

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 106**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2011 E 11738625 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2449113**

54 Título: **Formación de complejos de ácidos nucleicos con componentes catiónicos disulfuro-reticulados para la transfección e inmunoestimulación**

30 Prioridad:

30.07.2010 US 369549 P
30.07.2010 EP 10007992

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BAUMHOF, PATRICK;
VOSS, SÖHNKE;
KRAMPS, THOMAS y
KALLEN, KARL-JOSEF

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 558 106 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

Formación de complejos de ácidos nucleicos con componentes catiónicos disulfuro-reticulados para la transfección e inmunestimulación

5 La presente invención se refiere a un complejo de carga portador polimérico tal como se define en las reivindicaciones. El complejo de carga portador polimérico de la invención permite tanto una transfección eficiente de ácidos nucleicos en células in vivo e in vitro y/o para la inducción de una respuesta inmune (innata y/o adaptiva), preferentemente dependiendo del ácido nucleico a ser transportado como carga. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas, en particular vacunas, que comprenden el complejo de carga portador polimérico de la invención y opcionalmente un antígeno, así como el uso del complejo de carga portador polimérico de la invención y opcionalmente un antígeno para transfectar una célula, tejido u organismo, con propósitos terapéuticos (génicos) como los descritos aquí, y/o como un agente inmunestimulador o adyuvante, por ejemplo para provocar una respuesta inmune, para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades como las citadas. Finalmente, la invención se refiere a kits que contienen el complejo de carga portador polimérico de la invención, la composición farmacéutica de la invención y/o la vacuna de la invención o cualquiera de sus componentes en una o más partes del kit.

20 Muchas enfermedades actualmente requieren la administración de adyuvantes para proporcionar una respuesta inmune innata y, opcionalmente, para soportar una respuesta inmune adaptiva, particularmente en el contexto de las vacunas. Algunas, aunque no necesariamente todas de estas enfermedades alternativa o adicionalmente requieren la administración de fármacos basados en péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, por ejemplo, la transfección de ácidos nucleicos en células o tejidos. Estos requisitos normalmente representan aspectos diferentes en el tratamiento de estas enfermedades y son típicamente difíciles de resolver en un único enfoque. Como consecuencia, normalmente la técnica anterior maneja tales aspectos con enfoques separados.

25 En el contexto anterior, se cree en general que la vacunación es una de las formas más efectivas y económicas de prevenir o tratar enfermedades. No obstante, diversos problemas en el desarrollo de vacunas han demostrado ser difíciles de resolver: las vacunas habitualmente son ineficientes para los muy jóvenes y los muy ancianos; muchas vacunas tienen que administrarse varias veces y la protección que confieren se desvanece con el tiempo, requiriendo administraciones de refuerzo, y, para ciertas enfermedades tales como VIH, es urgente el desarrollo de vacunas eficientes. Como es generalmente aceptado, muchas de estas vacunas podrían habilitarse o mejorarse si pudiera provocar una respuesta inmune más potente y duradera.

En consecuencia, el desarrollo de nuevos adyuvantes eficientes y seguros con el objeto de la vacunación que soporten inducir y mantener una respuesta inmune adaptiva al iniciar o reforzar una respuesta inmune innata paralela representa un gran desafío.

35 Los adyuvantes se definen habitualmente como compuestos que pueden incrementar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno. Para reducir los efectos secundarios negativos, las nuevas vacunas tienen una composición más definida, que normalmente lleva a una menor inmunogenicidad en comparación con las vacunas basadas en células completas o virus previas. Por tanto, se requieren adyuvantes para ayudar a las nuevas vacunas a inducir una respuesta inmune potente y persistente, con el beneficio adicional de que se requieren menos antígenos y menos inyecciones. Ahora está claro que la respuesta inmune adaptiva depende principalmente del nivel y la especificidad de las señales de peligro iniciales percibidas por las células inmunes innatas después de la infección y vacunación (Guy, B. (2007), Nat Rev Microbiol 5(7): 505-17). En particular, para las vacunas candidatas de nueva generación, que comprenderán cada vez más proteínas recombinantes altamente purificadas que, aunque muy seguras son poco inmunogénicas, cada vez son más necesarios adyuvantes eficientes.

40 Desafortunadamente, sólo unos pocos adyuvantes licenciados están disponibles hasta la fecha. El más importante es el alumbre, que se sabe es seguro, pero también es un adyuvante muy débil. Se han desarrollado numerosos otros adyuvantes, por ejemplo, incluyendo la administración de patógenos, nucleótidos CpG, etc. Muchos de estos adyuvantes nuevos o "establecidos", sin embargo, aún no satisfacen los requisitos anteriores, toda vez que deben considerarse y resolverse muchos problemas nuevos y emergentes. Estos problemas incluyen, entre otros, enfermedades infecciosas nuevas y re-emergentes, administraciones repetidas, amenaza de gripe pandémica, etc.

45 Además, las nuevas dianas de las vacunas normalmente son más difíciles de desarrollar y, debido a sus respuestas inmunes diseñadas específicamente, requieren adyuvantes más potentes para tener éxito. Además, aún sigue habiendo un número significativo de patógenos importantes para los cuales ni siquiera se dispone de vacunas efectivas actualmente. Esto representa un objetivo futuro muy retador. Para hacer posible el desarrollo de vacunas contra estas dianas, serán necesarios adyuvantes más potentes. Estos

nuevos adyuvantes tendrán que ofrecer ventajas, incluyendo respuestas de anticuerpo más heterólogas, cobertura de la diversidad de patógenos, inducción de respuestas de anticuerpo funcionales potentes, asegurar una eliminación o neutralización de patógenos y la inducción de respuestas de células T más efectivas, para eliminar patógenos directa e indirectamente, en particular la inducción de células T citotóxicas que son parte de una respuesta inmune Th1. Además, podrían ser necesarios adyuvantes para lograr efectos más pragmáticos, incluyendo la reducción de las dosis de antígenos y superar la competencia de antígenos en las vacunas combinadas. Además, ya que el antecedente de una población cada vez más anciana, cada vez más sensible a enfermedades infecciosas, serán necesarios nuevos adyuvantes para superar el deterioro natural de la respuesta inmune con la edad (O'Hagan, D. T. y E. De Gregorio (2009), *Drug Discov Today* 14(11-12): 541-51).

