1, IGHM, IGHR, IGKC, IHG1, IHH, IKBKG, IL1, IL-1 RA, IL10, IL-11, IL12, IL12RB1, IL13, IL-13Ra2, IL-15, IL-16, IL-17, IL18, IL-1a, IL-1 α , IL-1b, IL-1 β , IL1RAPL1, IL2, IL24, IL-2R, IL2RA, IL2RG, IL3, IL3RA, IL4, IL4R, IL4R, IL-5, IL6, IL-7, IL7R, IL-8, IL-9, receptor de laminina inmaduro, IMMMP2L, INDX, INFGR1, INFGR2, INF α , IFN β INF γ , INS, INSR, INVS, IP-10, IP2, IPF1, IP1, IRF6, IRS1, ISCW, ITGA2, ITGA2B, ITGA6, ITGA7, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITIH1, ITM2B, IV, IVD, JAG1, JAK3, JBS, JBTS1, JMS, JPD, KAL1, KAL2, KALI, KLK2, KLK4, KCNA1, KCNE2, KCNE1, KCNH2, KCNJ1, KCNJ2, KCNJ1, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ4, KCNQ1, KCS, KERA, KFM, KFS, KFSD, KHK, ki-67, KIAA0020, KIAA0205, KIAA0205/m, KIF1B, KIT, KK-LC-1, KLK3, KLKB1, KM-HN-1, KMS, KNG, KNO, K-RAS/nn, KRAS2, KREV1, KRT1, KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT14L1, KRT14L2, KRT14L3, KRT16, KRT16L1, KRT16L2, KRT17, KRT18, KRT2A, KRT3, KRT4, KRT5, KRT6 A, KRT6B, KRT9, KRTHB1, KRTHB6, KRT1, KSA, KSS, KVVE, KYNU, LOH19CR1, L1CAM, LAGE, LAGE-1, LALL, LAMA2, LAMA3, LAMB3, LAMB1, LAMC2, LAMP2, LAP, LCA5, LCAT, LCCS, LCCS 1, LCFS2, LCS1, LCT, LDHA, LDHB, LDHC, LDLR, LDLR/FUT, LEP, LEWISY, LGCR, LGGF-PBP, LGI1, LGMD2H, LGMD1A, LGMD1B, LHB, LHCGR, LHON, LHRH, LHX3, LIF, LIG1, LIMM, LIMP2, LIPA, LIPA, LIPB, LIPC, LIVIN, L1CAM, LMAN1, LMNA, LMX1B, LOLR, LOR, LOX, LPA, LPL, LPP, LQT4, LRP5, LRS 1, LSF6, LT-13, LTBP2, LTC4S, LYL1, XCL1, LYZ, M344, MA50, MAA, MADH4, MAFD2, MAFD1, MAGE, MAGE-AI, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGEB1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-EI, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, MGB1, MGB2, MAN2A1, MAN2B1, MANBA, MANBB, MAOA, MAOB, MAPK8IP1, MAPT, MART-1, MART-2, MART2/m, MAT1A, MBL2, MBP, MBS1, MC1R, MC2R, MC4R, MCC, MCCC2, MCCC1, MCDR1, MCF2, MCKD, MCL1, MC1R, MCOLN1, MCOP, MCOR, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCPH2, MCPH1, MCS, M-CSF, MDB, MDCR, MDM2, MDRV, MDS 1, ME1, MEI/m, ME2, ME20, ME3, MEAX, MEB, MEC CCL-28, MECP2, MEBV, MELANA, MELAS, MEN1 MSLN, MET, MF4, MG50, MG50/PXDN, MGAT2, MGAT5, MGC1 MGCR, MGCT, MGI, MGP, MHC2TA, MHS2, MHS4, MIC2, MIC5, MIDI, MIF, MIP, MIP-5/HCC-2, MITF, MJD, MKI67, MKKS, MKS1, MLH1, MLL, MLLT2, MLLT3, MLLT7, MLLT1, MLS, MLYCD, MMA1a, MMP 11, MMVP1, antígeno MN/CA IX, MNG1, MN1, MOC31, MOCS2, MOCS1, MOG, MORC, MOS, MOV18, MPD1, MPE, MPFD, MPI, MPIF-1, MPL, MPO, MPS3C, MPZ, MRE11A, MROS, MRP1, MRP2, MRP3, MRSD, MRX14, MRX2, MRX20, MRX3, MRX40, MRXA, MRX1, MS, M54A2, MSD, MSH2, MSH3, MSH6, MSS, MSSE, MSX2, MSX1, MTATP6, MTCO3, MTC01, MTCYB, MTHFR, MTM1, MTRM2, MTND2, MTND4, MTND5, MTND6, MTND1, MTP, MTR, MTRNR2, MTRNR1, MTRR, MTTE, MTTG, MTTI, MTTK, M1TL2, MTTL1, MTTN, MTTT, MTTT1, MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUM-1, MUM-1/m, MUM-2, MUM-2/m, MUM-3, MUM-3/m, MUT, mutante p21 ras, MUTYH, MVK, MX2, MXI1, MY05A, MYB, MYBPC3, MYC, MYCL2, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYMY, MY015A, MY01G, MY05A, MY07A, MYOC, Miosina/m, MYP2, MYP1, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, NAGA, NAGLU, NAMSD, NAPB, NAT2, NAT, NBIA1, NBS1, NCAM, NCF2, NCF1, NDN, NDP, NDUFS4, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NEB, NEFH, NEM1, Neo-PAP, neo-PAP/m, NEU1, NEUROD1, NF2, NF1, NFYC/m, NGEF, NHS, NKS1, NKX2E, NM, NME1, NMP22, NMTC, NODAL, NOG, NOS3, NOTCH3, NOTCH1, NP, NPC2, NPC1, NPHL2, NPHP1, NPHS2, NPHS1, NPM/ALK, NPPA, NQ01, NR2E3, NR3C1, NR3C2, NRAS, NRAS/m, NRL, NROB1, NRTN, NSE, NSX, NTRK1, NUMA1, NXF2, NY-001, NY-E501, NY-ESO-B, NY-LU-12, ALDOA, NYS2, NYS4, NY-SAR-35, NYS1, NYX, 0A3, 0A1, OAP, OASD, OAT, OCA1, OCA2, OCD1, OCRL, OCRL1, OCT, ODDD, ODT1, OFC1, OFD1, OGDH, OGT, OGT/m, OPA2, OPA1, OPD1, OPEM, OPG, OPN, OPN1LW, OPN1MW, OPN1SW, OPPG, OPTB1, TTD, ORM1, ORP1, OS-9, OS-9/m, OSM LIE, OTC, OTOF, OTSC1, OXCT1, OYTES1, P15, P190 MINOR BCR-ABL, P2RY12, P3, P16, P40, P4HB, P-501, P53, P53/m, P97, PABPN1, PAFAH1B1, PAFAH1P1, PAGE-4, PAGE-5, PAH, PAI-1, PAI-2, PAK3, PAP, PAPP, PARK2, PART-1, PATE, PAX2, PAX3, PAX6, PAX7, PAX8, PAX9, PBCA, PBCRA1, PBT, PBX1, PBXP1, PC, PCBD, PCCA, PCCB, PCK2, PCK1, PCLD, PCOS1, PCSK1, PDB1, PDCN, PDE6A, PDE6B, PDEF, PDGFB, PDGFR, PDGFRL, PDHAI, PDR, PDX1, PECAM1, PEE1, PE01, PEPD, PEX10, PEX12, PEX13, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PEX1, PF4, PFBI, PFC, PFKFB1, PFKM, PGAM2, PGD, PGK1, PGK1P1, PGL2, PGR, PGS, PHA2A, PHB, PHEX, PHGDH, PHKA2, PHKA1, PHKB, PHKG2, PHP, PHYH, PI, P13, PIGA, PIM1-KINASE, PIN1, PIP5K1B, PITX2, PITX3, PKD2, PKD3, PKD1, PKDTS, PKHD1, PKLR, PKP1, PKU1, PLA2G2A, PLA2G7, PLAT, PLEC1, PLG, PLI, PLOD, PLP1, PMEL17, PML, PMURARa, PMM2, PMP22, PMS2, PMS1, PNKD, PNLIP, POF1, POLA, POLH, POMC,

PON2, PON1, PORC, POTE, POU1F1, POU3F4, POU4F3, POU1F1, PPAC, PPARG, PPCD, PPGB, PPH1, PPKB, PPMX, PPDx, PPP1R3A, PPP2R2B, PPT1, PRAME, PRB, PRB3, PRCA1, PRCC, PRD, PRDX5/m, PRF1, PRG4, PRKAR1A, PRKCA, PRKDC, PRKWNK4, PRNP, PROC, PRODH, PROM1, PROP1, PROS1, PRST, PRP8, PRPF31, PRPF8, PRPH2, PRPS2, PRPS1, PRS, PRSS7, PRSS1, PRTN3, PRX, PSA, PSAP, PSCA, PSEN2, PSEN1, PSG1, PSGR, PSM, PSMA, PSORS1, PTC, PTCH, PTCH1, PTCH2, PTEN, PTGS1, PTH, PTHR1, PTLAH, P1051, PTPN12, PTPNI I, PTPRK, PTPRK/m, PTS, PUJO, PVR, PVRL1, PWCR, PXE, PXMP3, PXR1, PYGL, PYGM, QDPR, RAB27A, RAD54B, RAD54L, RAG2, RAGE, RAGE-1, RAG1, RAP1, RARA, RASA1, RBAF600/m, RB1, RBP4, RBP4, RBS, RCA1, RCAS1, RCCP2, RCD1, RCV1, RDH5, RDPA, RDS, RECQL2, RECQL3, RECQL4, REG1A, REHOBE, REN, RENBP, RENS1, RET, RFX5, RFXANK, RFXAP, RGR, RHAG, RHAMM/CD168, RHD, RHO, Rip-1, RLBP1, RLN2, RLN1, RLS, RMD1, RMRP, ROM1, ROR2, RP, RP1, RP14, RP17, RP2, RP6, RP9, RPD1, RPE65, RPGR, RPGRIP1, RP1, RP10, RPS19, RPS2, RPS4X, RPS4Y, RPS6KA3, RRAS2, RS1, RSN, RSS, RU1, RU2, RUNX2, RUNXI, RWS, RYR1, S-100, SAA1, SACS, SAG, SAGE, SALL1, SARDH, SART1, SART2, SART3, SAS, SAX1, SCA2, SCA4, SCA5, SCA7, SCA8, SCA1, SCC, SCCD, SCF, SCLC1, SCN1A, SCN1B, SCN4A, SCN5A, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G, SCQ2, SCP1, SCZD2, SCZD3, SCZD4, SCZD6, SCZD1, SDF-1a/f3 SDHA, SDHD, SDYS, SEDL, SERPENA7, SERPINA3, SERPINA6, SERPINA1, SERPINC1, SERPIND1, SERPINE1, SERPINF2, SERPING1, SERPINI1, SFTPA1, SFTPB, SFTPC, SFTPD, SGCA, SGCB, SGCD, SGCE, SGM1, SGSH, SGY-1, SH2D1A, SHBG, SHFM2, SHFM3, SHFM1, SHH, SHOX, SI, SIAL, SIALYL LEWISX, SIASD, S11, SIM1, SIRT2/m, SIX3, SJS1, SKP2, SLC10A2, SLC12A1, SLC12A3, SLC17A5, SLC19A2, SLC22A1L, SLC22A5, SLC25A13, SLC25A15, SLC25A20, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC2A1, SLC2A2, SLC2A4, SLC3A1, SLC4A1, SLC4A4, SLC5A1, SLC5A5, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC7A7, SLC7A9, SLC11A1, SLOS, SMA, SMAD1, SMAL, SMARCB1, SMAX2, SMCR, SMCY, SM1, SMN2, SMN1, SMPD1, SNCA, SNRPN, SOD2, SOD3, SOD1, SOS1, SOST, SOX9, SOX10, Spl 7, SPANXC, SPG23, SPG3A, SPG4, SPG5A, SPG5B, SPG6, SPG7, SPINK1, SPINK5, SPPK, SPPM, SPSMA, SPTA1, SPTB, SPTLC1, SRC, SRD5A2, SRPX, SRS, SRY, β hCG, SSTR2, SSX1, 55X2 (HOM-MEL-40/SSX2), SSX4, ST8, STAMP-1, STAR, STARP1, STATH, STEAP, STK2, STK11, STN/ KLH, STO, STOM, STS, SUOX, SURF1, SURVIVINA-2B, SYCP1, SYM1, SYN1, SYNS1, SYP, SYT/SSX, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAAL6, TACSTD1, TACSTD2, TAG72, TAF7L, TAF1, TAGE, TAG-72, TALI, TAM, TAP2, TAP1, TAPVR1, TARC, TARP, TAT, TAZ, TBP, TBX22, TBX3, TBX5, TBXA2R, TBXAS1, TCAP, TCF2, TCF1, TCIRG1, TCL2, TCL4, TCL1A, TCN2, TC0F1, TCR, TCRA, TDD, TDFA, TDRD1, TECK, TECTA, TEK, TEUAML1, TELAB1, TEX15, TE, TFAP2B, TFE3, TFR2, TG, TGF α , TGF β , TGF β 1, TGF β 1, TGF β 2, TGF β RE, TGF- γ , TGF β RII, TGIF, TGM-4, TGM1, TH, THAS, THBD, THC, THC2, THM, THPO, THRA, THRB, TIMM8A, TIMP2, TIMP3, TIMP1, TITF1, TKCR, TKT, TLP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLX1, TM4SF1, TM4SF2, TMC1, TMD, TMIP, TNDM, TNF, TNFRSF11A, TNFRSF1A, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, TNF α , TNF β , TNNI3, TNNT2, TOC, TOP2A, TOP1, TP53, TP63, TPA, TPBG, TPI, TPI/m, TPI1, TPM3, TPM1, TPMT, TPO, TPS, TPTA, TRA, TRAG3, TRAPPC2, TRC8, TREH, TRG, TRH, TRIM32, TRIM37, TRP1, TRP2, TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, TRPS1, TS, TSC2, TSC3, TSC1, TSG101, TSHB, TSHR, TSP-180, TST, TTGA2B, TTN, TTPA, TTR, TU M2-PK, TULP1, TWIST, TYH, TYR, TYROBP, TYROBP, TYRP1, TYS, UBE2A, UBE3A, UBE1, UCHL1, UFS, UGT1A, ULR, UMPK, UMPS, UOX, UPA, UQCRC1, UR05, UROD, UPK1B, UROS, USH2A, USH3A, USH1A, USH1C, USP9Y, UV24, VBCH, VCF, VDI, VDR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-1, VEGFR-2/FLK-1, VHL, VIM, VMD2, VMD1, VMGLOM, VNEZ, VNF, VP, VRNI, VWF, VWS, WAS, WBS2, WFS2, WFS1, WHCR, WHN, WISP3, WMS, WRN, WS2A, WS2B, WSN, WSS, VVT2, W13, WT1, VVTS, WWS, XAGE, XDH, XIC, XIST, XK, XM, XPA, XPC, XRCC9, XS, ZAP70, ZFHx1B, ZFX, ZFY, ZIC2, ZIC3, ZNF145, ZNF261, ZNF35, ZNF41, ZNF6, ZNF198 y ZWS1.

Además, las proteínas terapéuticamente activas codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido también pueden seleccionarse de entre hormonas de crecimiento o factores de crecimiento, por ejemplo para promover el crecimiento en un ser vivo (transgénico), tal como, por ejemplo, TGF α y los IGFs (factores de crecimiento tipo insulina), proteínas que influyen en el metabolismo y/o la hematopoyesis, por ejemplo α -anti-tripsina, receptor de LDL, eritropoyetina (EPO), insulina, GATA-1, etc., o proteínas tales como, por ejemplo, factores VIII y XI del sistema de coagulación sanguínea, etc. Estas proteínas incluyen además enzimas, por ejemplo β -galactosidasa (lacZ), enzimas de restricción de ADN (por ejemplo FcoRI, HindIII, etc.), lisozimas, etc., o proteasas, por ejemplo papaina, bromelaina, queratinasas, tripsina, quimioproteasas, pepsina, renina (quimosina), suizima, nortasa, etc. Estas proteínas pueden codificarse por el al menos un ARN (molécula) del ARN complejo aquí definido. En consecuencia, la invención proporciona una tecnología que permite sustituir proteínas defectuosas en el organismo a tratar (por ejemplo, ya sea debido a mutaciones, debido a expresión defectuosa o ausente) y con ello a la expresión efectiva e incrementada de proteínas que no son funcionales en el organismo a tratar, como ocurre, por ejemplo, en los trastornos monogénicos, preferentemente sin conducir a una respuesta inmune innata.

Alternativamente, las proteínas terapéuticamente activas codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido también pueden seleccionarse de entre proteasas, etc., que permitan curar una enfermedad específica debida a, por ejemplo, una (sobre)expresión de una proteína disfuncional o exógena que causa trastornos o enfermedades. Así, la invención se puede

aplicar para introducir terapéuticamente el ARN complejado en el organismo para atacar a un organismo patógeno (virus, bacterias, etc.). Por ejemplo, el ARN que codifica para proteasas terapéuticas puede emplearse para segmentar proteínas virales esenciales para el ensamble viral o para otras etapas esenciales de la producción viral.

- 5 Las proteínas terapéuticamente activas codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido también se pueden seleccionar de entre proteínas moduladoras de varias vías intracelulares, por ejemplo mediante la modulación de la transmisión de señales (inhibición o estimulación) que puede influir en procesos intracelulares tales como la apoptosis, el crecimiento celular, etc., en particular con respecto al sistema inmunológico del organismo. En consecuencia, los
- 10 moduladores inmunes, citoquinas, linfocinas, monocinas, interferones, etc., pueden ser expresados de forma eficiente por el ARN complejado aquí definido. Preferentemente, estas proteínas por tanto incluyen también por ejemplo citoquinas de clase I de la familia de las citoquinas que contienen 4 residuos de cisteína conservados específicos de posición (CCCC) y un motivo de secuencia conservado Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS), donde X representa un aminoácido no conservado. Las citoquinas de clase I de la familia de las
- 15 citoquinas incluyen la sub-familia GM-CSF, por ejemplo la sub-familia IL-3, IL-5, GM-CSF, la sub-familia IL-6, por ejemplo IL-6, IL-11, IL-12, o la sub-familia IL-2, por ejemplo IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, etc., o las citoquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-10, etc. Por analogía, tales proteínas pueden incluir también citoquinas de clase II de la familia de las citoquinas (familia de receptores de interferón), que igualmente contengan 4 residuos de cisteína conservados específicos de posición (CCCC) pero ningún motivo de secuencia conservado Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). Las citoquinas de clase II de la familia de las citoquinas incluyen, por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc. Las proteínas codificadas por el al menos un ARN(m) modificado (de la composición
- 20 inmunosupresora de la invención) usado de acuerdo con la invención pueden incluir además también citoquinas de la familia de necrosis tumoral, por ejemplo TNF- α , TNF- β , TNF-RI, TNF-RII, CD40, Fas, etc., o de la familia de las quimiocinas, las cuales contienen 7 hélices de transmembrana e interactúan con la proteína G, por ejemplo IL-8, MIP-1, RANTES, CCR5, CXCR4, etc. Estas proteínas también pueden seleccionarse de entre factores de apoptosis o proteínas relacionadas o ligadas a la apoptosis, incluyendo AIF, Apaf, por ejemplo Apaf-1, Apaf-2, Apaf-3 o APO-2 (L), APO-3 (L), apopainina, Bad, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S, bik, CAD, calpaína, caspasas, por ejemplo caspasa-1, caspasa-2, caspasa-3, caspasa-4, caspasa-5, caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10, caspasa-11, ced-3, ced-9, c-Jun, c-Myc, crm-A, citocromo C, CdR1, DcR1, DD, DED, DISC, DNA-PK_{CS}, DR3, DR4, DR5, FADD/MORT-1, FAK, Fas (ligando Fas CD95/fas (receptor)), FLICE/MACH, FLIP, fodrin, fos, G-actina, Gas-2, gelsolina, granzimas A/B, ICAD, ICE, JNK, lamina A/V, MAP, MCL-1, Mdm-2, MEKK-1, MORT-1, NEDD, NF- κ B, NuMa, p53, PAK-2, PARP, perforina, PITSLRE, PKC δ , pRb, presenilina, pRICE, RAIDD, Ras, RIP, esfingomielinasa, timidina quinasa de Herpes simple, TRADD, TRAF2, RAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, transglutaminasa, etc.
- 25 Además, las proteínas terapéuticamente activas codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido también pueden codificar para receptores de células T específicos de antígenos. El receptor de células T o TCR es una molécula que se encuentra sobre la superficie de los linfocitos T (o células T), que generalmente es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Es un heterodímero que consiste
- 30 en una cadena alfa y beta en el 95% de las células T, mientras que el 5% de células T tienen TCRs consistentes en cadenas gamma y delta. El acoplamiento de TCR con antígeno y MHC da como resultado la activación de su linfocito T vía una serie de eventos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, correceptores y moléculas accesorias especializadas. Por consiguiente, estas proteínas permiten dirigir específicamente antígenos específicos y pueden soportar la funcionalidad del sistema inmunológico gracias a sus propiedades de dirección. En consecuencia, se puede buscar la transfección de células *in vivo* al administrar el al menos un ARN (molécula) del ARN complejado aquí definido que codifica para estos receptores o, de preferencia, un enfoque de transfección celular *ex vivo* (por ejemplo, transfectando específicamente ciertas células inmunes). Las moléculas receptoras de células T introducidas reconocen los antígenos específicos en la molécula MHC y así pueden apoyar el reconocimiento del sistema inmunológico
- 35 frente a los antígenos a atacar.

- Las proteínas terapéuticamente activas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido pueden comprender además una proteína adyuvante. En este contexto, preferentemente como proteína adyuvante se debe entender cualquier proteína que sea capaz de desarrollar una respuesta inmune innata como la aquí definida. De preferencia, esta
- 40 respuesta inmune innata comprende la activación de un receptor de reconocimiento de patrones, por ejemplo un receptor seleccionado de la familia del receptor tipo Toll (TLR), incluyendo por ejemplo un receptor tipo Toll seleccionado de TLR1 a TLR10 humano o de receptores tipo Toll murinos TLR1 a TLR13. Preferentemente, la respuesta inmune innata se desarrolla en un mamífero, es particular en un humano. Preferentemente, la proteína adyuvante se selecciona de entre proteínas adyuvantes humanas o de procedencia patógena, en particular de entre proteínas adyuvantes bacterianas. Además, también puede emplearse un ARNm que codifica para proteínas humanas implicadas en los efectos adyuvantes.
- 45
- 50

Las proteínas adyuvantes humanas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido comprenden típicamente cualquier proteína humana capaz de desarrollar una respuesta inmune innata (en un mamífero), por ejemplo una reacción de unión de un ligando TLR exógeno a un TLR. Muy preferiblemente, las proteínas adyuvantes humanas que pueden ser codificadas por el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención se seleccionan de entre el grupo consistente en, sin limitarse a, citoquinas que inducen o incrementan una respuesta inmune innata, incluyendo IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF y TNF-alfa; citoquinas que son liberadas de macrófagos, incluyendo IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF-alfa; de componentes del sistema de complemento incluyendo C1q, MBL, C1r, C1s, C2b, Bb, D, MASP-1, MASP-2, C4b, C3b, C5a, C3a, C4a, C5b, C6, C7, C8, C9, CR, CR2, CR3, CR4, C1qR, C1INH, C4bp, MCP, DAF, H, I, P y CD59; de proteínas que son componentes de las redes de señalización de los receptores de reconocimiento de patrones, incluyendo TLR e IL-1R1, donde los componentes son ligandos de los receptores de reconocimiento de patrones incluyendo IL-1alfa, IL-1beta, beta-defensina, proteínas de choque térmico, tales como HSP10, HSP60, HSP65, HSP75 y HSP90, gp96, fibrinógeno, dominio extra de repetición TyplII A de fibronectina; receptores, incluyendo IL-TR1, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11; transductores de señales incluyendo componentes de la señalización de GTPasas pequeñas (RhoA, Ras, Rac1, Cdc42, etc.), componentes de la señalización de PIP (P13K, Src-quinasa, etc.), componentes de la señalización dependiente de MyD88 (MyD88, IRAK1, IRAK2, etc.), componentes de la señalización independiente de MyD88 (TICAM1, TICAM2, etc.); factores de transcripción activados incluyendo, por ejemplo, NF- κ B, c-Fos, c-Jun, c-Myc; y genes diana inducidos incluyendo, por ejemplo, IL-1 alfa, IL-1 beta, Beta-Defensina, IL-6, IFN gama, IFN alfa e IFN beta; de moléculas co-estimuladoras, incluyendo CD28 o ligando CD40 o PD1; dominios de proteínas, incluyendo LAMP; proteínas de superficie celular; o proteínas adyuvantes humanas incluyendo CD80, CD81, CD86, trif, ligando flt-3, timopentina, Gp96 o fibronectina, etc., o cualquier especie homóloga de cualquiera de las proteínas adyuvantes humanas anteriores.

Las proteínas adyuvantes patógenas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido comprenden típicamente cualquier proteína patógena (adyuvante) que sea capaz de desarrollar una respuesta inmune innata (en un mamífero), muy preferiblemente seleccionadas entre proteínas patógenas (adyuvantes) derivadas de bacterias, protozoarios, virus u hongos, animales, etc., y aún más preferiblemente de entre proteínas adyuvantes patógenas seleccionadas del grupo consistente en, sin limitarse a, proteínas bacterianas, proteínas protozoarias (por ejemplo, profilina – tales como proteína de *Toxoplasma gondii*), proteínas virales o proteínas fúngicas, proteínas animales, etc.

En este contexto, las proteínas bacterianas (adyuvantes) que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo aquí definido pueden comprender cualquier proteína bacteriana capaz de desarrollar una respuesta inmune innata (de preferencia en un mamífero). Muy preferiblemente, las proteínas bacterianas (adyuvantes) que pueden ser codificadas por el ARN complejo pueden comprender proteínas adyuvantes bacterianas seleccionadas de entre el grupo consistente en, sin limitarse a, flagelinas bacterianas, incluyendo flagelinas de organismos que incluyen *Agrobacterium*, *Aquifex*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Caulobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Lachnospiraceae*, *Legionella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Roseburia*, *Salmonella*, *Serpulina*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio*, *Wolinella*, *Yersinia*, en especial flagelinas de las especies, sin limitarse a, *Agrobacterium tumefaciens*, *Aquifex pyrophilus*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bartonella bacilliformis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Borrelia burgdorferi*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Caulobacter crescentus*, *Clostridium botulinum strain Bennett clon 1*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia hominis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella bongori*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Serpulina hyodysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Treponema phagedenis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Wolinella succinogenes* y *Yersinia enterocolitica*.

Son especialmente preferentes aquellas flagelinas bacterianas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo aquí definido, que pueden seleccionarse de entre cualquier flagelina bacteriana que muestre un carácter adyuvante, en particular de entre flagelinas bacterianas seleccionadas del grupo consistente en proteínas de choque térmico bacterianas o chaperones, incluyendo Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100; OmpA (proteína de membrana Exterior) de bacterias gram-negativas; porinas bacterianas, incluyendo OmpF; toxinas bacterianas, incluyendo toxina pertussis (PT) de *Bordetella pertussis*, toxina de adenilato ciclasa de pertussis CyaA y CyaC de *Bordetella pertussis*, mutante PT-9K/129G de toxina de pertussis, toxina de adenilato ciclasa de pertussis CyaA y CyaC de *Bordetella pertussis*, toxina de tétanos, toxina de cólera (CT), subunidad B de toxina de cólera, mutante CTK63 de toxina de cólera, mutante CTE112K de CT, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* (LT), subunidad B de enterotoxina lábil al calor (LTB), mutantes de enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* con toxicidad reducida, incluyendo LTK63, LTR72; modulina soluble en fenol; proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP)

de *Helicobacter pylori*, proteína tensioactiva D; proteína de superficie exterior A lipoproteína de *Borrelia burgdorferi*, Ag38 (antígeno de 38 kDa) de *Mycobacterium tuberculosis*; proteínas de fimbrias bacterianas; enterotoxina CT de *Vibrio cholerae*, Pilina de pelos de bacterias gram-negativas, y proteína tensioactiva A; etc., o cualquier homólogo de especie de cualquiera de las proteínas (adyuvantes) bacterianas anteriores.

- 5 De forma especialmente preferente, las flagelinas bacterianas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido comprenden una secuencia seleccionada del grupo que comprende cualquiera de las siguientes secuencias tal como se refieren por su número de registro:

organismo	especie	nombre del gen	No. de registro	GI No
<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	FlaD (flaD) FlhB (flhB) FliG (fliG) FliN (fliN) FliM (fliM) MotA (motA) FlgF (flgF) FliI (fliI) FlgB (flgB) FlgC (flgC) FliE (fliE) FlgG (flgG) FlgA (flgA) FlgI (flgI) FlgH (flgH) FliL (fliL) FliP (fliP) FlaA (flaA) FlaB (flaB) FlaC (flaC)	U95165	GI:14278870
<i>Aquifex</i>	<i>Aquifex pyrophilus</i>		U17575	GI:596244
<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	Laf1	U26679	GI:1173509
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	hag	AB033501	GI:14278870
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	flab	X67138	GI:46019718
<i>Bartonella</i>	<i>Bartonella bacilliformis</i>		L20677	GI:304184
<i>Bordetella</i>	<i>Bordetella</i>	flaA	L13034	GI:289453
	<i>bronchiseptica</i>			
<i>Borrelia</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>		X16833	GI:39356
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	fliC	AF011370	GI:2935154
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	flaA flaB	J05635	GI:144197
<i>Caulobacter</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>		J01556	GI:144239
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium botulinum cepa Bennett clon 1</i>	FlaA	DQ845000	GI:114054886

<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	hag	M14358	GI:146311
			AJ 884569 (EMBL-SVA)	
<i>Helicobacter</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	flaA	X60746	GI:43631
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>		DQ789131	GI:113911615
<i>Legionella</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	flaA	X83232	GI:602877
<i>Listeria</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	flaA	X65624	GI:44097
<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	FlaD (flaD) FlaA (flaA) FlaB (flaB) FliA (fliA) FliZ (fliZ)	AF221596	GI:6959881
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	flaA	M57501	GI:151225
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	fliC	EF544882	GI:146335619
<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	flaA flaB	M24526	GI:152220
<i>Rhodobacter</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	fliC	AF274346	GI:10716972
<i>Roseburia</i>	<i>Roseburia cecicola</i>		M20983	GI:152535
<i>Roseburia</i>	<i>Roseburia hominis</i>	Fla2	DQ789141	GI:113911632
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>		D13689 (NCBI ID)	GI:217062
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella bongori</i>	fliC	AY603412	GI:51342390
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i>	flag	L21912	GI:397810
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	fliC	M84980	GI:154015
<i>Serpulina</i>	<i>Serpulina</i>	flaB2	X63513	GI:450669
	<i>hyodysenteriae</i>			
<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	hag	M27219	GI:152826
<i>Shigella</i>	<i>Shigella boydii</i>	fliC-SB	D26165	GI:442485
<i>Treponema</i>	<i>Treponema phagedenis</i>	flaB2	M94015	GI:155060
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	flaA	EF125175	GI:119434395
<i>Vibrio s</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		AF069392	GI:7327274
<i>Wolinella</i>	<i>Wolinella succinogenes</i>	flag	M82917	GI:155337
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>		L33467	GI:496295

5 Las proteínas protozoarias que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido se pueden seleccionar de entre cualquier proteína protozoaria de carácter adyuvante, es especial de entre el grupo consistente en, sin limitarse a, Tc52 de *Trypanosoma cruzi*, PFTG de *Trypanosoma gondii*, proteínas de choque térmico protozoarias, LfL de *Leishmania spp.*, proteína tipo profilina de *Toxoplasma gondii*, etc.

10 Las proteínas virales que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido pueden seleccionarse de entre cualquier proteína viral con carácter adyuvante, en especial de entre el grupo consistente en, sin limitarse a, glicoproteína de fusión de virus sincitial respiratorio (proteína F), proteína de cápside de virus MMT, proteína de virus de leucemia de ratón, proteína hemaglutinina del virus del sarampión tipo silvestre, etc.

Las proteínas fúngicas que pueden ser codificadas por el al un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido pueden seleccionarse de entre cualquier proteína fúngica con carácter adyuvante, en especial de entre el grupo consistente en, sin limitarse a, proteína inmunomoduladora fúngica (FIP; LZ-8), etc.

15 Finalmente, las proteínas adyuvantes patógenas que pueden ser codificadas por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido pueden seleccionarse de entre cualquier proteína patógena adicional que tenga carácter adyuvante, en especial de entre el grupo consistente en, sin limitarse a, hemocianina de lapa en cerradura (KLH), OspA, etc.

20 El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede codificar alternativamente para un antígeno. De acuerdo con la presente invención, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que es reconocida por el sistema inmunológico y que es capaz de desencadenar una respuesta inmune específica de antígeno, por ejemplo por la formación de anticuerpos. Los antígenos pueden clasificarse de acuerdo con su origen. Así, existen dos clases principales de antígenos: 25 exógenos y endógenos. Los antígenos exógenos son aquellos que entran en la célula o el cuerpo desde fuera (del cuerpo o de la célula), por ejemplo por inhalación, ingestión o inyección, etc. Estos antígenos son internalizados por células presentadoras de antígenos ("APCs", tales como células dendríticas o macrófagos) y procesados en fragmentos. Los APCs presentan después los fragmentos a las células auxiliares T (por ejemplo, CD4⁺) empleando moléculas MHC II en su superficie. El reconocimiento de estos fragmentos de antígeno por las células T lleva a la activación de las células T y a la secreción de citocinas. Las citocinas son 30 sustancias que pueden activar la proliferación de células inmunes, tales como células T citotóxicas, células B o macrófagos. Por el contrario, los antígenos endógenos son aquellos que han sido generados dentro de la célula, por ejemplo como resultado del metabolismo celular normal. Fragmentos de estos antígenos son presentados sobre las moléculas MHC I en la superficie de APCs. Estos antígenos son reconocidos por las células T CD8⁺ citotóxicas específicas de antígeno activadas. Después del reconocimiento, estas células T reaccionan secretando diferentes toxinas que causan lisis o apoptosis en la célula presentadora de 35 antígenos. Los antígenos endógenos comprenden antígenos, por ejemplo proteínas o péptidos codificados por un ácido nucleico extraño dentro de la célula, así como proteínas o péptidos codificados por la información genética de la propia célula, o antígenos virales de ocurrencia intracelular. Una clase de antígenos endógenos es la de los antígenos tumorales. Estos antígenos son presentados por las moléculas MHC I sobre la superficie de células tumorales. Esta clase puede subdividirse además en antígenos 40 específicos tumorales (TSAs) y antígenos asociados tumorales (TAAs). Los TSAs sólo pueden ser presentados por células tumorales y nunca por células "sanas" normales. Resultan típicamente de una mutación específica de tumor. Los TAAs, más comunes, normalmente son presentados tanto por las células tumorales como por las sanas. Estos antígenos son reconocidos y la célula presentadora de antígenos puede 45 ser destruida por las células T citotóxicas. Además, los antígenos tumorales también pueden ocurrir sobre la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado. En este caso, pueden ser reconocidos por anticuerpos.

50 Los antígenos que pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos. Preferentemente, los antígenos son proteínas o péptidos o fragmentos de los mismos, tales como epítopes de tales proteínas o péptidos. Los epítopes (también llamados "determinantes de antígenos") típicamente son fragmentos ubicados sobre la superficie exterior de estas estructuras de proteína o péptido antigénicos con 5 a 15, de preferencia 9 a 15, aminoácidos (epítopes de células B y epítopes de células T se presentan típicamente sobre moléculas MHC, donde MHC-1 presenta típicamente 55 epítopes con una longitud de aproximadamente 9 aminoácidos y MHC-II representa típicamente epítopes con una longitud de alrededor de 12-15 aminoácidos). Más aún, los antígenos codificados por el al menos un ARN (molécula) complejados según la invención también pueden comprender cualquier otra biomolécula, por ejemplo lípidos, carbohidratos, etc., que pueda unirse covalente o no covalentemente al ARN (molécula).

De acuerdo con la invención, los antígenos que pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención pueden ser antígenos exógenos o endógenos. Los antígenos endógenos comprenden antígenos generados en la célula, en especial en células degeneradas tales como células tumorales. Estos antígenos son conocidos como “antígenos tumorales”. Preferentemente, sin limitarse a estos, se ubican sobre la superficie de la célula. Además, los “antígenos tumorales” incluyen también antígenos expresados en células que no son (no fueron) por sí mismas (u originalmente no por sí mismas) degeneradas, sino que están asociadas al supuesto tumor. También se incluyen aquí antígenos conectados con los vasos de suministro a tumor o (re)formación de los mismos, en particular aquellos asociados a la neovascularización, por ejemplo factores de crecimiento, tales como VEGF, bFGF, etc. Los antígenos conectados a un tumor incluyen además antígenos de células o tejidos que típicamente embeben al tumor. Además, algunas sustancias (normalmente proteínas o péptidos) son expresadas en pacientes que sufren (con o sin conocimiento) de una enfermedad cancerosa y se encuentran en concentraciones incrementadas en los fluidos corporales de estos pacientes, por ejemplo proteínas asociadas a la invasión y migración de células tumorales. Estas sustancias también son conocidas como “antígenos tumorales”, sin embargo no son antígenos en el estricto significado de sustancia inductora de una respuesta inmune. El uso de éstos también está incluido en el alcance de la presente invención.

A modo de ejemplo, los antígenos que pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención pueden seleccionarse, sin limitarse a, por ejemplo de entre cualquier antígeno adecuado para el propósito específico, por ejemplo antígenos relevantes (o causales) de enfermedades infecciosas específicas tales como las aquí citadas, antígenos cancerosos tales como antígenos de superficie específicos tumorales, antígenos que se expresan en enfermedades cancerosas, antígenos mutantes expresados en enfermedades cancerosas o antígenos de proteínas implicados en la etiología de otras enfermedades, por ejemplo enfermedades autoinmunes, alergias, etc. Por ejemplo, estos antígenos pueden usarse para desensibilizar un paciente cuando se le administra un antígeno que cause estado alérgico o autoinmune en el paciente.

(Poli)péptidos antigénicos ilustrativos preferentes codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo aquí definido incluyen todos los péptidos antigénicos conocidos, por ejemplo antígenos tumorales, etc. Ejemplos específicos de antígenos tumorales son, entre otros, antígenos de superficie específicos de tumor (TSSAs), por ejemplo 5T4, alfa5-beta1-integrina, 707-AP, AFP, ART-4, B7H4, BAGE, Bcr-abl, antígeno MN/C IX, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8, beta-catenina/m, CD4, CD19, CD20, CD22, CD2Q5, CD27/m, CD 30, CD33, CD52, CD56, CD80, CDK4/m, CEA, CI, Cyp-B, DAM, EGR, ErbB3, ELF2M, EMMPRIN, EpCam, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/new, HLA-A*0201-R1701, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (o hTRT), iCE, IGF-1R, IL-2R, IL-5, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/melan-A, MART-2/Ski, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, PAP, proteinasa-3, p190 menor bcr-abl, Pml/RARalfa, PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, survivina, TEL/AMI 1, TGFbeta, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, VEGF y WT1, o de secuencias tales como, por ejemplo, NY-Eso-1 o NY-Eso-B. Cualquier clase de antígenos tumorales es adecuada para el propósito de la presente invención, por ejemplo, los antígenos tumorales conocidos por estar implicados en la neovascularización, por influir en la estructura de matriz extracelular, etc. También se incluyen fragmentos y análogos de los antígenos anteriores.

Ejemplos de antígenos tumorales que pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención se muestran en las siguientes Tablas 1 y 2. Estas tablas ilustran antígenos (proteínas) específicos (es decir, “antígenos tumorales”) con respecto a la enfermedad cancerosa a la que están asociados. De acuerdo con la invención, los términos “enfermedades cancerosas” y “enfermedades tumorales” se usan aquí como sinónimos.