La revisión de O'Hagan (2009; *supra*) resume algunas razones para la urgente necesidad de nuevos adyuvantes efectivos, por ejemplo, la necesidad de una dosis de antígeno más baja en vacunas, la necesidad de incrementar el alcance de una respuesta inmune y la actividad heteróloga, de hacer posible vacunas de combinación complejas y de superar la competencia antigénica, de superar una respuesta inmune limitada en algunos grupos de población, tales como los más ancianos, niños jóvenes y bebés, pacientes con enfermedades crónicas, e inmunocomprometidos, de incrementar la respuesta de células T efectoras y los títulos de anticuerpos, para producir respuestas protectoras más rápidamente y también para extender la duración de respuesta, incrementando la respuesta de las células B y T de memoria.

En resumen, son necesarios nuevos agentes o adyuvantes inmunoestimuladores eficientes y seguros, que sean preferiblemente eficientes para inducir una respuesta inmune innata, en particular para inducir la citoquina antiviral IFN-alfa; que preferentemente también sean eficientes para soportar una respuesta inmune adaptiva; seguros, es decir, como asociados con ningún efecto a largo plazo; que sean bien tolerados; que estén disponibles mediante una vía sintética simple; que muestren condiciones de almacenamiento económicas (en particular liofilización eficaz); que requieran componentes simples y económicos; que sean biodegradables; que sean compatibles con muchos tipos diferentes de antígenos de vacuna; que sean capaces del co-suministro de antígeno y potenciador inmune, etc.

Como ya se explicó anteriormente, los adyuvantes o agentes inmunoestimuladores normalmente actúan vía su capacidad para inducir una respuesta inmune innata. El sistema inmunológico innato forma el sistema dominante de la defensa del anfitrión en muchos organismos y comprende barreras tales como barreras humorales y químicas, que incluyen, por ejemplo, inflamación, el sistema de complemento y barreras celulares. El sistema inmune innato se basa típicamente en un pequeño número de receptores, llamados receptores de reconocimiento de patrones. Reconocen patrones moleculares conservados que distinguen a los organismos extraños, como virus, bacterias, hongos y parásitos, de las células del anfitrión. Estos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) incluyen ácidos nucleicos virales, componentes de paredes bacterianas y fúngicas, proteínas flagelares, y otros. La primera familia de receptores de reconocimiento de patrones (receptores de PAMP) estudiada en detalle fue la familia del receptor tipo Toll (TLR). Las TLRs son proteínas transmembrana que reconocen ligandos del medio extracelular o del lumen de endosomas. Después de la unión al ligando transducen la señal por medio de proteínas adaptadoras citoplásmicas, lo cual provoca el desencadenamiento de una respuesta de defensa del anfitrión e implica la producción de péptidos antimicrobianos, quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, citoquinas antivirales, etc. (véase, por ejemplo, Meylan, E., J. Tschopp, y col. (2006), *Nature* 442(7098): 39-44). Otros componentes relevantes adicionales del sistema inmunológico incluyen, por ejemplo, TLR endosómicos, receptores citoplásmicos, interferones tipo 1 y receptores citoplásmicos. Por tanto, preferentemente los agentes inmunoestimuladores o adyuvantes se definen aquí como inductores de una respuesta inmune innata, que activan los receptores de reconocimiento de patrones (receptores de PAMP). Aquí, se provoca una cascada de señales que, por ejemplo, pueden dar como resultado la liberación de citoquinas (por ejemplo IFN-alfa) que soportan la respuesta inmune innata. En consecuencia, preferentemente es una característica de un agente inmunoestimulador o adyuvante unirse a y activar estos receptores de PAMP. Idealmente, tal agente o adyuvante soporta adicionalmente la respuesta inmune adaptiva por ejemplo desplazando la respuesta inmune de manera que la clase preferida de células Th se active. Dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar, puede ser preferente un desplazamiento a una respuesta inmune basada en Th1 o, en otros casos, puede ser preferible un desplazamiento a una respuesta inmune Th2.

En la técnica anterior existen ciertos candidatos adyuvantes prometedores que cumplen al menos algunas, aunque no todas, las características requeridas definidas arriba.

Como ejemplo, entre los nuevos adyuvantes desarrollados anteriores, algunos ácidos nucleicos, tales como oligonucleótidos de ADN CpG o ARN (ARN inmunoestimulador) resultaron ser candidatos prometedores para nuevos agentes o adyuvantes inmunoestimuladores, ya que permiten la inducción terapéutica o profiláctica de una respuesta inmune innata. Así, estos adyuvantes basados en ácidos nucleicos normalmente tienen que suministrarse de forma efectiva en el sitio de acción para permitir la inducción de una respuesta inmune innata efectiva sin una pérdida innecesaria de la

actividad adyuvante y, en algunos casos, sin necesidad de incrementar el volumen administrado por encima de los niveles tolerados sistémicamente.

5 Un enfoque para resolver este aspecto puede ser la transfección de células que sean parte del sistema inmune innato (por ejemplo, células dendríticas, células dendríticas plasmocitoides (pDCs)) con ácidos nucleicos inmunoestimuladores que son ligandos de los receptores de PAMP (por ejemplo, receptores tipo Toll (TLR)), y así pueden llevar a la inmunestimulación mediante el ligando del ácido nucleico. Otros enfoques pueden ser la transfección directa de adyuvantes basados en ácidos nucleicos. Sin embargo, todos estos enfoques se verán típicamente influenciados negativamente por un suministro ineficiente del ácido nucleico y, en consecuencia, por una actividad adyuvante disminuida, en particular cuando se administran localmente.

15 Sin embargo, una desventaja principal de estos enfoques de los adyuvantes basados en ácido nucleico hasta la fecha es su limitada capacidad para atravesar la membrana plasmática de las células de mamíferos, dando como resultado un deficiente acceso celular y una eficacia terapéutica inadecuada. Hasta la fecha, este obstáculo representa un gran reto para las aplicaciones basadas en la transfección de ácidos nucleicos, por ejemplo de desarrollos biomédicos, y, en consecuencia, para el éxito comercial de muchos biofármacos (véase, por ejemplo, Foerg, C. & Merkle, H.P., J Pharm Sci 97, 144-62 (2008)).

20 Hasta la fecha, la transfección de ácidos nucleicos o genes en células o tejidos ha sido investigada en el contexto de la transfección *in vitro* y de enfoques terapéuticos génicos. Sin embargo, no existen hasta el momento adyuvantes que se basen en estas técnicas de suministro génico y que sean eficientes y seguros, en particular no existen adyuvantes licenciados. Esto se debe presuntamente a los complejos requisitos de los adyuvantes en general junto con aspectos de estabilidad que tienen que ser resueltos en el caso de los adyuvantes basados en ácidos nucleicos.

25 No obstante, la transfección de ácidos nucleicos o genes en células o tejidos para provocar una respuesta inmune (innata y/o adaptiva) parece proporcionar un enfoque prometedor para proporcionar nuevos adyuvantes.

30 Sin embargo, muchos de estos enfoques utilizan la transfección de ácidos nucleicos o genes en células o tejidos sin inducción de una respuesta inmune innata. Existen incluso algunas terapias génicas que tienen que evitar estrictamente la inducción de una respuesta inmune innata. Incluso en casos raros, donde la vacunación se lleva a cabo para inducir una respuesta inmune específica de antígeno adaptiva usando la administración de ácidos nucleicos, por ejemplo en vacunaciones de tumores usando antígenos codificados por ADN o ARNm, la inducción de una respuesta inmune adaptiva se lleva a cabo típicamente como una inmunización activa contra el antígeno codificado, pero no como una terapia adyuvante acompañante y requiere entonces de la administración adicional de un adyuvante separado para inducir una respuesta inmune innata.

35 Incluso aunque se conocen numerosos métodos de transfección en la técnica, la transferencia o inserción de ácidos nucleicos o genes en las células de un individuo representa aún un gran reto actualmente y aún no se ha resuelto de manera satisfactoria. Para resolver este aspecto complejo, en la última década se han desarrollado diversos métodos. Éstos incluyen la transfección por fosfato de calcio, lípidos catiónicos, polímeros catiónicos y liposomas. Otros métodos de transfección son electroporación y transducción viral.

40 Sin embargo, como es conocido del experto, los sistemas para la transferencia o inserción de ácidos nucleicos o genes tienen que cumplir diversos requisitos para su aplicación *in vivo*, incluyendo un suministro eficiente del ácido nucleico con alta funcionalidad en la célula de un individuo, protección del ácido nucleico contra las nucleasas que están presentes ubicuamente, liberación del ácido nucleico en la célula, ninguna preocupación de seguridad, fabricación posible en una forma comercialmente aceptable, disponibilidad a gran escala y estabilidad de almacenamiento en condiciones de bajo costo (por ejemplo, liofilización viable). Estos requisitos tienen que añadirse a los complejos requerimientos de un adyuvante, en particular cuando está en forma de un ácido nucleico como se comentó anteriormente.

50 Ciertas estrategias exitosas disponibles actualmente para la transferencia o inserción de ácidos nucleicos o genes se basan en el uso de vectores virales, tales como adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus y virus del herpes. Los vectores virales son capaces de mediar la transferencia génica con una alta eficiencia y de depositar una expresión génica a largo plazo. Sin embargo, la respuesta inmune aguda ("tormenta de citoquinas"), inmunogenicidad y mutagénesis de inserción descubierta en las pruebas clínicas de terapia génica han creado serias preocupaciones de seguridad acerca de algunos vectores virales normalmente empleados.

55 Otra solución al problema de la transferencia o inserción de ácidos nucleicos o genes puede encontrarse en el uso de vectores no virales. Aunque los vectores no virales no son tan eficientes como los virales, se han desarrollado muchos vectores no virales para proporcionar una alternativa más segura. Los métodos de suministro de

ácido nucleico no viral han sido explorados usando enfoques físicos (suministro de ácidos nucleicos libres de portadores) y químicos (suministro de ácido nucleico a base de vectores sintéticos). Los enfoques físicos normalmente incluyen inyección con aguja, electroporación, pistola génica, ultrasonido y suministro hidrodinámico, emplean una fuerza física que permea la membrana celular y facilita la transferencia génica intracelular. Los enfoques químicos usan típicamente compuestos sintéticos o naturales (por ejemplo, lípidos catiónicos, polímeros catiónicos, sistemas híbridos de polímeros lípidos) como portadores para suministrar el ácido nucleico a las células. Aunque se ha progresado significativamente en la ciencia básica y en las aplicaciones de varios sistemas de suministro de ácido nucleico no virales, la mayoría de los enfoques no virales aún son mucho menos eficientes que los vectores virales, especialmente para el suministro génico *in vivo* (véase, por ejemplo, Gao, X., Kim, K. & Liu, D., AAPS J9, E92-104 (2007)).