Tabla 1 Antígenos expresados en enfermedades cancerosas

Antígeno tumoral	Nombre	Sitio de expresión
5T4		cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer ovárico
707-AP	707 alanina prolina	melanoma
9D7		carcinoma de células renales
AFP	alfa-fetoproteína	carcinoma hepatocelular, cáncer de vesícula biliar, cáncer testicular, cáncer ovárico, cáncer de vejiga
AlbZIP HPG1		cáncer de próstata
alfa5beta1-integrina		
alfa5beta6-integrina		cáncer de colon
alfa-metilacil-coenzima A racemasa		cáncer de próstata

ES 2 539 188 T3

ART-4	antígeno de adenocarcinoma reconocido por células T 4	cáncer pulmonar, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas
B7H4		cáncer ovárico
BAGE-1	antígeno B	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células escamosas
BCL-2		leucemia
BING-4		melanoma
CA 15-3/CA 27-29		cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata
CA 19-9		cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de vesícula biliar, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón
CA 72-4		cáncer ovárico
CA125		cáncer ovárico, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de útero, carcinoma de cerviz, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón
calreticulina		cáncer de vejiga
CAMEL	antígeno reconocido por CTL en melanoma	melanoma
CASP-8	caspara-8	cáncer de cabeza y cuello
catepsina B		cáncer de mama
catepsina L		cáncer de mama
CD19		tumores de células B
CD20		
CD22		
CD25		
CD30		
CD33		
CD4		
CD52		
CD55		
CD56		
CD80		
CEA	antígeno carcinoembrionario	carcinoma de intestino, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de cerviz, cáncer de vejiga, melanoma
CLCA2	canal cloruro activ. por calcio-2	cáncer de pulmón
CML28		leucemia
Proteína tipo coactosina		cáncer pancreático
Colágeno XXIII		cáncer de próstata
COX-2		cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer colorrectal
CT-9/BRD6	proteína específica testicular de bromodominio	
Cten	proteína tipo tensina C-terminal	cáncer de próstata
ciclina B1		
ciclina D1		cáncer ovárico
cyp-B	ciclofilina B	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, leucemia de células T, carcinoma de células escamosas
CYPB1	Citocromo P450 1B1	leucemia

DAM-10/MAGE-B1	melanoma de antígeno de diferenciación 10	melanoma, tumores de piel, cáncer ovárico, cáncer de pulmón
DAM-6/MAGE-B2	melanoma de antígeno de diferenciación 6	melanoma, tumores de piel, cáncer ovárico, cáncer de pulmón
EGFR/Her1		cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama
EMMPRIN	inductor de metaloproteinasa de matriz extracelular asociada a células tumorales	cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer de cerebro, linfoma
EpCam	molécula de adhesión a células epiteliales	cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón
EphA2	receptor 2 de efrina tipo A	glioma
EphA3	receptor 2 de efrina tipo A	melanoma, sarcoma, cáncer de pulmón
ErbB3		cáncer de mama
EZH2	(potenciador de homólogo de Zeste 2)	cáncer de endometrio, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama
EGF-5	factor de crecimiento de fibroblastos-5	cáncer renal, carcinoma, cáncer de mama, cáncer de próstata
FN	fibronectina	melanoma
Fra-1	antígeno relacionado con Fos 1	cáncer de mama, cáncer esofágico, carcinoma de células renales, cáncer de tiroides
G250/CAIX	glicoproteína 250	leucemia, carcinoma de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer cervical
GAGE-1	antígeno G 1	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-2	antígeno G 2	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-3	antígeno G 3	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-4	antígeno G 4	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-5	antígeno G 5	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-6	antígeno G 6	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-7b	antígeno G 7b	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-8	antígeno G 8	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GDEP	gen expresado diferencialmente en próstata	cáncer de próstata
GnT-V	N-acetil-glucosaminil-transferasa V	glioma, melanoma
gp100	glicoproteína 100 kDa	melanoma
GPC3	glipican 3	carcinoma hepatocelular, melanoma
HAGE	antígeno de helicasa	cáncer de vejiga
HAST-2	tumor de anillo signete humano	
hepsina		próstata
Her2/neu/Erb2	receptor epidérmico humano-2/neurológico	cáncer de mama, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer ovárico, cáncer de páncreas, cáncer gástrico

ES 2 539 188 T3

HERV-K-MEL		melanoma
HNE	neutrófilo elastasa humana	leucemia
homeobox NKX 3.1		cáncer de próstata
HOM-TES-14/SCP-1		cáncer ovárico
HOM-TES-85		
HPV-E6		cáncer cervical
HPV-E7		cáncer cervical
HST-2		cáncer gástrico
hTERT	transcriptasa inversa de telomerasa humana	cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, sarcoma, linfoma no Hodgkin, leucemia aguda
iCE	carboxil esterasa intestinal	carcinoma de células renales
IGF-1R		cáncer colorrectal
IL-13Ra2	cadena alfa 2 de receptor de interleucina 13	glioblastoma
IL-2R		cáncer colorrectal
IL-5		
receptor de laminina inmaduro		carcinoma de células renales
kalikreína 2		cáncer de próstata
kalikreína 4		cáncer de próstata
Ki67		cáncer de próstata, cáncer de mama, linfoma no Hodgkin, melanoma
KIAA0205		cáncer de vejiga
KK-LC-1	antígeno de cáncer de pulmón Kita-kyushu 1	cáncer de pulmón
KM-HN-1		cáncer de engua, carcinomas hepatocelulares, melanoma, cáncer gástrico, esofágico, cáncer de colon, cáncer pancreático
LAGE-1	antígeno L	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma
livina		cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-A1	antígeno de melanoma-A1	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A10	antígeno de melanoma-A10	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A12	antígeno de melanoma-A12	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia, cáncer de próstata, tumores cerebrales
MAGE-A2	antígeno de melanoma-A2	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A3	antígeno de melanoma-A3	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A4	antígeno de melanoma-A4	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A6	antígeno de melanoma-A	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A9	antígeno de melanoma-A9	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-B1	antígeno de melanoma-B1	melanoma
MAGE-B10	antígeno de melanoma-B10	melanoma
MAGE-B16	antígeno de melanoma-B16	melanoma
MAGE-B17	antígeno de melanoma-B17	melanoma
MAGE-B2	antígeno de melanoma-B2	melanoma
MAGE-B3	antígeno de melanoma-B3	melanoma
MAGE-B4	antígeno de melanoma-B4	melanoma

ES 2 539 188 T3

MAGE-B5	antígeno de melanoma-B5	melanoma
MAGE-B1	6antígeno de melanoma-B6	melanoma
MAGE-C1	antígeno de melanoma-C1	cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-C2	antígeno de melanoma-C2	melanoma
MAGE-C3	antígeno de melanoma-C3	melanoma
MAGE-D1	antígeno de melanoma-D1	melanoma
MAGE-D2	antígeno de melanoma-D2	melanoma
MAGE-D4	antígeno de melanoma-D4	melanoma
MAGE-E1	antígeno de melanoma-E1	cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-E2	antígeno de melanoma-E2	melanoma
MAGE-F1	antígeno de melanoma-F1	melanoma
MAGE-H1	antígeno de melanoma-H1	melanoma
MAGEL2	MAGE tipo 2	melanoma
mamaglobina A		cáncer de mama
MART-1/Melan-A	antígeno de melanoma reconocido por células T 1/antígeno de melanoma A	melanoma
MART-2	antígeno de melanoma reconocido por células T 2	melanoma
proteína de matriz 22		cáncer de vejiga
MC1R	receptor de melanocortina 1	melanoma
M-CSF	gen de factor estimulador de colonia de macrófagos	cáncer ovárico
mesotelina		cáncer ovárico
MG50/PXDN		cáncer de mama, glioblastoma, melanoma
MMP 11	fosfoproteína de fase M 11	leucemia
antígeno MN/CA IX		carcinoma de células renales
MRP-3	proteína 3 asociada a resistencia a varios fármacos	cáncer de pulmón
MUC1	mucina 1	cáncer de mama
MUC2	mucina 2	cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer pancreático
NA88-A	clon de ADNc NA de paciente M88	melanoma
N-acetil-glucosaminiltransferasa-V		
Neo-PAP	Neo-poli(A) polimerasa	
NGEP		cáncer de próstata
NMP22		cáncer de vejiga
NPM/ALK	proteína de fusión de nucleofosmina/cinasa de linfoma anaplásico	
NSE	enolasa específica de neuronas	cáncer pulmonar microcítico, neuroblastoma, tumor de Wilm, melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de testículos, cáncer de páncreas
NY-ESO-1	Nueva York esófago 1	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma, linfoma B, hepatoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de mama
NY-ESO-B		
OA1	proteína de albinismo ocular tipo 1	melanoma
OFA-iLRP	antígeno oncofetal-receptor de laminina inmaduro	leucemia
OGT	gen de N-acetilglucosamina transferasa O-enlazado	
OS-9		
osteocalcina		cáncer de próstata
osteopontina		cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer ovárico
p15	proteína 15	

ES 2 539 188 T3

p15		melanoma
p190 bcr-abl menor		
p53		
PAGE-4	proteína 4 tipo GAGE de próstata	cáncer de próstata
PAI-1	inhibidor de activador de plasminógeno tisular 1	cáncer de mama
PAI-2	inhibidor de activador de plasminógeno tisular 2	cáncer de mama
PAP	fosfatasa ácida de próstata	cáncer de próstata
PART-1		cáncer de próstata
PATE		cáncer de próstata
PDEF		cáncer de próstata
Pim-1-quinasa		
Pin1	propil isomerasa	cáncer de próstata
POTE		cáncer de próstata
PRAME	antígeno de melanoma expresado preferencialmente	melanoma, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, sarcoma
proteína		cáncer de próstata
proteínasa-3		
PSA	antígeno específico de próstata	cáncer de próstata
PSCA		cáncer de próstata
PSGR		cáncer de próstata
PSM		
PSMA	antígeno de membrana específico de próstata	cáncer de próstata
RAGE-1	antígeno renal	cáncer de vejiga, cáncer renal, sarcoma, cáncer de colon
RHAMM/CD168	receptor para motilidad mediada por ácido hialurónico	leucemia
RU1	ubicua renal 1	cáncer de vejiga, melanoma, cáncer renal
RU2	ubicua renal 2	cáncer de vejiga, melanoma, sarcoma, tumor cerebral, cáncer esofágico, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de mama
S-100		melanoma
SAGE	antígeno de sarcoma	
SART-1	tumor de rechazo de antígeno escamoso 1	cáncer esofágico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer uterino
SART-2	tumor de rechazo de antígeno escamoso 2	cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, melanoma, tumor cerebral
SART-3	tumor de rechazo de antígeno escamoso 3	cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, leucemia, melanoma, cáncer esofágico
SCC	antígeno de carcinoma de células escamosas	cáncer de pulmón
Sp17	proteína de esperma 17	mieloma múltiple
SSX-1	punto de interrupción 1 de sarcoma sinovial X	carcinoma de células hepatocelulares, cáncer de mama
SSX-2/HOM-MEL-40	punto de interrupción 2 de sarcoma sinovial X	cáncer de mama
SSX-4	punto de interrupción 4 de sarcoma sinovial X	cáncer de vejiga, carcinoma de células hepatocelulares, cáncer de mama
STAMP-1		cáncer de próstata
STEAP	antígeno epitelial de transmembrana seis próstata	cáncer de próstata
survivina		cáncer de vejiga
survivina-2B	survivina de retención de intrón 2	cáncer de vejiga
TA-90		melanoma
TAG-72		carcinoma de próstata

TARP		cáncer de próstata
TGFb	TGFbeta	
TGFbRII	receptor II de TGFbeta	
TGM-4	transglutaminasa específica de próstata	cáncer de próstata
TRAG-3	proteína asociada resistente a taxol 3	cáncer de mama, leucemia y melanoma
TRG	gen relacionado a testina	
TRP-1	proteína 1 relacionada con tirosina	melanoma
TRP-2/6b	TRP-2/exón nuevo 6b	melanoma, glioblastoma
TRP-2/INT2	TRP-2/intrón 2	melanoma, glioblastoma
Trp-p8		cáncer de próstata
Tirosinasa		melanoma
UPA	activador de plasminógeno tipo urocinasa	cáncer de mama
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular	
VEGFR-2/FLK-1	receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular	
WT1	gen de tumor de Wilm	cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer ovárico, leucemia

Tabla 2 Antígenos mutantes expresados en enfermedades cancerosas

Antígeno mutante	Nombre	Sitio de expresión
bcr/abl	proteína de fusión región de racimo de interrupción-Abelson	CML
beta-Catenina/m	beta-Catenina	melanoma
BRCA1/m		cáncer de mama
BRCA2/m		cáncer de mama
CASP-5/m		cáncer colorrectal, cáncer gástrico, carcinoma endometrial
CASP-8/m		cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas
CDC27/m	ciclo de división celular 27	
CDK4/m	cinasa 4 dependiente de ciclina	melanoma
CDKN2A/m		melanoma
CML66		CML
COA-1/m		cáncer colorrectal
DEK-CAN	proteína de fusión	AML
EFTUD2/m		melanoma
ELF2/m	Factor de alargamiento 2	carcinoma pulmonar de células escamosas
ETV6-AML1	proteína de gen 6 de variante Ets/gen 1 de leucemia mieloide aguda	ALL
FN1/m	fibronectina 1	melanoma
GPNMB/m		melanoma
HLA-A*0201-R170I	intercambio de arginina por isoleucina en residuo 170 de la hélice alfa del dominio alfa2 en el gen HLA-A2	carcinoma de células renales
HLA-A11/m		melanoma
HLA-A2/m		carcinoma de células renales
HSP70-2M	proteína de choque térmico 70-2 mutada	carcinoma de células renales, melanoma, neuroblastoma
KIAA0205/m		tumor de vejiga
K-Ras/m		carcinoma pancreático, carcinoma colorrectal
LDLR-FUT	proteína de fusión LDR-Eucosiltransferas	melanoma
MART2/m		melanoma

ME1/m		carcinoma pulmonar no microcítico
MUM-1/m	melanoma ubicuo mutado 1	melanoma
MUM-2/m	melanoma ubicuo mutado 2	melanoma
MUM-3/m	melanoma ubicuo mutado 3	melanoma
Miosina clase I/m		melanoma
neo-PAP/m		melanoma
NFYC/m		carcinoma pulmonar de células escamosas
N-Ras/m		melanoma
OGT/m		carcinoma colorrectal
OS-9/m		melanoma
p53/m		
Pml/RARa	receptor de leucemia promielocítica/ácido retinoico	APL, PML
PRDX5/m		melanoma
PRPRK/m	proteína tipo receptor-tirosina fosfatasa kappa	melanoma
RBAF600/m		melanoma
SIRT2/m		melanoma
SYT-SSX-1	proteína de fusión sinaptotagmina I/sarcoma sinovial X	sarcoma
SYT-SSX-2	proteína de fusión sinaptotagmina 2/sarcoma sinovial X	sarcoma
TEL-AML1	proteína de fusión leucemia de familia Ets de translocación/leucemia mieloide aguda 1	AML
TGFbRII	receptor de TGFbeta II	carcinoma colorrectal
TPI/m	triosefosfato isomerasa	melanoma

En una realización preferente de la invención, ejemplos de antígenos tumorales que pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención se seleccionan de entre el grupo consistente en 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, 5 1-integrina, 5 6-integrina, -actinina-4/m, metilacil-coenzima A acetasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, coactosina-proteína similar, collage XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPBI, 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, gpl OO, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201 -R1 71, HLA-A1 1/m, HLA- A2/m, HNE, homeobox NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-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, MCI R, 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, NFYQm, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, p15, p190 bcr-abl menor, p53, p53/m, PAGE-4, PAM, PAI-2, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-cinasa, Pin-1, Pml/PARα, POTE, PRAME, PRDX5/m, prosteína, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP, survivina, survivina-2B, SYT-SSX-I, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGFβ, TGFβRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, tirosinasa, UPA, VEGF, VEGFR-2/FLK-1 y WT1.

En una realización preferente de la invención, ejemplos de antígenos tumorales que pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención se seleccionan de entre el grupo consistente en MAGE-A1 [número de registro M77481], MAGE-A6 [número de

registro NM_0053631, melana-A [número de registro NM_005511], GP100 [número de registro M77348], tirosinasa [número de registro NM_000372], survivina [número de registro AF077350], CFA [número de registro NM_004363], Her-2/neu [número de registro M11730], WT1 [número de registro NM_000378], PRAMF [número de registro NM_006115], FGFR1 (receptor de factor de crecimiento epidérmico 1) [número de registro AF288738], mucina-1 [número de registro NM_002456] y SEC61G [número de registro NM_014302].

Como otra alternativa, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención puede codificar para un anticuerpo. De acuerdo con la presente invención, este anticuerpo se puede seleccionar de cualquier anticuerpo, por ejemplo, cualquier anticuerpo producido de manera recombinante o que ocurre naturalmente conocido en la técnica, en particular de anticuerpos adecuados para propósitos terapéuticos, de diagnóstico o científicos, o anticuerpos que hayan sido identificados en relación con enfermedades cancerosas específicas. Aquí, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales y policlonales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y de bloqueo o neutralizantes) y especies de anticuerpos con especificidad poliepitópica. De acuerdo con la invención, "anticuerpo" comprende típicamente cualquier anticuerpo conocido en la técnica (por ejemplo, anticuerpos IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), tales como anticuerpos que ocurren naturalmente, anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped, anticuerpos que fueron aislados e identificados a partir de anticuerpos que ocurren naturalmente o anticuerpos generados por inmunización en un organismo huésped y producidos recombinantemente mediante métodos biomoleculares conocidos en la técnica, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, intracuerpos, es decir anticuerpos expresados en células y localizados opcionalmente en compartimientos celulares específicos, y fragmentos y variantes de los anticuerpos mencionados arriba. En general, el anticuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada donde ambas tienen dominios variables y constantes. La cadena ligera consiste en un dominio variable N-terminal, V_L , y un dominio constante C-terminal, C_L . Por el contrario, la cadena pesada del anticuerpo IgG, por ejemplo, comprende un dominio variable N-terminal, V_H , y tres dominios constantes, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Igualmente, preferentemente los anticuerpos de cadena única pueden codificarse por el al menos un ARN (molécula) del ARN complejo aquí con un ARN de una sola hebra, en especial un ARNm.

De acuerdo con una primera alternativa, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención puede codificar para un anticuerpo policlonal. En este contexto, el término "anticuerpo policlonal" se refiere típicamente a mezclas de anticuerpos dirigidas a antígenos específicos o inmunógenos o epítopes de una proteína que fueron generados por inmunización de un organismo huésped, tal como un mamífero, incluyendo por ejemplo cabra, vaca, cerdo, perro, gato, burro, mono, simio, roedores como ratón, hámster y conejo. Los anticuerpos policlonales generalmente no son idénticos y, por ello, reconocen normalmente diferentes epítopes o regiones del mismo antígeno. Así, en tal caso, típicamente se aplicará una mezcla (una composición) de diferentes moléculas de ARN complejadas como las reivindicadas en la presente invención, cada una codificando para un anticuerpo (monoclonal) específico dirigido a antígenos o inmunógenos o epítopes específicos de una proteína.

De acuerdo con otra alternativa, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención puede codificar para un anticuerpo monoclonal. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere aquí a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente y que pudieran estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos a un solo sitio antigénico. Además, al contrario que con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal es dirigido a un solo determinante en el antígeno. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales como los definidos arriba mediante el método de hibridoma descrito primero por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975), o mediante métodos de ADN recombinantes, por ejemplo como se describe en la patente US N° 4.816.567. "Anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990), por ejemplo. De acuerdo con Kohler y Milstein, un inmunógeno (antígeno) de interés se inyecta en un huésped, tal como un ratón, y los linfocitos de células B producidos en respuesta al inmunógeno se cosechan después de un tiempo. Las células B se combinan con células de mieloma obtenidas de ratón y se introducen en un medio que permita que las células B se fusionen con las células de hibridoma, produciendo hibridomas. Estas células fusionadas (hibridomas) se disponen después en pocillos separados en 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 de seleccionarse, los anticuerpos monoclonales pueden cultivarse en cultivos celulares o inyectando los hibridomas en ratones. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, las secuencias peptídicas de estos anticuerpos monoclonales tienen que ser secuenciadas, pudiendo prepararse las secuencias de ARN que codifiquen para estos anticuerpos según procedimientos bien conocidos en la técnica.

Para propósitos terapéuticos en humanos, también pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimuladorio complejado de la presente invención anticuerpos monoclonales o policlonales no humanos, tales como anticuerpos murinos. Sin embargo, estos anticuerpos típicamente sólo son de uso limitado, ya que que generalmente inducen una respuesta inmune debida a la producción de anticuerpos humanos dirigidos a los anticuerpos no humanos mencionados en el cuerpo humano. Por tanto, un anticuerpo no humano particular sólo puede ser administrado una vez al humano. Para resolver este problema, el al menos un ARN (molécula) del ARN complejado monohebra estimuladorio de la presente invención puede codificar anticuerpos quiméricos, humanizados no humanos y humanos. Los anticuerpos "quiméricos" que pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimuladorio complejado de la presente invención son preferentemente anticuerpos donde los dominios constantes de los anticuerpos descritos anteriormente se reemplazan por secuencias de anticuerpos de otros organismos, en particular por secuencias humanas. Los anticuerpos "humanizados" (no humanos) que también pueden ser codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimuladorio complejado de la presente invención son anticuerpos donde los dominios constantes y variables (excepto por los dominios hipervariables) descritos arriba son reemplazados por secuencias humanas. De acuerdo con otra alternativa, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimuladorio complejado de la presente invención puede codificar para anticuerpos humanos, es decir anticuerpos que tengan sólo secuencias humanas. Estos anticuerpos humanos pueden aislarse de tejidos humanos o de organismos huésped no humanos inmunizados que sean transgénicos para el locus génico de IgG humana, las secuencias de ARN secuenciadas pueden prepararse según procedimientos bien conocidos en la técnica. Además, pueden proporcionarse anticuerpos humanos empleando unalibrería de fagos.

Además, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimuladorio complejado de la presente invención puede codificar para anticuerpos biespecíficos. En el contexto de la invención, los anticuerpos "biespecíficos" son preferentemente anticuerpos que actúan como un adaptador entre un efector y un adiana respectivo, por ejemplo con el fin de reclutar moléculas efectoras tales como toxinas, fármacos, citoquinas, etc., dirigir células efectoras tales como CTI, células NK, macrófagos, granulocitos, etc. (véase Kontermann R.E., Acta Pharmacol. Sin. 2005, 26(1): 1-9). En general, los anticuerpos biespecíficos como los descritos en la presente están configurados para reconocer por ejemplo dos antígenos diferentes, inmunógenos, epítopes, fármacos, células (o receptores de las células) u otras moléculas (o estructuras) tales como las descritas anteriormente. Aquí, biespecificidad significa que las regiones de unión a antígeno de los anticuerpos son específicas para dos epítopes diferentes. Así, diferentes antígenos, inmunógenos o epítopes, etc., pueden acercarse entre sí, lo cual, opcionalmente, permite una integración directa de los dos componentes. Por ejemplo, células diferentes tales como células efectoras y células diana pueden conectarse vía un anticuerpo biespecífico. La presente invención incluye pero no está limitada a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen, por un lado, a un antígeno soluble como los aquí descritos, y, por el otro lado, a un antígeno o receptor sobre la superficie de una célula tumoral.

En resumen, de acuerdo con la invención, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimuladorio complejado de la presente invención también puede codificar para anticuerpos como los anteriormente definidos. Ya que estos anticuerpos son anticuerpos expresados intracelularmente, es decir anticuerpos codificados por ácidos nucleicos ubicados en compartimientos específicos de la célula y también ahí expresados, estos anticuerpos también pueden denominarse intracuerpos.

Preferentemente, los anticuerpos codificados por el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimuladorio complejado de la presente invención pueden comprender anticuerpos de longitud completa, es decir anticuerpos compuestos por las cadenas pesada y ligera completas como se ha descrito. Sin embargo, también derivados de anticuerpos tales como fragmentos, variantes o aductos de anticuerpos pueden ser codificados por el al menos un ARN del ARN monohebra estimuladorio complejado de acuerdo con la presente invención.

El al menos un ARN (molécula) del ARN complejado de la presente invención también puede codificar para fragmentos de anticuerpos seleccionados de entre fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Fab, pFc', Fd y Fv de los anticuerpos mencionados arriba. En general, los fragmentos de anticuerpo se conocen en la técnica. Por ejemplo, un fragmento Fab ("fragmento, unión a antígeno") está compuesto por un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Los dos dominios variables se unen al epítope en antígenos específicos. Las dos cadenas se conectan por un enlace disulfuro. Un fragmento scFv ("fragmento variable de cadena individual"), por ejemplo, consiste típicamente en los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. Los dominios son enlazados por un enlace artificial, en general un enlace polipéptido, tal como un péptido compuesto de 15-25 residuos de glicina, prolina y/o serina.

De acuerdo con la invención, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimuladorio complejado de la presente invención puede codificar para fragmentos y/o variantes de las proteínas, antígenos o anticuerpos terapéuticamente activos mencionados anteriormente, donde los fragmentos y/o las variantes pueden tener una identidad de secuencia con uno de las proteínas, antígenos o anticuerpos terapéuticamente

activos mencionados de al menos un 70%, 80% o un 85%, preferentemente de al menos un 90%, en especial de al menos un 95% y en particular de al menos un 99% de la longitud completa de las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de codificación que codifiquen para estas proteínas, antígenos o anticuerpos terapéuticamente activos. Preferentemente, los fragmentos y/o variantes tienen la misma función biológica o actividad específica en comparación con las proteínas, antígenos o anticuerpos terapéuticamente activos nativos de longitud completa, por ejemplo capacidad de unión específica (por ejemplo, de antígenos particulares), actividad catalítica (por ejemplo, de proteínas terapéuticamente activas), etc. En este contexto, la "función biológica" de los anticuerpos aquí descritos también comprende la neutralización de antígenos, activación de complementos u opsonización. Así, los anticuerpos reconocen típicamente ya sea epítopes nativos en la superficie celular o antígenos libres. Los antígenos definidos arriba pueden interactuar con los antígenos presentadores de células e iniciar diferentes mecanismos de defensa. Por un lado, el anticuerpo puede iniciar mecanismos de señalización en la célula seleccionada que lleven a su autodestrucción (apoptosis). Por otro lado, pueden marcar la célula de manera que los demás componentes o células efectoras del sistema inmunológico del cuerpo puedan reconocerlos y atacarlos. Los mecanismos de ataque son conocidos como citotoxicidad mediada por complemento dependiente de anticuerpos (CMC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La ADCC incluye el reconocimiento del anticuerpo por células inmunes que se acoplan a las células marcadas con anticuerpos y, ya sea a través de su acción directa o a través del reclutamiento de otros tipos celulares, llevan a la muerte de la célula seleccionada. CMC es un proceso donde se activa una cascada de proteínas de complemento diferentes, normalmente cuando varios anticuerpos están próximos unos con otros, dando como resultado bien la lisis celular o atrayendo otras células inmunes a este lugar para hacer la función de células efectoras. En la neutralización de un antígeno, el anticuerpo puede unirse a un antígeno y neutralizarlo. Esta reacción de neutralización, a su vez, en general conduce al bloqueo del anticuerpo. De esta manera, el anticuerpo puede unirse sólo a un antígeno, o, en el caso de un anticuerpo biespecífico, a dos antígenos. En particular, los fragmentos de anticuerpos scFv son útiles para reacciones de neutralización, ya que no contienen las funcionalidades del dominio constante de un anticuerpo. En la activación de complemento, el sistema complejo de proteínas de complemento puede activarse por medio de la unión de un anticuerpo independiente de la parte Fc de un anticuerpo. Los productos finales de la cascada de complemento dan como resultado la lisis de la célula y la generación de una miríada inflamatoria. En la opsonización, patógenos u otras partículas no celulares se hacen accesibles a los fagocitos por medio de la unión del dominio constante de un anticuerpo. Como alternativa, las células reconocidas como extrañas pueden ser lisadas mediante citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). En particular, las células NK pueden presentar funciones de lisis al activar los receptores Fc.

Para determinar el porcentaje al cual dos secuencias de ARN (ácidos nucleicos o aminoácidos) son idénticas, las secuencias pueden alinearse para así su comparación. Por tanto, pueden insertarse por ejemplo espacios en las secuencias de la primera secuencia y el componente en la posición correspondiente de la segunda secuencia puede compararse. Si una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo componente, como es el caso de una posición en la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esta posición. El porcentaje al cual dos secuencias son idénticas es función del número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones.

El porcentaje al cual dos secuencias son idénticas puede determinarse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente pero no limitativo de algoritmo matemático que se puede usar es el algoritmo de Karlin y col. (1993), PNAS USA 90:5873-5877, o de Atchul y col. (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402. Este algoritmo está integrado en el programa BLAST. Las secuencias que son idénticas a las secuencias del ARN del ARN complejo de la presente invención hasta cierto grado pueden ser identificadas por este programa.

Al menos una molécula de ARN (del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención) que codifican para secuencias de aminoácidos que tienen (a) sustituciones conservativas en comparación con una secuencia fisiológica particular caen bajo el término de variantes. Las sustituciones donde los aminoácidos codificados que se originan a partir de la misma clase son intercambiados por otros se denominan sustituciones conservativas. En particular, éstos son aminoácidos codificados que son cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales cargadas positiva o negativamente, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos codificados, cuyas cadenas laterales pueden entrar en puentes de hidrógeno, por ejemplo, cadenas laterales hidroxilo-funcionales. Esto significa que por ejemplo un aminoácido con una cadena lateral polar es reemplazado por otro aminoácido con una cadena lateral también polar, o por ejemplo un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrófoba es sustituido por otro aminoácido que tenga 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 modifican la estructura tridimensional o no afectan a la región de unión. Las modificaciones a una estructura tridimensional debidas a inserciones o supresiones pueden determinarse fácilmente, por ejemplo por espectro CD (espectros de dicroísmo circular) (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, in Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger y col.(ed.), Elsevier, Amsterdam).

ARN inmunostimulador

El al menos un ARN (molécula) del ARN complejo de la presente invención es un ARN inmunostimulador. Por tanto, el ARN inmunostimulador puede presentar un efecto inmunostimulador ya sea antes de la complejación del ARN con el oligopéptido de la invención de la fórmula (I) definida, o preferentemente, el efecto inmunostimulador del ARN tal como se usa en la presente invención puede ser potenciado o incluso inducido mediante complejación del ARN con el oligopéptido de la invención de acuerdo con la fórmula (I) definida anteriormente. El ARN inmunostimulador del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención puede ser cualquier ARN, por ejemplo, un ARN codificador como se ha definido. El ARN inmunostimulador es un ARN de una sola hebra, preferentemente un ARN circular o lineal, en especial un ARN lineal. Con especial preferencia, el ARN inmunostimulador puede ser un ARN monohebra lineal. Incluso con mayor preferencia, el ARN inmunostimulador puede ser un ARN monohebra mensajero (ARNm) lineal. Un ARN inmunostimulador también puede existir como un oligonucleótido de ARN corto tal como el definido arriba.

Un ARN inmunostimulador tal como se usa aquí puede además seleccionarse de entre cualquier clase de moléculas de ARN, naturales o preparadas sintéticamente, que pueden inducir una respuesta inmune. En este contexto, la respuesta inmune se puede provocar de varias maneras. Un factor esencial para la respuesta inmune adecuada es la estimulación de diferentes sub-poblaciones de células T. Los linfocitos T se dividen típicamente en dos sub-poblaciones, las células auxiliares T1 (Th1) y las células auxiliares T2 (Th2), con las cuales el sistema inmunológico es capaz de destruir patógenos (es decir antígenos) intracelulares (Th1) y extracelulares (Th2). Las dos poblaciones de células Th difieren en el patrón de las proteínas efectoras (citoquinas) producidas por ellas. Así, las células Th1 ayudan en la respuesta inmune celular mediante la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otro lado, promueven la respuesta inmune humoral mediante la estimulación de las células B para su conversión en células plasmáticas y mediante la formación de anticuerpos (por ejemplo contra antígenos). Por tanto, la relación Th1/Th2 es de gran importancia en la respuesta inmune. En relación con la presente invención, la proporción Th1/Th2 de la respuesta inmune preferentemente está desplazada en dirección a la respuesta celular (respuesta Th1), induciendo así una respuesta inmune celular. De acuerdo con un ejemplo, el sistema inmunológico puede ser activado por ligandos de los receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs son una familia de polipéptidos receptores de reconocimiento de patrón (PRR) altamente conservados que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y juegan un papel crítico en la inmunidad innata en mamíferos. Actualmente se han identificado al menos trece miembros de la familia, designados TLR1-TLR13 (receptores tipo Toll: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13). Además, se ha identificado numerosos ligandos TLR específicos. Por ejemplo, se ha encontrado que un ADN bacteriano no metilado y sus análogos sintéticos (CpG ADN) son ligandos para TLR9 (Hemmi H. y col. (2000), Nature 408:740-5; Bauer S. y col. (2001), Proc Natl Acad Sci USA 98, 9237-42). Además, se ha informado de que algunos ligandos para ciertos TLRs incluyen determinadas moléculas de ácido nucleico y que ciertos tipos de ARN son inmunostimuladores de manera independiente de secuencia o dependiente de secuencia, donde estas varias moléculas de ARN inmunostimuladoras pueden, por ejemplo, estimular TLR3, TLR7 o TLR8 o receptores intracelulares tales como RIG-I, MDA-5, etc. Por ejemplo, E.g. Lipford y col. determinaron ciertos oligorribonucleótidos que contienen G, U como inmunostimuladores actuando por medio de TLR7 y TLR8 (véase la WO 03/086280). Los oligonucleótidos inmunostimuladores que contienen G, U descritos por Lipford y col. se creía que eran derivables de fuentes de ARN, incluyendo ARN ribosómico, ARN de transferencia, ARN mensajero y ARN viral.

De acuerdo con la presente invención, se encontró que cualquier ARN (molécula), por ejemplo como el definido arriba (independientemente de su longitud específica, tipo de hebra, modificación y/o secuencia de nucleótidos) complejo con un péptido vehículo de acuerdo con la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ (fórmula I) puede tener propiedades inmunostimuladoras, es decir incrementar la respuesta inmune. El ARN tal como se define arriba complejo con un péptido vehículo de acuerdo con la fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ (fórmula I) puede así emplearse para incrementar una inmunostimulación (no específica), si es adecuado y se desea para un tratamiento específico. En consecuencia, puede ser una propiedad intrínseca del ARN complejo de la invención proporcionar efectos inmunostimuladores mediante la complejación de cualquier ARN con un péptido de acuerdo con la fórmula (I).

El al menos un ARN (molécula) (inmunostimulador) del ARN monohebra complejo de la presente invención también puede entonces comprender cualquier secuencia de ARN conocida por ser inmunostimuladora, incluyendo, sin limitarse a, secuencias de ARN que representan y/o codifican para ligandos de TLRs, preferentemente seleccionados de los miembros de la familia TLR1-TLR13, en especial de TLR7 y TLR8, ligandos para receptores intracelulares de ARN (tales como RIG-1 o MAD-5, etc.) (véase por ejemplo Meylan, E., Tschopp, J. (2006), Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses, Mol. Cell 22, 561-569), o cualquier otra secuencia de ARN inmunostimuladora. Además, las (clases) moléculas de ARN que pueden ser usadas como ARN inmunostimulador pueden incluir cualquier

otro ARN capaz de desarrollar una respuesta inmune. Sin limitación, tal ARN inmunoestimulador puede incluir ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y ARN viral (ARNv).

Otras (clases de) moléculas de ARN que pueden usarse como el al menos un ARN (molécula) (inmunoestimulador) del ARN monohebra complejado de la presente invención pueden comprender, sin limitarse a, por ejemplo una molécula de ARN de fórmula (IIa):



donde:

- G es guanosina, uracilo o un análogo de guanosina o uracilo;
 X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina, o un análogo de estos nucleótidos;
 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 análogos de la misma;
 m es un entero y es al menos 3; donde cuando m = 3 X es uracilo o un análogo del mismo, cuando m > 3 al menos existen 3 uracilos o análogos de uracilo sucesivos;
 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 análogos de la misma.

Además, otras (clases de) moléculas de ARN que pueden usarse como el al menos un ARN (molécula) (inmunoestimulador) del ARN monohebra complejado de la presente invención pueden comprender, sin limitarse a, por ejemplo una molécula de ARN de fórmula (IIb):



donde:

- C es citosina, uracilo o un análogo de citosina o uracilo;
 X es guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina o un análogo de estos nucleótidos;
 l es un entero de 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 análogos de la misma;
 m es un entero y es al menos 3; donde cuando m = 3 X es uracilo o un análogo del mismo, cuando m > 3 existen al menos 3 uracilos o análogos de uracilo sucesivos,
 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 análogos de la misma.

De preferencia, las moléculas de ARN inmunoestimuladoras tal como se utilizan aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN complejado de la presente invención comprenden una longitud tal como la definida en general anteriormente para las moléculas de ARN del ARN complejado de la presente invención, en especial una longitud de 5 a 5.000, de 500 a 5.000, o, con mayor preferencia de 1.000 a 5.000, o, alternativamente, de 5 a 1.000, 5 a 500, 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50, o, en particular de 50 a 30 nucleótidos.

El al menos un ARN inmunoestimulador tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la presente invención puede ser modificado además, preferentemente, "químicamente" para así incrementar las propiedades inmunoestimuladoras del ADN. El término "modificación química" significa que el ARN usado como ARN inmunoestimulador según la invención se modifica por sustitución, inserción o eliminación de átomos o grupos atómicos individuales o de varios átomos o grupos atómicos en comparación con las especies de ARN naturales.

Preferentemente, la modificación química del ARN comprende al menos un análogo de nucleótidos que ocurren naturalmente. En una lista que de ninguna manera es conclusiva, ejemplos que pueden ser citados para los análogos de nucleótidos a usar de acuerdo con la invención son análogos de guanosina, uracilo, adenosina, timidina, citosina. Las modificaciones pueden referirse a modificaciones de la base, la parte ribosa y/o la parte esqueleto fosfato. En este contexto, análogos de guanosina, uracilo, adenosina y citosina incluyen, sin limitación, cualquier guanosina, uracilo, adenosina, timidina o citosina que ocurra naturalmente o que no ocurra naturalmente, que haya sido alterada químicamente, por ejemplo por acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyendo 1-metiladenosina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanosina, 2,6-diaminopurina, 2'-amino-2'-desoxiadenosina, 2'-amino-2'-desoxicitidina, 2'-amino-2'-desoxiguanosina, 2'-amino-2'-desoxiuridina, 2-amino-6-cloropurinribósido, 2-aminopurinribósido, 2'-araadenosina, 2'-aracitidina, 2'-arauridina, 2'-azido-2'-desoxiadenosina, 2'-azido-2'-desoxicitidina, 2'-azido-2'-desoxiguanosina, 2'-azido-2'-desoxiuridina, 2-cloroadenosina, 2'-flor-2'-desoxiadenosina, 2'-flor-2'-desoxicitidina, 2'-flor-2'-desoxiguanosina, 2'-flor-2'-desoxiuridina, 2'-florotimidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 2-metiliosin-6-isopenteniladenosina, 2'-O-metil-2-aminoadenosina, 2'-O-metil-2'-desoxi-adenosina, 2'-O-metil-2'-desoxicitidina, 2'-O-metil-2'-desoxiguanosina, 2'-O-metil-2'-desoxiuridina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metilinosina, 2'-O-metilpseudouridina, 2-tiocitidina, 2-tiocitosina, 3-metilcitosina, 4-acetilcitosina, 4-tiouridina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5,6-dihidrouridina, 5-aminoalilcitidina, 5-aminoalil-desoxiuridina, 5-bromouridina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, 5-cloroaracitosina, 5-flourouridina, 5-yodouridina, 5-metoxycarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 6-azacitidina, 6-azauridina, 6-cloro-7-desazaguanosina, 6-cloropurinribósido, 6-mercapto-guanosina, 6-

metilmercaptapurina-ribósido, 7-desaza-2'-desoxiguanosina, 7-desazaadenosina, 7-metilguanosina, 8-azaadenosina, 8-bromoadenosina, 8-bromoguanosina, 8-mercaptoguanosina, 8-oxoguanosina, bencimidazolribódido, beta-D-manosilqueosina, dihidrouracilo, inosina, N1-metiladenosina, N6-([6-aminohexil]carbamoilmetil)adenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-metil-adenosina, N7-metilxantosina, N-uracil-5-oxiacetato de metilo, puromicina, queosina, ácido uracil-5-oxiacético, uracil-5-oxiacetato de metilo, wybutoxosina, xantosina y xiloadenosina. La preparación de estos análogos es conocida del experto en la materia, por ejemplo de 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. En caso de un análogo como el descrito anteriormente, se da particular preferencia de acuerdo con la invención a aquellos análogos que incrementan la inmunogenicidad de la secuencia de ARN in vivo inmunostimuladora aquí usada como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunostimulador complejo de la presente invención y/o que no interfieren con otra modificación que haya sido introducida en dicho ARN inmunostimulador.

ARNsi

El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunostimulador complejo de la presente invención puede estar en forma de ARNsi. Un ARNsi es de particular interés en relación con el fenómeno de interferencia de ARN. Se debe atención especial al fenómeno de interferencia de ARN en el curso de una investigación inmunológica. En los últimos años se ha descubierto un mecanismo de defensa a base de ARN que tiene lugar tanto en el reino de los hongos como en el reino vegetal y animal y actúa como un "sistema inmunológico del genoma". El sistema fue descrito originalmente en varias especies independientes unas de otras, primero en *C. elegans*, antes de que fuera posible identificar los mecanismos subyacentes de los procesos como idénticos: resistencia a virus mediada por ARN en plantas, PTGS (silenciamiento de genes post-transcripcional) en plantas e interferencia de ARN en eucariontes se basan en un procedimiento común. La técnica de interferencia de ARN (ARNi) *in vitro* se basa en moléculas de ARN de doble hebra (ARNds), que desencadenan la supresión específica de secuencias de expresión génica (Zamore (2001), Nat. Struct. Biol. 9:746-750; Sharp (2001), Genes Dev. 5:485-490; Hannon (2002), Nature 41-244-251). En la transfección de células de mamífero con ARNds largo, la activación de la proteína quinasa R y RnasaL ocasiona efectos no específicos, por ejemplo una respuesta a interferón (Stark y col. (1998), Annu. Rev. Biochem. 67:227-264, He y Katze (2002), Viral Immunol. 15:95-119). Estos efectos no específicos se evitan cuando se usa el llamado ARNsi más corto, por ejemplo de 21 a 23 pares (ARN de pequeña interferencia), debido a que los efectos no específicos no son desencadenados por un ARNsi que es más corto que 30 pb (Elbashir y col. (2001), Nature 411:494-498). Recientemente, también se han empleado moléculas de ARNds *in vivo* (McCaffrey y col. (2002), Nature 418:38-39; Xia y col. (2002), Nature Biotech. 20:1006-1010; Brummelkamp y col. (2002), Cancer Cell 2:243-247). Un ARNsi tal el aquí usado para el ARN monohebra estimulador complejo de acuerdo con la presente invención comprende típicamente una secuencia de ARN de una sola hebra de aproximadamente 8 a 30 nucleótidos, preferentemente de 17 a 25 nucleótidos, con especial preferencia de 20 a 25 y en particular de 21 a 23 nucleótidos. En principio, todas las secciones que tienen una longitud de 17 a 29, de preferencia de 19 a 25, muy preferiblemente de 21 a 23 pares de bases que pueden ocurrir en la región de codificación de una secuencia de ARN tal como la mencionada, por ejemplo de una secuencia de ARN(m), pueden servir como secuencia diana para un ARNsi. Igualmente, las moléculas de ARNsi también pueden ser dirigidas contra secuencias de nucleótidos de las proteínas o antígenos (terapéuticamente relevantes) descritos aquí anteriormente que no se encuentre en la región de codificación, en particular en la región no codificadora 5' del ARN, y por tanto, contra regiones no codificadoras del ARN confunción reguladora. Así, la secuencia diana del ARNsi puede caer en la región traducida y/o no traducida del ARN y/o en la región de los elementos de control. La secuencia diana de un ARNsi también puede caer en la región solapada de una secuencia no traducida y una traducida. En particular, la secuencia diana puede comprender al menos un nucleótido aguas arriba del extremo 5' del triplete de inicio de la región de codificación del ARN.