Estos agentes de transfección como los definidos arriba se usan típicamente con éxito únicamente en reacciones *in vitro*. Para la aplicación de ácidos nucleicos *in vivo*, sin embargo, se tienen que cumplir requisitos adicionales. Por ejemplo, los complejos entre los ácidos nucleicos y los agentes de transfección deben ser estables en soluciones salinas fisiológicas en cuanto a la aglomeración. Además, estos complejos típicamente no deben interactuar con partes del sistema de complemento de la filtración y con ello no deben ser a su vez inmunogénicos, ya que el propio portador no debería inducir una respuesta inmune adaptativa en el individuo. Además, el complejo deberá proteger el ácido nucleico de la degradación extracelular prematura por las nucleasas presentes de manera ubicua.

En la técnica existen muchos reactivos de transfección disponibles, especialmente lípidos catiónicos que tienen excelente actividad de transfección en cultivo celular. Sin embargo, la mayoría de estos reactivos de transfección no funcionan bien en presencia de suero, y sólo unos pocos son activos *in vivo*. Se produce un dramático cambio de tamaño, de carga superficial y composición lipídica cuando los lipoplejos son expuestos a la grandísima cantidad de proteínas cargadas negativamente y normalmente anfipáticas y polisacáridos presentes en la sangre, moco, fluido de revestimiento epitelial o matriz tisular. Una vez administrados *in vivo*, los lipoplejos tienden a interactuar con componentes sanguíneos cargados negativamente y formar grandes agregados que podrían ser absorbidos sobre la superficie de los glóbulos rojos circulantes, atrapados en una capa de moco espesa o embolizados en microvasculaturas, impidiéndoles alcanzar las células diana deseadas en la ubicación distal. Algunos incluso sufren una disolución después de ser introducidos en la circulación sanguínea (véase, por ejemplo, Gao, X., Kim, K. & Liu, D., AAPS J9, E92-104 (2007)).

Un enfoque más prometedor utiliza polímeros catiónicos. Los polímeros catiónicos resultaron ser eficientes en la transfección de ácidos nucleicos, toda vez que pueden acomplejarse estrechamente y condensar un ácido nucleico cargado negativamente. Así, se han explorado numerosos polímeros catiónicos como portadores para el suministro génico *in vitro* e *in vivo*. Éstos incluyen polietilenoimina (PEI), poliamidoamina y dendrímeros de polipropilamina, polialilamina, dextran catiónico, quitosano, proteínas catiónicas y péptidos catiónicos. Aunque la mayoría de los polímeros catiónicos comparten la función de condensar ADN en partículas pequeñas y facilitar la absorción celular por medio de endocitosis debido a la interacción carga-carga con sitios aniónicos sobre la superficie celular, su actividad de transfección y toxicidad difiere dramáticamente.

Sólo en un enfoque en la técnica, el efecto inmunoestimulador de ARN acomplejado con péptidos catiónicos cortos fue demostrado por Fotin-Mleczek y col. (WO2009/030481). Estas formulaciones parecen inducir eficientemente la producción de citoquinas en células inmunocompetentes. Desafortunadamente, Fotin-Mleczek y col. no evaluaron la inducción de la citoquina anti-viral IFN- α preferible por estos complejos. Además, estos complejos resultaron ser inestables durante liofilización. En un enfoque diferente, en la WO 2009/053700 se empleó ARN si (es decir ARN de doble hebra) complejado con agentes de condensación.

En el contexto anterior, los polímeros catiónicos presentan una mejor eficiencia de transfección con pesos moleculares cada vez mayores. Sin embargo, un peso molecular cada vez más alto levanta también una toxicidad cada vez más alta del polímero catiónico. En este contexto, el PEI de alto peso molecular es tal vez el polímero más activo y más estudiado para la transfección de ácidos nucleicos, en particular con propósitos de suministro génico. Desafortunadamente, tiene la misma desventaja debido a su naturaleza no biodegradable y toxicidad. Además, incluso a pesar de que los polímeros formados por polímeros de alto peso molecular tienen una estabilidad mejorada bajo condiciones fisiológicas, los datos han indicado que estos polímeros pueden impedir el desempaque de vectores. Para superar este impacto negativo, Read y col. (véase Read, M.L. y col., J Gene Med. 5, 232-245 (2003); y Read, M.L. y col., Nucleic Acids Res 33, e86 (2005)) desarrollaron un nuevo tipo de vector sintético basado en un polímero de reducción de la línea (RPC) preparado por policondensación oxidante del péptido Cys-Lys10-Cys. Este péptido Cys-Lys10-Cys puede ser segmentado por el ambiente intracelular para facilitar la liberación de ácidos nucleicos. En este contexto, Read y col. (2003, *supra*) pudieron demostrar que los polímeros formados por estos RPCs son desestabilizados al reducir las condiciones que hacen posible una liberación eficiente de ADN y ARNm. Sin embargo, al examinar la