ARN antisentido

El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención puede ser un ARN antisentido. En el contexto de la presente invención, preferentemente un ARN antisentido es una molécula de ARN (de una sola hebra) transcrita en base a la hebra, en lugar de la plantilla, de codificación de ADN, de manera que es complementaria al ARN sentido (mensajero). Un ARN antisentido tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN complejo de la presente invención típicamente forma un dúplex entre las moléculas de ARN sentido y antisentido, siendo capaz de bloquear la traducción del ARNm. Un ARN antisentido tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN complejo de la presente invención puede ser dirigido contra (puede ser complementario a) cualquier parte de la secuencia de ARNm que puede codificar para una proteína o antígeno (terapéuticamente relevante) (por ejemplo, como los descritos aquí anteriormente), si asimismo la traducción de la proteína codificada se reduce/suprime. En consecuencia, la secuencia diana del ARN antisentido en el ARNm diana puede ubicarse en la región traducida y/o no traducida del ARNm, por ejemplo en la región de los elementos de control del ARNm, en particular en la región no codificadora 5' del ARN que ejerce una función reguladora. La secuencia

diana de un ARN antisentido del ARNm seleccionado también puede construirse de manera que el ARN antisentido se enlaza al ARNm cubriendo con su secuencia una región que parcialmente complementaria a la secuencia (de codificación) no traducida y traducida del ARNm seleccionado; en particular, el ARN antisentido puede ser complementario a la secuencia de ARNm diana en al menos un nucleótido aguas arriba del extremo 5' del triplete de inicio de la región codificadora del ARNm seleccionado. Preferentemente, el ARN antisentido según se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunomodulador complejo de la presente invención comprende una longitud tal como la definida anteriormente en general para moléculas de ARN (del ARN complejo de la presente invención). Típicamente el ARN antisentido tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunostimulador complejo de la presente invención será un fragmento del ARNm diana. Más detalladamente, preferentemente el ARN antisentido puede tener una longitud de 5 a 5.000, de 500 a 5.000 y muy preferiblemente de 1.000 a 5.000 o, como alternativa, 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, o, alternativamente, todavía con mayor preferencia una longitud de 20 a 100, de 20 a 80 o de 20 a 60 nucleótidos.

15 Modificaciones del ARN

De acuerdo con una realización, el ARN tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención (independientemente de su potencial terapéutico específico, longitud y/o secuencia), en particular el oligonucleótido de ARN corto, el ARN de codificación, el ARN inmunostimulador, el ARNsi, el ARN antisentido, los riboswitches reguladores de la expresión génica, ribozimas o aptámeros, puede proporcionarse como un ARN modificado donde cualquier modificación (en particular la descrita a continuación) puede ser introducida (en cualquier combinación o como tal) en el ARN (molécula) tal como el definido arriba. Sin embargo, ciertos tipos de modificaciones pueden ser más adecuadas para tipos de ARN específicos (por ejemplo más adecuadas para un ARN de codificación), mientras que otras modificaciones pueden aplicarse a cualquier molécula de ARN, por ejemplo como la aquí definida, sin estar restringidas a tipos de ARN específicos. En consecuencia, se pueden introducir modificaciones del ARN para lograr efectos específicos o complejos deseables para su uso en la aplicación de la invención. Así, pueden diseñarse modificaciones, por ejemplo, para estabilizar el ARN contra la degradación, para incrementar su eficacia de transfección, para mejorar su eficacia de traducción, para incrementar su potencial inmunogénico y/o para incrementar su potencial terapéutico (por ejemplo, incrementar su silenciamiento o propiedades antisentido). Con particular preferencia, el ARN modificado como componente del ARN complejo de la invención permite combinar la mejora de al menos una, en especial al menos dos propiedades funcionales, por ejemplo para estabilizar el ARN y para mejorar el potencial terapéutico o inmunogénico.

En general, un objetivo primario es estabilizar el ARN tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunostimulador complejo de la presente invención, de forma que se amplíe su tiempo de vida media *in vivo*. Preferentemente, el tiempo de vida media de un ARN modificado bajo condiciones *in vivo* se amplía (en comparación con el ARN no modificado) en al menos un 20, preferiblemente en al menos un 40, con especial preferencia en al menos un 50 y en particular en al menos un 70, 80, 90, 100, 150 ó 200%. La estabilización lograda por la modificación puede aumentarla vida media del ARN modificado en al menos 5, 10, 15, 30 o preferiblemente en al menos 60 minutos en comparación con el ARN no modificado.

De acuerdo con una realización, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunostimulador complejo de la presente invención, preferentemente un ARN de codificación, por ejemplo ARNm, puede estabilizarse modificando el contenido en G/C, por ejemplo de la región de codificación del ARN. En una realización particularmente preferente de la presente invención, el contenido en G/C de la región de codificación del ARN (del ARN monohebra inmunostimulador complejo de la presente invención) es alterado, particularmente incrementado, en comparación con el contenido en G/C de la región de codificación de su correspondiente ARN salvaje, es decir el ARN no modificado. La secuencia de aminoácidos codificada del ARN modificado preferentemente no se altera en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada por el ARN salvaje correspondiente.

Esta modificación del ARN tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunostimulador complejo de la presente invención se basa en el hecho de que la secuencia de codificación de cualquier ARN a traducir es importante para la traducción eficiente de dicho ARN. En particular, las secuencias que tienen un mayor contenido en G (guanósina)/C (citósina) son más estables que aquellas que tienen un mayor contenido en A (adenósina)/U (uracilo). De acuerdo con la invención, los codones del ARN son por tanto alterados en comparación con el ARN tipo salvaje, mientras conservan la secuencia de aminoácidos traducida de manera que incluyen una mayor cantidad de nucleótidos G/C. Con respecto al hecho de que varios codones codifican para uno y el mismo aminoácido (la llamada degeneración del código genético), pueden determinarse los codones más favorables para la estabilidad (el llamado uso de codones alternativo).

Dependiendo del aminoácido que será codificado por el ARN tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejado de la presente invención, existen varias posibilidades para modificarlas secuencias del ARN en comparación con su secuencia salvaje. En caso de aminoácidos que son codificados por codones que contienen exclusivamente nucleótidos G o C, no es necesaria modificación alguna del codón. Así, los codones para Pro (CCC o CCG), Arg (CGC o CGG), Ala (GCC o GCG) y Gly (GGC o GGG) no requieren modificación, ya que no está presente A o U.

Por el contrario, los codones que contienen los nucleótidos A y/o U pueden modificarse mediante la sustitución por otros codones que codifiquen para los mismos aminoácidos pero que no contengan A y/o U. Ejemplos de estos son:

los codones para Pro pueden modificarse de CCU o CCA a CCC o CCG;
 los codones para Arg pueden modificarse de CGU o CGA o AGA o AGG a GGC o CG;
 los codones para Ala pueden modificarse de GCU o GCA a GCC o GCG;
 los codones para Gly pueden modificarse de GGU o GGA a GGC o GGG.

En otros casos, aunque los nucleótidos A o U no pueden ser eliminados de los codones, sin embargo es posible reducir el contenido en A y U empleando codones con menor contenido en nucleótidos A y/o U. Ejemplos de estos son:

los codones para Phe pueden modificarse de UUU a UUC;
 los codones para Leu pueden modificarse de UUA, UUG, CUU o CUA a CUC o CUG;
 los codones para Ser pueden modificarse de UCU o UCA o AGU a UCC, UCG o AGC;
 el codón para Tyr puede modificarse de UAU a UAC;
 el codón para Cys puede modificarse de UGU a UGC;
 el codón para His puede modificarse de CAU a CAC;
 el codón para Gln puede modificarse de CAA a CAG;
 los codones para Ile pueden modificarse de AUU o AUA a AUC;
 los codones para Thr pueden modificarse de ACU o ACA a ACC o ACG;
 el codón para Asn puede modificarse de AAU a AAC;
 el codón para Lys puede modificarse de AAA a AAG;
 los codones para Val pueden modificarse de GUU o GUA a GUC o GUG;
 el codón para Asp puede ser modificado de GAU a GAC;
 el codón para Glu puede ser modificado de GAA a GAG;
 el codón de parada UAA puede ser modificado a UAG o UGA.

En el caso de los codones para Met (AUG) y Trp (UGG), por otro lado, no hay posibilidad de modificación de secuencia.

Las sustituciones citadas se pueden usar bien individualmente o bien en todas las combinaciones posibles para incrementar el contenido en G/C del ARN según se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la presente invención en comparación con su ARN tipo salvaje particular, es decir su secuencia original. De esta manera, por ejemplo, todos los codones para Thr que se encuentran en la secuencia salvaje pueden modificarse a ACC (o ACG). Sin embargo, preferentemente, por ejemplo, se usan combinaciones de las posibilidades de sustitución anteriores:

sustitución de todos los codones que codifiquen para Thr en la secuencia original (ARN tipo silvestre) por ACC (o ACG) y
 sustitución de todos los codones que se codifiquen originalmente para Ser por UCC (o UCG o AGC);
 sustitución de todos los codones que codifiquen para Ile en la secuencia original por AUC y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Lys por AAG y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Tyr por UAC;
 sustitución de todos los codones que codifiquen para Val en la secuencia original por GUC (o GUG) y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Glu por GAG y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Ala por GCC (o GCG) y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Arg por CGC (o CGG);
 sustitución de todos los codones que codifiquen para Val en la secuencia original por GUC (o GUG) y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Glu por GAG y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Ala por GCC (o GCG) y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Gly por GGC (o GGG) y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Asn por AAC;
 sustitución de todos los codones que codifiquen para Val en la secuencia original por GUC (o GUG) y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Phe por UUC y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Cys por UGC y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Leu por CUG (o CUC) y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Gln por CAG y
 sustitución de todos los codones que codifiquen originalmente para Pro por CCC (o CCG); etc.

Preferentemente, el contenido en G/C de la región codificadora del ARN según se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención se incrementa en al menos un 7%, en especial en al menos un 15%, de manera particularmente preferente en al menos un 20%,
 5 en comparación con el contenido en G/C de la región codificadora del ARN tipo salvaje que codifica para una proteína. De acuerdo con una realización específica, al menos un 60%, en especial al menos un 70%, con especial preferencia al menos un 80% y con total preferencia al menos un 90%, 95% o incluso un 100% de los codones sustituibles en la región que codifica para una proteína o la secuencia entera de la secuencia de ARN tipo salvaje son sustituidos, incrementando así o incluso maximizando el contenido en G/C de la
 10 secuencia.

En este contexto, es particularmente preferente incrementar el contenido en G/C del ARN según se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención al máximo (es decir, 100% de los codones sustituibles) en particular en la región que codifica para una proteína, en comparación con la secuencia tipo salvaje.

15 De acuerdo con la invención, una modificación preferente en el ARN tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención se basa en el descubrimiento de que la eficiencia de traducción también viene determinada por una frecuencia diferente en la ocurrencia de moléculas de ARNt en las células. Así, si los llamados "codones raros" están presentes en una secuencia de ARN en un grado incrementado, la secuencia de ARN modificada correspondiente es
 20 traducida en un nivel significativamente más deficiente que en el caso en que están presentes codones que codifican para moléculas de ARNt relativamente "frecuentes".

De acuerdo con la invención, en el ARN tal como se usa aquí como el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención, la región que codifica para la proteína se modifica en comparación con la región correspondiente del ARN salvaje de manera que al menos un
 25 codón para la secuencia salvaje que codifica para un ARNt relativamente raro en la célula se cambia por un codón que codifique para un ARNt relativamente frecuente en la célula y porte el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Con esta modificación, las secuencias de ARN son modificadas de manera que se insertan los codones para los cuales moléculas de ARNt que ocurren frecuentemente estén disponibles. En otras palabras, de acuerdo con la invención, con esta modificación todos los codones de la secuencia salvaje
 30 que codifiquen para un ARNt relativamente raro en la célula pueden en cada caso cambiarse por un codón que codifique para un ARNt que sea relativamente frecuente en la célula y el cual, en cada caso, porte el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.

El experto en la materia conoce qué moléculas de ARNt ocurren en forma relativamente frecuente en la célula y cuáles, en contraste, ocurren relativamente en forma rara; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet.
 35 Dev. 2001, 11(6):660-666. Son particularmente preferentes los codones que usan, para el aminoácido particular, el ARNt que ocurre más frecuentemente, por ejemplo, el codón Gly, el cual usa el ARNt que ocurre más frecuente en la célula (humana).

De acuerdo con la invención, es particularmente preferente enlazar el contenido en G/C secuencial que es incrementado, en particular maximizado, en el ARN usado aquí como el al menos un ARN (molécula) del
 40 ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención, con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región codificadora del ARN. Esta realización preferente permite proporcionar un ARN (modificado) producido y estabilizado de forma particularmente eficiente del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención.

La determinación del contenido en G/C de un ARN según se usa aquí como el al menos un ARN (molécula)
 45 del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención (mayor contenido en G/C; intercambio de moléculas de ARNt) puede llevarse a cabo con el programa de ordenador detallado en la WO 02/098443 – el contenido de su descripción se incluye en su alcance completo en la presente invención. Usando este programa de ordenador, la secuencia de nucleótidos de cualquier ARN deseado puede modificarse con ayuda del código genético o de su naturaleza degenerativa de manera que el resultado es un
 50 contenido en G/C máximo en combinación con el uso de codones que codifiquen para moléculas de ARNt que ocurran lo más frecuentemente posible en la célula, donde la secuencia de aminoácidos codificada por el ARN (molécula) preferentemente no está modificada en comparación con la secuencia no modificada. Alternativamente, también es posible modificar sólo el contenido de G/C o sólo el uso de codones en comparación con la secuencia original. El código de origen es Visual Basic 6.0 (entorno de desarrollo:
 55 Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 con Servicepack 3) también se describe en la WO 02/098443.

En otra realización preferente de la presente invención, el contenido en A/U en el ambiente del sitio de unión a ribosomas del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra estimulador complejo de la presente invención se incrementa en comparación con el contenido en A/U en el ambiente del sitio de unión a

ribosomas del ARN tipo salvaje particular. Esta modificación (un mayor contenido en A/U alrededor del sitio de unión a ribosomas) incrementa la eficiencia de unión de los ribosomas al ARN modificado. Una unión efectiva de los ribosomas al sitio de unión a ribosomas (secuencia Kozak: GCCGCCACCAUGG (SEQ ID NO: 33), el AUG forma el codón de inicio) a su vez tiene el efecto de una traducción eficiente del ARN modificado.

5 De acuerdo con otra realización de la presente invención, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede modificarse en cuanto a elementos de secuencia potencialmente desestabilizadores. Particularmente, la región codificadora y/o la región no traducida 5' y/o 3' de este ARN pueden modificarse en comparación con el ARN salvaje particular de manera que no contenga elementos de secuencia desestabilizadores, preferentemente la secuencia de aminoácidos codificada del ARN (molécula) no se modifica en comparación con su ARN salvaje particular. Es sabido que, por ejemplo, en secuencias de moléculas de ARN eucarióticas ocurren elementos de secuencia desestabilizadores (DSE) a los que se unen proteínas de señal que regulan la degradación enzimática del ARN *in vivo*. Para mayor estabilización del ARN (molécula), opcionalmente en la región que codifica para una proteína, pueden llevarse a cabo una o más de estas modificaciones en comparación con la región correspondiente del ARN tipo salvaje de manera que no contenga ningún elemento de secuencia desestabilizadora o sustancialmente ningún elemento de secuencia desestabilizadora. De acuerdo con la invención, los DSE presentes en las regiones no traducidas (3'- y/o 5'-UTR) también se pueden eliminar del al un ARN (molécula) del ARN complejo de la presente invención mediante estas modificaciones.

20 Estas secuencias de desestabilización son, por ejemplo, secuencias ricas en AU (AURES), que cuales ocurren en las secciones 3'-UTR de numerosas moléculas de ARN inestables (Caput y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83:1670 a 1674). Por tanto, el ARN del ARN complejo según la presente invención preferentemente se modifica, en comparación con el ARN salvaje, de manera que el ARN no contenga estas secuencias desestabilizadoras. Esto es también aplicable a aquellos motivos de secuencia que son reconocidos por posibles endonucleasas, por ejemplo la secuencia GAACAAG, contenida en el segmento 3'-UTR del gen que codifica para el receptor de transferrina (Binder y col., EMBO J. 1994, 13: 1969 a 1980). Preferentemente, estos motivos de secuencia también se eliminan de acuerdo con la invención en el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención.

30 De acuerdo con la presente invención, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede tener una estructura de cierre en el extremo 5'. Ejemplos de estructuras de bloqueo de extremo que pueden usarse de acuerdo con la invención son m7G(5')ppp, (5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G.

Otra modificación que incrementa la estabilidad del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención se basa en elongaciones 5' o 3' del ARN, típicamente elongaciones homonucleótidas de una longitud de 10 a 200 nucleótidos. Estas elongaciones pueden contener, particularmente cuando el ARN se proporciona como ARNm, una cola poli-A en el terminal 3' típicamente de alrededor de 10 a 200 nucleótidos de adenosina, preferentemente de alrededor de 10 a 100 nucleótidos de adenosina, en especial de alrededor de 20 a 70 nucleótidos de adenosina o en particular de alrededor de 20 a 60 nucleótidos de adenosina. Como alternativa o además, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede contener, en particular si el ARN se proporciona como ARNm, una cola poli-C en el terminal 3' típicamente de alrededor de 10 a 200 nucleótidos de citosina, preferentemente de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, en especial de alrededor de 20 a 70 nucleótidos de citosina o en particular de alrededor de 20 a 60 o incluso 10 a 40 nucleótidos de citosina.

45 Otra modificación que puede tener lugar en el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención, en particular cuando el ARN se proporciona como ARNm, se refiere a al menos un IRES y/o a al menos una secuencia estabilizadora 5' y/o 3'. De acuerdo con la invención, pueden ser insertados uno o más de los denominados IRES (sitio de entrada ribosómico interno) en el ARN. Así, un IRES puede funcionar como el único sitio de unión al ribosoma, pero también puede servir para proporcionar un ARN que codifique para varias proteínas que vayan a ser traducidas por los ribosomas independientemente unos de otros (ARN multicistónico). Ejemplos de secuencias IRES que pueden emplearse 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 fiebre porcina clásica (CSFV), virus del leucoma del ratón (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

De acuerdo con la invención, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede presentar al menos una secuencia estabilizadora 5' y/o 3' tal como se conoce en la técnica. Estas secuencias estabilizadoras en las regiones no traducidas 5' y/o 3' tienen el efecto de incrementar la vida media del ARN en el citosol. Estas secuencias estabilizadoras pueden tener

un 100% de homología de secuencia con las secuencias naturales que se encuentran en los virus, bacterias y eucariotas, pero también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Las secuencias no traducidas (UTR) del gen de la globina, por ejemplo de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis* pueden mencionarse como ejemplos de secuencias estabilizadoras a emplear en la presente invención para un ARN estabilizado. Otro ejemplo de secuencia estabilizadora es aquella de fórmula general (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC (SEQ ID NO: 34), contenida en la 3'UTR del ARN altamente estable que codifica para la globina, colágeno-1, 15-lipooxigenasa o la para tirosina-hidroxilasa (véase, Holcik y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 1997, 94:2410 a 2414). Estas secuencias estabilizadoras pueden por supuesto usarse individualmente o en combinación unas con otras y también en combinación con otras secuencias estabilizadoras conocidas por el experto en la técnica. Por tanto, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención preferentemente está presente como ARN estabilizado por regiones no traducidas UTR de globina, en particular como ARN estabilizado por UTR de globina.

Si se desea, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede contener modificaciones en esqueleto. Una modificación en el esqueleto en relación con la presente invención es aquella en la cual se modifican químicamente los fosfatos del esqueleto nucleotídico contenido en el ARN. Tales incluyen típicamente, sin limitarse a, modificaciones de entre el grupo consistente en metilfosfonatos, fosfoamidatos y fosfoatoatos (por ejemplo, citidin-5'-O-(1-tiofosfato)).

El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede contener, además o alternativamente, modificaciones de azúcar. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es aquella modificación química del azúcar en los nucleótidos presentes, incluyendo típicamente, sin limitarse a, modificaciones de azúcar seleccionadas de entre el grupo consistente en 2'-desoxi-2'-fluoro-oligorribonucleótido (2'-fluor-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-fluor-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato), 2'-desoxi-2'-desamino-oligorribonucleótido (2'-amino-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato), 2'-O-alkiloligorribonucleótido, 2'-desoxi-2'-C-alkiloligorribonucleótido (2'-O-metilcitidin-5'-trifosfato, 2'-metiluridin-5'-trifosfato), 2'-C-alkiloligorribonucleótido e isómeros de los mismos (2'-aracitidin-5'-trifosfato, 2'-arauridin-5'-trifosfato) o azidotrifosfato (2'-azido-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato).

El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede contener, además o alternativamente, al menos una modificación de base, preferentemente adecuada para incrementar significativamente la expresión de la proteína codificada por el al menos un ARN (molécula) en comparación con la secuencia de ARN no alterada, es decir la natural (= nativa). Significativamente en este caso se refiere a un incremento de la expresión de la proteína en comparación con la expresión de la secuencia de ARN nativa en al menos un 20%, preferentemente en al menos un 30%, 40%, 50% ó 60%, en especial en al menos un 20%, 80%, 90% o incluso 100% y en particular en al menos un 150%, 200% o incluso 300%. En relación con la presente invención, un nucleótido con una modificación de base se selecciona preferentemente de entre el grupo de nucleótidos modificados en base consistente en 2-amino-6-cloropurino-ribósido-5'-trifosfato, 2-aminadenosin-5'-trifosfato, 2-triocitidin-5'-trifosfato, 2-tiouridin-5'-trifosfato, 4-tiouridin-5'-trifosfato, 5-aminoalilcitidin-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridin-5'-trifosfato, 5-bromocitidin-5'-trifosfato, 5-bromouridin-5'-trifosfato, 5-yodocitidin-5'-trifosfato, 5-yodouridin-5'-trifosfato, 5-metilcitidin-5'-trifosfato, 5-metiluridin-5'-trifosfato, 6-azacitidin-5'-trifosfato, 6-azauridin-5'-trifosfato, 6-cloropurino-ribósido-5'-trifosfato, 7-desazadenosin-5'-trifosfato, 7-desazaguanosin-5'-trifosfato, 8-azaadenosin-5'-trifosfato, 8-azoadenosin-5'-trifosfato, bencimidazolribósido-5'-trifosfato, N1-metiladenosin-5'-trifosfato, N1-metilguanosa-5'-trifosfato, N6-metiladenosin-5'-trifosfato, O6-metilguanosa-5'-trifosfato, pseudouridin-5'-trifosfato o puromicina-5'-trifosfato, xantosin-5'-trifosfato. Se da particular preferencia a los nucleótidos para modificaciones de base seleccionadas de entre el grupo de nucleótidos modificados en base consistente en 5-metilcitidin-5'-trifosfato, 7-desazaguanosin-5'-trifosfato, 5-bromocitidin-5'-trifosfato y pseudouridin-5'-trifosfato.

El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención también puede contener, además o alternativamente, al menos una modificación de un nucleósido en un nucleótido tal como está presente en el al menos un ARN (molécula) que actúe como inmunosupresor, esto es que preferentemente sea adecuado prevenir o reducir la respuesta inmune cuando se administra a un paciente que lo requiera. Esta al menos una modificación se selecciona preferentemente de entre las modificaciones de nucleósido siguientes:

- a) una modificación química en posición 4, 5 ó 6 de la base pirimidina de los nucleósidos citidina y/o uridina;
- b) una modificación química en posición 2, 6, 7 u 8 de la base purina de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosa; y/o
- c) una modificación química en posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosa, citidina y/o uridina.

En este contexto, un ARN(m) es una cadena de ácido nucleico formada por diversos nucleótidos seleccionados típicamente de entre adenosin-5'-monofosfato, guanosa-5'-monofosfato, inosin-5'-

monofosfato, citidin-5'-monofosfato y/o uridin-5'-monofosfato. Estos nucleótidos se unen entre sí vía su monofosfato. Los nucleótidos comprenden nucleósidos y un 5'-monofosfato como componente estructural, estando formados los nucleósidos típicamente por una nucleobase, es decir una pirimidina (uracilo o citosina) o una base purina (adenina o guanina) y un azúcar. En consecuencia, una modificación de un nucleósido del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención siempre se referirá a una modificación en la estructura de los nucleósidos del nucleótido respectivo del al menos un ARN (molécula).

De acuerdo con una primera modificación a), al menos un nucleósido del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención puede modificarse por una modificación química en posición 5 ó 6 de la base pirimidina de los nucleósidos citidina y/o uridina. Sin limitarse a, tales modificaciones químicas en posición 4, 5 ó 6 de la base pirimidina de los nucleósidos citidina y/o uridina puede seleccionarse de entre el grupo consistente en: 4-tio-, 5-yodo-(5-I-), 5-bromo-(5-Br-), 5-aminoalil-, 5-fluor-(5-F-), 5-hidroxi-, 5-hidro-(5-H-), 5-nitro-, 5-propinil-(5-(C=C-CH₃)-), 5-metil-, 5-metil-2-tio-, 5-formil-, 5-hidroximetil-, 5-metoxi-, 5-oxiacetato de metilo, ácido 5-oxiacético, 5-carboxihidroximetil-, metil éster de 5-(carboxihidroximetil)piridimidin-, 5-metoxicarbonilmetil-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio-, 5-aminometil-, 5-aminometil-2-tio-, 5-aminometil-2-seleno-, 5-metilaminometil-, 5-carbamoilmetil-, 5-carboximetilaminometil-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-, 5-carboximetil-, 5-metildihidro-, 5-taurinometil-, 5-taurinometil-2-tiouridina, 5-isopentenilaminometil-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-, 5-aminopropil-(5-(C₃H₆NH₃)-), 5-metoxietoximetil-(5-(CH₂-O-C₂H₄-O-CH₃)-) o 6-aza-.

De acuerdo con la segunda modificación b), al menos un nucleósido del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención, adecuado para suprimir y/o evitar una respuesta inmunoestimuladora (innata) en un mamífero exhibida típicamente cuando se administra el al menos un ARN (molécula) no modificado correspondiente, puede modificarse alternativamente con una modificación química en posición 2, 6, 7 u 8 de la base purina de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina. Sin limitarse a, tales modificaciones químicas en posición 2, 6, 7 u 8 de la base purina de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina se puede seleccionar de entre el grupo consistente en 2-amino-, 7-desaza-, 8-aza- u 8-azido-.

De acuerdo con la tercera modificación c), al menos un nucleósido del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención, adecuado para suprimir y/o evitar una respuesta inmune estimuladora (innata) en un mamífero exhibida típicamente cuando se administra el al menos un ARN (molécula) no modificado correspondiente, puede ser modificado por al menos una modificación química en posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina cuando se incorporan en la secuencia de ARN. Sin limitarse a, tales modificaciones químicas en posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina puede seleccionarse de entre el grupo consistente en: 2'-desoxi-, 2'-amino-2'-desoxi-, 2'-amino-, 2'-fluor-2'-desoxi-, 2'-fluoro-, 2'-O-metil-2'-desoxi- o 2'-O-metil-.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, al menos un nucleósido del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención ha sido modificado en la posición 4, 5 ó 6 de la base pirimidina de los nucleósidos citidina y/o uridina y en la posición 2' del azúcar ribosa de acuerdo con las modificaciones a) y c) antes definidas.

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, al menos un nucleósido del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención ha sido modificado en la posición 2, 6, 7 u 8 de la base purina de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina y en la posición 2' del azúcar ribosa de acuerdo con las modificaciones b) y c) definidas arriba, en particular como se han definido.

De acuerdo con una realización muy particularmente preferente, al menos un nucleósido del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención ha sido modificado para portar nucleósidos químicamente modificados (del ARN(m)) seleccionados del siguiente grupo: 4-tiouridin-5'-(mono)fosfato, 2-aminopurinribósido-5'-(mono)fosfato, 5-aminoalilcitidin-5'-(mono)fosfato, 5-aminoaliluridin-5'-(mono)fosfato, 5-bromocitidin-5'-(mono)fosfato, 5-bromo-2'-desoxicitidin-5'-(mono)fosfato, 5-bromouridin-5'-(mono)fosfato, 5-bromo-2'-desoxiuridin-5'-(mono)fosfato, 5-yodocitidin-5'-(mono)fosfato, 5-yodo-2'-desoxicitidin-5'-(mono)fosfato, 5-yodouridin-5'-(mono)fosfato, 5-yodo-2'-desoxiuridin-5'-(mono)fosfato, 5-propinil-2'-desoxicitidin-5'-(mono)fosfato, 5-propinil-2'-desoxiuridin-5'-(mono)fosfato, 5-formilcitidin-5'-(mono)fosfato, 5,2'-O-dimetilcitidin-5'-(mono)fosfato, 5-hidroximetilcitidin-5'-(mono)fosfato, 5-formil-2'-O-metilcitidin-5'-(mono)fosfato, 5,2'-O-dimetiluridin-5'-(mono)fosfato, 5-metil-2-tiouridin-5'-(mono)fosfato, 5-hidroxiuridin-5'-(mono)fosfato, 5-metoxiuridin-5'-(mono)fosfato, uridina, ácido 5-oxiacético-5'-(mono)fosfato, uridina, 5-oxiacetato de metilo, 5'-(mono)fosfato, 5-(carboxihidroximetil)uridin-5'-(mono)fosfato, metil éster de 5-(carboxihidroximetil)uridina-5'-(mono)fosfato, 5-metoxicarbonilmetiluridin-5'-(mono)fosfato, 5-metoxicarbonilmetil-2'-O-metiluridin-5'-(mono)fosfato, metoxi-carbonilmetil-2-tiouridin-5'-(mono)fosfato, 5-

aminometil-2-tiouridin-5'-(mono)-fosfato, 5-metilaminometiluridin-5'-(mono)fosfato, 5-metilaminometil-2-tiouridin-5'-(mono)fosfato, 5-metilaminometil-2-selenouridin-5'-(mono)fosfato, 5-carbamoil-metiluridin-5'-(mono)fosfato, 5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridin-5'-(mono)fosfato, carboximetilaminometiluridin-5'-(mono)fosfato, 5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridin-5'-(mono)fosfato, 5-carboximetilaminometil-2tiouridin-5'-(mono)fosfato, 5-carboximetiluridin-5'-(mono)fosfato, 5-metildihidrouridin-5'-(mono)fosfato, 5-taurinometiluridin-5'-(mono)fosfato, 5-taurinometil-2-tiouridin-5'-(mono)fosfato, 5-(isopentenilaminometil)uridin-5'-(mono)fosfato, 5-(isopentenilaminometil)-2-tiourididid-5'-(mono)fosfato, 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metiluridin-5'-(mono)-fosfato, 6-azacitidin-5'-(mono)fosfato, 7-desazaadenosin-5'-(mono)fosfato, 7-desazaguanosin-5'-(mono)fosfato, 8-azaadenosin-5'-(mono)fosfato, 8-azido-adenosin-5'-(mono)fosfato, pseudouridin-5'-(mono)fosfato, 2'-amino-2'-desoxi-citidin-(mono)fosfato, 2'-fluorotimidin-5'-(mono)fosfato, inosin-5'-(mono)fosfato, 2'-O-metilinosin-5'-(mono)fosfato.

Si se desea, el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmuoestimulador complejado de la presente invención puede contener sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, que preferentemente se introducen para lograr efectos funcionales. Estos diferentes tipos de modificaciones de nucleótidos pueden introducirse cuando el ARN, por ejemplo ARNm, se deriva de una secuencia WT. Así, se emplea una matriz de ADN para preparar ARN del ARN complejado según la presente invención mediante técnicas de mutagénesis dirigida a sitio bien conocidas (véase por ejemplo Maniatis y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición, Cold Spring Harbor, NY, 2001). En este proceso de preparación del ARN, se puede transcribir una molécula de ADN correspondiente *in vitro*. Esta matriz de ADN presenta un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, el cual es seguido por la secuencia de nucleótidos deseada para el ARN a preparar y una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. De acuerdo con la invención, la molécula de ADN que forma la matriz de un ARN de interés puede prepararse mediante proliferación fermentativa y aislamiento subsecuente como parte de un plásmido que puede ser replicado en bacterias. Los plásmidos que pueden mencionarse como adecuados para la presente invención son, por ejemplo, plásmidos pT7Ts (GenBank número de registro U26404; Lai y col., Development 1995, 121:2349 a 2360), pGEM® series, por ejemplo pGEM®-1 (GenBank número de registro X65300, de Promega) y pSP64 (GenBank número de registro X65327); véase también Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin and Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press. Boca Raton, FL, 2001.

La proporción molar o en masa de los componentes del complejo de ARN según la presente invención, esto es la relación en masa o molar entre el ARNm (ya sea de una sola o de doble hebra) y el uno o más oligopéptidos no está restringida, seleccionándose la adecuada para cada aplicación particular. Sin embargo, la relación en masa o molar entre el uno o más oligopéptidos y el ARN puede ser inferior a 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, o inferior a 1:20. Como alternativa, la relación en masa o molar del uno o más oligopéptidos y el ARN puede ser superior a 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1. Preferentemente, la relación en masa o molar entre el uno o más oligopéptidos y el ARN no puede inferior a 1:5 con respecto al contenido del uno o más oligopéptidos. En especial, la relación en masa o molar del uno o más oligopéptidos y el ARN es de 1:5 a 20:1, en particular de 1:3 a 15:1.

De acuerdo con una realización preferente particular, la relación en masa de los componentes del complejo de ARN según la presente invención, particularmente la relación en masa entre el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmuoestimulador complejado de la presente invención de ARN y el al menos un oligopéptido se sitúa en un rango de aproximadamente 1:100 a alrededor de 1:0,5, en especial tiene un valor de alrededor de 1:50 a aproximadamente 1:1, o incluso con mayor preferencia de alrededor de 1:90, aproximadamente 1:80, alrededor de 1:70, aproximadamente 1:60, alrededor de 1:50, aproximadamente 1:45, alrededor de 1:40, aproximadamente 1:35, alrededor de 1:30, aproximadamente 1:25, alrededor de 1:20, aproximadamente 1:15, alrededor de 1:10, aproximadamente 1:5, alrededor de 1:4, aproximadamente 1:3, alrededor de 1:2, aproximadamente 1:1 o incluso alrededor de 1:0,5 con respecto a la relación ARN:péptido en el complejo, pudiendo formarse cualquier intervalo combinando dos de los valores indicados específicamente. En particular, la relación en masa entre el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmuoestimulador complejado y el uno o más oligopéptidos puede estar en el intervalo de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:1.

De igual forma, la relación molar entre los componentes del complejo de ARN de acuerdo con la presente invención, en particular la relación molar entre el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmuoestimulador complejado y el uno o más oligopéptidos está, preferentemente, de acuerdo con una realización particularmente preferente, en un intervalo de alrededor de 1:20.000 a alrededor de 1:500 o incluso 1:250, en especial en un intervalo de alrededor de 1:10.000 a aproximadamente 1:1.000, o incluso tiene un valor de alrededor de 1:9.500, alrededor de 1:9.000, aproximadamente 1:8.500, alrededor de 1:8.000, aproximadamente 1:7.500, alrededor de 1:7.000, aproximadamente 1:6.500, alrededor de 1:6.000, aproximadamente 1:5.500, alrededor de 1:5.000, aproximadamente 1:4.500 alrededor de 1:4.000, aproximadamente 1:3.500, alrededor de 1:3.000, aproximadamente 1:2.500, alrededor de 1:2.000,

aproximadamente 1:1.500, alrededor de 1:1.000, aproximadamente 1:500, alrededor de 1:450, aproximadamente 1:400, alrededor de 1:350, aproximadamente 1:300 o alrededor de 1:250 con respecto a la relación ARN:péptido en el complejo, pudiendo formarse cualquier intervalo combinando dos de los valores indicados específicamente. Más preferiblemente, la relación molar entre el al menos un ARN (molécula) del
 5 ARN monohebra inmunoestimulador complejo y el uno o más oligopéptidos puede estar en un intervalo de alrededor de 1:10.000 a alrededor de 1:1.000. Para propósitos inmunoestimulatorios, la relación molar entre los componentes del complejo de ARN según la presente invención puede estar en un intervalo de aproximadamente 1:10.000 a alrededor de 1:100 o incluso en un intervalo de alrededor de 1:10.000 a aproximadamente 1:500.

10 En el contexto de la presente invención, la relación molar y la relación en masa dependen típicamente una de otra, estando cada una de estas relaciones influenciada por factores tales como la longitud del ARN o del péptido. Sin embargo, para propósitos de determinación, la relación en masa y la relación molar pueden calcularse para un tamaño del complejo promedio, donde una relación en masa de alrededor de 1:50-1:1 corresponde a aproximadamente una relación molar de alrededor de 1:10.000 a 1:1.000. Ejemplos de relaciones molares y en masa se muestran en los Ejemplos, los cuales pueden usarse para cálculos
 15 adicionales.

Además, la relación de los componentes del complejo de ARN según la presente invención, en particular la relación entre el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimulador complejo y el uno o más oligopéptidos también se puede calcular en base a la relación nitrógeno/fosfato (relación N/P) del
 20 complejo de ARN completo. En el contexto de la presente invención, preferentemente la relación N/P está en el intervalo de aproximadamente 0,2-50, en especial en un intervalo de alrededor de 0,5-50 y en particular de alrededor de 0,75-25 o 1-25 con respecto a la relación ARN:péptido en el complejo, con mayor preferencia en el intervalo de alrededor de 10-50 y con total preferencia en el intervalo de aproximadamente 25-50.

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición, preferentemente a una composición
 25 farmacéutica, que comprende un ARN monohebra inmunoestimulador complejo de acuerdo con la presente invención y opcionalmente un vehículo (farmacéuticamente) adecuado y/o sustancias y aditivos auxiliares adicionales. La composición (farmacéutica) empleada de acuerdo con la presente invención comprende típicamente una cantidad segura y efectiva de un ARN monohebra inmunoestimulador complejo de acuerdo con la invención. Tal como se usa aquí, una "cantidad segura y efectiva" se refiere a una
 30 cantidad de un ARN complejo de acuerdo con la presente invención que proporciona un efecto sobre células o tejidos *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo induce una expresión (*in vitro* o *in vivo*) significativa de una proteína codificada tal como se ha descrito, por ejemplo una proteína terapéuticamente activa, un anticuerpo o un antígeno, o cualquier otra proteína o péptido como los anteriormente descritos, provocando un cambio positivo de un estado a tratar (*in vivo*) en una célula, un tejido o un organismo, por ejemplo una enfermedad
 35 tumoral o cancerosa, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, autoinmune, enfermedades (mono)genéticas, etc. tales como las aquí descritas y/o para inducir o incrementar una respuesta inmune. Sin embargo, al mismo tiempo, la "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios graves, en particular en la terapia de enfermedades como las aquí mencionadas, esto es haciendo posible una relación razonable ventaja-riesgo. La determinación de estos
 40 límites se encuentra típicamente en la escala del juicio médico razonable. Por tanto, la concentración del ARN complejo de acuerdo con la invención en estas composiciones (farmacéuticas) puede variar, por ejemplo, sin limitarse a, en una escala amplia de por ejemplo 0,1 ng a 1.000 mg/ml o incluso más. Esta "cantidad segura y efectiva" de ARN complejo de acuerdo con la invención puede variar en relación con el estado particular a tratar y con la edad y el estado físico del paciente, la severidad del estado, la duración del
 45 tratamiento, la naturaleza de terapias concomitante, del vehículo (farmacéuticamente) adecuado particular usado y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del médico. La composición (farmacéutica) aquí descrita puede emplearse en humanos y también en medicina veterinaria.

La composición (farmacéutica) según la invención aquí descrita puede comprender opcionalmente un
 50 vehículo adecuado, preferentemente un vehículo farmacéuticamente adecuado. El término "vehículo adecuado" aquí empleado incluye preferentemente una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, o diluyentes o compuestos encapsulantes adecuados para su administración a una persona. El término "compatible" tal como se usa aquí significa que los constituyentes de la composición son susceptibles de mezcla junto con el ARN complejo según la invención y la sustancia auxiliar contenida opcionalmente en la composición, como tales y unos con otros, de forma que no se produzca interacción alguna que pueda
 55 reducir sustancialmente la efectividad (farmacéutica) de la composición bajo las condiciones normales de uso, por ejemplo que se reduzca la actividad (farmacéutica) de las proteínas codificadas o incluso se suprima o deteriore la expresión de las proteínas codificadas o que se inhiba el potencial inmunogénico del ARN complejo. El vehículo adecuado debe por supuesto tener una pureza suficientemente alta y una toxicidad suficientemente baja como para su administración a una persona a tratar.