- eficiencia de transmisión *in vitro*, Read y col. (2003, *supra*) también observaron que no fueron satisfactorias las proporciones N/P (átomos de nitrógeno:fósforo) de 2, siendo necesarias proporciones N/P más altas para mejorar la eficiencia de transfección. Además, Ready col. (2003, *supra*) observaron que además era necesaria cloroquina o el lípido catiónico DOTAP para incrementar la eficiencia de transfección a niveles adecuados.
- 5 Como consecuencia, Read y col. (2005, *supra*) incluyeron residuos de histidina en los RPC con capacidad de regulación endosómica conocida y demostraron que estos RPC ricos en histidina podían ser cortados por el ambiente reductor intracelular. Este enfoque hizo posible suministrar a un citoplasma un agente de una amplia variedad de ácidos nucleicos, incluyendo ADN plasmídico, ARN y moléculas de ARN sin necesidad del agente endosomolítico cloroquina.
- 10 Desafortunadamente, ni Read y col. (2003, *supra*) ni Read y col. (2005, *supra*) evaluaron en cuanto a si los RPC pueden usarse directamente para aplicaciones *in vivo*. En su estudio en 2005 se llevaron a cabo transfecciones en ausencia de suero para evitar enmascarar la capacidad de los residuos de histidina para incrementar la transferencia génica que pudiera haberse originado a partir de la unión de proteínas de suero a polímeros que restringen la absorción celular. No obstante, los experimentos preliminares indicaron que las propiedades de
- 15 transfección de los polímeros de RPC ricos en histidina pueden verse afectadas por la presencia de proteínas séricas, con una reducción del 50% en células positivas para GFP observada en 10% de FCS. Para la aplicación *in vivo* Read y col. (2005, *supra*) propusieron modificaciones con el polímero hidrófilo poli-[N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida]. Desafortunadamente, no pudieron impedir la agregación de polímeros y la unión de complejos policationicos a proteínas séricas. Además, fuertes se formaron complejos cargados
- 20 catiónicos (potencial zeta positivo) cuando se creaban los complejos del ácido nucleico debido al gran exceso de polímero catiónico, el cual se caracteriza por la alta proporción N/P. En consecuencia, estos complejos sólo son de uso limitado *in vivo* debido a su fuerte tendencia a la aglomeración inducida por sal e su interacción con contenidos de suero (opsonización). Además, estos complejos (cargados positivamente) pueden excitar una activación de complemento cuando se
- 25 usan para propósitos de terapia génica. También ha resultado que estos complejos basados en RPC cargados positivamente mostraron una reducción deficiente de la carga de ácido nucleico después de la administración local en la dermis.
- En un enfoque similar al de Ready col., McKenzie y col. (McKenzie, D.L., K.Y. Kwok, y col. (2000), *J Biol Chem* 275(14): 9970-7 y McKenzie, D. L., E. Smiley y col. (2000), *Bioconjug Chem* 11(6): 901-9) desarrollaron
- 30 péptidos de reticulación como agentes de suministro génico insertando varias cisteínas en péptidos sintéticos cortos. En sus estudios examinaron la óptima formación de complejos con ADN y, como resultado, pudieron demostrar que es necesaria una proporción N/P de al menos 2 para condensados de ADN de péptidos completamente formados. Por tanto, sólo los complejos cargados positivamente parecieron demostrar una condensación de ADN óptima. En contraste
- 35 con estos datos propusieron el desarrollo de complejos cargados negativamente para el suministro génico *in vivo*, ya que se demostró en estudios anteriores que la aplicación intravenosa de condensados de ADN electropositivos lleva a una rápida opsonización y biodistribución no específica al pulmón e hígado (Collard, W. T., Evers, D. L., McKenzie, D.L., y Rice, K.G. (2000), *Carbohydr. Res.* 323, 176-184). Por tanto, McKenzie y col. (2000; *supra*) propusieron la derivación de los portadores con polietilenglicol y ligandos dirigidos. Cabe mencionar
- 40 que el enfoque de McKenzie y col. (2000; *supra*) es además objeto de una patente (US 6.770.740 B1) que describe particularmente la transfección de ácidos nucleicos de codificación, ácidos nucleicos antisentido y ribozimas.
- Así, la aplicación *in vivo* de ácidos nucleicos parece ser aún uno de los retos debido a que las proteínas plasmáticas con carga aniónica pueden unirse no específicamente a complejos cargados positivamente y eliminarlos rápidamente, por ejemplo, vía el sistema reticuloendotelial. La opsonización y activación del sistema de
- 45 complemento por complejos catiónicos son fenómenos fisiológicos adicionales que pueden participar en reducir la eficacia de los complejos catiónicos administrados *in vivo*. Esto se aplica en particular a la administración de fármacos basados en ácidos nucleicos, por ejemplo, a la transfección de ácidos nucleicos en células o tejidos, particularmente si se pretende la expresión de una proteína o péptido codificado o la transcripción de un ARN del ácido nucleico transfectado.
- 50 En resumen, la técnica anterior no proporciona medios o métodos viables que, por un lado, permitan establecer adyuvantes eficientes y seguros con propósitos de vacunación, y que, por otro lado, sean además adecuados para el suministro *in vivo* de ácidos nucleicos, en particular para compactar y estabilizar un ácido nucleico con el objeto de la transfección del ácido nucleico *in vivo* sin presentar los efectos secundarios descritos arriba. En particular, no se conocen medios o métodos en la técnica anterior en el contexto anterior, que sean, por
- 55 un lado, lo suficientemente estables para llevar una carga de ácido nucleico a la diana antes de que sean cortados metabólicamente, y que, por otro lado, puedan ser depurados del tejido antes de que puedan acumularse y alcanzar niveles tóxicos. Además, no se conocen medios o métodos que, además de los requisitos anteriores, induzcan un patrón deseable de citoquinas, particularmente citoquina antiviral IFN- α .
- 60 En consecuencia, el objetivo de la presente invención es proporcionar estos medios o métodos que resuelven estos problemas.

El objetivo subyacente a la presente invención se resuelve mediante el objeto de la presente invención, preferentemente de las reivindicaciones anexas.

De acuerdo con la invención, el objeto subyacente de la presente invención es el resultado de un complejo de carga portador polimérico que comprende:

- 5 a) como portador, un portador polimérico formado por componentes catiónicos disulfuro-reticulados, donde los péptidos catiónicos disulfuro-reticulados son péptidos catiónicos, teniendo los péptidos catiónicos una longitud de 10-100 residuos aminoácidos, estando formados los enlaces disulfuro por residuos de cisteína contenidos en los péptidos catiónicos, situados proximales a los extremos terminales de los péptidos catiónicos y
- 10 b) como una carga, al menos una molécula de ARN monohebra,

para su uso en un método para inmuno-estimular la respuesta inmune de un paciente que lo necesite o para su uso en un método para un tratamiento adyuvante de un paciente que lo necesite.