- Los vehículos se seleccionan según la vía de administración, ya sea en forma sólida o líquida. Así, la selección de un vehículo (farmacéuticamente) adecuado tal como el descrito arriba se determina según sea la forma de administración de la composición (farmacéutica) según la invención. La composición (farmacéutica) según la invención puede administrarse, por ejemplo, de forma sistémica. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, intra o transdérmica, oral, parenteral, incluyendo subcutánea, intramuscular, entre otras, o inyecciones intravenosas, vías tópicas y/o intranasales. La cantidad adecuada de composición (farmacéutica) según la invención a administrar puede determinarse mediante experimentos de rutina en modelos de animales. Estos modelos incluyen, pero no están limitados a, modelos en conejo, oveja, ratón, rata, perro y primates no humanos.
- 5
- 10 Si se administra en forma líquida, por ejemplo mediante inyección, el vehículo puede seleccionarse de entre agua libre de pirógenos, solución salina isotónica y soluciones tamponadas, por ejemplo soluciones tampón fosfato. Las formas de dosis única preferentes para la inyección incluyen soluciones estériles de agua, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas, por ejemplo solución de lactato de Ringer. El pH de estas soluciones debe ajustarse a alrededor de 7,0 a aproximadamente 7,6, de preferencia alrededor de 7,4.
- 15 Preferentemente, la composición (farmacéutica) contiene el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la invención en agua. Alternativamente, la composición (farmacéutica) según la invención puede contener un tampón de inyección como vehículo para la preparación líquida, preferentemente que mejore la transfección y, si el ARN del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención codifica para una proteína también la traducción de la proteína codificada, en células, tejidos o en un organismo. La composición (farmacéutica) según la invención puede comprender, por ejemplo, un tampón pH para inyección acuoso o agua que contenga, con respecto a la composición (farmacéutica) total, si está en forma líquida, una sal de sodio, preferentemente al menos 50 mM de sal de sodio, una sal de calcio, preferentemente al menos 0,01 mM de sal de calcio y/o una sal de magnesio, y opcionalmente una sal de potasio, preferentemente al menos 3 mM de sal de potasio. De acuerdo con una realización preferente, las sales de sodio, de calcio y/o de magnesio y opcionalmente de potasio contenidas en este tampón de inyección están en forma de haluros, por ejemplo cloruros, yoduros o bromuros, o en forma de hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos o sulfatos. Ejemplos aquí son, para la sal de sodio, NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃ y/o Na₂SO₄, para la sal de potasio opcional KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃ y/o K₂SO₄, y para la sal de calcio y/o de magnesio CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂, MgCl₂, MgI₂, MgBr₂, MgCO₃, MgSO₄ y/o Mg(OH)₂. El tampón de inyección también puede contener aniones orgánicos de los cationes mencionados. En una realización particularmente preferente, este tampón de inyección contiene, como sales, cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂) y opcionalmente cloruro de potasio (KCl), pudiendo estar presentes otros aniones además de los cloruros.
- 20
- 25
- 30
- 35 Estas sales están presentes típicamente en el tampón de inyección opcionalmente empleado en la composición (farmacéutica) según la invención, con respecto a la composición (farmacéutica) total (si está en forma líquida), en una concentración de al menos 50 mM de cloruro de sodio (NaCl), al menos 3 mM de cloruro de potasio (KCl) y al menos 0,01 mM de cloruro de calcio y/o magnesio (CaCl₂). El tampón de inyección puede estar en forma tampón para inyección hipertónico, isotónico o hipotónico. En relación con la presente invención, en este contexto el tampón de inyección es hipertónico, isotónico o hipotónico en cada caso con respecto al medio de referencia particular, es decir, el tampón de inyección tiene bien un contenido de sal más alto, igual o inferior en comparación con el medio de referencia particular, donde preferentemente se emplean concentraciones de las sales mencionadas que no dañen las células por ósmosis o por otros efectos de la concentración. Medios de referencia aquí son, por ejemplo, líquidos presentes en los métodos *in vivo*, por ejemplo sangre, fluido linfático, fluidos citosólicos y otros fluidos del cuerpo, o líquidos o tampones empleados convencionalmente en los métodos *in vitro*. Estos líquidos y tampones son conocidos por el experto en la técnica.
- 40
- 45
- 50 El tampón de inyección opcionalmente presente en la composición (farmacéutica) según la invención también puede incluir componentes adicionales, por ejemplo azúcares (mono-, di-, tri- o polisacáridos), en particular glucosa o manitol. En una realización preferente, sin embargo, no están presentes azúcares en el tampón de inyección. También es preferible que el tampón de inyección no contenga ningún componente no cargado, por ejemplo, azúcares. El tampón de inyección contiene típicamente exclusivamente cationes metálicos, en particular del grupo consistente en metales alcalinos o alcalinotérreos, y aniones, en particular los descritos arriba. El pH del tampón de inyección, con respecto a la composición (farmacéutica) total, si está en forma líquida, preferentemente está entre 1 y 8,5, en especial entre 3 y 5, con especial preferencia entre 5,5 y 7,5, en particular entre 5,5 y 6,5. Si es adecuado, el tampón de inyección también puede contener un sistema tampón que fije el tampón de inyección a un pH determinado. Este puede ser, por ejemplo, un sistema tampón fosfato, HEPES o Na₂HPO₄/NaH₂PO₄. Sin embargo, de forma particularmente preferente, el tampón de inyección no contiene ninguno de los sistemas tampón mencionados arriba o ningún tampón en absoluto.
- 55
- 60 El tampón de inyección opcionalmente presente en la composición (farmacéutica) según la invención puede incluir, además de o como alternativa a los cationes monovalentes y divalentes descritos, cationes divalentes,

- en particular del grupo consistente en metales alcalinotérreos, tales como, por ejemplo, magnesio (Mg^{2+}), o también hierro (Fe^{2+}), y cationes monovalentes, en particular del grupo de los metales alcalinos, por ejemplo litio (Li^+). Preferentemente, estos cationes monovalentes están en forma de sales, por ejemplo de halurostales como cloruros, yoduros o bromuros, o en forma de hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos o sulfatos. Ejemplos a mencionar aquí son, para la sal de litio, $LiCl$, LiI , $LiBr$, Li_2CO_3 , $LiHCO_3$, Li_2SO_4 , para la sal de magnesio, $MgCl_2$, MgI_2 , $MgBr_2$, $MgCO_3$, $MgSO_4$ y $Mg(OH)_2$, y para la sal de hierro, $FeCl_2$, $FeBr_2$, FeF_2 , Fe_2O_3 , $FeCO_3$, $FeSO_4$, $Fe(OH)_2$. Todas las combinaciones de cationes di- y/o monovalentes, como los descritos están también incluidas. Estos tampones de inyección que contienen sólo cationes divalentes, sólo monovalentes y/o di y monovalentes también pueden usarse entonces en la composición (farmacéutica) según la invención. Estos tampones de inyección que contienen sólo un tipo de cationes di- o monovalentes, en especial por ejemplo sólo cationes Ca^{2+} , o sales de los mismos, por ejemplo $CaCl_2$, también pueden usarse. Las molaridades citadas para Ca^{2+} (como catión divalente) y Na^+ (como catión monovalente) (es decir típicamente concentraciones de al menos 50 mM para Na^+ , al menos 0,01 mM para Ca^{2+} y opcionalmente al menos 3 mM para K^+) en el tampón de inyección también se pueden tomar en consideración si se emplea otro catión di- o monovalente, en particular otros cationes del grupo de los metales alcalinotérreos y alcalinos, en lugar de algunos o todos los Ca^{2+} o, respectivamente, Na^+ en el tampón de inyección de acuerdo con la invención para la preparación de la solución de inyección. Todos los Ca^{2+} o Na^+ , como se ha mencionado, pueden de hecho reemplazarse en cada caso por otros cationes di- o respectivamente monovalentes en el tampón de inyección, por ejemplo también empleando una combinación de otros cationes divalentes (en lugar de Ca^{2+}) y/o una combinación de otros cationes monovalentes (en lugar de Na^+) (en particular una combinación de otros cationes divalentes del grupo de los metales alcalinotérreos o, respectivamente, de otros cationes monovalentes del grupo de los metales alcalinos), siendo preferente reemplazar cuando mucho algunos de los Ca^{2+} o Na^+ , es decir al menos un 20%, de preferencia al menos un 40%, en especial al menos un 60% y en particular al menos un 80% de las molaridades totales particulares de los cationes mono y divalentes en la inyección a ser ocupada por Ca^{2+} y, respectivamente, Na^+ . Sin embargo, es particularmente preferente que el tampón de inyección opcionalmente presente en la composición (farmacéutica) según la invención contenga exclusivamente Ca^{2+} como catión divalente y Na^+ como catión monovalente, es decir, con respecto a la composición (farmacéutica) total, el Ca^{2+} represente un 100% de la molaridad total de cationes divalentes, y el Na^+ represente un 100% de la molaridad total de cationes monovalentes. La solución acuosa del tampón de inyección puede contener, con respecto a la composición (farmacéutica) total, hasta un 30% molar de las sales contenidas en la solución, preferentemente hasta un 25% molar, en especial hasta un 20% molar, con especial preferencia hasta un 15% molar, muy preferiblemente hasta un 10% molar, todavía más preferiblemente hasta un 5% molar, igualmente muy preferiblemente hasta un 2% molar de sales insolubles o poco solubles. Las sales poco solubles en el contexto de la presente invención son aquellas cuyo producto de solubilidad es $< 10^{-4}$. Las sales fácilmente solubles son aquellas cuyo producto de solubilidad es $> 10^{-4}$. Preferentemente, el tampón de inyección opcionalmente presente en la composición (farmacéutica) según la invención es 50 mM a 800 mM, de preferencia de 60 mM a 500 mM, muy preferiblemente de 20 mM a 250 mM, de manera particularmente preferible 60 mM a 110 mM en cloruro de sodio ($NaCl$), de 0,01 mM a 100 mM, de preferencia de 0,5 mM a 80 mM, muy preferiblemente de 1,5 mM a 40 mM en cloruro de calcio ($CaCl_2$) y opcionalmente de 3 mM a 500 mM, de preferencia de 4 mM a 300 mM, muy preferiblemente de 5 mM a 200 mM en cloruro de potasio (KCl). Los aniones orgánicos también pueden estar presentes como aniones adicionales además de los aniones inorgánicos mencionados arriba, por ejemplo haluros, sulfatos o carbonatos. Entre éstos se pueden mencionar succinato, lactobionato, lactato, malato, maleato, etc., los cuales también pueden estar presentes en combinación.
- Un tampón de inyección opcionalmente presente en la composición (farmacéutica) según la invención contiene preferentemente lactato. Si contiene un anión orgánico, el tampón de inyección contiene en particular exclusivamente lactato como anión orgánico. El lactato en el contexto de esta invención puede ser cualquier lactato deseado, por ejemplo L-lactato y D-lactato. Las sales lactato en relación con la presente invención son típicamente lactato de sodio y/o lactato de calcio, especialmente si el tampón de inyección contiene sólo Na^+ como catión monovalente y Ca^{2+} como catión divalente. El tampón de inyección opcionalmente empleado en la composición (farmacéutica) según la invención y como el descrito preferentemente contiene, con respecto a la composición farmacéutica total, de 15 mM a 500 mM, muy preferiblemente de 15 mM a 200 mM y de manera particularmente preferente de 15 mM a 100 mM de lactato.
- Si se formula en forma no líquida (por ejemplo, en forma sólida o semisólida), la composición farmacéutica de la invención puede contener compuestos que pueden servir como vehículos adecuados o constituyentes de los mismos, por ejemplo azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones como almidón de maíz o almidón de patata; celulosa y sus derivados, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa; tragacanto pulverizado; malta; gelatina; sebo; lubricantes sólidos como ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales como aceite de nuez moscada, aceite de semilla de algodón, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles, por ejemplo polipropilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico. Sin embargo, los compuestos anteriores también pueden usarse para proporcionar composiciones líquidas.

Otros componentes que pueden incluirse en la composición farmacéutica de la invención son, por ejemplo, emulsionantes, por ejemplo Tween[®]; agentes humectantes como laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes; portadores de medicamentos; agentes formadores de tabletas; estabilizantes; antioxidantes; conservantes.

- 5 Otros vehículos adecuados para inyección incluyen hidrogeles, dispositivos para la liberación controlada o retrasada, ácido poliláctico y matrices de colágeno. Vehículos adecuados que pueden usarse aquí incluyen aquellos adecuados para lociones, cremas, geles y similares. Si el compuesto se administra oralmente, las tabletas, cápsulas y similares son las formas de dosis única preferentes. Los vehículos adecuados para preparar formas de dosis única que pueden usarse para la administración oral son bien conocidos en la técnica. Su selección dependerá de consideraciones secundarias, tales como el sabor, el coste y la estabilidad de almacenamiento, los cuales no son críticos para los propósitos de la presente invención y pueden implementarse sin dificultades por el experto en la técnica.

- 10 También se describe aquí un método de transfección (*in vitro* o *in vivo*) para transfectar células o tejidos con el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención descrito. Preferentemente, el método de transfección (*in vitro* o *in vivo*) de la invención comprende las siguientes etapas:

- 15 a) Opcionalmente preparar y/o proporcionar un ARN monohebra inmunoestimulador complejo de acuerdo con la presente invención, que comprenda al menos un ARN complejo con uno o más oligopéptidos de fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Xaa)_x;
- 20 b) Transfectar una célula, un tejido (*vivo*) o un organismo (*in vitro* o *in vivo*) usando el ARN monohebra inmunoestimulador complejo preparado y/o proporcionado en la etapa a).

El preparar y/o proporcionar un ARN monohebra inmunoestimulador complejo como el definido en la etapa a) del método de transfección *in vitro* o *in vivo* de la invención para transfectar células o tejidos con el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la invención se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. Un ARN monohebra inmunoestimulador complejo como se usa aquí comprende al menos un ARN complejo con uno o más oligopéptidos de fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Xaa)_x. Así, preparar y/o proporcionar un ARN monohebra inmunoestimulador complejo como el definido en la etapa a) puede comprender la preparación y/o provisión del al menos un ARN y del uno o más oligopéptidos de fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Xaa)_x.

30 Los métodos para la preparación de secuencias peptídicas cortas tales como (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Xaa)_x son bien conocidos en la técnica, pudiendo emplearse por ejemplo síntesis en fase sólida como síntesis en fase sólida Fmoc u otros métodos adecuados (véase, por ejemplo, R. Martin, Ed., Protein Synthesis: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 77 Humana Press (1998)).

Preparar y/o proporcionar el al menos un ARN (molécula) como componente del complejo de la invención definido puede comprender, de acuerdo con la etapa a), una primera subetapa a1), en particular la provisión y/o preparación de un patrón de ácido nucleico que comprende típicamente una secuencia correspondiente al ARN deseado. La secuencia del patrón de ácido nucleico puede ser cualquier ácido nucleico, por ejemplo un ADN mono o bi catenar, ADNc, ADN genómico o fragmentos de los mismos, etc., que puede codificar para una proteína terapéuticamente activa, un anticuerpo o un antígeno, o cualquier otra proteína o péptido como el descrito. Típicamente, pueden emplearse secuencias de ADN, por ejemplo plásmidos de ADN, preferentemente en forma linealizada, para este propósito. De preferencia, la secuencia del patrón de ácido nucleico puede ser un vector (de expresión), en especial un vector (de expresión) con un sitio de unión a ARN polimerasa. Cualquier vector (de expresión) conocido en la técnica anterior, por ejemplo, vectores (de expresión) comerciales (véase arriba), puede usarse para esto. Vectores (de expresión) son, por ejemplo, aquellos que tienen un sitio de unión SP6 o T7 o T3 aguas arriba y/o aguas abajo del sitio de clonación. El vector puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifique para una proteína terapéuticamente activa, un anticuerpo o un antígeno, o cualquier otra proteína o péptido como el descrito arriba, que típicamente se clona en el vector (de expresión), por ejemplo mediante un sitio de clonación múltiple del vector usado.

50 Antes de la transcripción, normalmente el vector (de expresión) se segmenta con enzimas de restricción en el sitio donde se encontrará el extremo 3' futuro del ARN, usando enzimas de restricción adecuadas, y el fragmento se purifica. Esto impide que el ARN transcrito contenga secuencias del vector, pudiendo obtenerse un transcrito de ARN de longitud definida. En este contexto, preferentemente no se usa ninguna enzima de restricción que genere extremos salientes (tales como, por ejemplo, AatII, ApaI, BanII, BglI, Bsp1286, BsfXI, CfoI, HaeII, HgiAI, HhaI, KpnI, PstI, PvuII, SacI, SacII, SfiI, SphI, etc.). No obstante, si se emplean estas enzimas de restricción, el extremo 3' saliente podría bloquearse, por ejemplo con Klenow o ADN-polimerasa T4.

Como alternativa a lo anterior, el patrón de ácido nucleico para preparar y/o proporcionar el al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimuladorcomplejado de la invención se puede preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Preferentemente, el patrón de ácido nucleico y uno de los cebadores usados en ésta contiene típicamente la secuencia de un sitio de unión a ARN-polimerasa. Además, el extremo 5' del cebador usado preferentemente contiene una extensión de aproximadamente 10-50 nucleótidos adicionales, en especial de 15 a 30 nucleótidos adicionales y en particular alrededor de 20 nucleótidos.

Antes de la transcripción *in vitro*, el ácido nucleico, por ejemplo el patrón de ADN o el ADNc, usado como plantilla de transcripción, normalmente se purifica y se libera de RNAsa con el fin de asegurar un alto rendimiento. En este contexto, la purificación de este patrón puede llevarse a cabo con la ayuda de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo con un gradiente de cloruro de cesio, métodos de intercambio iónico o purificación por electroforesis en gel de agarosa.

Después de la preparación y/o provisión del patrón de ácido nucleico, se puede llevar a cabo una reacción de transcripción *in vitro* de acuerdo con una segunda subetapa a2) para preparar el al menos un ARN (molécula) deseado del ARN monohebra inmunoestimuladorcomplejado de la invención usando el patrón de ácido nucleico preparado en la primera subetapa a1) definida.

La reacción de transcripción *in vitro* según una segunda subetapa a2) se lleva a cabo como en una reacción de transcripción *in vitro* típica. El medio de transcripción *in vitro* adecuado comprende inicialmente la plantilla de ácido nucleico descrita, por ejemplo alrededor de 0,1-10 µg, preferentemente aproximadamente 1-5 µg, en especial 2,5 µg y en particular alrededor de 1 µg de este ácido nucleico. El medio de transcripción *in vitro* adecuado opcionalmente comprende además un agente reductor, por ejemplo DTT, en especial alrededor de 1-20 µl de DTT 50 mM, en particular alrededor de 5 µl de DTT 50 mM. El medio de transcripción *in vitro* comprende típicamente nucleótidos, por ejemplo una mezcla de nucleótidos; en el caso de la presente invención comprende una mezcla de nucleótidos A, G, C o U, típicamente alrededor de 0,1-10 mM por nucleótido, preferentemente 0,1 a 1 mM por nucleótido, en particular aproximadamente 4 mM en total. El medio de transcripción *in vitro* adecuado comprende igualmente una ARN-polimerasa, por ejemplo T7 ARN-polimerasa (por ejemplo T7-Opti mRNA kit, CureVac, Tübingen, Alemania), T3 ARN-polimerasa o SP6, típicamente alrededor de 10 a 500 U, de preferencia aproximadamente 25 a 250 U, en especial alrededor de 50 a 150 U y en particular alrededor de 100 U de ARN-polimerasa. Además, el medio de transcripción *in vitro* se mantiene preferiblemente libre de RNAsa para así evitar la degradación del transcrito del al menos un ARN (molécula) del ARN complejo de la invención. Por ello, un medio de transcripción *in vitro* adecuado comprende opcionalmente además un inhibidor de RNAsa.

La patrón de ácido nucleico puede después incubarse en el medio de transcripción *in vitro* y transcribirse al al menos un ARN (molécula) del ARN complejo de la invención, el cual puede codificar para una proteína terapéuticamente activa, un anticuerpo o un antígeno, o cualquier otra proteína o péptido como el descrito anteriormente. Tiempos de incubación típicos son de alrededor de 30 a 240 minutos, preferentemente alrededor de 40 a 120 minutos y en especial de aproximadamente 90 minutos. Temperaturas de incubación típicas son alrededor de 30-45°C, preferiblemente 37-42°C. La temperatura de incubación depende de la ARN-polimerasa usada; por ejemplo, para T7 ARN-polimerasa es de aproximadamente 37°C. El al menos un ARN (molécula) del ARN complejo de la invención obtenido mediante transcripción preferentemente es ARNm. Los rendimientos obtenidos en la transcripción *in vitro*, para las cantidades iniciales indicadas empleadas, típicamente se sitúan en aproximadamente 30 µg de ARN por µg de ADN patrón usado. En el contexto de la presente invención, los rendimientos obtenidos en la transcripción *in vitro* pueden incrementarse mediante escalada ascendente lineal. Para ello, las cantidades de partida indicadas empleadas se incrementan preferentemente de acuerdo con los rendimientos requeridos, por ejemplo en un factor de multiplicación 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, etc.

Después de la incubación, opcionalmente se puede realizar una purificación del transcrito del al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimuladorcomplejado de la invención. Para ello puede emplearse cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo métodos de purificación cromatográficos como cromatografía de afinidad, filtración en gel, etc. Mediante la purificación, los nucleótidos y el ADN patrón no incorporado, es decir en exceso, se eliminan del medio de transcripción *in vitro*, obteniéndose un ARN limpio. Por ejemplo, después de la transcripción, la mezcla de reacción con el ARN transcrito puede digerirse con DNAsa para así eliminar el patrón de ADN remanente en la mezcla de reacción. El al menos un ARN (molécula) del ARN monohebra inmunoestimuladorcomplejado de la presente invención transcrito puede ser subsecuente o alternativamente precipitado con LiCl. La purificación del ARN transcrito puede tener lugar por IP RP-HPLC. Esto hace posible en particular la separación efectiva de los fragmentos más largos y más cortos unos de otros.

Preferentemente, en este contexto, la purificación del ARN puede realizarse por métodos de purificación de ARN a escala preparativa, que se distingue además porque el ARN se purifica por HPLC usando una fase

inversa porosa como fase estacionaria (mensajero PURE). Por ejemplo, para purificarse puede emplear una fase inversa como fase secundaria para la purificación HPLC. Para la cromatografía de fase inversa, habitualmente un compuesto no polar sirve como fase estacionaria y un disolvente polar, tal como una mezcla acuosa, habitualmente en forma de tampón, de acetonitrilo y/o metanol, sirve como fase móvil para la elución. Preferentemente, la fase inversa porosa tiene un tamaño de partícula de $8,0 \pm 2 \mu\text{m}$, en especial de $\pm 1 \mu\text{m}$, en particular $\pm 0,5 \mu\text{m}$. El material de fase inversa puede estar en forma de esferas. De forma particularmente ventajosa, la purificación se puede llevar a cabo con una fase inversa porosa con este tamaño de partícula, opcionalmente en forma de esferas, con lo que se obtienen resultados de separación particularmente buenos. Preferentemente la fase inversa empleada es porosa, ya que con fases inversas estacionarias no porosas, tales como las descritas por ejemplo por Azarani A. y Hecker K.H., se acumulan presiones demasiado altas, por lo que la purificación preparativa del ARN es sólo difícilmente posible, si se logra. Preferentemente, la fase inversa tiene un tamaño de poro de 200 a 5.000, en particular un tamaño de poro de 300 a 4.000. Tamaños de poro particularmente preferentes para las fases inversas son 200-400, 800-1.200 y 3.500-4.500. Con una fase inversa que tiene estos tamaños de poro, se logran resultados particularmente buenos con respecto a la purificación del ARN transcrito. El material preferente para la fase inversa es poliestireno-divinilbenceno, en particular poliestireno-divinilbenceno no alquilado. Las fases estacionarias de poliestireno-divinilbenceno se conocen per se. Para la purificación, el poliestireno-divinilbenceno que son conocidas y se emplean ya en métodos HPLC, pudiendo obtenerse comercialmente. De forma particularmente preferente se emplea un poliestireno-divinilbenceno poroso no alquilado, en particular con un tamaño de partícula de $8,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ y un tamaño de poro de 250-300, 900-1.100 ó 3.500-4.500 para la purificación. Las ventajas descritas pueden lograrse de una manera particularmente favorable con este material para las fases inversas.

La purificación por HPLC se puede llevar a cabo por el método de pares iónicos, un ión de carga positiva se añade a la fase móvil como contraión para el ARN cargado negativamente. Así, se forma un par iónico con carácter lipófilo, que se ralentiza por la fase estacionaria no polar del sistema de fase inversa. En la práctica, las condiciones precisas para el método de pares de iones deben obtenerse empíricamente para cada problema de separación específico. El tamaño del contraión, su concentración y el pH de la solución contribuyen en gran medida al resultado de la separación. De forma ventajosa, a la fase móvil se añaden sales de alquilamonio, tales como acetato de trietilamonio y/o compuestos de tetraalquilamonio, tales como tetrabutilamonio. Preferentemente, se añade acetato de trietilamonio 0,1M y el pH se ajusta a aproximadamente 7. La selección de la fase móvil depende de la naturaleza de la separación deseada. Esto significa que la fase móvil para una separación específica, tal como se puede conocer por ejemplo de la técnica anterior, puede no transferirse fácilmente a otro problema de separación con el éxito adecuado. Deben determinarse las condiciones de elución ideales, en particular la fase móvil usada, para cada problema de separación mediante experimentos empíricos. Una mezcla de un disolvente acuoso y uno orgánico puede emplearse como fase móvil para eluir el ARN en el método HPLC. En este contexto, es favorable que se emplee como disolvente acuoso un tampón tenga en particular un pH de aproximadamente 7, por ejemplo 6,5-7,5, por ejemplo 7,0; preferentemente, se usa un tampón de acetato de trietilamonio, de manera particularmente preferible un tampón de triacetato de trietilamonio 0,1M que, como se describió arriba, actúa también como contraión para el ARN en el método de pares iónicos. El disolvente orgánico empleado en la fase móvil puede ser acetonitrilo, metanol o una mezcla de éstos, en particular es acetonitrilo. La purificación del ARN por un método HPLC tal como el descrito se lleva a cabo, de manera particularmente favorable, con estos disolventes orgánicos. De forma particularmente preferente, la fase móvil es una mezcla de acetato de trietilamonio 0,1M, pH 7, y acetonitrilo. Es particularmente favorable si la fase móvil contiene un 5,0% en volumen a un 20,0% en volumen de disolvente orgánico con respecto a la fase móvil, siendo el resto, para constituir el 100% en volumen, el disolvente acuoso. Es muy particularmente favorable que el método de acuerdo con la invención contenga, en la fase móvil, un 9,5% en volumen a un 14,5% en volumen de disolvente orgánico con respecto a la fase móvil, siendo el resto, hasta el 100% en volumen, el disolvente acuoso. Así, la elución del ARN puede llevarse a cabo de manera isocrática o por separación por gradiente. En caso de una separación isocrática, la elución del ARN se lleva a cabo con un solo agente de elución o con una mezcla de varios agentes de elución que permanece constante, siendo posible entonces que los disolventes descritos en detalle arriba se empleen como agente de elución.

Alternativamente, el al menos un ARN (molécula) de acuerdo con la etapa a) del método de transfección se puede preparar por síntesis química. Aquí pueden emplearse diversos métodos conocidos en la técnica. El método de fosforamidita se usa ampliamente para sintetizar químicamente oligonucleótidos, por ejemplo fragmentos de ARN (Nucleic Acid Research, 17:7059-7071, 1989). En general, este método de fosforamidita hace uso de una reacción de condensación entre una fosforamidita nucleósido y un nucleósido como reacción clave usando tetrazol como acelerador. Debido a que esta reacción normalmente es competitiva, tanto en el grupo hidroxilo en una parte azúcar como en el grupo amino en una parte base nucleósido, se requiere la reacción selectiva sobre sólo el grupo hidroxilo en una parte de azúcar para sintetizar un nucleótido deseado. En consecuencia, se previene la reacción secundaria del grupo amino normalmente protegiendo el grupo amino. El grupo protector se elimina cuando termina la síntesis. Información más específica acerca de cómo sintetizar moléculas de ARN puede recuperarse de Arnold y col., "Chloridite and

Amidite Automated Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Using Amidine Protected Nucleosides," en "7th Symposium Chem. Nucleic Acid Components," Nucleic Acids Symposium Series, 18, 181 -184 (30 de agosto, 1987); Chemical Abstracts, 108(19), pág. 692, Abstr. No. 167875z (9 de mayo, 1988); Hayakawa y col., "Benzimidazolium Triflate as an Efficient Promoter for Nucleotide Synthesis via the Phosphoramidite Method," J. Organic Chemistry, 61 (23), 7996-7997 (15 de noviembre, 1996); Pirrung y col., "Proofing of Photolithographic DNA Synthesis with 3',5'-Dimethoxybenzoinyloxy-carbonyl-Protected Deoxynucleoside Phosphoramidites," J. Organic Chemistry, 63(2), 241 -246 (23 de enero, 1998); Effenberger y col., Trifluoromethanesulfonic Imidazolide- A Convenient Reagent for Introducing the Triflate Group, Tetrahedron Letters, 1980 (45), 3947-3948 (Sep. 1980).

10 La preparación del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de acuerdo con la etapa a) de la presente invención ocurre típicamente de acuerdo con la subetapa a3) añadiendo una cantidad específica del al menos un ARN (molécula) a una cantidad específica del uno o más oligopéptidos de fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$. Así, se contemplan típicamente relaciones molares o en masatales como las indicadas anteriormente para el al menos un ARN (molécula) y el uno o más oligopéptidos de la fórmula empírica aquí definida $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$. La formación de complejos ocurre típicamente después de mezclar ambos componentes. De esta manera, el componente peptídico se añade típicamente al componente de ARN, en algunos casos a la inversa.

Esta etapa de preparación de acuerdo con la etapa de método a), sin embargo, es opcional y podría no tener lugar si el ARN monohebra inmunoestimulador complejo según la presente invención ya está disponible. En consecuencia, las subetapas a1), a2) y a3) definidas arriba también son opcionales y no tienen que llevarse a cabo si el ARN usado para el ARN monohebra inmunoestimulador complejo ya está disponible. De forma similar, el uno o más oligopéptidos de fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ pueden ser usados directamente y no tienen que prepararse, si ya están disponibles, por ejemplo de un proveedor.

De acuerdo con la etapa b) del método para transfectar células o tejidos *in vitro* o *in vivo*, una célula o tejido puede transfectarse usando el ARN monohebra inmunoestimulador complejo proporcionado y/o preparado de acuerdo con la etapa a). En general, la transfección de las células o tejidos *in vitro* o *in vivo* se lleva a cabo añadiendo el ARN monohebra inmunoestimulador complejo proporcionado y/o preparado de acuerdo con la etapa a) a las células o tejidos. Preferentemente, el ARN monohebra inmunoestimulador complejo entra después en las células por mecanismos celulares, por ejemplo por endocitosis. La adición del ARN monohebra inmunoestimulador complejo de esta manera a las células o tejidos puede ocurrir, de acuerdo con la invención, sin la adición de ningún componente adicional debido al potencial de transfección del ARN (molécula) monohebra inmunoestimulador complejo de la invención. Como alternativa, la adición del ARN monohebra inmunoestimulador complejo proporcionado y/o preparado de acuerdo con la etapa a) a las células o tejidos puede ocurrir en forma de composición, por ejemplo como un componente de una solución acuosa, de preferencia como una composición farmacéutica tal como la definida arriba, opcionalmente conteniendo componentes adicionales para incrementar la actividad de transfección.

Las células (o células huésped) en este contexto para la transfección del ARN monohebra inmunoestimulador complejo (proporcionado y/o preparado de acuerdo con la etapa a)) *in vitro* incluyen cualquier célula, preferentemente, sin limitarse a, células que serán transfectadas mediante cualquier molécula de ARN (como la definida arriba) usando el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la invención. En particular, la transfección de ARN puede permitir la expresión de una proteína codificada por el ARN del ARN complejo de la invención en la célula o puede permitir que el ARN (por ejemplo, ARNsi, ARN anti-sentido) del complejo de la invención atenúe o suprima la expresión de un gen celular. Las células en este contexto incluyen preferentemente células eucarióticas cultivadas (por ejemplo células de levadura, vegetales, animales y humanas) o células procarióticas (por ejemplo células bacterianas, etc.) o inducen una respuesta inmune. Preferentemente seleccionan células de organismos multicelulares si son necesarias modificaciones post-traduccionales, por ejemplo glicosilación de la proteína codificada (N- y/u O-acopladas). Por el contrario, con células procarióticas, estas células eucarióticas (superiores) hacen posibles modificaciones post-traduccionales de la proteína sintetizada. El experto en la técnica conoce gran número de estas células eucarióticas superiores o líneas celulares, por ejemplo líneas de células 293T (línea celular renal embrionaria), HeLa (células de carcinoma de cérvix humano), CHO (células de ovario de hámster chino) y otras líneas celulares, incluyendo las células y líneas celulares desarrolladas para propósitos de laboratorio, tales como, por ejemplo, células bTERT-MSC, HEK293, Sf9 o COS. Las células eucarióticas adecuadas incluyen además células o líneas celulares deterioradas por enfermedades o infecciones, por ejemplo células cancerosas, en particular células cancerosas de cualquiera de los tipos de cánceres mencionados en la presente descripción, células deterioradas por VIH y/o células del sistema inmunológico o del sistema nervioso central (SNC). Las células adecuadas pueden igualmente derivarse de microorganismos eucarióticos tales como levaduras, por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae* (Stinchcomb y col., Nature, 282:39, (1997)), *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia* y hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, etc. Las células adecuadas igualmente incluyen células procarióticas, por ejemplo células bacterianas como *Escherichia coli* o de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*,

Pseudomonas, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, preferentemente *E. coli*, etc. Son particularmente preferentes células humanas o células animales, por ejemplo de los animales aquí mencionados, como células eucarióticas. Más aún, para la transfección *ex vivo* del ARN complejado de acuerdo con la presente invención pueden emplearse células presentadoras de antígenos (APCs).
 5 Son particularmente preferentes las células dendríticas, las cuales se pueden usar para la transfección *ex vivo* del ARN monohebra inmunostimulador complejado de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, células hemáticas y/o células hematopoyéticas, o poblaciones parciales de las mismas, es decir cualquier tipo de células que pueden aislarse de sangre (completa) y/o que pueden derivarse de líneas celulares cultivadas derivadas de éstas, pueden ser
 10 transfectadas con un ARN monohebra inmunostimulador complejado como el aquí definido usando el método de transfección anterior, por ejemplo glóbulos rojos (eritrocitos), granulocitos, células mononucleares (células mononucleares de sangre periférica, PBMCs) y/o plaquetas sanguíneas (trombocitos), APSs, DCs, etc. Preferentemente, se usan células hemáticas, especialmente poblaciones parciales de las mismas, las cuales se caracterizan en particular por contener una proporción pequeña de APCs específicas bien
 15 diferenciadas tales como DCs. Las células transfectadas preferentemente pueden contener menos de un 5%, en especial no más de un 2%, de DCs cuando se usan para transfección. En el contexto de la presente invención, como "células hemáticas" se entiende preferentemente una mezcla o una población sustancialmente enriquecida o pura de glóbulos rojos, granulocitos, células mononucleares (PBMCs) y/o plaquetas hemáticas de sangre completa, suero sanguíneo u otra fuente, por ejemplo del bazo o de nódulos linfáticos, donde están
 20 presente sólo una pequeña proporción de APCs profesionales. Las células hemáticas tal como se usan de acuerdo con la presente invención son preferentemente células hemáticas frescas, es decir, el periodo entre la toma de las células hemáticas (especialmente de sangre) y la transfección es corto, por ejemplo inferior a 12 horas, en especial inferior a 6 horas, en particular inferior a 2 horas y de forma particularmente preferente inferior a 1 hora. Además, las células hemáticas a transfectar usando el método anterior para transfectar el
 25 ARN monohebra inmunostimulador complejado de la presente invención proceden del paciente real a ser tratado con la composición farmacéutica de la presente invención. El uso de células hemáticas, células hematopoyéticas y poblaciones parciales de las mismas como las definidas arriba se basa en el sorprendente descubrimiento de que, para vacunar un paciente a tratar contra ciertos antígenos codificados por un ARNm como el aquí definido, no es necesario diferenciar las células hemáticas, por ejemplo PBMCs, obtenidas por
 30 ejemplo de la sangre de un individuo, especialmente del paciente real a ser tratado, mediante laboriosas tardías y costosas técnicas de cultivo de células en una población celular con una alta proporción de células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales, especialmente de células dendríticas (DCs), pero que es suficiente para una estimulación inmune exitosa para transfectar células hemáticas directamente con el
 35 ARNm que codifica para uno o más antígenos, obteniendo así una composición farmacéutica que lleva a cabo una estimulación inmune adecuada, por ejemplo en el paciente real donante de las células hemáticas, especialmente de las poblaciones parciales mencionadas arriba de las mismas, preferentemente donde la estimulación inmune se dirige contra uno o más antígenos tumorales o uno o más antígenos de un germen o agente patógeno. La transfección de un ARN monohebra inmunostimulador complejado como el aquí
 40 definido en células hemáticas o derivadas (ya sea aisladas del mismo o de líneas de células cultivadas respectivas) no está limitada a antígenos y, por supuesto, se refiere a cualquier ARN como el aquí definido usado para un ARN monohebra inmunostimulador complejado, por ejemplo cualquier ARN inmunostimulador adicional como el definido, cualquier ARN codificador, etc.

Aunque existe la necesidad de transfectar células cultivadas *in vitro* (por ejemplo células humanas o animales) o de transfectar células explantadas (por ejemplo, células humanas o animales) *in vitro* (antes de
 45 su retransplante en el organismo huésped), también se considera la administración directa del ARN complejado de la invención a pacientes para la transfección *in vivo*. En consecuencia, la transfección del ARN monohebra inmunostimulador complejado (provisto y/o preparado de acuerdo con la etapa a)) también puede ocurrir *in vivo* de acuerdo con la etapa b), es decir se puede administrar a tejidos vivos y/u organismos. Por tanto, el ARN monohebra inmunostimulador complejado proporcionado en la etapa a) del método de
 50 transfección puede administrarse a un tejido vivo o a un organismo, ya sea como tal o por ejemplo como componente de una composición (líquida), en particular una composición acuosa, por ejemplo una composición farmacéutica como la definida arriba. En este contexto, un organismo (o un ser) significa típicamente un mamífero seleccionado de entre, sin limitarse a, el grupo que comprende humanos o animales, incluyendo por ejemplo cerdo, cabra, ganado, vaca, perro, gato, mono, burro, simio o roedores,
 55 incluyendo ratones, hámster y conejo. Además, preferentemente los tejidos vivos mencionados se derivan de estos organismos. La administración del ARN monohebra inmunostimulador complejado a estos tejidos vivos y/u organismos puede realizarse vía cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo sistémica, incluyendo por ejemplo las vías intra- o transdérmicas, orales, parenterales, incluyendo inyecciones subcutáneas, intramusculares o intravenosas, tópicas y/o intranasales como las definidas arriba.

Además, el método para la transfección, que aplicarse *in vitro* o *ex vivo*, también puede adecuarse para su uso *in vivo*, por ejemplo como método de tratamiento de diversas enfermedades como las aquí mencionadas. En una forma preferente de un método de tratamiento de acuerdo con la invención se puede incluir una etapa

adicional, que puede incluir la administración de otra sustancia farmacéuticamente efectiva, por ejemplo de un anticuerpo, un antígeno (en particular un patógeno o un antígeno tumoral como el aquí descrito) o la administración de al menos una citoquina. Ambos pueden administrarse independientemente del ARN monohebra inmunoestimulador complejado como ADN o ARN que codifica para, por ejemplo, la citoquina o el antígeno o la citoquina o el antígeno pueden administrarse como tales. El método de tratamiento también comprende la administración de un adyuvante adicional (como los aquí descritos) capaz de activar el sistema inmunológico.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, el ARN monohebra inmunoestimulador complejado tal como se ha definido, que comprende al menos un ARN complejado con uno o más oligopéptidos, donde el oligopéptido tiene una longitud de 8 a 15 aminoácidos y la fórmula empírica $(Arg)_l;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, se puede usar para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades específicas tales como las aquí mencionadas. El tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades específicas dependen típicamente de la selección de una proteína adecuada codificada por el ARN del ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la presente invención. En este contexto, el tratamiento puede llevarse a cabo administrando el ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la presente invención (que codifique para esa proteína) como tal o administrando la composición (farmacéutica) de acuerdo con la presente invención tal como se ha definido anteriormente.

Sin limitarse a éstas, las enfermedades o estados incluyen en este contexto, por ejemplo, cáncer o enfermedades tumorales seleccionadas de melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas renales, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores prostáticos, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer hepático, carcinomas mamarios (= cáncer de mama), cáncer uterino, cáncer cervical, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, tumores inducidos por virus diversos, por ejemplo carcinomas inducidos por virus del papiloma (por ejemplo, carcinoma de cérvix = cáncer cervical), adenocarcinomas, tumores inducidos por el virus herpes (por ejemplo, linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV), tumores inducidos por hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neurinoma acústico, carcinomas de pulmón (=cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas pulmonares microcíticos, cáncer de garganta, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma de recto, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebrales, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer testicular, carcinoma de tiroides, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberg, tumor pituitario, micosis fungoide, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer de riñón, timoma, carcinoma de cuerpo, cáncer de hueso, linfomas no Hodgkin, cáncer uretral, síndrome CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer vulvar, cáncer intestinal, carcinoma de colon, carcinoma esofágico (= cáncer esofágico), condiciones verrugosas, tumores de intestino delgado, craneofaringeomas, carcinoma ovárico, tumores de tejidos blandos, cáncer ovárico (= carcinoma ovárico), carcinoma pancreático (= cáncer pancreático), carcinoma de endometrio, metástasis hepáticas, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumor de tapa, cáncer prostático (= tumores de próstata), etc.

Las enfermedades o estados también pueden incluir en este contexto enfermedades infecciosas seleccionadas entre, por ejemplo, enfermedades infecciosas virales, seleccionadas de, sin ser limitarse a, SARS, fiebre amarilla, Lyme, ántrax, SIDA, condiloma acuminata, molusco contagioso, fiebre del dengue, fiebre de tres días, virus Ébola, resfriados, meningoencefalitis de verano tempranas (FSME), gripe, herpes, hepatitis, herpes simple tipo I, herpes simple tipo II, herpes zóster, influenza, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, virus de Marburg, sarampión, fiebre aftosa, mononucleosis, paperas, infección por virus de Norwalk, fiebre glandular de Pfeiffer, viruela, polio (poliomelitis), pseudocroup, eritema infeccioso, rabia, verrugas, fiebre del Nilo Occidental, viruela aviaria, citomegalovirus (CMV), enfermedades infecciosas bacterianas, tales como aborto (inflamación de próstata), ántrax, apendicitis (inflamación del ciego), borreliosis, botulismo, Campylobacter, Chlamydia trachomatis (inflamación de la uretra, conjuntiva), cólera, difteria, donavonosis, epiglotitis, tífus ocasionado por piojos, fiebre tifoidea, gangrena gaseosa, gonorrea, plaga de la liebre, Helicobacter pylori, tos ferina, bubón climático, osteomielitis, enfermedad de los legionarios, lepra, listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, ántrax, inflamación del oído medio, Mycoplasma hominis, sepsis neonatal (corioamnionitis), noma, fiebre paratifoidea, plaga, síndrome de Reiter, fiebre moteada de las montañas rocallosas, fiebre paratifoidea por Salmonella, fiebre tifoidea por Salmonella, fiebre escarlata, sífilis, tétanos, gonorrea, fiebre de tsutsugamushi, tuberculosis, tífus, vaginitis (colpitis), chancro suave y enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoarios u hongos, tales como disentería amébrica, bilharziosis, enfermedad de Chagas, Equinococo, solitaria del pez, ictiotoxismo (ciguatera), solitaria del zorro, micosis pedis, solitaria del perro, candidosis, pitiriasis, la comezón (escabiosis), leishmaniasis, leishmaniasis cutánea, disentería lambliana (giardiasis), piojos, paludismo, microscopia, oncocercosis, (ceguera del río), enfermedades fúngicas, solitaria de las reses, esquistosomiasis, (enfermedad del sueño), solitaria del puerco, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), leishmaniasis visceral, dermatitis por pañal o solitaria enana.

Las enfermedades en el contexto de la presente invención incluyen también, sin limitarse a, enfermedades virales (infecciosas) causadas por virus seleccionados de, sin limitación, VIH, virus orthopox variola, virus orthopox alastrim, virus parapox ovis, virus contagioso del molusco, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes B, virus de la varicela zoster, virus de la pseudorrabia, virus de la citomegalia humana, virus del herpes humano 6, virus del herpes humano 7, virus de Epstein-Barr, virus del herpes humano 8, virus de la hepatitis B, virus de chikungunya, virus de O'nyng'nyong, rubivirus, virus de la hepatitis C, virus GB, C, virus del Nilo Occidental, virus del Dengue, virus de la fiebre amarilla, virus Mal de Louping, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis B de Japón, virus de Powassan, virus FSMF, virus corona asociado con SAR, virus de corona humano 229E, virus corona humano Oc43, Torovirus, virus linfotrófico de células T humanas tipo 1, virus linfotrófico de células T humanas tipo II, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, virus de la inmunodeficiencia humana tipo II, virus de Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de Tacaribe, virus de Junin, virus de Machupo, virus de la enfermedad de Borna, virus de Bunyamwera, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre del Valle de Rift, virus de la fiebre de la mosca de la arena, virus de Toscana, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de Hazara, virus de Kasan, virus de Hantaan, virus de Seúl, virus de Prospect Hill, virus de Puumala, virus de Dobrava Belgrado, virus de Tula, virus sin nombre, virus del Lago Victoria Marburg, virus del Ébola Zaire, virus del Ébola Sudán, virus del Ébola de Costa de Marfil, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus de la influenza C, virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus sincitial respiratorio, metanemovirus humano, virus Indiana de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus de Mokola, virus de Duvenhage, lisavirus del murciélago europeo 1 + 2, lisavirus del murciélago australiano, adenovirus A-F, virus del papiloma humano, virus del condiloma 6, virus del condiloma 11, virus del polioma, virus adeno-asociado 2, rotavirus u orbivirus, etc. Estas enfermedades también pueden por ejemplo tratarse con una vacuna de acuerdo con la invención.

Además, las enfermedades o estados pueden incluir enfermedades cardiovasculares seleccionadas de, sin limitarse a, enfermedad cardíaca coronaria, arteriosclerosis, apoplejía e hipertensión, y enfermedades neuronales seleccionadas de enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, distonía, epilepsia, esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson, etc.

Las enfermedades o estados también pueden incluir en este contexto trastornos o enfermedades alérgicas. La alergia es una condición que incluye típicamente una hipersensibilidad inmunológica anormal y adquirida a ciertos antígenos o alérgenos extraños. Las alergias normalmente resultan en una respuesta inflamatoria local o sistémica a estos antígenos o alérgenos y lleva a una inmunidad del cuerpo contra estos alérgenos. Los alérgenos en este contexto incluyen por ejemplo céspedes, pólenes, o mohos, fármacos o numerosos activadores ambientales, etc. Sin limitarse a una teoría, se supone que varios mecanismos de enfermedad diferentes están implicados en el desarrollo de las alergias. De acuerdo con un esquema de clasificación por P. Gell y R. Coombs, la palabra "alergia" fue restringida a hipersensibilidades tipo I, las cuales son causadas por un mecanismo de IgE cásico. La hipersensibilidad tipo I se caracteriza por una extensa activación de mastocitos y basófilos por IgE, dando como resultado una respuesta inflamatoria sistémica que puede conllevar desde síntomas benignos como nariz mucosa hasta amenazadores de la vida, choque anafiláctico y muerte. Tipos bien conocidos de alergias incluyen, sin limitarse a, asma alérgica (que lleva a hinchazón de la mucosa nasal), conjuntivitis alérgica (que lleva a enrojecimiento y comezón de la conjuntiva), rinitis alérgica ("fiebre del heno"), anafilaxis, angioderma, dermatitis atópica (eczema), urticaria, eosinofilia, alergias respiratorias a picaduras de insectos, alergias dérmicas (que llevan a e incluyen varios salpullidos, tales como eczema, urticaria y dermatitis (por contacto)), alergias a alimentos, alergias a medicinas, etc. Con respecto a la presente invención, se proporciona por ejemplo una composición farmacéutica que contiene por ejemplo un ARN que codifica para un alérgeno (por ejemplo, de gato, polvo, de ácaro, un antígeno vegetal por ejemplo de abedul, etc.), como un complejo de la invención. Así, el alérgeno codificado puede desensibilizar la respuesta inmune del paciente. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden desplazar la respuesta inmune (excedente) a una respuesta TH1 más fuerte, suprimiendo o atenuando así la respuesta IgE no deseada que sufre el paciente.

Además, las enfermedades o estados como los aquí definidos pueden incluir enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes pueden dividirse en general en trastornos autoinmunes sistémicos y específicos de órganos o localizados, dependiendo de las características clinicopatológicas principales de cada enfermedad. Las enfermedades autoinmunes pueden dividirse en las categorías de síndromes sistémicos, incluyendo LES, síndrome de Sjörgen, escleroderma, artritis reumatoide y poliomiostitis o síndromes locales que pueden ser endocrinológicos (DM tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, etc.), dermatológicos (pénfigo vulgar), hematológicos (anemia hemolítica autoinmune), neurales (esclerosis múltiple) o pueden incluir virtualmente cualquier masa de tejido corporal implicada. Las enfermedades autoinmunes a tratar pueden seleccionarse del grupo consistente en enfermedades autoinmunes tipo I o enfermedades autoinmunes tipo II o enfermedades autoinmunes tipo III o enfermedades autoinmunes tipo IV, por ejemplo esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes, diabetes tipo I (diabetes mellitus), lupus eritematoso sistémico (LES), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades alérgicas tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV,

fibromialgia, caída de cabello, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, miastenia grave, neurodermitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (PSS), psoriasis, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, psoriasis, vasculitis, etc., o diabetes tipo II.

5 Aunque el modo exacto de cómo el sistema inmunológico induce una reacción inmune contra autoantígenos no ha sido elucidado hasta la fecha, existen varios descubrimientos con respecto a la etiología. Así, la autorreacción puede deberse a una By-pass de células T. Un sistema inmunológico normal requiere la activación de las células B por las células T antes de que las primeras puedan producir anticuerpos en grandes cantidades. Este requerimiento de una célula T puede ser derivado en casos raros, tales como
 10 infección por organismos que produzcan súper-antígenos capaces de iniciar la activación policlonal de células B, o incluso de células T, al unirse directamente a la subunidad de los receptores de las células T de forma no específica. Otra explicación deduce las enfermedades autoinmunes a partir de una imitación molecular. Un antígeno exógeno puede compartir similitudes estructurales con ciertos antígenos huésped; de esta manera, cualquier anticuerpo producido contra este antígeno (que imite los autoantígenos) también puede, en teoría,
 15 unirse a los antígenos huéspedes y amplificar la respuesta inmunológica. La forma más impresionante de imitación molecular se observa en estreptococos beta-hemolíticos del grupo A, los cuales comparten antígenos con el miocardio humano, y son responsables de manifestaciones cardíacas de fiebre reumática. Por tanto, la presente invención permite proporcionar un ARN que codifica para un autoantígeno como componente del ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención (o una composición líquida que contenga este ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención) o para proporcionar una
 20 composición farmacéutica que contenga un autoantígeno (como proteína, ARNm o ADN que codifique para una proteína autoantígeno) y un ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención, todos típicamente permiten que el sistema inmunológico se desensibilice.

Finalmente, las enfermedades a tratar en el contexto de la presente invención incluyen también enfermedades monogenéticas, es decir enfermedades hereditarias o enfermedades genéticas en general.
 25 Estas enfermedades genéticas son causadas típicamente por defectos genéticos, por ejemplo mutaciones genéticas que resultan en una pérdida de actividad de proteínas o mutaciones regulatorias que no permiten la transcripción o traducción de la proteína. Con frecuencia, estas enfermedades conducen a trastornos metabólicos u otros síntomas, por ejemplo distrofia muscular. En consecuencia, la presente invención permite tratar estas enfermedades proporcionando el ARN monohebra inmunoestimulador complejado aquí definido.
 30 Hasta el momento, pueden tratarse las siguientes enfermedades: deficiencia de 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (tipo II); deficiencia de 3-cetotiolasa; sensibilidad a 6-mercatopurina; síndrome de Akog-Scott; abetalipoproteinemia; acatalasemia; acondrogénesis; acondrogénesis-hipocondrogénesis; acondroplasia; acromatopsia; displasia acromesomélica (tipo Hunter-Tompson); deficiencia de ACTH; deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa (cadena corta, cadena media, cadena larga); coli poliposis adenomatosa; deficiencia de adenosina desaminasa; deficiencia de adenilosuccinasa; adalinopatía, hiperplasia adrenal congénita (debido a deficiencia de 11-beta-hidroxilasa, a deficiencia de 17-alfa-hidroxilasa, a deficiencia de 21-hidroxilasa); hipoplasia adrenal congénita con hipogonadismo hipogonadrotópico; síndrome adrenogenital; adrenoleucodistrofia, adrenomielopatía; afibrinogememia; agamaglobulinemia; síndrome de Alagille, albinismo (marrón, ocular, oculocutáneo, rojo); intolerancia al alcohol aguda, deficiencia de aldolasa A; aldeosteronismo remediable con glucocorticoides; enfermedad de Alexander; alcaptonuria; alopecia universal; deficiencia de alfa-1-antiquimiotripsina; deficiencia de alfa-metilacil-CoA racemasa; síndrome de retraso mental/alfa talasemia; síndrome de Alport; enfermedad de Alzheimer 1 (relacionada con APP); enfermedad de Alzheimer 3; enfermedad de Alzheimer 4; amelogénesis imperfecta; neuropatía amiloide (familiar, varios tipos alélicos); amiloidosis (tipo holandés; tipo finlandés; renal hereditaria; renal; sistémica senil) esclerosis lateral amiotrófica; analbuminemia; insensibilidad a andrógenos; anemia (Diamond-Blackfan); anemia (hemolítica debida a deficiencia de PK); anemia (hemolítica, Rh-nula, tipo supresor); anemia (hemolítica neonatal, fatal y casi fatal); anemia (sideroblástica, con ataxia); anemia (sideroblástica/hipocrómica); anemia debida a deficiencia de G6PD; aneurisma (arterial familiar); síndrome de Angelman; angioedema; aniridia; anomalías en el segmento anterior y catarata; disgénesis mesenquimática del segmento anterior; disgénesis mesenquimática de segmento anterior y catarata; deficiencia de antitrombina 3; rasgos de personalidad relacionados con ansiedad; síndrome de Apert; apnea (post-anestésica); deficiencia de ApoA-1 y ApoC-III (combinada); deficiencia de apolipoproteína A-II; apolipoproteína B-100 (defectuosa en ligandos); exceso de minerales o corticoides aparente (hipertensión debida a); argininemia; argininosuccinicaciduria; artropatía (pseudorematoides progresiva, infantil); aspartilglucosaminuria; ataxia (episódica); ataxia con deficiencia de vitamina E aislada; ataxia-telangiectasia; atelosteogénesis II; deficiencia de ADN ligasa dependiente de ATP I; defecto séptico atrial con defectos de conducción atrioventricular; atricia con lesiones papulares; autismo (succinilpurinémico); enfermedad poliglandular autoinmune tipo I; disfunción del sistema nervioso autónomo; anomalía de Axenfeld; azoospermia; síndrome de Bamforth-Lazarus; síndrome de Bannayan-Zonana; síndrome de Barth; síndrome de Bartter (tipo 2 o tipo 3); carcinoma de células basales; síndrome de nevus de células basales; infección BCG; síndrome de cutis girata de Beare-Stevenson; distrofia muscular de Becker; síndrome de Beckwith-Wiedemann; síndrome de Bernard-Soulier (tipo B, C); miopatía de Bethlem; mala absorción de ácidos biliares primaria; deficiencia de biotinidasa; cáncer de vejiga; trastorno hemorrágico debido a receptor de tromboxano
 55
 60

A2 defectuoso; síndrome de Bloom; braquidactilia (tipo B1 o tipo C); síndrome braquioótico; síndrome braquiootorrenal; cáncer de mama (intraductal invasivo; lobular; masculino, con síndrome de Reifstein; esporádico); cáncer de mama-1 (precoz); cáncer de mama-2 (precoz); miopatía de Brody; síndrome de Brugada; síndrome de Brunner; linfoma de Burkitt; distrofia de mariposa (retinal); deficiencia de C1q (tipo A; tipo B; tipo C); deficiencia de C1r/C1s; deficiencia de C1s; aislada; deficiencia de C2; deficiencia de C3; deficiencia de inactivador de C3b; deficiencia de C4; deficiencia de C8; tipo II; deficiencia de C9; displasia campomélica con inversión de sexo autosómica; síndrome de camptodactilia-artropatía-coxa varapericarditis; enfermedad de Canavan; deficiencia de carbamoilfosfato sintetasa I; síndrome de glicoproteína deficiente en carbohidratos (tipo I; tipo Ib; tipo II); tumor carcinoide de pulmón; cardioencefalomiopatía (infantil fatal, debida a deficiencia de citocromo C oxidasa); cardiomiopatía (dilatada; dilatada X-relacionada; hipertrófica familiar; hipertrófica); deficiencia de carinitina (primaria y sistémica); deficiencia de carnitina-acilcarnitina translocasa; síndrome del túnel carpiano (familiar); catarata (ceruleana; congénita; cristalina aculeiforme, de inicio juvenil, polimórfica y laminar, punteada, pulverulenta zonular); catarata tipo Coppock; deficiencia de CD59; enfermedad del núcleo central; ataxia cerebelar; angiopatía amiloide cerebral; arteriopatía cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía; malformaciones cavernosas cerebrales 1; síndrome cerebrooculofacioesquelético; xantomatosis cerebrotendinosa; enfermedad cerebrovascular; lipofuscinosis ceroides (neuronal, de tipo juvenil variante, con depósitos osmiofílicos granulares); lipofuscinosis ceroides (neuronal-1, infantil); lipofuscinosis ceroides (neuronal-3, juvenil); síndrome de Char; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía de Charcot-Marie-Tooth tipo Charlevoix-Saguenay; síndrome de Chediak-Higashi; diarrea por cloruro (tipo finlandés); colestasis (intrahepática recurrente benigna); colestasis (intrahepática familiar); colestasis (intrahepática familiar progresiva); enfermedad de almacenamiento de éster colestérol; condrodilatación punteada (braquidactilia; rizomélica; dominante X-relacionada; recesiva X-relacionada; tipo Grebe); condrosarcoma; coroideremia; enfermedad granulomatosa crónica (autosómica, debida a deficiencia de CYBA); enfermedad granulomatosa crónica (X-relacionada); enfermedad granulomatosa crónica debida a deficiencia de NCF-1; enfermedad granulomatosa crónica debida a deficiencia de NCF-2; síndrome de quilomicronemia, familiar; citrulinemia; síndrome de Cockayne clásico 1; labio leporino, mandíbula hendida, paladar hendido; síndrome de displasia ectodérmica por labio/paladar hendido; displasia cleidocranial; deficiencia de CMO II; enfermedad de Coats; síndrome de Cockayne 2, tipo B; síndrome de Coffin-Lowry, resistencia a colchicina; adenocarcinoma de colon; cáncer de colon; ceguera de color (deutan; protan; tritan); cáncer colorrectal; deficiencia de factor V y VIII combinada; hiperlipemia combinada (familiar); inmunodeficiencia combinada (X-relacionada, moderada); deficiencia de complejo 1; trastorno neurológico complejo; distrofia de cono 3; distrofia de cono-barra 3; distrofia de cono-barra 6; distrofia retinal de cono-barra 2; ausencia bilateral congénita de vasos deferentes; conjuntivitis, lineosa; aracnodactilia contractural; coproporfiria; córnea plana congénita; turbidez corneal; distrofia corneal (tipo Avellino; tipo gota gelatinosa; tipo Groenouw tipo 1; tipo retina 1; tipo Reis-Bucklers); resistencia a cortisol; resistencia a cumarina; enfermedad de Cowden; deficiencia de CPT, hepática (tipo 1; tipo II); calambres (familiares, agravados por potasio); síndrome sordera craneofacial-mano; craneosinostosis (tipo 2); cretinismo; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; síndrome de Crigler-Najjar; síndrome de Crouzon; síndrome de Currarino; cutis laxo; hematopoyesis cíclica; ictiosis cíclica; cilindromatosis; fibrosis quística; quistinosis (nefropática); cistinuria (tipo II; tipo II; daltonismo; enfermedad de Darier; deficiencia de proteína D-bifuncional; sordera dominante autosómica I; sordera dominante autosómica 11; sordera dominante autosómica 12; sordera dominante autosómica 15; sordera dominante autosómica 2; sordera dominante autosómica 3; sordera dominante autosómica 5; sordera dominante autosómica 8; sordera dominante autosómica 9; sordera recesiva autosómica 1; sordera recesiva autosómica 2; sordera recesiva autosómica 21; sordera recesiva autosómica 3; sordera recesiva autosómica 4; sordera recesiva autosómica 9; sordera sensorineural no sindrómica 13; sordera X-relacionada 1; sordera X-relacionada 3; sensibilidad a debrisoquina; enfermedad de Dejerine-Sottas; demencia (danesa familiar); demencia (frontotemporal, con parkinsonismo); enfermedad de Dent; anomalías dentales; atrofia dentatorrubro-palidolusiana; síndrome de Denys-Drash; dermatofibrosarcoma protuberans; enfermedad desmoide; diabetes insípida (nefrogénica); diabetes insípida (neurohipofísea); diabetes mellitus (resistente a insulina); diabetes mellitus (forma rara); diabetes mellitus (tipo II); displasia diastrófica; dihidropirimidiniuria; inversión de sexo sensible a dosis; degeneración de retina alveolar de Doyne; síndrome de Dubin-Johnson; distrofia muscular de Duchenne; anemia diseritropoyética con trombocitopenia; disfibrirogenemia (tipo alfa; tipo beta; tipo gama); disqueratosis congénita 1; disprotrombinemia; distonía (sensible a DOPA); distonía (mioclónica); distonía-1 (torsión); displasia ectodérmica; ectopia lenta; ectopia de pupila; ectrodactilia (displasia ectodérmica, y síndrome de labio/paladar hendido 3); síndrome de Ehlers-Danlos (forma progeroide); síndrome de Ehlers-Danlos (tipo I, tipo II; tipo III; tipo IV; tipo VI; tipo VIII); estenosis aórtica supraavalvular por elastina; eliptocitosis-1; eliptocitosis-2; eliptocitosis-3; síndrome de Ellis-van Creveld; distrofia muscular de Emery-Dreifuss; enfisema; encefalopatía; fibroblastosis endocárdica-2; carcinoma endometrial; deficiencia de acetilcolinesterasa de placa final; síndrome de cono S incrementado; acueducto vestibular agrandado; epidermolísis bullosa; epidermolísis bullosa distrófica (dominante recesiva); epidermolísis bullosa simple; hiperqueratosis epidermóica; queratoderma palmoplantar epidermolítico; epilepsia (generalizada; juvenil; mioclónica; de lóbulo frontal nocturna; mioclónica progresiva); epilepsia, benigna, neonatal (tipo 1 o tipo 2); displasia epifísea (múltiple); ataxia episódica (tipo 2); ataxia episódica/síndrome de mioquimia; eritremias (alfa-; displasia); eritrocitosis; eritroqueratoderma; resistencia a estrógenos; mieloglobulinuria ejercional debida a deficiencia de LDH-A; exostosis múltiple (tipo 1, tipo 2); vitreoretinopatía exudativa; X-relacionada; enfermedad de Fabry;

deficiencia de factor H, deficiencia de factor VII; deficiencia de factor X; deficiencia de factor XI; deficiencia de factor XII; deficiencia de factor XIII A; deficiencia de factor XIII B; fiebre del mediterráneo familiar; anemia de Fanconi; síndrome de Fanconi-Bickel; lipogranulomatosis de Farber; hígado graso (agudo); favismo; enfermedad de ojo de pescado; hipoplasia foveal; síndrome X frágil; síndrome de Frasier; ataxia de Friedreich; intolerancia a fructosa-bifosfatasa fructosa; fucosidosis; deficiencia de fumarasa; fondo albipunteado; fondo flavimaculado; deficiencia de G6PD; deficiencia de GABA-transaminasa; deficiencia de galactocinasa con cataratas; deficiencia de galactosa epimerasa; galactosemia; galactosialidosis; deficiencia de GMT; síndrome de Gardner; cáncer gástrico; enfermedad de Gaucher; epilepsia generalizada con ataques febriles más; tumores de células germinales; enfermedad de Gerstmann-Straussler; hepatitis de células gigantes (neonatal); trastorno de plaquetas gigantes; fibroblastoma de células gigantes; síndrome de Gitelman; trombostenia de Glanzmann (tipo A; tipo B); glaucoma 1A; glaucoma 3A; glioblastoma multiforme; glomerulosclerosis (segmental focal); defecto de transporte glucosa (barrera hemoencefálica); mala absorción de glucosa/galactosa; deficiencia de glucosidasa I; glutaricaciduria (tipo I; tipo IIB; tipo IIC); deficiencia de glutatona sintetasa; deficiencia de glicerol cinasa; receptor de glicina (polipéptido alfa-1); enfermedad de almacenamiento de glucógeno I; enfermedad de almacenamiento de glucógeno II; enfermedad de almacenamiento de glucógeno III; enfermedad de almacenamiento de glucógeno IV; enfermedad de almacenamiento de glucógeno VI; enfermedad de almacenamiento de glucógeno VII; glucogenosis (hepática, autosómica); glucogenosis (hepática, X-relacionada); gangliosidosis GM1; gangliosidosis GM2; Goiter (multinodular adolescente); Goiter (congénito); Goiter (nonendémico, simple); disgénesis gonadal (tipo XY); granulomatosis, séptica; enfermedad de Graves; síndrome de cefalopolisindactililia de Greig; síndrome de Griscelli; enanismo deficiente de hormona de crecimiento; retraso de crecimiento con sordera y retraso mental; ginecomastia (familiar, debido a actividad aromataasa incrementada); atrofia girante de coroides y retina con ornitinemia (sensible o no sensible a B6); enfermedad de Hailey-Hailey; síndrome de Haim-Munk; síndrome de mano-pie-útero; harderoporfirinuria; deficiencia de HDL (familiar); bloque cardíaco (no progresivo o progresivo); anemia de cuerpo de Heinz; síndrome HELLP; hematuria (benigna familiar); deficiencia de heme oxigenasa-1; migraña hemipléjica; hemocromatosis; enfermedad de hemoglobina H; anemia hemolítica debido a exceso de ADA; anemia hemolítica debida a deficiencia de adenilato cinasa; anemia hemolítica debida a defecto de banda 3; anemia hemolítica debida a deficiencia de glucosiltransferasa; anemia hemolítica debida a deficiencia de hexocinasa; anemia hemolítica debida a deficiencia de PGK; síndrome hemolítico-urémico; linfocitosis hemafagocítica; hemofilia A; hemofilia B; diátesis hemorrágica debida a deficiencia de factor V; hemosiderosis (sistémica, debida a aceruloplasminemia); deficiencia de lipasa hepática; hepatoblastoma; carcinoma hepatocelular; telangiectasia hemorrágica hereditaria 1; telangiectasia hemorrágica hereditaria 2; síndrome de Hermansky-Pudlak; heterotaxia (visceral X-relacionada); heterotopia (perinventricular); síndrome de Hippel-Lindau; enfermedad de Hirschprung; deficiencia de HRG debida a trombofilia de glicoproteína rica en histidina; deficiencia de HMG-CoA liasa; holoprosencefalia-2; holoprosencefalia-3; holoprosencefalia-4; holoprosencefalia-5; síndrome de Holt-Oram; homocistinuria; Hoyeraal-Hreidarsson; HPFH (tipo deleción o tipo no deleción); gota relacionada con HPRT; enfermedad de Huntington; hidrocefalia debida a estenosis de acueducto; hidrops fetal; hiperbetalipoproteinemia; hipercolesterolemia; familiar; hiperferritinemia síndrome de cataratas; hiperglicerolemia; hiperglucinemias; hiperinmunoglobulemia D y síndrome de fiebre periódica; hiperinsulinismo; síndrome de hiperinsulinismo-hiperamonemia; parálisis periódica hipercalcémica; hiperlipoproteinemia; hiperlisinemia; hipermetionemia (persistente, autosómica, dominante, debida a metionina, hereditaria); deficiencia de adenosiltransferasa I/III; síndrome de iperornitinemias-hiperamonemias-homocitrulinemia; hiperoxaluria; hiperparatiroidismo; iperfenilnemia debida a deficiencia de pterina-4-acarbinomina deshidrasa; hiperproinsulinemia; hiperprolinemia; hipertensión; hipertiroidismo (congénito); hipertrigliceridemia; hipoalfalipoproteinemia; hipobetalipoproteinemia; hipocalcemia; hipocondroplasia; anemia microcítica hipocrómica; hipodontia; hipofibrinogenemia; hipoglobulinemia y células B ausentes; hipogonadismo (hipergonadotrópico); hipogonadotrópico (hipogonadismo); parálisis periódica hipocalcémica; hipomagnesemia; hipomielinación (congénita); hipoparatiroidismo; hipofosfatasa (adultez; niñez; infantil; hereditaria); hipoprotrombinemia; hipotiroidismo (congénito; congénito hereditario; no goitroso); eritroderma ictiosiforme; ictiosis; ictiosis bullosa de Siemens; deficiencia de IgG2; síndrome de cilios inmóviles 1; inmunodeficiencia (complejo receptor de células T/CD3); inmunodeficiencia (X-relacionada, con hiper-IM); inmunodeficiencia debida a defecto en CD3-gama; síndrome de anomalías de inestabilidad facial por inmunodeficiencia centromérica; incontinencia pigmenti; insensibilidad a dolor (congénita, con anhidrosis); insomnio (familiar fatal); deficiencia de receptor de interleucina-2 (cadena alfa); enfermedad de discos intervertebrales; iridogoniodisgenésis; deficiencia de hormona de crecimiento aislada (tipo IIIgcon tipo GH y Kowarski ausente con GH bioinactiva); isovalericacidemia; síndrome de Jackson-Weiss; síndrome de Jensen; síndrome de Jervell y Lange-Nielsen; síndrome de Joubert; síndrome de Juberg-Marsidi; síndrome de Kallmann; enfermedad de Kanzaki; queratitis; queratoderma (palmoplantar); queratosis palmoplantar estriada I; queratosis palmoplantar estriada II; cetoacidosis debida a deficiencia de SCOT; síndrome de Keutel; síndrome de Klippel-Trenaouay; displasia de Kniest; neutropenia de Kostmann; enfermedad de Krabbe; síndrome de Kurziipp-polydaktylie; lactacidemia debida a deficiencia de PDX1; displasia mesomérica de Langer; enanismo de Laron; síndrome de Laurence-Moon-Biedl-Bardet; deficiencia de LCHAD; amaurosis congénita de Leber; malformación del eje izquierdo-derecho; síndrome de Leigh; leyomiomatosis (difusa, con síndrome de Alport); lepreonismo; discondrosteosis de Leri-Weill; síndrome de Lesch-Nyhan; leucemia (mieloide aguda, promielocítica aguda; linfoblástica de células T aguda; mieloide crónica; mielomonocítica

juvenil; leucemia 1 (linfocítica aguda de células T); deficiencia de adhesión de leucocitos; adenoma de células de Leydig; síndrome de Lhermitte-Duclos; síndrome de Liddle; síndrome de Li-Faumeni; deficiencia de lipoamida deshidrogenasa; lipodistrofia; hiperplasia adrenal lipoide; deficiencia de lipasa de lipoproteína; lisencefalia (X-relacionada); Lisencefalia-1; enfermedad de almacenamiento de glucógeno en hígado (tipo 0);

5 síndrome QT largo 1; síndrome QT largo-2; síndrome QT largo-3; síndrome QT largo-5; síndrome QT largo-6; síndrome de Lowe; cáncer de pulmón; cáncer pulmonar (no microcítico); cáncer pulmonar (microcítico); linfedema; linfoma (no Hodgkin de células B); linfoma (macroscópico difuso); linfoma (folicular); linfoma (MALT); linfoma (células de manto); síndrome linfoproliferativo (ligado a X); intolerancia a proteína lisinúrica; enfermedad de Machado-Joseph; anemia macrocítica refractaria (de síndrome 5q); distrofia macular;

10 mesotelioma maligno; deficiencia en Malonil-CoA descarboxilasa; manosidosis (alfa o beta); enfermedad de orina de jarabe de arce (tipo Ia; tipo Ib; tipo II); síndrome de Marfan; síndrome de Maroteaux-Lamy; síndrome de Marshall; síndrome MASA; leucemia de células cebadas; mastocitosis con trastorno hematológico asociado; enfermedad de McArdle; displasia fibrosa poliostótica de McCune-Albright; síndrome de McKusick-Kaufman; fenotipo de McLeod; carcinoma de tiroides medular; meduloblastoma; distrofia corneal de Meesmann; anemia megaloblástica 1; melanoma; glomerulonefritis membrorproliferativa; enfermedad de Meniere; meningioma (relacionado a NF2; relacionado con SIS); enfermedad de Menkes; retraso mental (ligado a X); metabolizador deficiente de mefentoína; mesotelioma; leucodistrofia metacromática; condrod displasia metafísica (tipo Murk Jansen; tipo Schmid); metemoglobinemia; deficiencia en metionina adenosiltransferasa (autosómica recesiva); deficiencia en metilcobalamina (tipo cbl G); metilmalonicaciduria

20 (tipo deficiencia en mutasa); melanociaciduria; deficiencia de MHC clase II; microftalmia (cataratas y anomalías del iris); miopatía de Miyoshi; MODY; síndrome de Mohr-Tranebjaerg; deficiencia en cofactor de molibdeno (tipo A o tipo B); moniletrix; Enfermedad de Fabry; enfermedad de Gaucher; mucopolisacaridosis; mucoviscidosis; síndrome de Muencke; síndrome de Muir-Torre; nanismo de Mulibrey; deficiencia en carboxilasa múltiple (sensible a biotina); neoplasia endocrina múltiple; glucogenosis muscular;

25 distrofia muscular (merosindeficiente congénita); distrofia muscular (congénita de Fukuyama); distrofia muscular (extremidad-cintura); distrofia muscular (tipo Duchenne); distrofia muscular con epidermolisis bullosa simple; síndrome miasténico (congénito de canal lento); infección micobacteriana (atípica, familiar diseminada); síndrome mielodisplásico; leucemia mielógena; malignidad mieloide; deficiencia de mieloperoxidasa; deficiencia de mioadenilato desaminasa; mioglobinuria/hemólisis debida a deficiencia en PGK; síndrome de encefalomiopatía mioneurogastrointestinal; miopatía (actina; congénita; relacionada con desmina; cardioesquelética; distal; nemalina); miopatía debida a deficiencia en CPT II; miopatía debida a deficiencia en fosfoglicerato mutasa; miotonia congénita; miotonia levior; distrofia miotónica; liposarcoma mixoide; deficiencia en NAGA; síndrome de Nailpatella; hiperparatiroidismo neonatal; nefrolitiasis; nefronofitosis (juvenil); nefropatía (hipocomplementémica crónica); nefrosis-1; síndrome nefrótico; síndrome de Netherton; neuroblastoma; neurofibromatosis (tipo 1 o tipo 2); neurolemomatosis; lipofuscinosis ceroid neuronal 5; neuropatía; neutropenia (neonatal aloimmune); enfermedad de Niemann-Pick (tipo A; tipo B; tipo C1; tipo D); ceguera de Night (estacionaria congénita); síndrome de ruptura de Nijmegen; neocompactación de miocardio ventricular izquierdo; queratoderma palmoplantar nonepidermolítico; enfermedad de Norrie; enfermedad de Norum; deficiencia en nucleósido fosforilasa; obesidad; síndrome de occipital; albinismo

40 ocular (tipo NettleShip-Falls); distrofia muscular oculofaríngea; enfermedad de Oguchi; oligodontia; síndrome de Omenn; síndrome de Opitz G; coloboma de nervio óptico con enfermedad renal; deficiencia en ornitina transcarbamilasa; oroticaciduria; intolerancia ortostática; síndrome de OSMED; osificación de ligamento longitudinal posterior de espina; osteoartritis; osteogénesis imperfecta; osteolisis; osteopetrosis (recesiva o idiopática); osteosarcoma; carcinoma ovárico; disgénesis ovárica; paquinoncia congénita (tipo Jackson-Lawler o tipo Jadassohn-Lewandowsky); enfermedad de Paget ósea; síndrome de Pallister-Hall; agenesia pancreática; cáncer pancreático, pancreatitis; síndrome de Papillon-Lefevre; paragangliomas; paramiotonia congénita; foramina parietal; enfermedad de Parkinson (familiar o juvenil); hemoglobinuria nocturna paroxismal; enfermedad de Palizaeus-Merzbacher; síndrome de Pendred; hipospadias perineales; fiebre periódica; trastorno de biogénesis peroxisomal; hipocluemia hiperinsulinémica persistente de infancia; síndrome de ducto Mulleriano persistente (tipo II); anomalía de Peters; síndrome de Peutz-Jeghers; síndrome de Pfeiffer; fenilcetonuria; gota relacionada con fosforribosil pirofosfato sintetasa; deficiencia en fosforilasa cinasa de hígado y músculo; piebaldismo; pilomatricoma; pinealoma con retinoblastoma bilateral; adenoma de secreción de ACTH pituitario; deficiencia de hormona pituitaria; tumor pituitario; deficiencia en sulfatasa esteroide placentar; deficiencia de inhibidor de plasmina; deficiencia de plasminógeno (tipos I y II);

55 enfermedad de plasminógeno de Tochigi; trastorno plaquetario; deficiencia en glicoproteína IV plaquetaria; deficiencia en factor activador de plaquetas de acetil hidrolasa; enfermedad renalpoliquística; osteodisplasia lipomembranosa poliquistica con leuquenencefalopatía esclerosante; polidactilia, postaxial; poliposis; síndrome de pterigio popliteal; porfiria (hepática aguda o intermitente aguda o eritropoyética congénita); porfiria cutánea tardía; porfiria hepatoeritropoyética; porfiria variegata; síndrome de Prader-Willi; pubertad precoz; insuficiencia ovárica prematura; progeria tipo I; progeria tipo II; oftalmoplegia externa progresiva; colestasis intrahepática progresiva II; prolactinoma (hiperparatiroidismo, síndrome carcinoide); deficiencia en prolidasa; propionicacidemia; cáncer de próstata; deficiencia a proteína S; proteinuria; protoporfiria (eritropoyética); pseudoacocondrodisplasia; pseudohermafroditismo; pseudohipoaldosteronismo; pseudohipoparatiroidismo; hipospadias perineales pseudovaginales; raquitismo por deficiencia en pseudovitaminas D; pseudoxantoma elástico (dominante autosómico; recesivo autosómico); proteinosis alveolar pulmonar; hipertensión pulmonar; púrpura fulminante; icnodisostosis; piropoiquilocitosis; deficiencia

de piruvato carboxilasa; deficiencia de piruvato deshidrogenasa; síndrome de Rabson-Mendenhall; enfermedad de Refsum; carcinoma de células renales; acidosis tubular renal; acidosis tubular renal con sordera; síndrome de osteoporosis-acidosis tubular renal; reticulosis (histiocítica familiar); degeneración retinal; distrofia retinal; retinitis pigmentosa; retinitis moteada albiscia; retinoblastoma; deficiencia de proteína de unión a retinol; retinosquiscis; síndrome de Rett; síndrome de Rh(mod); síndrome de predisposición rabdoide; tumores rabdoides; rabadomiosarcoma; rabadomiosarcoma (alveolar); condrod displasia rizomélica punteada; síndrome de Ribbing; raquitismo (resistente a vitamina D); anomalía de Rieger; síndrome de Robinow; síndrome de Rothmund-Thomson; síndrome de Rubenstein-Taybi; sacaropinuria; síndrome de Saethre-Chotzen; enfermedad de Salla; enfermedad de Sandhoff (formas infantil, juvenil y adulta); síndrome de Sanfilippo (tipo A o tipo B); enfermedad de Schindler; Schizencefalia; esquizofrenia (crónica); Schwannoma (esporádico); SCID (recesivo autosómico, tipo T-negativo/Bpositivo); vía secretora W/TMD; SED congénita; síndrome de Segawa; defecto en células T selectivas; SEMD (tipo Pakistán); SEMD (tipo Strudwick); displasia septoóptica; inmunodeficiencia combinada severa (negativa a células B); inmunodeficiencia combinada severa (negativa a células T, tipo positivo a células B/células asesinas naturales); inmunodeficiencia combinada severa (X-relacionada); inmunodeficiencia combinada severa debido a deficiencia en ADA; inversión de sexo (XY, con insuficiencia adrenal); síndrome de Sezary; síndrome de Shah-Waardenburg; estatura corta; síndrome de Shprintzen-Goldberg; trastorno de almacenamiento de ácido siálico; sialidosis (tipo I o tipo II); Sialuria; anemia de células falsiformes; síndrome de Simpson-Golabi-Behmel; situs ambiguus; síndrome de Sjogren-Larsson; síndrome de Smith-Fineman-Myers; síndrome de Smith-Lemli-Opitz (tipo I o tipo II); somatotrofinoma; distrofia de fondo de Sorsby; paraplejía espástica; esferocitosis; esferocitosis-1; esferocitosis-2; atrofia muscular espinal y bulbar de Kennedy; atrofia muscular espinal; ataxia espinocerebelar; disostosis espondilocostal; displasia espondiloepifisea tardía; displasia espondilometáfisea (tipo japonés); enfermedad de Stargardt-1; steatocistoma múltiple; síndrome de Stickler; síndrome de Sturge-Weber; heteropía laminar subcortical; heterotopía laminar subcortical; deficiencia en semialdehído deshidrogenasa succínica; intolerancia a sacarosa; síndrome de Sutherland-Haan; elevación de cloruro en sudor CF; sinfangismo; síndrome de sinostosis; sinpolidactilia; enfermedad de Tangier; enfermedad de Tay-Sachs; leucemia linfoblástica aguda de células T; inmunodeficiencia de células T; leucemia prolinfocítica de células T; talasemia (alfa o delta); talasemia debida a Hb Lepore; displasia tanatofórica (tipo I o II); síndrome de anemia megaloblástica sensible a tiamina; trombocitemia; trombofilia (displasminogénica); trombofilia debida a deficiencia en cofactor de heparina II; trombofilia debida a deficiencia en proteína C; trombofilia debida a defectos en trombomodulina; adenoma de tiroides; resistencia a hormona tiroides; deficiencia de yodo peroxidasa tiroide; síndrome de Tietz; metabolizador deficiente de tolbutamida; síndrome de Townes-Brocks; deficiencia en transcobalamina II; disostosis mandibulofacial de Collins Treacher; síndrome de tricondrotóseo; síndrome tricorniofalágeo; tricotodistrofia; deficiencia en proteína trifuncional (tipo I o tipo II); deficiencia en tripsinógeno; esclerosis tuberosa I; esclerosis tuberosa 2; síndrome de Turcot; tirosina fosfatasa; tirosinemia; síndrome de Ullrich-Mamario; urolitiasis (2,8-dihidroxiadenina); síndrome de Usher (tipo 1B o tipo 2A); malformaciones venosas; taquicardia ventricular; virilización; defecto de coagulación dependiente de vitamina K; deficiencia en VLCAD; síndrome de Vohwinkel; síndrome de von Hippel-Lindau; enfermedad de von Willebrand; síndrome de Waardenburg; síndrome de Waardenburg-albinismo ocular; variante neurológica de Waardenburg-Shah; síndrome de Waardenburg-Shah; síndrome de Wagner; sensibilidad a Warfarina; síndrome de Watson; síndrome de Weissenbacher-Zweymuller; síndrome de Werner; disostosis acrodental de Weyers; esponja blanca; síndrome de Williams-Beuren; tumor de Wilms (tipo I); enfermedad de Wilson; síndrome de Wiskott-Aldrich; síndrome de Wolcott-Rallison; síndrome de Wolfram; enfermedad de Wolman; xantineria (tipo I); xeroderma pigmentoso; X-SCID; síndrome de hipopigmentación de sordera-ceguera yemenita; hipercalcemia ipocalciúrica (tipo I); síndrome de Zellweger; síndrome de Zlotogora-Ogur.

Las enfermedades a tratar preferentes que tienen un antecedente hereditario genético y que son causadas típicamente por un defecto en un solo gen y se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel se seleccionan de entre el grupo consistente en enfermedades heredadas recesivas autosómicas, por ejemplo deficiencia en adenosina desaminasa, hipercolesterolemia familiar, síndrome de Canavan, enfermedad de Gaucher, anemia de Fanconi, lipofuscinosis ceroid neuronal, mucoviscidosis (fibrosis quística), anemia de células falsiformes; fenilcetonuria, alcaptonuria, albinismo, hipotireosis, galactosemia, deficiencia en alfa-1-anti-tripsina, xeroderma pigmentoso, síndrome de Ribbing, mucopolisacáridos, labio hendidado, mandíbula y paladar hendidos, síndrome de Laurence Moon Biedl Bardet, síndrome de polidactilia de costillas cortas, cretinismo, síndrome de Joubert, progeria tipo II, braquidactilia, síndrome adrenogenital y enfermedades heredadas por cromosoma X, por ejemplo ceguera al color, como ceguera a rojo/verde, síndrome X frágil, distrofia muscular (tipo Duchenne y Becker-Kiener), hemofilia A y B, deficiencia G6PD, enfermedad de Fabry, mucopolisacaridosis, síndrome de Norrie, retinitis pigmentosa, granulomatosis séptica, X-SCID, deficiencia en ornitina transcarbamilasa, síndrome de Lesch-Nyhan, o entre enfermedades heredadas autosómicas dominantes, por ejemplo angioedema hereditario, síndrome de Marfan, neurofibromatosis, progeria tipo I, osteogénesis imperfecta, síndrome de Klippel-Trenaurnay, síndrome de Sturge-Weber, síndrome de Hippel-Lindau y esclerosis tuberosa.

La presente invención permite también el tratamiento de enfermedades que aún no han sido heredadas o las cuales no pueden resumirse en las categorías anteriores. Estas enfermedades pueden incluir por ejemplo el tratamiento de pacientes que requieran de un factor de proteína específico, por ejemplo una proteína terapéuticamente activa específica como la mencionada anteriormente. Esto puede incluir, por ejemplo, pacientes de diálisis, que sufran diálisis renal regular y que puedan necesitar proteínas terapéuticamente activas específicas como las definidas arriba, por ejemplo eritropoyetina (EPO), etc.

De acuerdo con otra realización, la presente invención comprende el uso de al menos un ARN monohebra inmunoestimulador complejo de acuerdo con la presente invención para transfectar una célula o un organismo. La transfección de la célula o el organismo se puede llevar a cabo de preferencia usando el método de transfección (*in vitro* o *in vivo*) anterior para transfectar células a un tejido con el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la presente invención.