15 Aquí, el complejo de carga polimérico comprende al menos un vehículo polimérico como se define en a) y al menos una molécula de ARN monohebra como se define en b). Además, el complejo de carga polimérico puede comprender también un componente catiónico o una molécula de ácido nucleico como se define aquí.

El término "agente inmunoestimulador" se entiende típicamente como sin incluir agentes tales como por ejemplo antígenos (de cualquier estructura química) que provoquen una respuesta inmune adaptiva/citotóxica, por ejemplo, una respuesta inmune "humoral" o "celular", en otras palabras que provoquen respuestas inmunes (y confieran inmunidad por ellos mismos) que se caracterizan por una respuesta específica a propiedades estructurales de un antígeno reconocido como extraño por las células competentes inmunes. Más bien, por "agente inmunoestimulador", se entiende típicamente que significa agentes/compuestos/complejos que no desencadenan una respuesta inmune adaptiva/citotóxica por ellos mismos, sino que exclusivamente pueden incrementar una respuesta inmune adaptiva/citotóxica de forma no específica, por ejemplo activando receptores "PAMP" y así desencadenando la liberación de citoquinas que soportan la respuesta inmune adaptiva/citotóxica real. En consecuencia, cualquier inmunoestimulación por agentes (por ejemplo, antígenos) que provoquen una respuesta inmune adaptiva y/o citotóxica por ellos mismos (que confieren inmunidad por ellos mismos directa o indirectamente) no está típicamente contemplada en el contexto "agente inmunoestimulador".

30 El término "adyuvante" también se entiende que no comprende agentes que confieren inmunidad por ellos mismos. En consecuencia, los adyuvantes no confieren por ellos mismos inmunidad, sino que ayudan al sistema inmunológico de varias maneras a incrementar la respuesta inmune específica de antígeno, por ejemplo, promover la presentación de un antígeno al sistema inmunológico. De esta manera, preferentemente un adyuvante puede por ejemplo modular la respuesta inmune específica de antígeno, por ejemplo desplazando la respuesta específica de antígeno basada en Th1 dominante a una respuesta específica de antígeno más basada en Th2 o viceversa. Así, los términos "agente inmunoestimulador" y "adyuvante" en el contexto de la presente invención se refieren típicamente a agentes, compuestos o complejos que no confieren inmunidad por ellos mismos, sino que exclusivamente soportan la respuesta inmune de una manera no específica (en contraste con una respuesta inmune específica de antígeno) por efectos que modulan la respuesta específica de antígeno (respuesta inmune celular y/o humoral adaptiva) por medidas no específicas, por ejemplo, expresión/secreción de citoquinas, presentación de antígenos mejorada, desplazamiento de la naturaleza de los brazos de la respuesta inmune, etc. En consecuencia, cualquier agente que provoque por sí mismo inmunidad está típicamente excluido por los términos "adyuvante" o "agente inmunoestimulador".

45 El complejo de carga portador polimérico de la invención permite la provisión de adyuvantes eficientes y seguros para propósitos de vacunación y portadores para transfección, ya sea en el campo de vacunación, la terapia adyuvante o aplicación de terapias génicas, etc.

Ventajosamente, el complejo de carga portador polimérico de la invención es adecuado para el suministro *in vivo* de ácidos nucleicos, en particular para compactar y estabilizar un ácido nucleico con el objeto de la transfección del ácido nucleico sin mostrar los efectos secundarios negativos de los polímeros de alto peso molecular descritos arriba, sin ninguna biodegradabilidad o incluso alta toxicidad, aglomeración, baja actividad de transfección *in vivo*, etc. El complejo de carga portador polimérico de la invención proporciona también una transferencia de ácido nucleico *in vivo* eficiente particularmente vía intradérmica o intramuscular, incluyendo estabilidad en suero, estabilidad en sal, absorción eficiente, sin activación de complemento, liberación de ácido nucleico, etc. Este complejo de carga portador polimérico de la invención, cuando es provisto como adyuvante, soporta además la inducción y mantenimiento de una respuesta inmune adaptiva al iniciar o reforzar una respuesta inmune innata paralela. Además, el complejo de carga portador polimérico de la invención tiene una excelente estabilidad de almacenamiento, en particular durante la liofilización.

El complejo de carga portador polimérico de la invención como se define arriba comprende como un componente un portador polimérico formado por componentes catiónicos reticulados por disulfuro. El término "componente catiónico" se refiere típicamente a una molécula cargada, cargada positivamente (catión) a un valor de pH de aproximadamente 1 a 9, de preferencia a un valor de pH de o por debajo de 9, o por debajo de 8, o por debajo de 7, muy preferiblemente a valores de pH fisiológicos, por ejemplo, alrededor de 7,3 a 7,4. En consecuencia, un péptido, proteína o polímero catiónico de acuerdo con la presente invención se carga positivamente bajo condiciones fisiológicas, particularmente bajo condiciones salinas fisiológicas de la célula *in vivo*. La definición de "catiónico" también puede referir a componentes "policatiónicos".

En este contexto, los componentes catiónicos que forman la base del portador polimérico del complejo de carga portador polimérico de la invención por reticulación de disulfuro son péptidos catiónicos tal como se definen en la reivindicación 1. Otros componentes peptídicos adicionales pueden seleccionarse de entre cualquier péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico adecuado para este propósito, en particular cualquier péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico capaz de formar un complejo con un ácido nucleico como se define de acuerdo con la presente invención, y por ello preferentemente condensar el ácido nucleico. El péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico es preferentemente una molécula lineal, sin embargo, también pueden emplearse péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos ramificados.

Cada proteína, péptido o polímero catiónico o policatiónico del portador polimérico contiene al menos una porción -SH, muy preferiblemente al menos un residuo cisteína o cualquier grupo químico adicional que tenga una porción -SH capaz de formar un enlace de disulfuro después de la condensación con al menos una proteína, péptido o polímero catiónico o policatiónico adicional como componente catiónico del portador polimérico aquí mencionado.