De acuerdo con otra realización, la presente invención comprende el uso de al menos un ARN monohebra inmunoestimulador complejo de acuerdo con la presente invención (para la preparación de un agente) para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades, trastornos, afecciones o estados patológicos mencionados arriba. En este contexto un agente puede ser, por ejemplo, una composición farmacéutica como la definida arriba o un tampón de inyección como el aquí definido, que contengan además el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la invención, una vacuna, etc. Si se usa más de un tipo de molécula de ARN monohebra inmunoestimulador complejo, las moléculas de ARN monohebra inmunoestimulador complejo pueden ser diferentes en sus ARN (moléculas), formando así una mezcla de al menos dos tipos de ARN (molécula) monohebra inmunoestimulador complejo distintos. Si se emplea más de un ARN monohebra inmunoestimulador complejo (en la preparación de un agente) para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades mencionadas arriba, estos (o al menos dos) tipos de ARN (molécula) diferentes pueden estar contenidos en estas mezclas de ARN monohebra inmunoestimulador complejo. En este contexto, cualquiera de los ARN (moléculas) mencionados puede usarse para el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la invención, por ejemplo un oligonucleótido de ARN corto, un ARN codificador, un ARN si, un ARN antisentido o riboswitches, ribozimas o aptámeros, etc. En especial se emplea un ARN (molécula) codificador, en particular un ARN (molécula) codificador lineal, y con total preferencia un ARNm. Preferentemente, este ARN (molécula) codificador, en especial un ARN (molécula) codificador lineal y en particular un ARNm se usa para el ARN monohebra inmunoestimulador complejo, típicamente el ARN (molécula) codifica para una proteína o péptido adecuado para la terapia de la enfermedad específica, por ejemplo un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno de cáncer específico, a un antígeno tumoral, cuando se trata un cáncer específico, etc. Las combinaciones de ARN (moléculas) adecuadas son conocidas por el experto en la técnica y a partir de la descripción de la presente invención.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, puede ser preferible desarrollar (además), por ejemplo inducir o incrementar, una respuesta inmune durante la terapia. En este contexto, la respuesta inmune puede ocurrir de varias maneras. Un factor sustancial para la respuesta inmune adecuada es la estimulación de diferentes sub-poblaciones de células T. Los linfocitos T se dividen típicamente en dos sub-poblaciones, células T auxiliares 1 (Th1) y células T auxiliares 2 (Th2), con las cuales el sistema inmunológico es capaz de destruir patógenos intracelulares (Th1) y extracelulares (Th2) (por ejemplo antígenos). Las dos poblaciones de células Th difieren en el patrón de las proteínas efectoras (citoquinas) producidas por ellas. Así, las células Th1 ayudan en la respuesta inmune celular mediante la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otro lado, promueven la respuesta inmune humoral mediante la estimulación de las células B para su conversión en células de plasma y mediante la formación de anticuerpos (por ejemplo, contra antígenos). Por tanto, la relación Th1/Th2 es de gran importancia para la respuesta inmune. En varias enfermedades que se tratan con la presente invención, la relación Th1/Th2 de la respuesta inmune se desplaza preferentemente en dirección a la respuesta celular (respuesta Th1), induciendo así una respuesta inmune celular. En consecuencia, la presente invención también se puede usar para revertir este desplazamiento de la respuesta inmune. Así, la presente invención incluye también el uso de al menos un ARN monohebra inmunoestimulador complejo de acuerdo con la presente invención (para la preparación de un agente) para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades mencionadas, donde el agente (y/o el ARN monohebra inmunoestimulador complejo) puede ser capaz de desarrollar, por ejemplo inducir o incrementar, una respuesta inmune en un tejido o en un organismo como se ha definido. De nuevo, un agente en este contexto puede ser por ejemplo una composición farmacéutica tal como la definida arriba o un tampón de inyección como el aquí definido que contenga el ARN monohebra inmunoestimulador complejo de la invención, etc. Si se usa más de un tipo de ARN monohebra inmunoestimulador complejo en este contexto (para la preparación de un agente) para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades mencionadas, los tipos de ARN monohebra inmunoestimulador complejo pueden ser diferentes con respecto a sus ARN (moléculas) y pueden formar una mezcla de tipos de ARN distintos.

Sin embargo, para la presente realización, es preferible que al menos una de estas moléculas de ARN monohebra inmunoestimulador complejo induzca o potencie la respuesta inmune durante la terapia. En este contexto, cualquiera del ARN (moléculas) mencionado arriba se puede usar para el ARN monohebra

inmunoestimulador complejado de la invención, por ejemplo un oligonucleótido de ARN corto, un ARN codificador, un ARNsi, un ARN antisentido o riboswitches, ribozimas o aptámeros, etc. En especial, se puede usar para el ARN monohebra inmunoestimulador complejado un ARN (molécula) codificador, en particular un ARN (molécula) codificador lineal, y con total preferencia un ARNm. Si el ARN (molécula) es un ARN (molécula) codificador, en especial un ARN (molécula) codificador lineal y en particular un ARNm, típicamente codifica para una proteína o péptido adecuado para la terapia de la enfermedad específica, por ejemplo un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno de cáncer específico cuando se trata un cáncer (específico), etc. Si está contenido más de un ARN monohebra inmunoestimulador complejado en el agente, pueden seleccionarse diferentes combinaciones de proteínas o péptidos. Estas combinaciones de ARN (moléculas) adecuado (y, si se usa un ARN codificador, de proteínas o péptidos codificados) son conocidas por el experto en la técnica o pueden combinarse a partir de moléculas de ARN que codifiquen para proteínas terapéuticamente efectivas, etc. como se define en la descripción de la presente invención. La inducción o mejora de la respuesta inmune junto con el tratamiento de una enfermedad específica usando una composición o agente farmacéutico como el definido arriba puede ser particularmente adecuada en aquellos donde una respuesta inmune inducida o incrementada ayude al tratamiento de una enfermedad específica como se mencionó arriba.

Alternativamente, el tratamiento de la enfermedad y la inducción o mejora de la respuesta inmune se pueden llevar a cabo usando diferentes composiciones o agentes farmacéuticos como los definidos arriba de manera escalonada en el tiempo. Por ejemplo, se puede inducir o incrementar la respuesta inmune administrando una composición farmacéutica o un agente como el aquí definido que contenga un ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención antes de (o concurrentemente con) administrar otra composición farmacéutica o un agente como el aquí definido que puede contener un ARN monohebra inmunomodulador complejado de la invención, por ejemplo un oligonucleótido de ARN corto, un ARN codificador, un ARN monohebra inmunoestimulador complejado, un ARNsi, un ARN antisentido o riboswitches, ribozimas o aptámeros, etc., adecuado para la terapia de la enfermedad específica.

De acuerdo con una realización, la presente invención comprende además el uso de al menos un ARN monohebra inmunoestimulador complejado de acuerdo con la presente invención (en la preparación de un agente) para modular, preferentemente para inducir o incrementar, una respuesta inmune en un tejido o en un organismo como los definidos arriba, en especial para soportar una enfermedad o estado como el aquí mencionado. Así, el ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención se puede usar para activar el sistema inmunológico de manera no específica, por ejemplo desencadenando la producción de ciertas citoquinas. El ARN monohebra inmunoestimulador complejado puede usarse por tanto para soportar la respuesta inmune específica, desarrollada por ejemplo por un antígeno derivado de patógenos o tumores. Un agente en este contexto puede ser por ejemplo una composición farmacéutica como la definida arriba o un tampón de inyección como el aquí definido que contenga el ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención, una vacuna, etc. La respuesta inmune puede modularse por el al menos un ARN monohebra inmunoestimulador complejado debido a que el uno o más oligopéptidos de longitud de 8 a 15 aminoácidos y de fórmula empírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$, y/o por las propiedades inmunoestimuladoras de la proteína codificada por el ARN del ARN monohebra inmunoestimulador complejado.

Por tanto, la presente invención puede servir, siempre que sea adecuado, para lograr varios objetivos. Un ARN monohebra inmunoestimulador complejado como tal o como componente de una composición de la invención puede a su vez mejorar las propiedades de transfección del ARN como componente del complejo de la invención. Esta propiedad subyacente del ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención es benéfica para una amplia variedad de aplicaciones. Siempre que se intente introducir un ARN en una célula, con la presente invención se asegura una mejor eficacia de transfección. Esta propiedad como tal puede permitir el uso de la presente invención para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, por ejemplo enfermedades monogénicas o genéticas como las definidas arriba.

Además, la presente invención se puede usar siempre que se contemple el tratamiento de trastornos inmunes, por ejemplo alergias o enfermedades autoinmunes. Más aún, la presente invención puede activar el sistema inmunológico del paciente al incrementar su respuesta inmune no específica o específica. En consecuencia, puede desarrollar una respuesta inmune no específica, siempre que sea adecuado, para curar una enfermedad. Igualmente, siempre que se requiera, puede desarrollar una respuesta inmune específica como tal (por ejemplo codificando para un antígeno con el ARN como componente del complejo inventivo) o mediante una combinación del ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención con un antígeno, por ejemplo en la misma composición. Siempre que se requiera, el ARN monohebra inmunoestimulador complejado de la invención puede ser un antígeno o un anticuerpo o cualquier otra proteína o péptido como el definido arriba capaz de modular la respuesta inmune (preferentemente de inducir o incrementarla o, en el caso de alergias o enfermedades autoinmunes, de desensibilizar el sistema inmunológico del paciente a un alérgeno o autoantígeno específico). Para modular, por ejemplo inducir o incrementar, una respuesta inmune en un tejido o un organismo, el ARN monohebra inmunoestimulador

complejado puede administrarse al tejido u organismo anteriormente definido ya sea como tal o como un agente como se ha definido arriba. Los modos de administración emplear pueden ser los mismos que los descritos arriba para las composiciones farmacéuticas. La administración del agente puede ocurrir antes, junto con y/o después de una terapia de enfermedades o estados como los aquí mencionados, por ejemplo por la administración del agente antes, junto con y/o después de una terapia o de una administración de un terapéutico adecuado para estas enfermedades o estados.

De acuerdo con una realización final, la presente invención proporciona también kits que contienen un ARN monohebra inmunoestimulador complejado de acuerdo con la invención y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención así como, opcionalmente, instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosis del ARN monohebra inmunoestimulador complejado de acuerdo con la invención y/o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención. El kit puede comprender además, por separado, uno o más del siguiente grupo de componentes: al menos un antígeno o al menos un anticuerpo o una composición que contenga un antígeno o un anticuerpo, un adyuvante adicional o una composición que contenga al menos un adyuvante y/o al menos una citoquina o una composición que contenga al menos una citoquina. El antígeno, anticuerpo y/o la citoquina puede proporcionarse como tal (proteínas) o puede como un ADN o ARN que codifique para el antígeno, anticuerpo o citoquina.

Estos kits pueden ser aplicados por ejemplo a cualquiera de las aplicaciones o usos mencionados arriba, de preferencia para el uso de al menos un ARN monohebra inmunoestimulador complejado de acuerdo con la presente invención (en la preparación de un agente) para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades mencionadas. Los kits también pueden ser aplicados para el uso de al menos un ARN monohebra inmunoestimulador complejado de acuerdo con la presente invención (en la preparación de un agente) para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades mencionadas donde el agente (y/o el ARN monohebra inmunoestimulador complejado) es capaz de inducir o incrementar una respuesta inmune en un tejido o un organismo como el definido. Estos kits pueden aplicarse además al uso de al menos un ARN monohebra inmunoestimulador complejado de acuerdo con la presente invención (en la preparación de un agente) para modular, de preferencia para desarrollar, por ejemplo para inducir o incrementar, una respuesta inmune en un tejido o un organismo como el definido, y en especial para soportar una enfermedad o estado tal como se mencionan aquí.

FIGURAS

Las siguientes figuras intentan ilustrar la invención, sin que se limite el objeto de la invención a las mismas.

Figura 1: muestra la secuencia de una secuencia de ARNm de luciferasa estabilizada, donde el ARNm nativo que codifica para la luciferasa se modifica con un marcador poli-A/poli-C (A70-C30). El primer constructo (constructo CAP-Ppluc(wt)-muag-A70-C30, SEQ ID NO: 35) contenía los siguientes elementos de secuencia: secuencias estabilizadoras del gen de alfa-globina, 70 x adenosina en el extremo 3' terminal (cola poli-A), 30 x citosina en el extremo terminal 3' (cola poli-C); representado por los siguientes símbolos: ___ = secuencia de codificación; == = 3'-UTR del gen de alfa globina; = cola poli-A; ----- = cola poli-C.

Figura 2: muestra la secuencia de una secuencia de ARNm de luciferasa estabilizada, donde el constructo de acuerdo con la SEQ ID NO: 35 (ver Figura 1) se modifica además con una secuencia optimizada en GC para un mejor uso de los codones. El constructo final (constructo CAP-Ppluc(GC)-muag-A70-C30, SEQ ID NO: 36) contenía los siguientes elementos de secuencia: secuencia optimizada en GC para un mejor uso de codones, secuencias estabilizadoras del gen de alfa-globina, 70 x adenosina en el extremo 3' terminal y (cola de poli-A), 30 x citosina en el extremo terminal 3' (cola poli-C); representados por los siguientes símbolos: ___ = secuencia de codificación; == = 3'-UTR modificado del gen de alfa globina; = cola poli-A; ---- = cola poli-C.

Figura 3: muestra la secuencia de codificación de la secuencia de SEQ ID NO: 35 (SEQ ID NO: 37) (ver Figura 1).

Figura 4: muestra la secuencia de codificación optimizada en GC de la secuencia SEQ ID NO: 36 (SEQ ID NO: 38) (ver Figura 2). Los codones optimizados en GC están subrayados.

Figura 5: muestra el efecto inmunoestimulador del ARN complejado con nona-arginina ((Arg)₉) en células hPBMC por medida de la producción de IL-6. Como se observa, las células hPBMC muestran una producción de IL-6 significativa, es decir, un efecto inmunoestimulador significativo del ARN complejado con nona-arginina ((Arg)₉).

Figura 6: muestra el efecto inmunoestimulador de ARN complejado con nona-arginina ((Arg)₉) en células hPBMC por medida de la producción de TNF-alfa. Como se observa, las células hPBMC muestran

una producción significativa de TNF-alfa, es decir, un efecto inmunoestimulador significativo del ARN complejado con nona-arginina ((Arg)₉).

5 Figura 7: un ejemplo comparativo de los efectos inmunoestimuladores del ARN complejado bien con nona-arginina ((Arg)₉) o con poli-L-arginina, respectivamente, en hPBMCs. Adecuadamente, un efecto inmunoestimulador significativo se puede observar para relaciones en masa inferiores a 1:5 (ARN:nona-arginina) (1:10; 1:8; 1:5; 1:2; 1:1; 2:1). Sin embargo, cuando se usan relaciones en masa de ARN:nona-arginina 5:1, no se observa ninguna producción significativa de TNF-alfa. Esto se aplica a experimentos de estimulación, usando nona-arginina ((Arg)₉) o ARNm solo. Además, se observó que la complejación de ARN con poli-L-arginina lleva a una inducción significativamente más baja de la producción de TNF-alfa en comparación con nona-arginina ((Arg)₉). Aparentemente, concentraciones más altas de poli-L-arginina parecen ser tóxicas para células transfectadas con la misma, particularmente cuando se usa una relación en masa 1:2 ARN:poli-L-arginina:ARN o superior, ya que las células fueron lisadas.

15 Figura 8: muestra la expresión de luciferasa después de la transfección de los complejos de ARN con nona-arginina ((Arg)₉) en células HeLa. Como se puede derivar de la Figura 8, una relación en masa inferior a 2:1 (ARN:nona-arginina) parece ser adecuada. Por el contrario, la complejación con poli-L-arginina de (masa molecular más alta) no lleva a una actividad luciferasa significativa. Así, la poli-L-arginina de (alta masa molecular) no parece ser adecuada para la transfección de ARNm.

20 Figura 9: un ejemplo comparativo de la expresión de luciferasa tras la transfección de los complejos de ARN con hepta-arginina ((Arg)₇) en células HeLa. Como puede derivarse de la Figura 9, la transfección de los complejos de ARN con hepta-arginina ((Arg)₇) no lleva a una actividad luciferasa significativa. Así, la hepta-arginina ((Arg)₇) tampoco parece ser adecuada para la transfección de ARNm.

25 Figura 10: muestra el efecto inmunoestimulador de ARN complejado con hepta-arginina ((Arg)₇) en células hPBMC por medida de la producción de IL-6. Como puede verse, las células hPBMC muestran una producción de IL-6 significativa, es decir, un efecto inmunoestimulador significativo del ARN complejado con hepta-arginina.

Figura 11: muestra el efecto inmunoestimulador de ARN complejado con hepta-arginina ((Arg)₇) en células hPBMC por medida de la producción de TNF-alfa. Como se puede ver, las células hPBMC muestran una producción significativa de TNF-alfa, es decir, un efecto inmunoestimulador significativo del ARN complejado con hepta-arginina ((Arg)₇).

30 Figura 12: muestra el efecto del ARN complejado con péptido R9 en la expresión de luciferasa en células HeLa.

Figura 13: muestra el efecto del ARN complejado con péptido R9H3 en la expresión de luciferasa en células HeLa.

35 Figura 14: muestra el efecto del ARN complejado con péptido H3R9H3 en la expresión de luciferasa en células HeLa.

Figura 15: muestra el efecto del ARN complejado con péptido YYR9SSY en la expresión de luciferasa en células HeLa.

Figura 16: muestra el efecto del ARN complejado con péptido H3R9SSY en la expresión de luciferasa en células HeLa.

40 Figura 17: muestra el efecto del ARN complejado con péptido (RKH)₄ en la expresión de luciferasa en células HeLa.

Figura 18: muestra el efecto del ARN complejado con péptido Y(RKH)₂R en la expresión de luciferasa en células HeLa.

Figura 19: muestra el efecto de la histidina en posiciones terminales en la eficacia de transfección.

45 Figura 20: muestra el efecto de aminoácidos neutros en posiciones terminales en la eficacia de transfección.

Figura 21: muestra el efecto inmunoestimulador de ARN complejoado con R9H3 en la secreción de TNFalfa en hPBMCs.

5 Figura 22: muestra el efecto inmunoestimulador de ARN complejoado con R9H3 en la secreción de IL-6 en hPBMCs.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, sin que su objeto se limite a los mismos.

10 **Ejemplo 1: Preparación de constructos de ARNm de luciferasa**

En los siguientes experimentos se preparó una secuencia de ARNm de luciferasa estabilizada y se usó para experimentos de transfección, donde el ARNm que codifica para la luciferasa nativa se modificó con un marcador poli-A/poli-C (A70-C30) y se optimizó en GC para un mejor uso de codones y mayor estabilidad.

15 Un primer constructo (constructo CAP-Ppluc(wt)-muag-A70-C30, SEQ ID NO: 35) contenía los siguientes elementos de secuencia:

secuencias de estabilización del gen de alfa-globina,
70 adenosina en el extremo 3' terminal y
30 citosina en el extremo 3' terminal.

20 El constructo final (constructo CAP-Ppluc(GC)-muag-A70-C30, SEQ ID NO: 36) según se usa aquí para los siguientes experimentos contenía los siguientes elementos de secuencia:

secuencia optimizada en GC para un mejor uso de codones,
secuencias de estabilización del gen de alfa-globina,
70 Adenosina en el extremo 3' terminal y

30 Citosina en el extremo 3'-terminal.

25 Estas secuencias también se muestran en las Figuras 1 y 2 (SEQ ID NO: 35 y 36). Las secuencias de codificación respectivas se muestran en las Figuras 3 y 4 (SEQ ID NO: 35 y 36).

Ejemplo 2: Transcripción *in vitro* de ARNm de luciferasa estabilizado

El ARN de luciferasa estabilizado de SEQ ID NO: 35 o 36 (Luc-RNActive) se transcribió *in vitro* usando T7-polimerasa (T7-Opti mRNA kit, CureVac, Tübingen, Alemania) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

30 Todos los transcritos de ARNm contenían una cola poli-A de 70 bases y una estructura de bloqueo 5'. La estructura de bloqueo 5' se obtuvo al añadir un exceso de N7-metilguanosa-5'-trifosfato-5'-guanosa.

Ejemplo 3: Formación de un complejo de ARN con nona-arginina ((Arg)₉), poli-L-arginina o péptidos adicionales con base en (Arg)₉, respectivamente

35 15 µg de ARNm de luciferasa estabilizado con ARNm de SEQ ID NO: 36 (Luc-RNActive) se mezclaron, en diferentes relaciones en masa, con nona-arginina (Arg₉) o poli-L-arginina (Sigma-Aldrich; P4663; 5000-15000 g/moles), formando así un complejo. Se usaron relaciones de masa siguientes como las mostradas a modo de ejemplo para ((Arg)₉). Se usó Poly-L-arginina para ejemplos comparativos siguiendo las mismas instrucciones.

	ARN	(Arg) ₉	(Arg) ₉	(Arg) ₉	ARN	(Arg) ₉	H ₂ O	Conc,(Ar g) ₉	(Arg) ₉ / ARN
			µg	µg	µl	µl	µl	[µM]	
1	Falso						70,0	0	
2	(Arg) ₉ solo			150		3	67,0	151,32	
3	ARN solo		15		3,8		66,3	0,00	
4	1	10	15	150,0	3,8	3,0	63,3	151,32	10:1
5	1	8	15	120,0	3,8	2,4	63,9	121,06	8:1
6	1	5	15	75,0	3,8	1,5	64,8	75,66	5:1
7	1	2	15	30,0	3,8	0,6	65,7	30,26	2:1
8	1	1	15	15,0	3,8	15,0	51,3	15,13	1:1
9	2	1	15	7,5	3,8	7,5	58,8	7,57	1:2

ES 2 539 188 T3

10	5	1	15	3,0	3,8	3,0	63,3	3,03	1:5
11	8	1	15	1,9	3,8	1,9	64,4	1,89	1:8
12	10	1	15	1,5	3,8	1,5	64,8	1,51	1:10

Además, se prepararon ARN (moléculas) complejadas con base en (Arg)₉ usando los siguientes péptidos para la complejación:

- 5 R9: Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
 R9H3: Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His-His-His
 H3R9H3: His-His-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His-His-His
 YSSR9SSY: Tyr-Ser-Sr-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr
 H3R9SSY: His-His-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr
 10 (RKH)4: Arg-Lys-His-Arg-Lys-His-Arg-Lys-His-Arg-Lys-His
 Y(RKH)2R: Tyr-Arg-Lys-His-Arg-Lys-His-Arg

15 Para la complejación, 4 µg de ARN de luciferasa estabilizado de SEQ ID NO: 36 (Luc-RNActive) se mezclaron en proporciones molares con el péptido respectivo (de la fórmula I), formando así un complejo. Posteriormente la solución resultante se ajustó con agua a un volumen final de 50 µl y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las relaciones usadas se indican en las siguientes tablas. Entonces se sembraron células HeLa (150x10³/pocillo) 1 día antes de transfección en placas de microtitulación de 24 pocillos a una confluencia del 70% cuando se llevó a cabo la transfección.

R9:

Formulación → N/P		R9		N/P
<i>Relación molar</i>		<i>Relación en masa</i>		
ARN	R9	ARN µg	Péptido µg	
1,00	10000,00	1,00	23,72	50,00
1,00	5000,00	1,00	11,86	25,00
1,00	2500,00	1,00	5,93	12,50
1,00	1000,00	1,00	2,37	5,00
1,00	500,00	1,00	1,19	2,50
1,00	100,00	1,00	0,24	0,50
1,00	10,00	1,00	0,02	0,05

20

R9H3:

Formulación → N/P		R9H3		N/P
<i>Relación molar</i>		<i>Relación en masa</i>		
ARN	R9H3	ARN µg	Péptido µg	
1,00	10000,00	1,00	30,58	50,00
1,00	5000,00	1,00	15,29	25,00
1,00	2500,00	1,00	7,65	12,50
1,00	1000,00	1,00	3,06	5,00
1,00	500,00	1,00	1,53	2,50
1,00	100,00	1,00	0,31	0,50
1,00	10,00	1,00	0,03	0,05

H3R9H3:

Formulación → N/P		H3R9H3		N/P
<i>Relación molar</i>		<i>Relación en masa</i>		
ARN	H3R9H3	ARN µg	Péptido µg	
1,00	10000,00	1,00	37,43	50,00
1,00	5000,00	1,00	18,72	25,00
1,00	2500,00	1,00	9,36	12,50
1,00	1000,00	1,00	3,74	5,00
1,00	500,00	1,00	1,87	2,50
1,00	100,00	1,00	0,37	0,50
1,00	10,00	1,00	0,04	0,05

25

YSSR9SSY:

Formulación → N/P		YSSR9SSY		N/P
<i>Relación molar</i>		<i>Relación en masa</i>		
ARN	YSSR9SSY	ARN µg	Péptido µg	
1,00	10000,00	1,00	34,95	50,00
1,00	5000,00	1,00	17,48	25,00

1,00	2500,00		1,00	8,74	12,50
1,00	1000,00		1,00	3,50	5,00
1,00	500,00		1,00	1,75	2,50
1,00	100,00		1,00	0,35	0,50
1,00	10,00		1,00	0,03	0,05

H3R9SSY:

Formulación →N/P		H3R9SSY		N/P
Relación molar		Relación en masa		
ARN	H3R9SSY	ARN µg	Péptido µg	
1,00	10000,00	1,00	36,18	50,00
1,00	5000,00	1,00	18,09	25,00
1,00	2500,00	1,00	9,05	12,50
1,00	1000,00	1,00	3,62	5,00
1,00	500,00	1,00	1,81	2,50
1,00	100,00	1,00	0,36	0,50
1,00	10,00	1,00	0,04	0,05

(RKH)4:

Formulación →N/P		(RKH)4		N/P
Relación molar		Relación en masa		
ARN	(RKH)4	ARN µg	Péptido µg	
1,00	10000,00	1,00	28,38	50,00
1,00	5000,00	1,00	14,19	25,00
1,00	2500,00	1,00	7,10	12,50
1,00	1000,00	1,00	2,84	5,00
1,00	500,00	1,00	1,42	2,50
1,00	100,00	1,00	0,28	0,50
1,00	10,00	1,00	0,03	0,05

5

Y(RKH)2R:

Formulación →N/P		R9		N/P
Relación molar		Relación en masa		
ARN	Y(RKH)2R	ARN µg	Péptido µg	
1,00	10000,00	1,00	19,67	50,00
1,00	5000,00	1,00	9,83	25,00
1,00	2500,00	1,00	4,92	12,50
1,00	1000,00	1,00	1,97	5,00
1,00	500,00	1,00	0,98	2,50
1,00	100,00	1,00	0,20	0,50
1,00	10,00	1,00	0,02	0,05

Ejemplo 4: Transfección mediada por nona-arginina ((Arg)₉) y expresión de ARNm de luciferasa estabilizado de SEQ ID NO: 35 o 36 (Luc-RNActive) en células HeLa

- 10 Se sembraron células HeLa (150x10³/pocillo) 1 día antes de la transfección en placas de microtitulación de 24 pocillos a una confluencia del 70% cuando se llevó a cabo la transfección. Para la transfección (40 µl), 50 µl de la solución ARN/(péptido) descrita en el Ejemplo 3 se mezclaron con 250 µl de medio libre de suero y se añadió a las células (concentración de ARN final: 13 µg/ml). Antes de la adición de la solución de transfección, las células HeLa se lavaron suave y cuidadosamente dos veces con 1 ml de Optimen (Invitrogen) por pocillo.
- 15 Luego, la solución de transfección (300 µl por pocillo) se añadió a las células y las células fueron incubadas durante 4 horas a 37°C. Entonces se añadieron 300 µl de medio RPMI (Camprex) que contenía 10% de FCS por pocillo y las células se incubaron durante 20 horas más a 37°C. La solución de transfección fue succionada 24 horas después de la transfección y las células fueron lisadas en 300 µl de tampón de lisis (25 mM de Tris-PO₄, 2 mM de EDTA, 10% de glicerol, 1% de Triton-X 100, 2 mM de DTT). Los sobrenadantes se
- 20 mezclaron después con tampón de luciferina (25 mM de glicilglicina, 15 mM de MgSO₄, 5 mM de ATP, 62,5 µM de luciferina) y se detectó la luminiscencia usando un luminómetro (Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 8 y 12 a 18.

Ejemplo 5: Estimulación inmune después de la transfección de complejos de ARN con nona-arginina ((Arg)₉) o poli-L-arginina (ejemplo comparativo)

- 25 a) Experimentos de transfección:

Se aislaron células HPBMC de sangre periférica de donadores sanos usando un gradiente Ficoll y se lavaron con 1xPBS (solución salina tampónfosfato). Las células se sembraron después en placas de microtitulación de 96 pocillos (200 x 10³/pocillo). Las células hPBMC fueron incubadas durante 24 horas, como se describió en el Ejemplo 4, con 10 µl del complejo ARN/péptido (concentración final de ARN: 6 µg/ml; se usaron las mismas cantidades de ARN) en medio X-VIVO 15 (BioWhittaker) (concentración de ARN final: 10 µg/ml). El efecto inmunoestimulador en las células hPBMC se midió detectando la producción de citoquina (interleucina-6 y factor de necrosis tumoral alfa). Para ello, se incubaron placas de microtitulación de ELIA (Nunc Maxisorb) durante una noche (o/n) con tampón de unión (0,02% de NaN₃, 15 mM de Na₂CO₃, 15 mM de NaHCO₃, pH 9,7), que contenía además un anticuerpo de citoquina específico. Las células se bloquearon después con 1xPBS, que contenía 1% de BSA (seroalbúmina bovina). Se añadió el sobrenadante celular y se incubó durante 4 horas a 37°C. Entonces, la placa de microtitulación se lavó con 1xPBS, 0,05% de Tween 20 y se incubó con un anticuerpo secundario marcado con biotina (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). Se añadió peroxidasa de rábano acoplada a estreptavidina a la placa. Después, la placa se lavó de nuevo con 1xPBS, que contenía 0,05% de Tween-20 y se añadió ABTS (ácido2,2'-azido-bis(3-etilbenzotriazolín-6-sulfónico) como sustrato. La cantidad de citoquina se determinó midiendo la absorción a 405 nm (OD405) usando una curva estándar con citoquinas recombinantes (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania) un con lector ELIS Sunrise de Tecan (Crailsheim, Alemania).

b) Resultados

20 i) Efecto inmunoestimulador de ARN complejoado con nona-arginina ((Arg)₉)

i1) Se incubaron células hPBMC con ARN complejoado con nona-arginina ((Arg)₉) durante 24 horas como se ha descrito en una relación en masa ARN:(Arg)₉ de 1:1. Se midió la producción de IL-6 en los sobrenadates de células usando ELISA. Como resultado, las células HPBMC mostraron una producción significativa de IL-6, es decir, un efecto inmunoestimulador significativo de ARN complejoado con nona-arginina ((Arg)₉) (véase Figura 5).

i2) Se incubaron células HPBMC con ARN complejoado con nona-arginina ((Arg)₉) durante 24 horas como se ha descrito en una relación en masa ARN:(Arg)₉ de 1:1. Se midió la producción de TNF-alfa en los sobrenadantes de células usando ELISA. Como resultado, las células HPBMC mostraron una producción de TNF-alfa significativa, es decir, un efecto inmunoestimulador significativo de ARN complejoado con nona-arginina ((Arg)₉) (véase Figura 6).

35 ii) Comparación del efecto inmunoestimulador de ARN complejoado con nona-arginina ((Arg)₉) o con poli-L-arginina, respectivamente (ejemplo comparativo)

Se incubaron hPBMCs a diferentes relaciones en masa (ARN:nona-arginina 1:10; 1:8; 1:5; 1:2; 1:1; 2:1; 5:1; 8:1 y 10:1) con un complejo de ARN y nona-arginina ((Arg)₉) o poli-L-arginina, etc., respectivamente, durante 24 horas. Posteriormente se midió la producción de TNF-alfa usando ELISA. Ventajosamente, se observa un efecto inmunoestimulador significativo para relaciones en masa inferiores a 5:1 (ARN:nona-arginina) (1:10; 1:8; 1:5; 1:2; 1:1; 2:1) (véase Figura 7). Con relaciones en masa ARN:nona-arginina 5:1 no se observa producción significativa de TNF-alfa. Lo mismo se aplica para experimentos de estimulación, usando nona-arginina ((Arg)₉) o ARNm solo (véase Figura 7, izquierda). Además, la complejación del ARNm con poli-L-arginina lleva a una inducción significativamente más baja de producción de TNF-alfa en comparación con nona-arginina ((Arg)₉) (véase Figura 7, derecha). Además, se observó que concentraciones más altas de poli-L-arginina parecen ser tóxicas para células transfectadas, particularmente cuando se usa una relación en masa 1:2 ARN:poli-L-arginina o inferior, ya que las células fueron lisadas.

Ejemplo 6: Expresión de luciferasa después de transfección de complejos de ARN con nona-arginina ((Arg)₉) o poli-L-arginina, respectivamente, en células HeLa (ejemplo comparativo)

a) Expresión de luciferasa después de la transfección de complejos de ARN con nona-arginina ((Arg)₉) en células HeLa. Células HeLa fueron transfectadas con RNActive que codificaba para luciferasa, que había sido complejoado con diferentes proporciones de nona-arginina o poli-L-arginina, respectivamente. Se midió 24 horas más tarde la actividad luciferasa. Aparentemente, una relación en masa inferior a 2:1 (ARN:nona-arginina) parece ser adecuada (véase Figura 8).

b) En comparación, la complejación con poli-L-arginina de alta masa molecular no incrementa la actividad luciferasa a un nivel significativo. Así, la poli-L-arginina de (alta masa molecular) no parece ser adecuada para la transfección de ARNm (véase Figura 8).

Ejemplo 7: Expresión de luciferasa bajo transfección de complejos de ARN con hepta-arginina ((Arg)₇) en células HeLa (ejemplo comparativo)

Células HeLa fueron transfectadas con luciferasa de codificación RNActive complejada con diferentes proporciones de hepta-arginina ((Arg)₇). Veinticuatro horas más tarde se midió la actividad luciferasa. Aparentemente, la complejación con hepta-arginina ((Arg)₇) no incrementa la actividad luciferasa a un nivel

significativo. Así, la hepta-arginina ((Arg)₇) no parece ser adecuada para la transfección de ARNm (véase Figura 9).

Ejemplo 8: Estimulación inmune después de transfección de complejos de ARN con hepta-arginina ((Arg)₇) (ejemplo comparativo)

5 a) Experimentos de transfección: Se llevaron a cabo experimentos de transfección para hepta-arginina ((Arg)₇) análogos a los experimentos del Ejemplo 5 anterior.

b) Resultados del efecto inmunoestimulador de ARN complejado con hepta-arginina ((Arg)₇):

10 i) Se incubaron células HPBMC con ARN complejado con hepta-arginina ((Arg)₇) durante 24 horas como se ha descrito a una relación en masa ARN:(Arg)₇ de 1:1. Se midió la producción de IL-6 en los sobrenadantes de células usando ELISA. Como resultado, las células HPBMC mostraron una producción de IL-6 significativa, es decir, un efecto inmunoestimulador significativo de ARN complejado con hepta-arginina ((Arg)₇) (véase Figura 10).

15 ii) Las células HPBMC fueron además incubadas con ARN complejado con hepta-arginina ((Arg)₇) durante 24 horas como se ha descrito a una relación en masa ARN:(Arg)₇ de 1:1. Se midió la producción de THF-alfa en los sobrenadantes de células usando ELISA. Como resultado, las células HPBMC mostraron también una producción significativa de TNF-alfa, es decir, un efecto inmune estimulador significativo de ARN complejado con hepta-arginina ((Arg)₇) (véase Figura 11).

Ejemplo 9: Determinación del efecto de la histidina en la eficiencia de transfección

20 Para determinar el efecto de la histidina en la eficiencia de transfección se llevó a cabo una transfección de manera análoga a los experimentos de transfección mostrados usando péptidos con diferente contenido en histidina. Así, 4 µg de ARNm de luciferasa estabilizado de SEQ ID NO: 36 (Luc-RNActive) fueron mezclados en relaciones molares con el péptido respectivamente (de acuerdo con la fórmula I), particularmente R9, R9H3 o H3R9H3, formando un complejo. Posteriormente la solución resultante se ajustó con agua hasta un volumen final de 50 µl y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las relaciones usadas en cada experimento son 1:10.000, 1:5.000 y 1:1.000. Se sembraron células HeLa (150x10³/pocillo) sembradas 1 día antes de la transfección en placas de microtitulación de 24 pocillos a una confluencia del 70% cuando la transfección se llevó a cabo. Para la transfección, 50 µl de la solución de ARN/péptido se mezcló con 250 µl de medio libre de suero y se añadió a las células (concentración final de ARN: 13 µg/ml). Antes de la adición de la solución de transfección, las células HeLa se lavaron cuidadosa y suavemente dos veces con 1 ml de Optimen (Invitrogen) por pocillo. Después, la solución de transfección (300 µl por pocillo) se añadió a las células y las células se incubaron durante 4 horas a 37°C. Posteriormente se añadieron 300 µl de medio RPMI (Camprex) que contenía 10% de FCS por pocillo y las células se incubaron durante 20 horas más a 37°C. La solución de transfección se succionó 24 horas después de la transfección y las células fueron lisadas en 300 µl de tampón de lisis (25 mM de Tris-PO₄, 2 mM de EDTA, 10% de glicerol, 1% de Tritón-X 100, 2 mM de DTT). Los sobrenadantes se mezclaron después con tampón de luciferina (25 mM de glicilglicina, 15 mM de MgSO₄, 5 mM de ATP, 62,5 µM de luciferina) y se detectó la luminiscencia usando un luminómetro (Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania).

40 Los resultados se muestran en la Figura 19. Como puede verse, un tramo de 3 histidinas en un extremo terminal sí incrementa la eficiencia de transfección del ARN complejado, donde un tramo de 3 histidinas en ambos extremos terminales incrementa significativamente la eficacia de transfección del ARN complejado.

Ejemplo 10: Determinación del efecto de aminoácidos neutros en la eficiencia de transfección

45 Para determinar el efecto de aminoácidos neutros en la eficiencia de transfección se llevó a cabo un experimento de transfección adicional de manera análoga a los experimentos de transfección anteriores del Ejemplo 9 usando el péptido H3R9CCS. Los resultados de este experimento adicional se muestran en la Figura 20.

Ejemplo 11: Inmunoestimulación usando R9H3 en hPBMCs

50 El efecto de R9H3 en la inmunoestimulación se ensayó en hPBMCs. Así, se preparó un complejo de R9H3 y ARN como el del Ejemplo 3. Más aún, células HPBMC de sangre periférica de donadores sanos se aislaron usando un gradiente Ficoll y se lavaron con 1xPBS (solución salina tampón fosfato). Las células se sembraron después en placas de microtitulación de 96 pocillos (200x10³/pocillo). Las células HPBMC fueron incubadas durante 24 horas como se describe en el Ejemplo 4 con 10 µl del complejo de ARN/péptido (concentración final de ARN: 6 µg/ml; se usaron las mismas cantidades de ARN) en medio X-VIVO 15 (BioWhittaker). El efecto inmunoestimulador en las células hPBMC se midió detectando la producción de citoquina (interleucina-6 y factor de necrosis tumoral alfa). Así, placas de microtitulación de ELISA (Nunc Maxisorb) fueron incubadas durante una noche (o/n) con tampón de unión (0,02% de NaN₃, 15 mM de

Na₂CO₃, 15 mM de NaHCO₃, pH 9,7) que contenía además un anticuerpo de citoquina específico. Las células se bloquearon después con 1xPBS que contenía 1% de BSA (seroalbúmina bovina). Se añadió el sobrenadante y se incubó durante 4 horas a 37°C. Posteriormente, la placa de microtitulación se lavó con 1xPBS, 0,05% de Tween 20, y luego se incubó con un anticuerpo secundario marcado con biotina (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). Se añadió a la placa peroxidasa de rábano acoplada a estreptavidina. La placa se lavó de nuevo con 1xPBS que contenía 0,05% de Tween-20, y se añadió ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) como sustrato. La cantidad de citoquina se determinó midiendo la absorción a 405 nm (OD405) usando una curva estándar con citoquinas recombinantes (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania) con un lector ELISA Sunrise de Tecan (Crailsheim, Alemania). Los resultados se muestran en las Figuras 21 y 22. Como se puede observar, apareció una inmuoestimulación significativa a una relación 1:5.000 de ARN:R9H3.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Curevac GmbH

<120> Transfection of complexed RNA

<130> cu01P052wo1

<150> PCT/EP2007/007702

<151> 2007-09-04

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 539 188 T3

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)_l(Lys)_m(His)_n(Om)_o(Xaa)_x according to formula I;

<400> 1

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)_l(Lys)_m(His)_n(Om)_o(Xaa)_x according to formula I;

<400> 2

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)_l(Lys)_m(His)_n(Om)_o(Xaa)_x according to formula I;

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)_l(Lys)_m(His)_n(Om)_o(xaa)_x according to formula I;

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)_l(Lys)_m(His)_n(Orn)_o(Xaa)_x according to formula I;

<400> 5

ES 2 539 188 T3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)₁(Lys(m))(His)n(Om)₅(Xaa)₁₀x according to formula I;

<400> 6

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)₁(Lys(m))(His)n(Om)₅(Xaa)₁₀x according to formula I;

<400> 7

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)₁(Lys(m))(His)n(Om)₅(Xaa)₁₀x according to formula I;

<400> 8

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)₁(Lys(m))(His)n(Om)₅(Xaa)₁₀x according to formula I;

<400> 9

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT

ES 2 539 188 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)*l*(Lys(*m*))(His)*n*(Om)*o*(Xaa)*x* according to formula I;

<400> 10

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)*l*(Lys(*m*))(His)*n*(Om)*o*(Xaa)*x* according to formula I;

<400> 11

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)*l*(Lys(*m*))(His)*n*(Om)*o*(Xaa)*x* according to formula I;

<400> 12

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)*l*(Lys(*m*))(His)*n*(Om)*o*(Xaa)*x* according to formula I;

<400> 13

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)*l*(Lys(*m*))(His)*n*(Om)*o*(Xaa)*x* according to formula I;

<400> 14

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 16

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 17

His His His His His His His His
1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 18

His His His His His His His His His
1 5

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT

ES 2 539 188 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 19

His His His His His His His His His His
1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 20

His His His His His His His His His His His
1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 21

His His His His His His His His His His His His
1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 22

His His His His His His His His His His His His His
1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<400> 23

His His His His His His His His His His His His His His His
1 5 10

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)_l(Lys)_m(His)_n(Om)_o(Xaa)_x according to formula I;

<400> 24

His His His His His His His His His His His His His His His His
1 5 10 15

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)_l(Lys)_m(His)_n(Om)_o(Xaa)_x according to formula I;

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Xaa = omithine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)_l(Lys)_m(His)_n(Om)_o(Xaa)_x according to formula I;

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Xaa = omithine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

ES 2 539 188 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general fomula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<220>
<221> misc_feature
<223> Xaa = Omithine

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general fomula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<220>
<221> misc_feature
<223> Xaa = Omithine

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 28

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general fomula: (Arg)(Lys(m))(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<220>
<221> misc_feature
<223> Xaa = Omithine

ES 2 539 188 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 29

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)l(Lys(m)(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<220>
<221> misc_feature
<223> Xaa = Omithine

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)l(Lys(m)(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(14)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 31

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Inventive oligopeptide having the general formula: (Arg)l(Lys(m)(His)n(Om)o(Xaa)x according to formula I;

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Xaa = Omithine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 32

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 33
 <211> 13
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Beschreibung der sequenz: Koszak-sequenz (s. Beschreibung s. 31)

<400> 33
 gccgccacca ugg 13

<210> 34
 <211> 15
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Beschreibung der sequenz: generische Sequenz einer Stabilisierungssequenz (s. Beschreibung S. 32)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n = C oder u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = jedes natuerlich auftretende Nukleotid oder ein Analog davon

<220>
 <221> repeat_unit
 <222> (5)..(5)
 <223> x = beliebig

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n = U oder A

<220>
 <221> repeat_unit
 <222> (10)..(10)
 <223> x = beliebig

ES 2 539 188 T3

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> n = pyrimidine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n is a, c, g, or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = C oder U

<400> 34
 nccancccn ucnc 15

<210> 35
 <211> 1882
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> description of sequence: construct CAP-Ppluc(wt)-muag-A70-C30

<400> 35

```

gggagaaagc uuggcauucc gguacuguug guaaagccac cauggaagac gccaaaaaca      60
uaaagaaagg cccggcgcca uucuauccgc uggaagaugg aaccgcugga gagcaacugc      120
avaaggcuau gaagagauac gccucgguuc cuggaacaau ugcuuuuaca gaugcacaua      180
ucgaggugga caucacuuc gcugaguacu ucgaaauguc cguucgguug gcagaagcua      240
ugaaacgaua ugggcugaau acaaaucaca gaaucgucgu augcagugaa aacucucuuc      300
aaauuuuuau gccgguguug ggcgcguuau uuaucggagu ugcaguugcg cccgcgaacg      360
acauuuauaa ugaacgugaa uugcucaaca guaugggcau uucgcagccu accguggugu      420
ucguuuccaa aaaggguug caaaaauuu ugaacgugca aaaaagcuc ccaucaucc      480
aaaaauuuau uaucauggau ucuaaacgg auuaccaggg auuucagucg auguacacgu      540
ucgucacauc ucaucuaccu cccgguuuua augaaucga uuuugugcca gaguccuucg      600
auagggacaa gacaauugca cugaucauga acuccucugg aucuacuggu cugccuaaag      660
gugucgcucu gccucauaga acugccugcg ugagauucuc gcaugccaga gauccuuuu      720
uuggcaauca aaucuuuccg gauacugcga uuuuaagugu uguuccauuc caucacgguu      780
uuggaauguu uacuaacacuc ggauuuuga uauguggauu ucgagucguc uuaauguaua      840
gauuugaaga agagcuguuu cugaggagcc uucaggauua caagauuca agugcgcugc      900
uggugccaac ccuauucucc uucuuvcgcca aaagcacucu gauugacaaa uacgauuuau      960
cuauuuuaca cgaaaugcu ucugguggcg cuccccucuc uaaggaaguc ggggaagcgg      1020
    
```

ES 2 539 188 T3

uugccaagag guuccaucug ccagguauca ggaaggaaua ugggucacu gagacuacau 1080
 cagcuauucu gauuacaccc gagggggaug auaaacccggg cgcggucggu aaaguuguuc 1140
 cauuuuuuga agcgaagguu guggaucugg auaccgggaa aacgcugggc guuaaucaaa 1200
 gaggcgaacu gugugugaga gguccuaua uuauguccgg uuauguaaac aauccggaag 1260
 cgaccaacgc cuugauugac aaggauggau ggcuacauuc uggagacaua gcuuacuggg 1320
 acgaagacga acacuucuuc aucguugacc gccugaaguc ucugauuaag uacaaaggcu 1380
 aucagguggc ucccgcugaa uuggaaucua ucuugcucca acacccaac aucuucgagc 1440
 caggugucgc agguucuucc gacgaugacg ccggugaacu ucccgccgc guuguuguuu 1500
 uggagcacgg aaagacgaug acggaaaaag agaucgugga uuacgucgcc agucaaguua 1560
 caaccgcgaa aaaguugcgc ggaggaguug uguuugugga cgaaguaccg aaaggucuua 1620
 ccggaaaacu cgacgcaaga aaaaucagag agauccucau aaaggccaag aaggcggaa 1680
 agaucgccgu guaaaucuag uuauaagacu gacuagcccg augggccucc caacgggccc 1740
 uccuccccuc cuugcaccga gauuaauaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa auauuccccc ccccccccc ccccccccc 1860
 ccccucua g acaauuggaa uu 1882

<210> 36

<211> 1857

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> description of sequence: construct CAP-Ppluc(GC)-muag-A70-C30

<400> 36

gggagaaagc uugaggauug aggacgcca gaacaucaag aagggcccg cgcccuucua 60
 cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugagc gguacgccu 120
 ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
 guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
 ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccg ugcugggcgc 300
 ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
 gaacagcaug gggauccagc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420
 gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480
 gaccgacuac caggguucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgccggg 540
 cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau 600
 caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc 660
 cugcgugcgc uucucgcacg cccgggacc caucuucggc aaccagauca ucccggacac 720
 cgccauccug agcguugguc cguuccacca cggcuucggc auguucacga cccugggcua 780
 ccucaucugc ggcuuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugc 840

gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccucgu ucagcuucuu 900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg 960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggcga ggccguggcc aagcgguucc accucccggg 1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg 1080
ggacgacaag ccgggcgccc ugaggcaaggu ggucccguuu uucgaggcca agguggugga 1140
ccuggacacc ggcaagacc ugaggcugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcggggggc 1200
gaugaucaug agcggcuacg ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga 1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320
cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcggcg ccgagcugga 1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
cgacgccggc gagcugcccg ccgagguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg 1560
cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccguguaag acuaguuaa 1680
agacugacua gcccgaugg ccucccaacg ggcccuccuc cccuccuugc accgagauua 1740
auaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1800
aaaaauuuu ccccccccc ccccccccc ccccccccc ucuagacaau uggauuu 1857

<210> 37
 <211> 1653
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> description of sequence: coding sequence of the sequence according to SEQ ID NO: 35

<400> 37

auggaagacg ccaaaaacau aaagaaaggc ccggcgccau ucuauccgcu ggaagaugga 60
accgcuggag agcaacugca uaaggcuau aagagauacg cccugguucc uggaacaauu 120
gcuuuuacag augcacauau cgagguggac aucacuacg cugaguacuu cgaaaugucc 180
guucgguuug cagaagcuau gaaacgauau gggcugaaua caaauacag aaucgucgua 240
ugcagugaaa acucucuca auucuuuau ccgguguuug gcgcuuuuu uaucggaguu 300
gcaguugcgc ccgccaacga cauuuuuuu gaacgugaau ugcuaacag uaugggcauu 360
ucgcagccua ccgugguguu cguuuccaaa aagggguugc aaaaauuuu gaacgugcaa 420
aaaaagcucc caaucaucca aaaauuuuu aucauggauu cuaaaacgga uuaccagggg 480
uuucagucga uguacacguu cgucacaucu caucuaccuc ccgguuuuua ugaauacgau 540
uuugugccag aguccuucga uagggacaag acaauugcac ugaucaugaa cuccucugga 600
ucucaggguc ugccuaaagg ugucgcucug ccucauagaa cugccugcgu gagauucug 660
caugccagag auccuuuuu uggcaaucaa aucauuccgg auacugcgau uuuaaguguu 720

ES 2 539 188 T3

guuccauucc	aucacgguuu	uggaauguuu	acuacacucg	gauauuugau	auguggauuu	780
cgagucgucu	uaauguauag	auuugaagaa	gagcuguuuc	ugaggagccu	ucaggauuac	840
aagauucaa	gugcgcugcu	ggugccaacc	cuauucuccu	ucuucgcaa	aagcacucug	900
auugacaaa	acgauuuau	uaauuuacac	gaaauugcuu	cugguggcgc	ucuccucucu	960
aaggaagucg	gggaagcgg	ugccaagagg	uuccaucugc	cagguaucag	gcaaggauau	1020
gggucacug	agacuacauc	agcuauucug	auuacacccg	agggggauga	uaaaccgggc	1080
gcgugcgua	aaguuguucc	auuuuuugaa	gcgaaggguu	uggaucugga	uaccgggaaa	1140
acgucggcg	uuauucaaag	aggcgaacug	ugugugagag	guccuugau	uauguccggu	1200
uauguaaaca	auccggaagc	gaccaacgcc	uugauugaca	aggauuggau	gcuacauucu	1260
ggagacauag	cuuacuggga	cgaagacgaa	cacuucuuca	ucguugaccg	ccugaagucu	1320
cugauuaagu	acaaaggcua	ucagguggcu	cccgcugaau	uggaauccau	cuugcuccaa	1380
cacccaaca	ucuucgacgc	aggugucgca	ggucuucccg	acgaugacgc	cggugaacuu	1440
cccgccgccg	uuguuguuuu	ggagcacgga	aagacgauga	cggaaaaaga	gaucguggau	1500
uacgucgcca	gucaaguaac	aaccgcgaaa	aaguugcgcg	gaggaguugu	guuuguggac	1560
gaaguaccga	aaggucuuac	cggaaaacuc	gacgcaagaa	aaucagaga	gauccucaua	1620
aaggccaaga	agggcggaaa	gaucgccgug	uaa			1653

<210> 38

<211> 1653

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> description of sequence: the GC-optimized coding sequence of the sequence according to SEQ ID NO: 36

<400> 38

auggaggacg	ccaagaacau	caagaagggc	ccggcgcccu	ucuacccgcu	ggaggacggg	60
accgccggcg	agcagcucca	caaggccaug	aagcgguacg	cccuggugcc	gggcacgauc	120
gccuucaccg	acgccacau	cgaggucgac	aucaaccuacg	cggaguacuu	cgagaugagc	180
gugcgcugg	ccgaggccau	gaagcgguac	ggccugaaca	ccaaccaccg	gaucguggug	240
ugcucggaga	acagccugca	guucuucaug	ccggugcugg	gcgccucuu	caucggcgug	300
gccgucgccc	cggcgaacga	caucuacaac	gagcgggagc	ugcugaacag	cauggggau	360
agccagccga	ccgugguguu	cgugagcaag	aagggccugc	agaagauccu	gaacgugcag	420
aagaagcugc	ccaucaucca	gaagaucauc	aucauggaca	gcaagaccga	cuaccagggc	480
uuccagucga	uguacacguu	cgugaccagc	caccucccgc	cgggcuucaa	cgaguacgac	540
uucgucccg	agagcuucga	ccgggacaag	accaucgccc	ugaucaugaa	cagcagcggc	600
agcaccggcc	ugccgaaggg	gguggcccug	ccgcaccgga	ccgccugcgu	gcgcuucucg	660
cacgcccg	acccaucuu	cggcaaccag	aucaucccgg	acaccgccau	ccugagcgug	720

gugccguucc accacggcuu cggcauguuc acgacccugg gcuaccucau cugcggcuuc 780
cggguggucc ugauguaccg guucgaggag gagcuguucc ugcggagccu gcaggacuac 840
aagauccaga gcgcgcugcu cgugccgacc cuguucagcu ucuucgcaa gagcaccug 900
aucgacaagu acgaccuguc gaaccugcac gagaucgcca gcgggggcgc cccgcugagc 960
aaggaggugg gcgaggccgu ggccaagcgg uuccaccucc cgggcauccg ccaggguac 1020
ggccugaccg agaccacgag cgcgauccug aucacccccg agggggacga caagccgggc 1080
gccgugggca aggugguccc guucuucgag gccaaaggugg uggaccugga caccggcaag 1140
accugggcg ugaaccagcg gggcgagcug ugcgugcggg ggccgaugau caugagcggc 1200
uacgugaaca acccggaggc caccaacgcc cucaucgaca aggacggcug gcugcacagc 1260
ggcgacaucg ccuacuggga cgaggacgag cacuucuua ucgucgaccg gcugaagucg 1320
cugaucaagu acaagggcua ccagguggcg ccggccgagc uggagagcau ccugcuccag 1380
cacccaaca ucuucgacgc cggcguggcc gggcugccgg acgacgacgc cggcgagcug 1440
ccggccgcg ugguggugcu ggagcacggc aagaccauga cggagaagga gaucgucgac 1500
uacguggcca gccaggugac caccgccaag aagcugcggg gcggcguggu guucguggac 1560
gagguccga agggccugac cgggaagcuc gacgcccgga agauccgca gauccugauc 1620
aaggccaaga agggcgcaa gaucgccgug uaa 1653

<210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of sequence: exemplary oligopeptide according to generic formula (I)
 <400> 39

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His His
1 5 10

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of sequence: exemplary oligopeptide according to generic formula (I)
 <400> 40

His His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg His His His
1 5 10 15

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

ES 2 539 188 T3

<220>

<223> Description of sequence: exemplary oligopeptide according to generic formula (I)

<400> 41

Tyr Ser Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ser Ser Tyr
1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of sequence: exemplary oligopeptide according to generic formula (I)

<400> 42

His His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ser Ser Tyr
1 5 10 15

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of sequence: exemplary oligopeptide according to generic formula (I)

<400> 43

Arg Lys His Arg Lys His Arg Lys His Arg Lys His
1 5 10

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

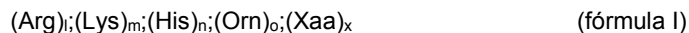
<223> Description of sequence: exemplary oligopeptide according to generic formula (I)

<400> 44

Tyr Arg Lys His Arg Lys His Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. ARN monohebra inmunoestimulador complejo que comprende al menos un ARN (molécula) complejo con uno o más oligopéptidos no unidos al ARN de forma covalente, caracterizado porque la proporción nitrógeno/fosfato (ratio N/P) del al menos un ARN del ARN complejo con uno o más oligopéptidos está en el intervalo de 0,5-50 y porque el oligopéptido tiene una longitud de 8 a 15 aminoácidos y tiene la siguiente fórmula empírica:



donde:

- $l + m + n + o + x = 8-15$, y l , m , n u o , independientemente uno del otro, pueden ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, siempre que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos un 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y
 - Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado entre aminoácidos nativos o no nativos excepto de Arg, Lys, His u Orn; y
 - x puede ser cualquier número seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, siempre que el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido.
2. ARN complejo según la reivindicación 1, caracterizado porque el al menos un ARN (molécula) es un ARNm.
3. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el oligopéptido tiene una longitud de 8 a 14, 8 a 13, 8 a 12, ó 9 a 12 ó 9 a 11 aminoácidos.
4. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el contenido total de Arg, Lys, His y Orn representa al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de todos los aminoácidos del oligopéptido del ARN complejo.
5. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque Xaa en la fórmula empírica $(\text{Arg})_i;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$ se selecciona de entre aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra, incluyendo aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba neutra y aminoácidos que tienen una cadena lateral polar neutra.
6. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el oligopéptido de fórmula empírica $(\text{Arg})_i;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$ no comprende aminoácidos en uno o en ambos extremos terminales, que comprenden una cadena lateral ácida.
7. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el oligopéptido de fórmula empírica $(\text{Arg})_i;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$ comprende aminoácidos neutros o básicos en uno o en ambos extremos terminales, o aminoácidos básicos en uno o en ambos extremos terminales y al menos uno, preferentemente al menos dos, en especial al menos tres aminoácidos básicos en ambos extremos terminales.
8. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el oligopéptido de fórmula empírica $(\text{Arg})_i;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$ comprende un tramo de al menos 3 aminoácidos básicos contiguos dentro de su secuencia.
9. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el oligopéptido de fórmula empírica $(\text{Arg})_i;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$ comprende al menos 1, 2 ó 3 aminoácidos no catiónicos en uno o ambos extremos terminales, seleccionándose preferentemente el aminoácido no catiónico de histidina.
10. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el al menos un ARN (molécula) del ARN complejo es un ARNm, codificando el ARNm para una proteína o un péptido terapéuticamente activos, una proteína o péptido inmunoestimulador, un antígeno tumoral o un anticuerpo.
11. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el ARN es un ARN modificado, en particular un ARN estabilizado, en comparación con el ARN tipo salvaje.
12. ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la relación en masa entre el al menos un ARN (molécula) del ARN complejo y el uno o más oligopéptidos está

en un intervalo de 1:100 a 1:0,5, o tiene un valor de 1:50 a 1:1, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:45, 1:40, 1:35, 1:30, 1:25, 1:20, 1:15, 1:10, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1 o 1:0,5.

- 5 **13.** ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la relación molar entre el al menos un ARN (molécula) del ARN complejo y el uno o más oligopéptidos está en un intervalo de 1:20.000 a 1:500 o 1:250, o en un intervalo de 1:10.000 a 1:1.000, o tiene un valor de 1:9.500 a 1:9.000, 1:8.500, 1:8.000, 1:7.500, 1:7.000, 1:6.500, 1:6.000, 1:5.500, 1:5.000, 1:4.500, 1:4.000, 1:3.500, 1:3.000, 1:2.500, 1:2.000, 1:1.500, 1:1.000, 1:500, 1:450, 1:400, 1:350, 1:300 o 1:250.
- 10 **14.** ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la proporción nitrógeno/fosfato (ratio N/P) está en un intervalo de 0,75-25.
- 15 **15.** ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque el oligopéptido se selecciona de entre el grupo consistente en: Arg₉His₃, His₃Arg₉His₃, TyrSerSerArg₉SerSerTyr, His₃Arg₉SerSerTyr, (ArgLysHis)₄, Tyr(ArgLysHis)₂Arg; o de Arg₈, Arg₉, Arg₁₀, Arg₁₁, Arg₁₂, Arg₁₃, Arg₁₄, Arg₁₅ (SEQ ID NOS: 1-8); Lys₈, Lys₉, Lys₁₀, Lys₁₁, Lys₁₂, Lys₁₃, Lys₁₄, Lys₁₅ (SEQ ID NOS: 9-16); His₈, His₉, His₁₀, His₁₁, His₁₂, His₁₃, His₁₄, His₁₅ (SEQ ID NOS: 17-24) y Orn₈, Orn₉, Orn₁₀, Orn₁₁, Orn₁₂, Orn₁₃, Orn₁₄, Orn₁₅ (SEQ ID NOS: 25-32).
- 16.** ARN complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque el ARN complejo se formula como una composición farmacéutica.

1	<u>GGGAGAAAGC</u>	<u>UUGGCAUUCC</u>	<u>GGUACUGUUG</u>	<u>GUAAAGCCAC</u>	<u>CAUGGAAGAC</u>
51	<u>GCCAAAAACA</u>	<u>UAAAGAAAGG</u>	<u>CCCGGCGCCA</u>	<u>UUCUAUCCGC</u>	<u>UGGAAGAUGG</u>
101	<u>AACCGCUGGA</u>	<u>GAGCAACUGC</u>	<u>AUAAGGCUAU</u>	<u>GAAGAGAUAC</u>	<u>GCCUGGUUC</u>
151	<u>CUGGAACAAU</u>	<u>UGCUIIUACA</u>	<u>GAUGCACUA</u>	<u>UCGAGGUGGA</u>	<u>CAUCACUAC</u>
201	<u>GCUGAGUACU</u>	<u>UCGAAAUGUC</u>	<u>CGUUCGGUUG</u>	<u>GCAGAAGCUA</u>	<u>UGAAACGAUA</u>
251	<u>UGGGCUGAAU</u>	<u>ACAAAUCACA</u>	<u>GAAUCGUCGU</u>	<u>AUGCAGUGAA</u>	<u>AACUCUCUUC</u>
301	<u>AAUUCUUUAU</u>	<u>GCCGGUGUUG</u>	<u>GGCGCGUUAU</u>	<u>UUAUCGGAGU</u>	<u>UGCAGUUGCG</u>
351	<u>CCCGCGAACG</u>	<u>ACAUUUUAAA</u>	<u>UGAACGUGAA</u>	<u>UUGCUCACAA</u>	<u>GU AUGGGCAU</u>
401	<u>UUCGCAGCCU</u>	<u>ACCGUGGUGU</u>	<u>UCGUUCCAA</u>	<u>AAAGGGGUUG</u>	<u>CAAAAAUUU</u>
451	<u>UGAACGUGCA</u>	<u>AAAAAAGCUC</u>	<u>CCAUCAUCC</u>	<u>AAAAAAUUAU</u>	<u>UAUCAUGGAU</u>
501	<u>UCUAAAACGG</u>	<u>AUUACCAGGG</u>	<u>AUUUCAGUCG</u>	<u>AUGUACACGU</u>	<u>UCGUCACAUC</u>
551	<u>UCAUCUACCU</u>	<u>CCCGGUUUUA</u>	<u>AUGAAUACGA</u>	<u>UUUUGUGCCA</u>	<u>GAGUCCUUCG</u>
601	<u>AUAGGGACAA</u>	<u>GACAAUUGCA</u>	<u>CUGAUCAUGA</u>	<u>ACUCCUCUGG</u>	<u>AUCUACUGGU</u>
651	<u>CUGCCUAAAG</u>	<u>GUGUCGCUCU</u>	<u>GCCUCAUAGA</u>	<u>ACUGCCUGCG</u>	<u>UGAGAUUCUC</u>
701	<u>GCAUGCCAGA</u>	<u>GAUCCUAUUU</u>	<u>UUGGCAAUCA</u>	<u>AAUCAUCCG</u>	<u>GAUACUGCGA</u>
751	<u>UUUUAAGUGU</u>	<u>UGUUCCAUUC</u>	<u>CAUCACGGUU</u>	<u>UUGGAAUGUU</u>	<u>UACUACACUC</u>
801	<u>GGAUUUUGA</u>	<u>UAUGUGGAUU</u>	<u>UCGAGUCGUC</u>	<u>UUAUGUAUA</u>	<u>GAUUUGAAGA</u>
851	<u>AGAGCUGUUU</u>	<u>CUGAGGAGCC</u>	<u>UUCAGGAUUA</u>	<u>CAAGAUUCA</u>	<u>AGUGCGCUGC</u>
901	<u>UGGUGCCAAC</u>	<u>CCUAUUCUCC</u>	<u>UUCUUCGCCA</u>	<u>AAAGCACUCU</u>	<u>GAUUGACAAA</u>
951	<u>UACGAUUUAU</u>	<u>CUAAUUUACA</u>	<u>CGAAAUUGCU</u>	<u>UCUGGUGGCG</u>	<u>CUCCCCUCUC</u>
1001	<u>UAAGGAAGUC</u>	<u>GGGGAAGCGG</u>	<u>UUGCCAAGAG</u>	<u>GUUCCAUCUG</u>	<u>CCAGGUAUCA</u>
1051	<u>GGCAAGGAUA</u>	<u>UGGGCUCACU</u>	<u>GAGACUACAU</u>	<u>CAGCUAUUCU</u>	<u>GAUACACCC</u>
1101	<u>GAGGGGGAUG</u>	<u>AUAAACCGGG</u>	<u>CGCGGUCGGU</u>	<u>AAAGUUGUUC</u>	<u>CAUUUUUGA</u>
1151	<u>AGCGAAGGUU</u>	<u>GUGGAUCUGG</u>	<u>AUACCGGGAA</u>	<u>AACGCUGGGC</u>	<u>GUAAAUCAA</u>
1201	<u>GAGGCGAACU</u>	<u>GUGUGUGAGA</u>	<u>GGUCCUAUGA</u>	<u>UUAUGUCCGG</u>	<u>UUAUGUAAAC</u>
1251	<u>AAUCCGGAAG</u>	<u>CGACCAACGC</u>	<u>CUUGAUUGAC</u>	<u>AAGGAUGGAU</u>	<u>GGCUACAUC</u>
1301	<u>UGGAGACUA</u>	<u>GCUUACUGGG</u>	<u>ACGAAGACGA</u>	<u>ACACUUCUUC</u>	<u>AUCGUUGACC</u>
1351	<u>GCCUGAAGUC</u>	<u>UCUGAUUAAG</u>	<u>UACAAAGGCU</u>	<u>AUCAGGUGGC</u>	<u>UCCCGCUGAA</u>
1401	<u>UUGGAAUCCA</u>	<u>UCUUGCUCCA</u>	<u>ACACCCCAAC</u>	<u>AUCUUCGACG</u>	<u>CAGGUGUCGC</u>
1451	<u>AGGUCUUCCC</u>	<u>GACGAUGACG</u>	<u>CCGGUGAACU</u>	<u>UCCCGCCGCC</u>	<u>GUUGUUGUUU</u>
1501	<u>UGGAGCACGG</u>	<u>AAAGACGAUG</u>	<u>ACGGAAAAAG</u>	<u>AGAUCGUGGA</u>	<u>UUACGUCGCC</u>
1551	<u>AGUCAAGUAA</u>	<u>CAACCGCGAA</u>	<u>AAAGUUGC GC</u>	<u>GGAGGAGUUG</u>	<u>UGUUUGUGGA</u>
1601	<u>CGAAGUACCG</u>	<u>AAAGGUCUUA</u>	<u>CCGGAAAACU</u>	<u>CGACGCAAGA</u>	<u>AAAUCAGAG</u>
1651	<u>AGAUCUCUACU</u>	<u>AAAGGCCAAG</u>	<u>AAGGGCGGAA</u>	<u>AGAUCGCCGU</u>	<u>GUAAUUCUAG</u>
1701	<u>UUUAUAGACU</u>	<u>GACUAGCCCG</u>	<u>AUGGGCCUCC</u>	<u>CAACGGGCCC</u>	<u>UCCUCCCCUC</u>
1751	<u>CUUGCACCGA</u>	<u>GAUUAUUAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>
1801	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AUAUCCCCC</u>	<u>CCCCCCCCC</u>
1851	<u>CCCCCCCCC</u>	<u>CCCCUCUAG</u>	<u>ACAAUUGGAA</u>	<u>UU</u>	

Figura 1

1	<u>GGGAGAAAGC</u>	<u>UUGAGGAUGG</u>	<u>AGGACGCCAA</u>	<u>GAACAUCAAG</u>	<u>AAGGGCCC</u>
51	<u>CGCCCUUCUA</u>	<u>CCCUCUGGAG</u>	<u>GACGGGACCG</u>	<u>CCGGCGAGCA</u>	<u>GCUCCACAAG</u>
101	<u>GCCAUGAAGC</u>	<u>GGUACGCCCU</u>	<u>GGUGCCGGGC</u>	<u>ACGAUCGCCU</u>	<u>UCACCGACGC</u>
151	<u>CCACAUCGAG</u>	<u>GUCGACAUCA</u>	<u>CCUACGCGGA</u>	<u>GUACUUCGAG</u>	<u>AUGAGCGUGC</u>
201	<u>GCCUGGCCGA</u>	<u>GGCCAUGAAG</u>	<u>CGGUACGGCC</u>	<u>UGAACACCAA</u>	<u>CCACCGGAUC</u>
251	<u>GUGGUGUGCU</u>	<u>CGGAGAACAG</u>	<u>CCUGCAGUUC</u>	<u>UUCAUGCCGG</u>	<u>UGCUGGGCGC</u>
301	<u>CCUCUUCAUC</u>	<u>GGCGUGGCCG</u>	<u>UCGCCCCGGC</u>	<u>GAACGACAUC</u>	<u>UACAACGAGC</u>
351	<u>GGGAGCUGCU</u>	<u>GAACAGCAUG</u>	<u>GGGAUCAGCC</u>	<u>AGCCGACCGU</u>	<u>GGUGUUCGUG</u>
401	<u>AGCAAGAAGG</u>	<u>GCCUGCAGAA</u>	<u>GAUCCUGAAC</u>	<u>GUGCAGAAGA</u>	<u>AGCUGCCCAU</u>
451	<u>CAUCCAGAAG</u>	<u>AUCAUCAUCA</u>	<u>UGGACAGCAA</u>	<u>GACCGACUAC</u>	<u>CAGGGCUUCC</u>
501	<u>AGUCGAUGUA</u>	<u>CACGUUCGUG</u>	<u>ACCAGCCACC</u>	<u>UCCCCCGGG</u>	<u>CUUCAACGAG</u>
551	<u>UACGACUUCG</u>	<u>UCCCCGAGAG</u>	<u>CUUCGACCGG</u>	<u>GACAAGACCA</u>	<u>UCGCCUGAU</u>
601	<u>CAUGAACAGC</u>	<u>AGCGGCAGCA</u>	<u>CCGGCCUGCC</u>	<u>GAAGGGGGUG</u>	<u>GCCUGCCGC</u>
651	<u>ACCGGACCGC</u>	<u>CUGCGUGCGC</u>	<u>UUCUCGCACG</u>	<u>CCCGGGACCC</u>	<u>CAUCUUCGGC</u>
701	<u>AACCAGAUA</u>	<u>UCCCCGACAC</u>	<u>CGCCAUCCUG</u>	<u>AGCGUGGUGC</u>	<u>CGUCCACCA</u>
751	<u>CGGCUUCGGC</u>	<u>AUGUUCACGA</u>	<u>CCUUGGGCUA</u>	<u>CCUCAUCUGC</u>	<u>GGCUUCCGGG</u>
801	<u>UGGUCCUGAU</u>	<u>GUACCGGUUC</u>	<u>GAGGAGGAGC</u>	<u>UGUUCUGCG</u>	<u>GAGCCUGCAG</u>
851	<u>GACUACAAGA</u>	<u>UCCAGAGCGC</u>	<u>GCUGCUCGUG</u>	<u>CCGACCCUGU</u>	<u>UCAGCUUCUU</u>
901	<u>CGCCAAGAGC</u>	<u>ACCCUGAUCG</u>	<u>ACAAGUACGA</u>	<u>CCUGUCGAAC</u>	<u>CUGCACGAGA</u>
951	<u>UCGCCAGCGG</u>	<u>GGGCGCCCCG</u>	<u>CUGAGCAAGG</u>	<u>AGGUGGGCGA</u>	<u>GGCCGUGGCC</u>
1001	<u>AAGCGGUUCC</u>	<u>ACCUCCGGG</u>	<u>CAUCCGCCAG</u>	<u>GGCUACGGCC</u>	<u>UGACCGAGAC</u>
1051	<u>CACGAGCGCG</u>	<u>AUCCUGAUCA</u>	<u>CCCCGAGGG</u>	<u>GGACGACAAG</u>	<u>CCGGGCGCCG</u>
1101	<u>UGGGCAAGGU</u>	<u>GGUCCCGUUC</u>	<u>UUCGAGGCCA</u>	<u>AGGUGGUGGA</u>	<u>CCUGGACACC</u>
1151	<u>GGCAAGACCC</u>	<u>UGGGCGUGAA</u>	<u>CCAGCGGGGC</u>	<u>GAGCUGUGCG</u>	<u>UGC GGGGGCC</u>
1201	<u>GAUGAUCAUG</u>	<u>AGCGGCUACG</u>	<u>UGAACAAACC</u>	<u>GGAGGCCACC</u>	<u>AACGCCCUCA</u>
1251	<u>UCGACAAGGA</u>	<u>CGGCUGGCUG</u>	<u>CACAGCGGCG</u>	<u>ACAUCGCCUA</u>	<u>CUGGGACGAG</u>
1301	<u>GACGAGCACU</u>	<u>UCUUCAUCGU</u>	<u>CGACCGGCUG</u>	<u>AAGUCGCUGA</u>	<u>UCAAGUACAA</u>
1351	<u>GGGCUACCAG</u>	<u>GUGGCGCCGG</u>	<u>CCGAGCUGGA</u>	<u>GAGCAUCCUG</u>	<u>CUCCAGCACC</u>
1401	<u>CCAACAUCUU</u>	<u>CGACGCCGGC</u>	<u>GUGGCCGGGC</u>	<u>UGCCGGACGA</u>	<u>CGACGCCGGC</u>
1451	<u>GAGCUGCCGG</u>	<u>CCGCGGUGGU</u>	<u>GGUGCUGGAG</u>	<u>CACGGCAAGA</u>	<u>CCAUGACGGA</u>
1501	<u>GAAGGAGAUC</u>	<u>GUCGACUACG</u>	<u>UGGCCAGCCA</u>	<u>GGUGACCACC</u>	<u>GCCAAGAAGC</u>
1551	<u>UGCGGGGCGG</u>	<u>CGUGGUGUUC</u>	<u>GUGGACGAGG</u>	<u>UCCCGAAGGG</u>	<u>CCUGACCGGG</u>
1601	<u>AAGCUCGACG</u>	<u>CCCGGAAGAU</u>	<u>CCGCGAGAUC</u>	<u>CUGAUC AAGG</u>	<u>CCAAGAAGGG</u>
1651	<u>CGGCAAGAUC</u>	<u>GCCGUGUAAG</u>	<u>ACUAGUUAUA</u>	<u>AGACUGACUA</u>	<u>GCCCGAUGGG</u>
1701	<u>CCUCCCAACG</u>	<u>GGCCCUCCUC</u>	<u>CCUCCUUGC</u>	<u>ACCGAGAUUA</u>	<u>AUAAAAAAAA</u>
1751	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>
1801	<u>AAAAAAUAUU</u>	<u>CCCCCCCC</u>	<u>CCCCCCCC</u>	<u>CCCCCCCC</u>	<u>UCUAGACAAU</u>
1851	<u>UGGAAUU</u>				

Figura 2

AUG GAA GAC GCC AAA AAC AUA AAG AAA GGC CCG GCG CCA UUC UAU CCG
 CUG GAA GAU GGA ACC GCU GGA GAG CAA CUG CAU AAG GCU AUG AAG AGA
 UAC GCC CUG GUU CCU GGA ACA AUU GCU UUU ACA GAU GCA CAU AUC GAG
 GUG GAC AUC ACU UAC GCU GAG UAC UUC GAA AUG UCC GUU CGG UUG GCA
 GAA GCU AUG AAA CGA UAU GGG CUG AAU ACA AAU CAC AGA AUC GUC GUA
 UGC AGU GAA AAC UCU CUU CAA UUC UUU AUG CCG GUG UUG GGC GCG UUA
 UUU AUC GGA GUU GCA GUU GCG CCC GCG AAC GAC AUU UAU AAU GAA CGU
 GAA UUG CUC AAC AGU AUG GGC AUU UCG CAG CCU ACC GUG GUG UUC GUU
 UCC AAA AAG GGG UUG CAA AAA AUU UUG AAC GUG CAA AAA AAG CUC CCA
 AUC AUC CAA AAA AUU AUU AUC AUG GAU UCU AAA ACG GAU UAC CAG GGA
 UUU CAG UCG AUG UAC ACG UUC GUC ACA UCU CAU CUA CCU CCC GGU UUU
 AAU GAA UAC GAU UUU GUG CCA GAG UCC UUC GAU AGG GAC AAG ACA AUU
 GCA CUG AUC AUG AAC UCC UCU GGA UCU ACU GGU CUG CCU AAA GGU GUC
 GCU CUG CCU CAU AGA ACU GCC UGC GUG AGA UUC UCG CAU GCC AGA GAU
 CCU AUU UUU GGC AAU CAA AUC AUU CCG GAU ACU GCG AUU UUA AGU GUU
 GUU CCA UUC CAU CAC GGU UUU GGA AUG UUU ACU ACA CUC GGA UAU UUG
 AUA UGU GGA UUU CGA GUC GUC UUA AUG UAU AGA UUU GAA GAA GAG CUG
 UUU CUG AGG AGC CUU CAG GAU UAC AAG AUU CAA AGU GCG CUG CUG GUG
 CCA ACC CUA UUC UCC UUC UUC GCC AAA AGC ACU CUG AUU GAC AAA UAC
 GAU UUA UCU AAU UUA CAC GAA AUU GCU UCU GGU GGC GCU CCC CUC UCU
 AAG GAA GUC GGG GAA GCG GUU GCC AAG AGG UUC CAU CUG CCA GGU AUC
 AGG CAA GGA UAU GGG CUC ACU GAG ACU ACA UCA GCU AUU CUG AUU ACA
 CCC GAG GGG GAU GAU AAA CCG GGC GCG GUC GGU AAA GUU GUU CCA UUU
 UUU GAA GCG AAG GUU GUG GAU CUG GAU ACC GGG AAA ACG CUG GGC GUU
 AAU CAA AGA GGC GAA CUG UGU GUG AGA GGU CCU AUG AUU AUG UCC GGU
 UAU GUA AAC AAU CCG GAA GCG ACC AAC GCC UUG AUU GAC AAG GAU GGA
 UGG CUA CAU UCU GGA GAC AUA GCU UAC UGG GAC GAA GAC GAA CAC UUC
 UUC AUC GUU GAC CGC CUG AAG UCU CUG AUU AAG UAC AAA GGC UAU CAG
 GUG GCU CCC GCU GAA UUG GAA UCC AUC UUG CUC CAA CAC CCC AAC AUC
 UUC GAC GCA GGU GUC GCA GGU CUU CCC GAC GAU GAC GCC GGU GAA CUU
 CCC GCC GCC GUU GUU GUU UUG GAG CAC GGA AAG ACG AUG ACG GAA AAA
 GAG AUC GUG GAU UAC GUC GCC AGU CAA GUA ACA ACC GCG AAA AAG UUG
 CGC GGA GGA GUU GUG UUU GUG GAC GAA GUA CCG AAA GGU CUU ACC GGA
 AAA CUC GAC GCA AGA AAA AUC AGA GAG AUC CUC AUA AAG GCC AAG AAG
 GGC GGA AAG AUC GCC GUG UAA

Figura 3

AUG GAG GAC GCC AAG AAC AUC AAG AAG GGC CCG GCG CCC UUC UAC CCG
 CUG GAG GAC GGG ACC GCC GGC GAG CAG CUC CAC AAG GCC AUG AAG CGG
 UAC GCC CUG GUG CCG GGC ACG AUC GCC UUC ACC GAC GCC CAC AUC GAG
GUC GAC AUC ACC UAC GCG GAG UAC UUC GAG AUG AGC GUG CGC CUG GCC
GAG GCC AUG AAG CGG UAC GGC CUG AAC ACC AAC CAC CGG AUC GUG GUG
 UGC UCG GAG AAC AGC CUG CAG UUC UUC AUG CCG GUG CUG GGC GCC CUC
 UUC AUC GGC GUG GCC GUC GCC CCG GCG AAC GAC AUC UAC AAC GAG CGG
GAG CUG CUG AAC AGC AUG GGG AUC AGC CAG CCG ACC GUG GUG UUC GUG
AGC AAG AAG GGC CUG CAG AAG AUC CUG AAC GUG CAG AAG AAG CUG CCC
AUC AUC CAG AAG AUC AUC AUC AUG GAC AGC AAG ACC GAC UAC CAG GGC
UUC CAG UCG AUG UAC ACG UUC GUG ACC AGC CAC CUC CCG CCG GGC UUC
AAC GAG UAC GAC UUC GUC CCG GAG AGC UUC GAC CGG GAC AAG ACC AUC
GCC CUG AUC AUG AAC AGC AGC GGC AGC ACC GGC CUG CCG AAG GGG GUG
GCC CUG CCG CAC CGG ACC GCC UGC GUG CGC UUC UCG CAC GCC CGG GAC
CCC AUC UUC GGC AAC CAG AUC AUC CCG GAC ACC GCC AUC CUG AGC GUG
GUG CCG UUC CAC CAC GGC UUC GGC AUG UUC ACG ACC CUG GGC UAC CUC
AUC UGC GGC UUC CGG GUG GUC CUG AUG UAC CGG UUC GAG GAG GAG CUG
UUC CUG CGG AGC CUG CAG GAC UAC AAG AUC AGC GCG CUG GAC CUC GUG
CCG ACC CUG UUC AGC UUC GCC AAG AGC ACC CUG AUC GAC AAG UAC UAC
GAC CUG UCG AAC CUG CAC GAG AUC GCC AGC GGG GCC CCG CUG AGC AGC
AAG GAG GUG GGC GAG GCC GUG GCC AAG CGG UUC CAC CUC CCG GGC AUC
CGC CAG GGC UAC GGC CUG ACC GAG ACC ACG AGC GCG AUC CUG AUC ACC
CCC GAG GGG GAC GAC AAG CCG GGC GCC GUG GGC AAG GUG GUC CCG UUC
UUC GAG GCC AAG GUG GUG GAC CUG GAC ACC GGC AAG ACC CUG GGC GUG
AAC CAG CGG GGC GAG CUG UGC GUG CGG GGG CCG AUG AUC AUG AGC GGC
UAC GUG AAC AAC CCG GAG GCC ACC AAC GCC CUC AUC GAC AAG GAC GGC
UGG CUG CAC AGC GGC GAC AUC GCC UAC UGG GAC GAG GAC GAG CAC UUC
UUC AUC GUC GAC CGG CUG AAG UCG CUG AUC AAG UAC AAG GGC UAC CAG
GUG GCG CCG GCC GAG CUG GAG AGC AUC CUG CUC CAG CAC CCC AAC AUC
UUC GAC GCC GGC GUG GCC GGG CUG CCG GAC GAC GAC GCC GGC GAG CUG
CCG GCC GCG GUG GUG GUG CUG GAG CAC GGC AAG ACC AUG ACG GAG AAG
GAG AUC GUC GAC UAC GUG GCC AGC CAG GUG ACC ACC GCC AAG AAG CUG
CGG GGC GGC GUG GUG UUC GUG GAC GAG GUC CCG AAG GGC CUG ACC GGG
AAG CUC GAC GCC CGG AAG AUC CGC GAG AUC CUG AUC AAG GCC AAG AAG
GGC GGC AAG AUC GCC GUG UAA