Cada proteína, péptido o polímero catiónico, policatiónico o cualquier componente adicional del portador polimérico preferentemente se enlaza a sus componentes adyacentes (proteínas, péptido, polímeros catiónicos u otros componentes) por una reticulación de disulfuro. De preferencia, la reticulación por disulfuro es un enlace de disulfuro (reversible) (-S-S-) entre al menos una proteína, péptido o polímero catiónico o policatiónico y al menos una proteína, péptido o polímero catiónico o policatiónico adicional u otro componente del portador polimérico. La reticulación por disulfuro se forma típicamente por condensación de porciones -SH de los componentes del portador polimérico, particularmente de los componentes catiónicos. Esta porción -SH puede ser parte de la estructura de la proteína, péptido o polímero catiónico o policatiónico o cualquier componente adicional del portador polimérico antes de la reticulación por disulfuro o se puede añadir antes de la misma mediante una modificación como la definida abajo. En este contexto, los azufres adyacentes a un componente del portador polimérico, necesarios para proporcionar un enlace de disulfuro, pueden ser provistos por el propio componente, por ejemplo, por una porción -SH como la definida aquí o se pueden proporcionar modificando el componente en consecuencia para tener una porción -SH. Estas porciones -SH son proporcionadas típicamente por cada uno de los componentes, por ejemplo, mediante una cisteína o cualquier aminoácido (modificado) adicional o compuesto del componente que tenga una porción -SH. En caso de que el componente catiónico o cualquier componente adicional del portador polimérico sea un péptido o proteína, se prefiere que la porción -SH sea provista por al menos un residuo cisteína. Alternativamente, el componente del portador polimérico puede modificarse correspondientemente con una porción -SH, de preferencia mediante una reacción química con un compuesto que porte una porción -SH, de manera que cada uno de los componentes del portador polimérico porta al menos una de estas porciones -SH. Este compuesto que porta una porción -SH puede ser, por ejemplo, una cisteína (adicional) o cualquier aminoácido (modificado) adicional o compuesto del componente del portador polimérico que porte una porción -SH. Este compuesto puede ser también cualquier compuesto o porción no amino que contenga o permita introducir una porción -SH en el componente como el definido aquí. Estos compuestos no amino pueden unirse al componente del portador polimérico de acuerdo con la presente invención por reacciones químicas o de unión de compuestos, por ejemplo por la unión de un ácido 3-tiopropiónico o 2-iminotiolano (reactivo de Traut), por formación de amida (por ejemplo, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), por adición de Michael (por ejemplo, porciones de maleinimida, carbonilos α,β -insaturados, etc.), por química simplificada (por ejemplo, azidas o alquinos), por metátesis de alqueno/alquinos (por ejemplo, alquenos o alquinos), formación de imina o hidrazona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de formación de complejos (avidina, biotina, proteína G) o componentes que permitan reacciones de sustitución tipo S_N (por ejemplo, haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácidos sulfónicos, sales de oxifosfonio) u otras porciones químicas que pueden utilizarse en la unión de componentes adicionales. En algunos casos, la porción -SH puede estar enmascarada por grupos protectores durante la unión química al componente. Estos grupos protectores se conocen en la técnica y pueden eliminarse después del acoplamiento químico. En cada caso, la porción -SH, por ejemplo de una cisteína o de cualquier aminoácido o compuesto (modificado) adicional, puede estar presente en los extremos terminales o internamente en cualquier posición del componente del portador polimérico. Como se define aquí, cada uno de los componentes del portador polimérico tiene típicamente al menos una porción -SH, pero también puede tener dos, tres, cuatro, cinco o incluso

másporciones-SH.Ademásdelaunión de componentes catiónicos, se puede usar una porción -SH para unir componentes adicionales del portador polimérico como el definido aquí, particularmente un componente aminoácido, por ejemplo epítomos de antígeno,antígenos,anticuerpos,péptidospenetradoresdecélulas(porejemplo, TAT), ligandos, etc.

- 5 Como se definióarriba,elportadorpoliméricodelamolécula de carga portadora polimérica de la invención está formado por componentes catiónicos (o policationicos) reticulados por disulfuro de acuerdo con la reivindicación 1.

De acuerdocon la invención, el portador polimérico del complejo de carga portador comprende al menos un portador polimérico que está formado por componentes catiónicos reticulados por disulfuro, donde los componentes catiónicosdel rfeticulado con disulfuro son péptidos catiónicos, teniendo estos péptidos catiónicos una longitud de 3 a 100 aminoácidos, preferentementede 10 a 15, 16, 17, 18, 19 ó 20; o de 15 a 25 aminoácidos. Además,el portador polimérico pude incluir además al menos un caompinente catiónico (o policationico) seleccionado de entre péptidos o proteínas catiónicos o policationicos. Estos péptidosoproteínascatiónicosopolicationicospreferentemente tienen una longitud de 3 a 300 aminoácidos, preferentemente de uan longitud de aproximadamente 3 a 50 aminoácidos, en especial de una longitud de aproximadamente 3 a 25 aminoácidos, esto es una longitud de aproximadamente 3 a 10; 5 a 20; 5 a 15; 8 a 15, 16 o 17; 10 a 15, 16, 17, 18, 19, o 20; o 15 a 25 aminoácidos. Alternativa o adicionalmente, estos péptidos o proteínas catiónicos o policationicos pueden tener unpesomolecular deaproximadamente 0,01 kDa aalrededor de100 kDa, incluyendo unpeso molecular de aproximadamente0,5 kDaa alrededorde 100 kDa, de preferencia de aproximadamente 10 kDa a alrededor de 50 kDa, aúnmáspreferiblemente dealrededorde10kDaaaproximadamente30 kDa.