Figura 4

Liberación de IL-6 de hPBMCs

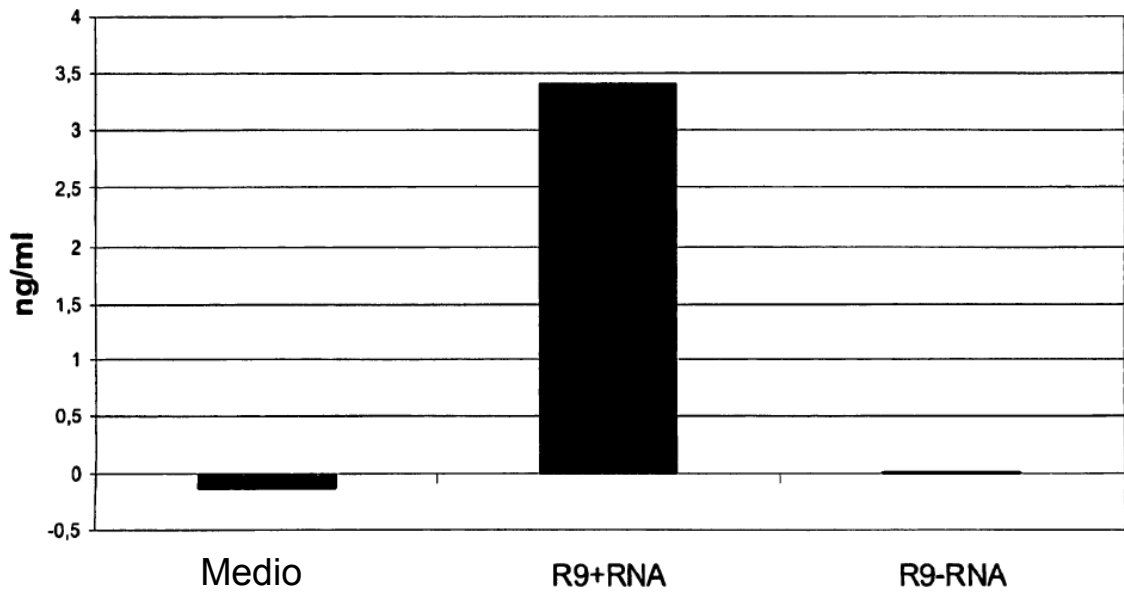


Figura 5

Liberación de TNFalfa de hPBMCs

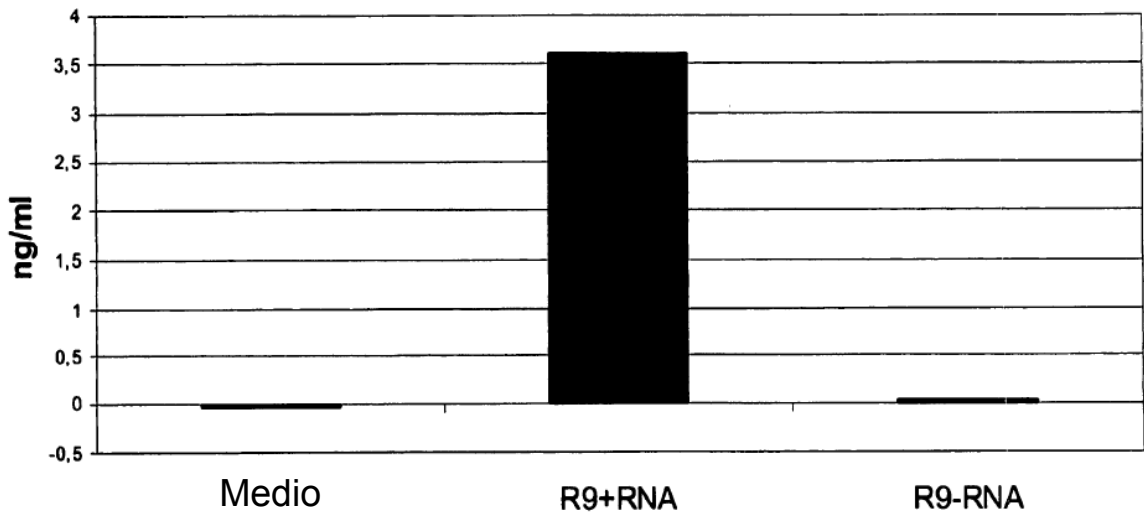


Figura 6

Liberación de TNFalfa en hPBMCs

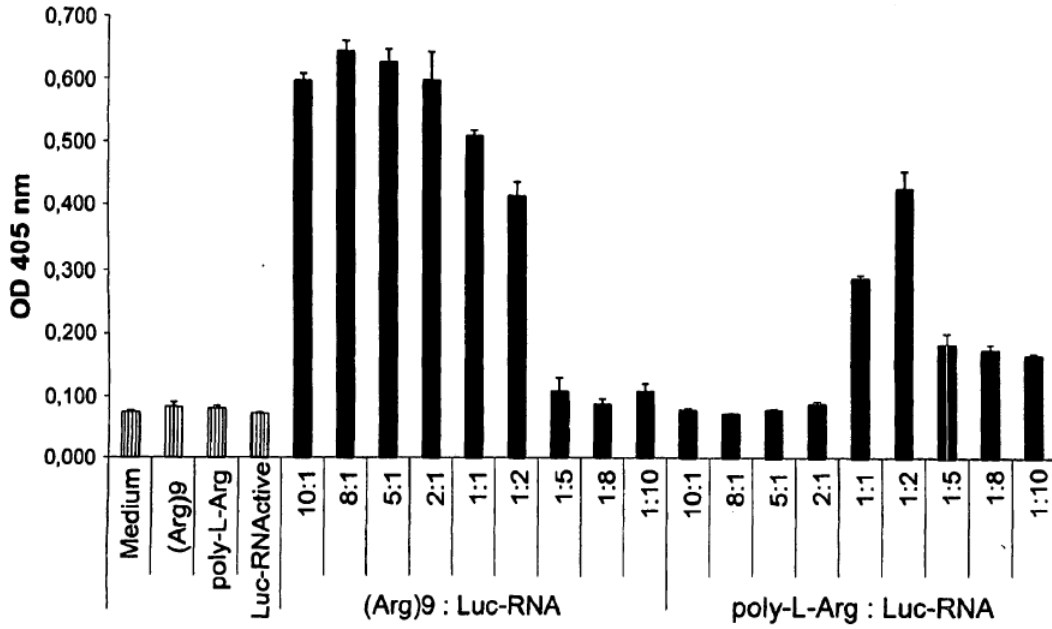


Figura 7

Expresión de Luciferasa en células HeLa

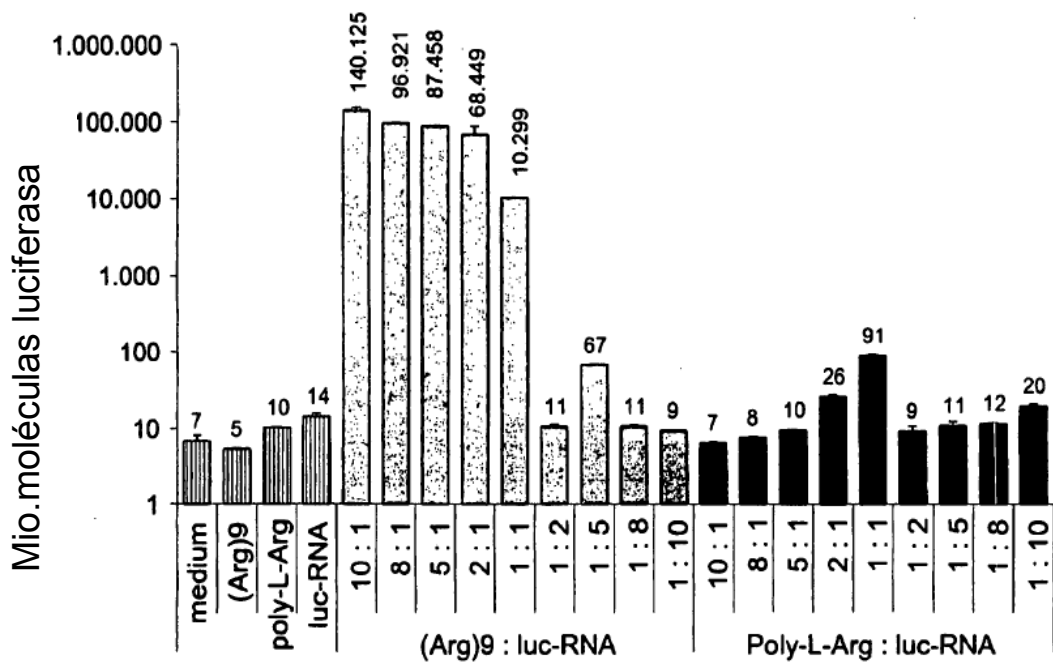


Figura 8

Expresión de Luciferasa en células HeLa

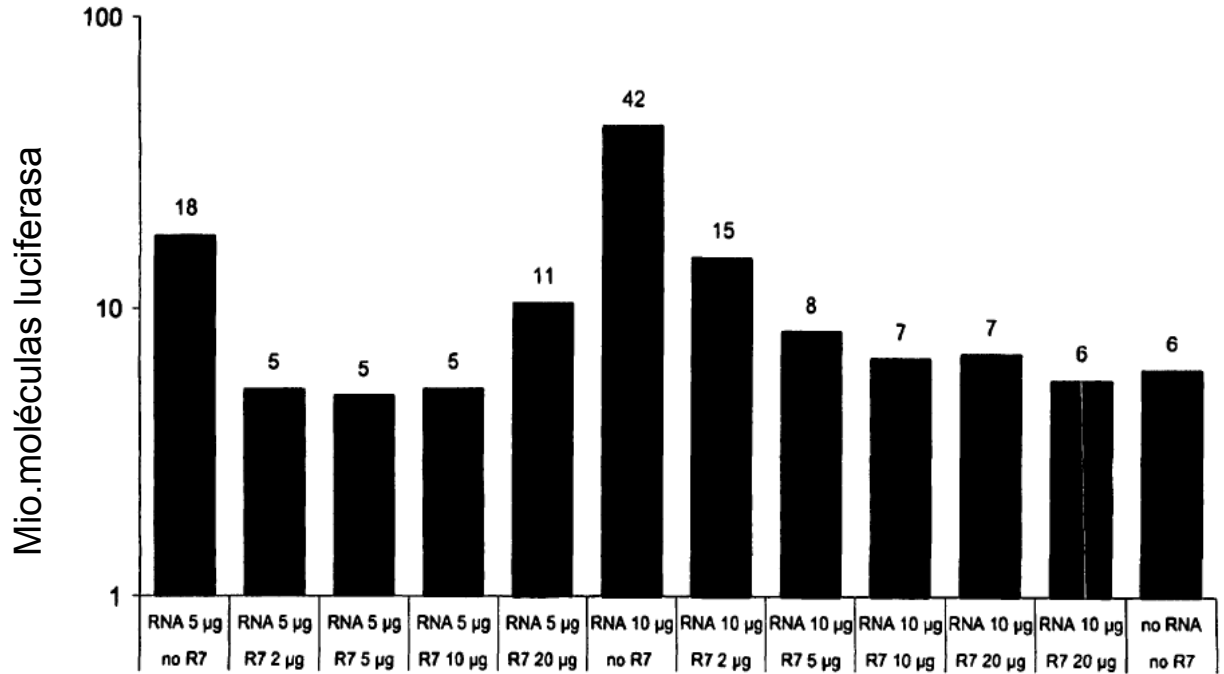


Figura 9

Liberación de IL-6 en hPBMCs

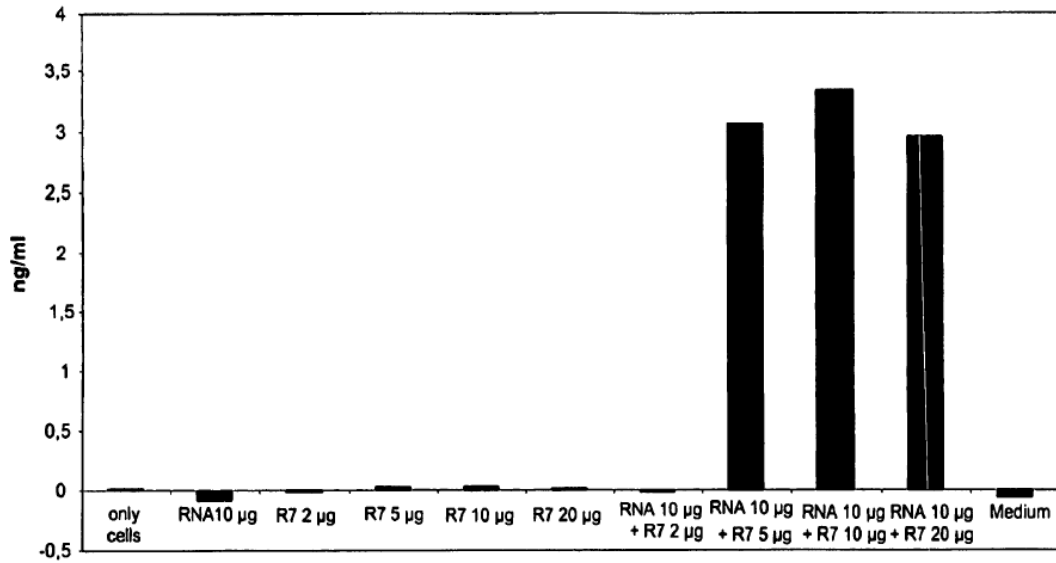


Figura 10

Liberación de TNFalfa en hPBMCs

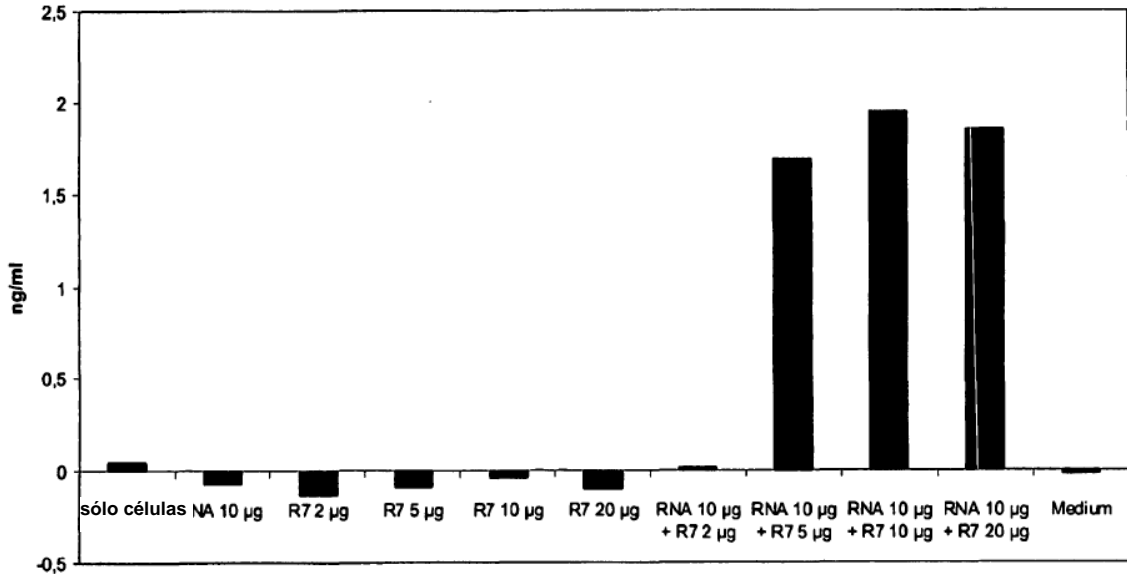


Figura 11

Efecto de formulaciones de péptido R9 en la expresión de luciferasa en células HeLa

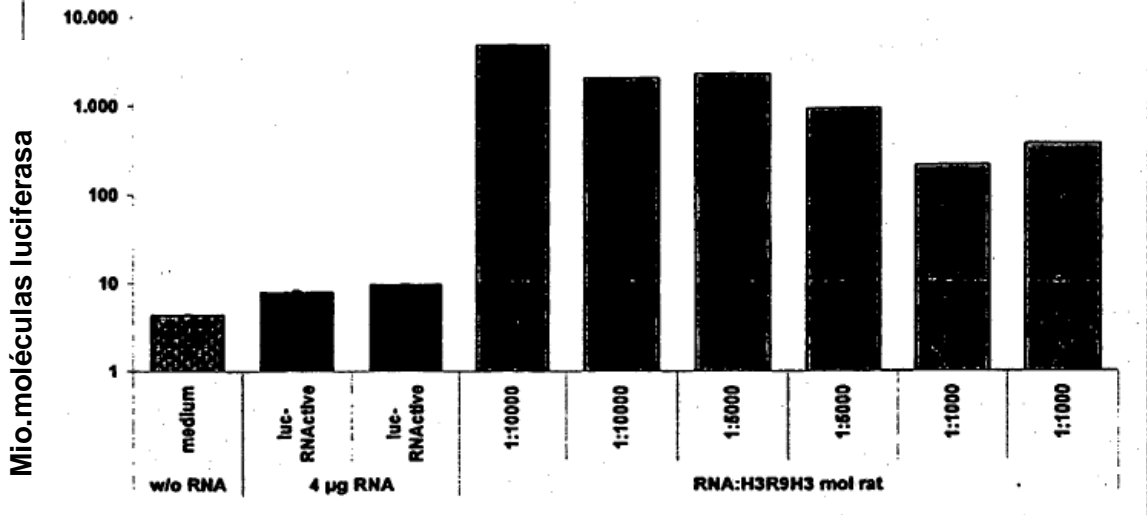


Figura 12

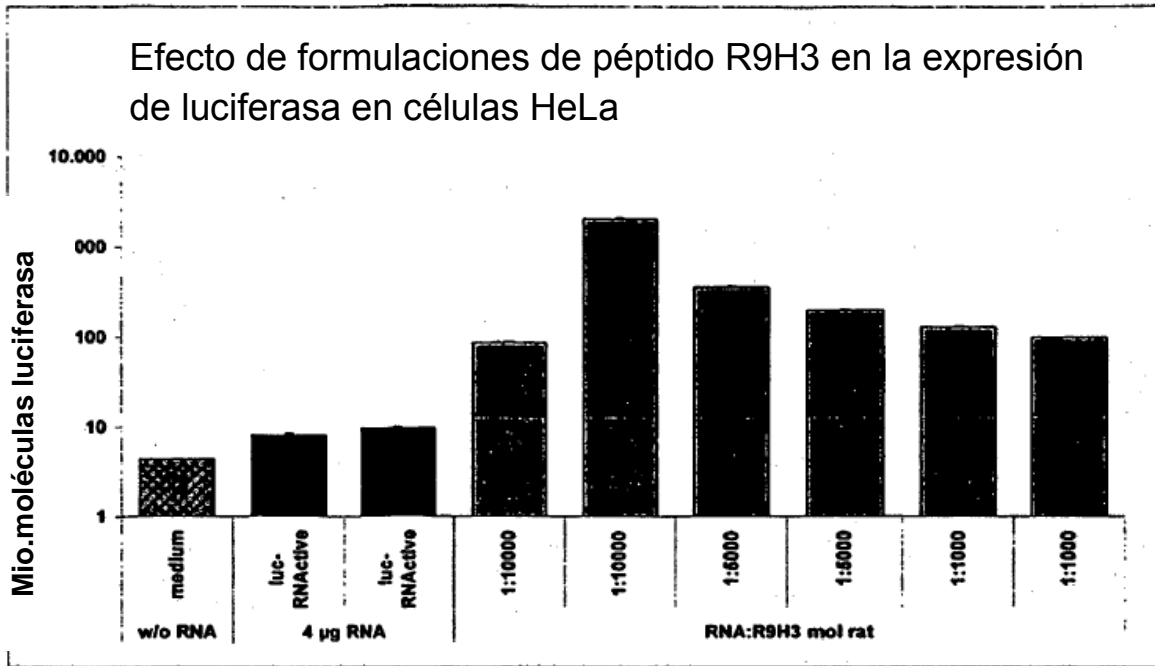


Figura 13

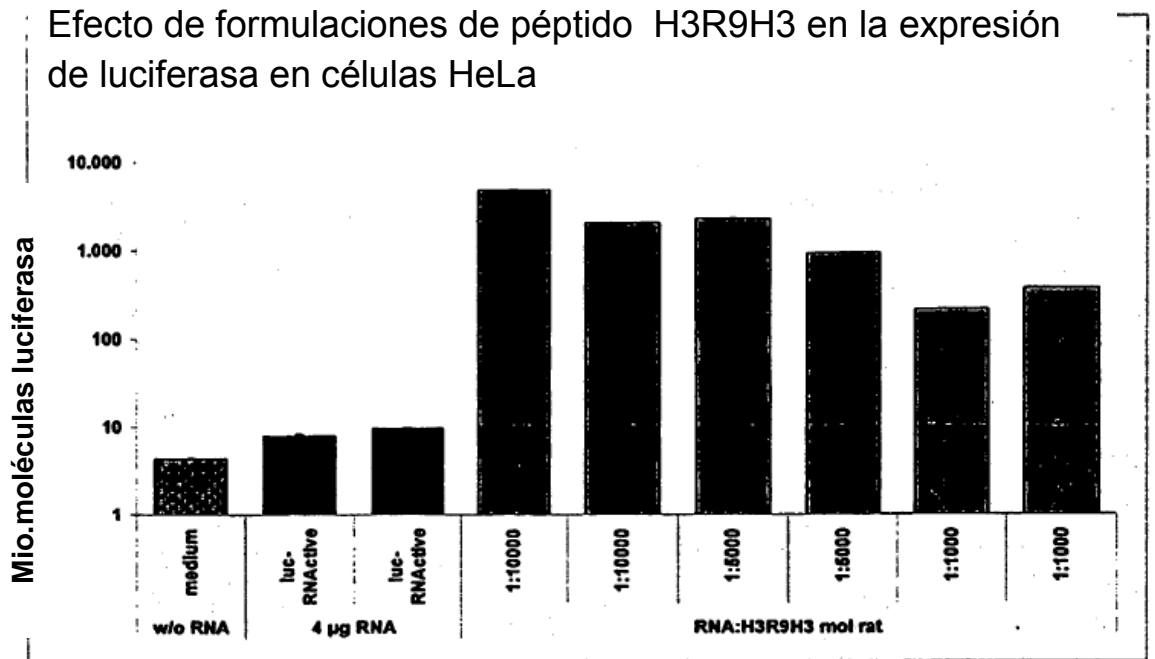


Figura 14

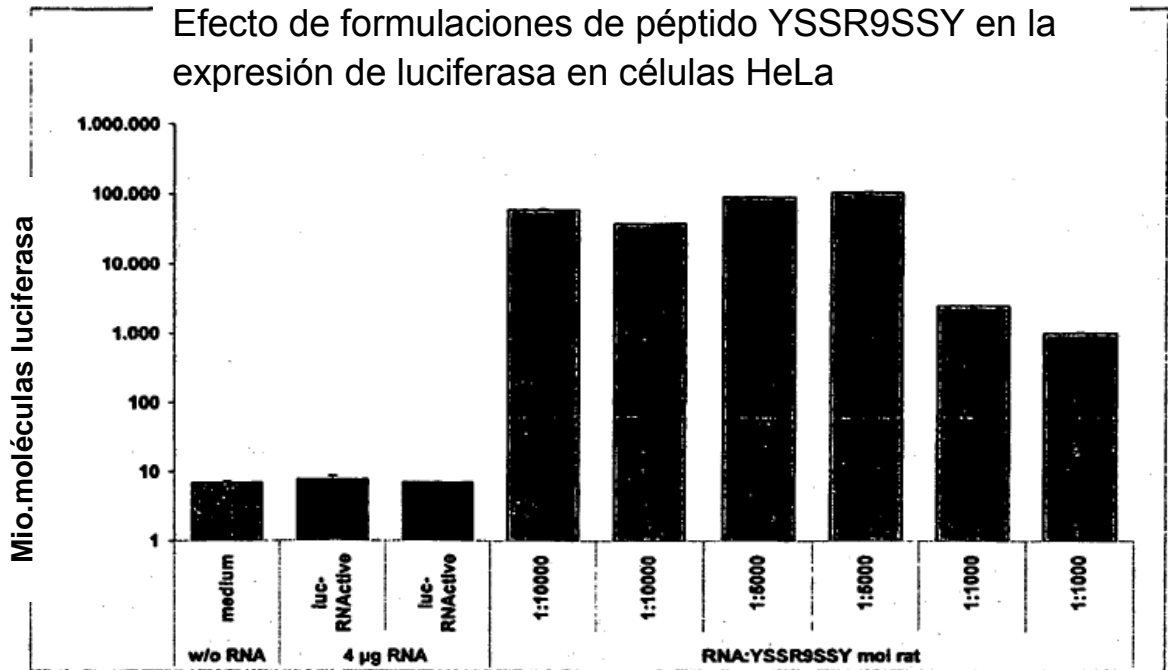


Figura 15

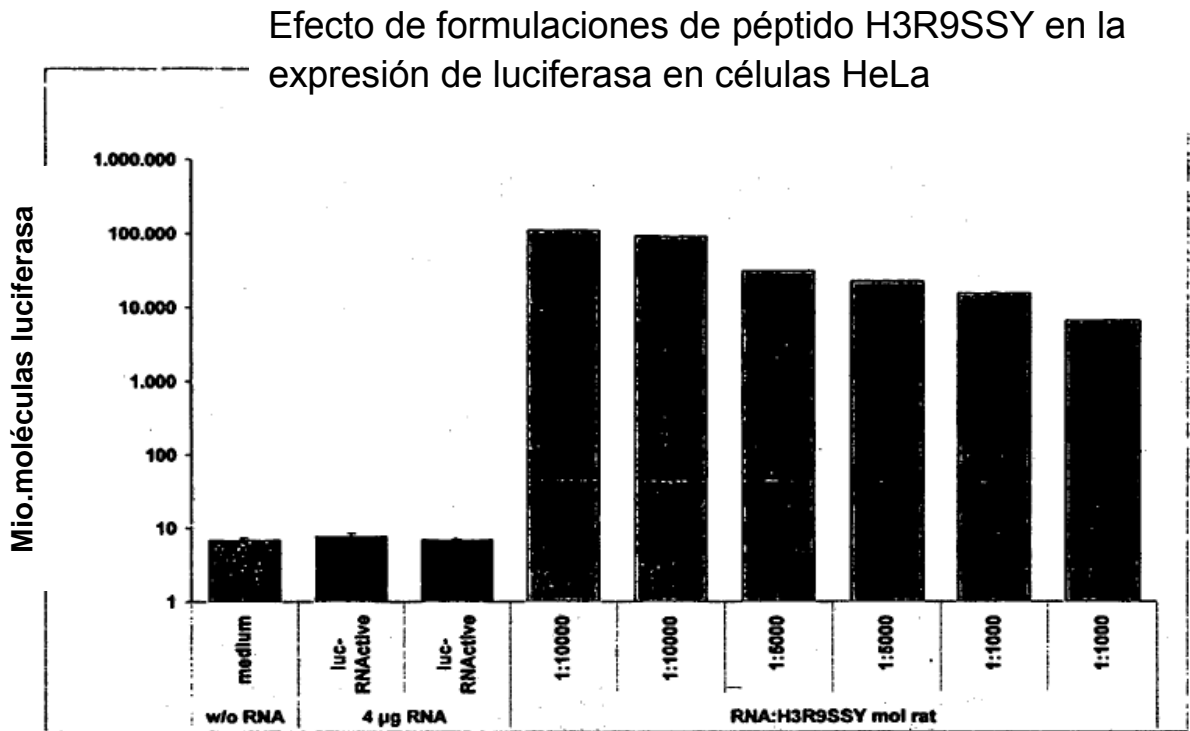


Figura 16

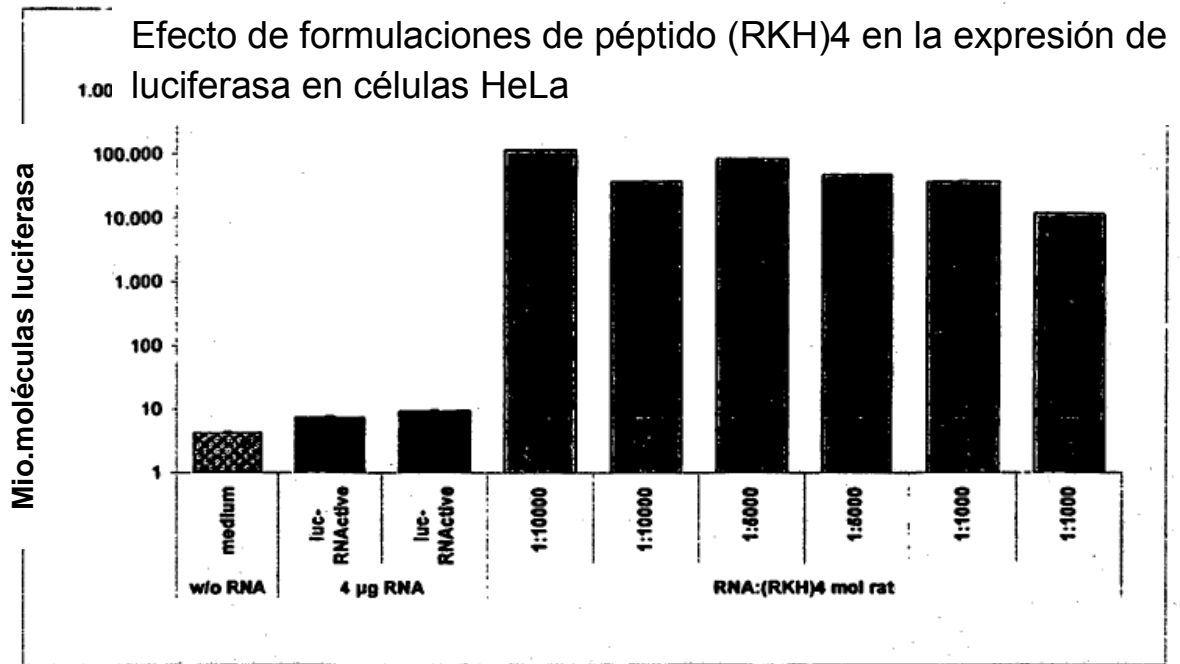


Figura 17

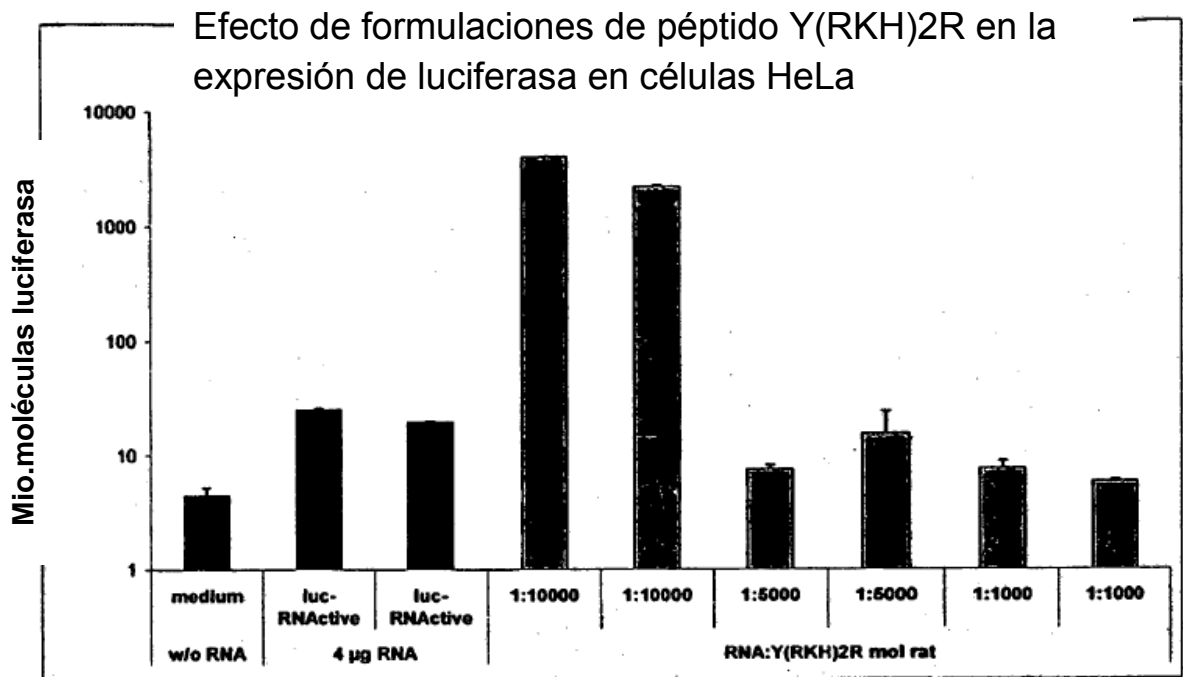


Figura 18

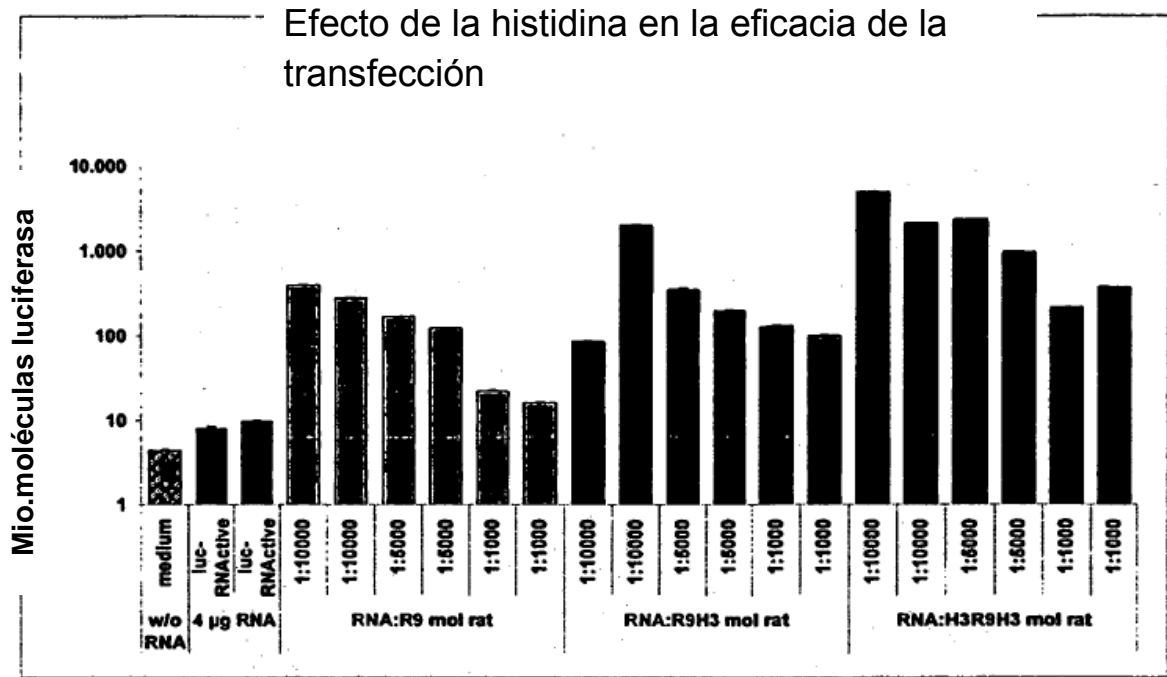


Figura 19

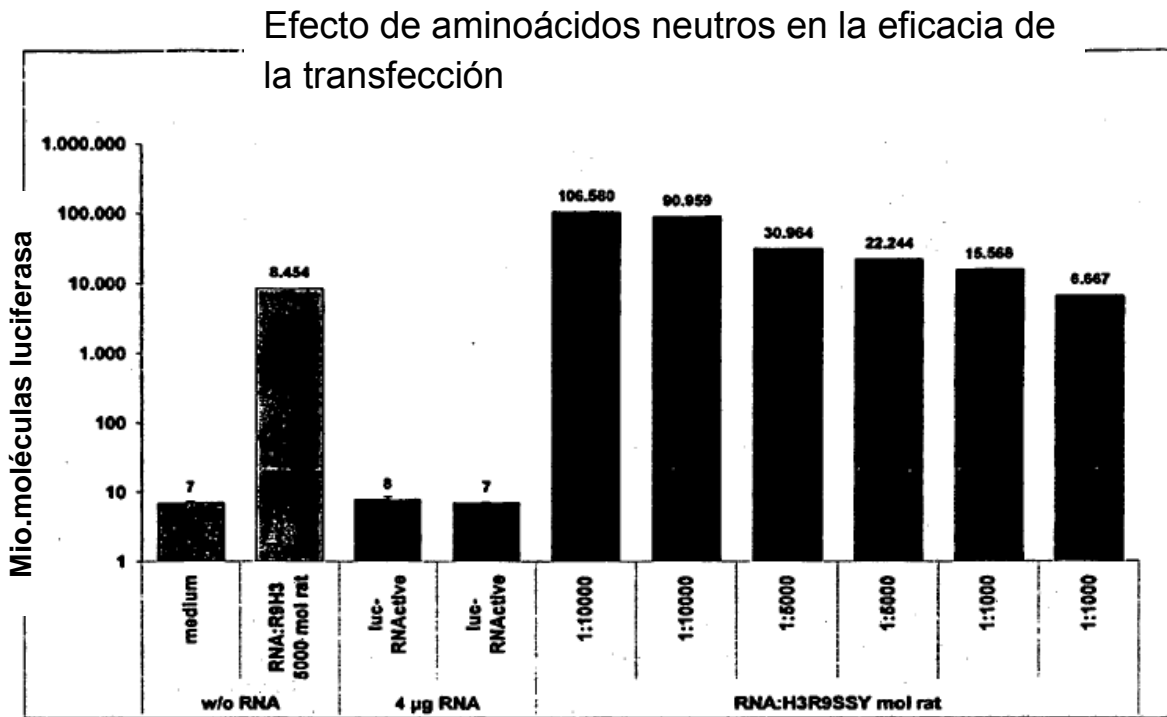


Figura 20

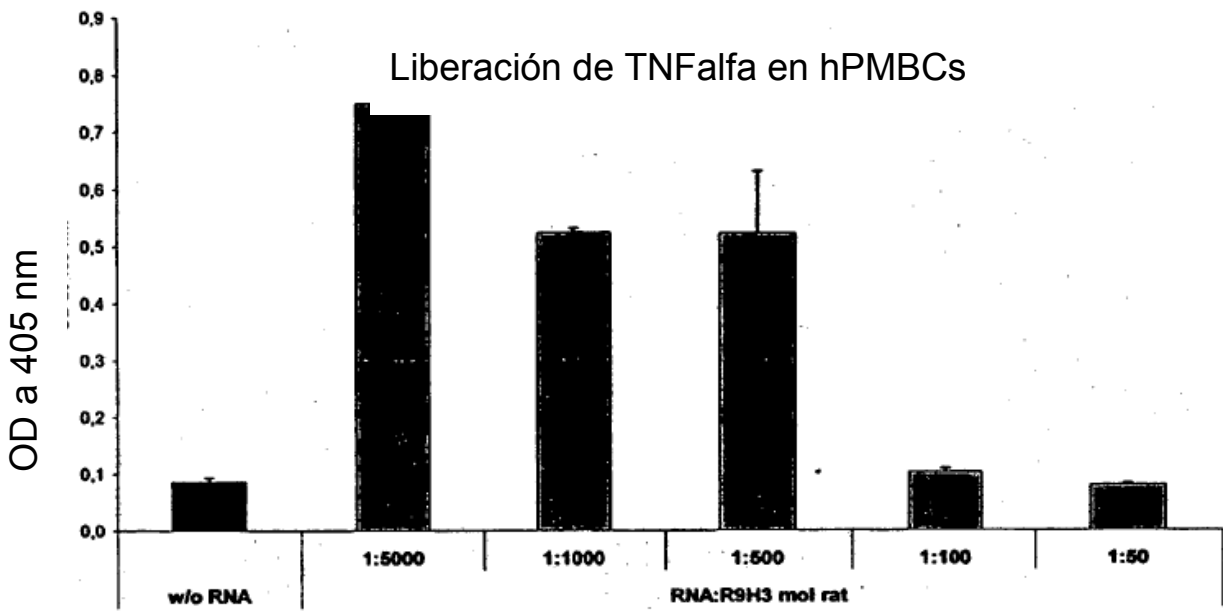


Figura 21

Liberación de IL-6 en hPMBCs

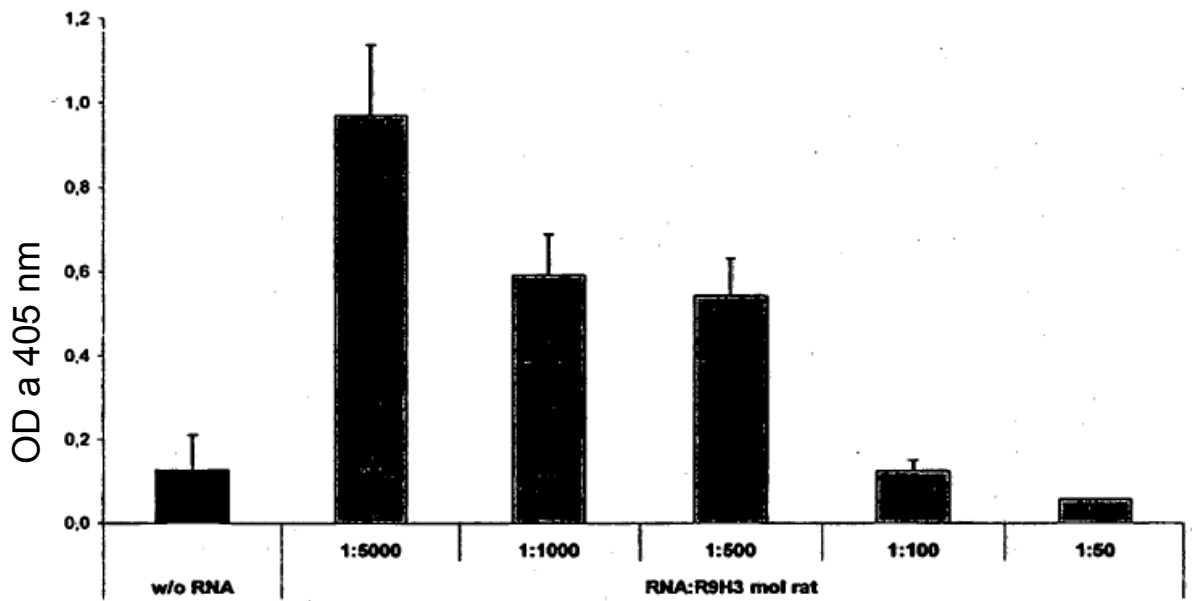


Figura 22