Las propiedades catiónicas del péptido o proteína catiónico o policationico o del portador polimérico completo, si el portador poliméricoestá compuesto completamente por péptidos o proteínas catiónicos o policationicos, se pueden determinar según su contenido de aminoácidos catiónicos. Preferentemente, el contenido de aminoácidos catiónicos en el péptido o proteína catiónico o policationico y/o en el portador polimérico es al menos un 10%,20%o30%,depreferenciaal menosun 40%,muypreferiblementeal menosun 50%,60%o70%,perotambiénpreferiblemente al menos un 80%, 90%, o incluso un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, más preferiblemente al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,90%,95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en el intervalo de aproximadamente10%a90%,muypreferiblementeenelintervalodealrededor de 15% a75%, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 20% a 50%, por ejemplo, 20, 30, 40 ó 50%, o en un intervalo formado por cualesquiera dos de los valores mencionados arriba, siemprecuandoelcontenidodetodoslosaminoácidos,porejemploaminoácidos catiónicos, lipófilos, hidrófilos,aromáticosyotros aminoácidos,enel péptido o proteína catiónico o policationico, o en el portador polimérico completo si el portador polimérico estácompuestocompletamentede péptidos o proteínas catiónicos o policationicos, sea del 100%.

En este contexto, preferentemente los aminoácidos catiónicos son los aminoácidos naturales Arg (Arginina), Lys (lisina), His (histidina) y Orn (Ornitina). Sin embargo, enunsentidomásampliocualquieraminoácido (no natural) queporteunacargacatiónicasobresucadenalateral también se puede contemplarparallevaracabolainvención.Sin embargo, son preferentes aquellos aminoácidos catiónicos cuyas cadenas laterales están cargadas positivamente encondiciones de pH fisiológicas. Enuna realización especialmente preferente, estos aminoácidos son Arg, Lys y Orn.

Preferentemente, estospéptidosoproteínascatiónicosopolicationicosdelportadorpolimérico,quecomprendenoestánmodificadosadicionalmente para comprenderal menos una porción -SH, se seleccionan de, sin limitarse a, péptidos o proteínas catiónicos tales como protamina,nucleolina,esperminaoespermidina,oligo-opoli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, oligo o poli- arginina, péptidos penetradores de células (CPPs), CPPs quiméricos tales como Transportan, o péptidos MPG,péptidos deuniónaVIH,Tat,VIH-1Tat (VIH),péptidosderivadosde Tat, miembros de la familia de la penetratina, por ejemplo penetratina, péptidos derivados de antenapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CCPs derivados de antimicrobianos, por ejemplo Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, KALA, PpTG20, Loligomere, FGF, Lactoferrina, histonas, péptidos derivados de VP22 o análogos, HSV, VP22 (herpes simple), MAP, KALA o dominiosde transduccióndeproteínasPTDs,PpT620,péptidosricosenprolina,péptidosricosenarginina,péptidosricos enlisina,Pep-1,L- oligómeros, péptidos de calcitonina, etc.

55 Alternativa o adicionalmente,estospéptidosoproteínas catiónicos o policationicos del portador polimérico, que comprenden o están modificados adicionalmente para comprender al menos una porción -SH, seseleccionan de, sin limitarse a, los siguientes péptidos catiónicos con la siguiente fórmula suma (I):



5 donde $l+m+n+o+x=3-100$, y, l, m, n, o, x , independientemente unos de otros, son cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 y 91-100 siempre que el contenido total de Arg (Arginina), Lys (Lisina), His (Histidina) y Orn (Ornitina) represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa es cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (es decir, naturales) o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y x es cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, siempre que el contenido total de Xaa no exceda el 90% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Cualquiera de los aminoácidos Arg, Lys, His, Orn y Xaa puede estar dispuesto en cualquier lugar del péptido. En este contexto, se son particularmente preferentes los péptidos o proteínas catiónicos en el intervalo de 7-30 aminoácidos. Con especial preferencia, los péptidos de esta fórmula son oligoargininas tales como, por ejemplo, Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₁₂, His₃Arg₉, Arg₉His₃, His₃Arg₉His₃, His₆Arg₉His₆, His₃Arg₄His₃, His₆Arg₄His₆, TyrSer₂Arg₉Ser₂Tyr, (ArgLysHis)₄, Tyr(ArgLysHis)₂Arg, etc.

15 De acuerdo con una realización preferente particular, estos péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del portador polimérico de la fórmula suma empírica (I) mostrada arriba pueden comprender, sin limitarse a, al menos uno del siguiente subgrupo de fórmulas:

Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₁₀, Arg₁₁, Arg₁₂, Arg₁₃, Arg₁₄, Arg₁₅₋₃₀;

Lys₇, Lys₈, Lys₉, Lys₁₀, Lys₁₁, Lys₁₂, Lys₁₃, Lys₁₄, Lys₁₅₋₃₀;

His₇, His₈, His₉, His₁₀, His₁₁, His₁₂, His₁₃, His₁₄, His₁₅₋₃₀;

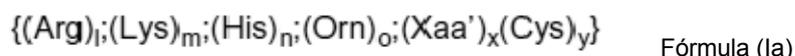
Orn₇, Orn₈, Orn₉, Orn₁₀, Orn₁₁, Orn₁₂, Orn₁₃, Orn₁₄, Orn₁₅₋₃₀;

20 De acuerdo con otra realización no reivindicada, los péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos del portador polimérico con la fórmula suma empírica (I) mostrada arriba y que comprenden o están modificadas adicionalmente para comprender al menos una porción -SH se pueden seleccionar preferiblemente de, sin limitarse a, al menos uno del siguiente subgrupo de fórmulas. Las siguientes fórmulas (al igual en la fórmula empírica (I)) no especifica ningún orden de aminoácido, sino que intentan reflejar fórmulas empíricas especificando exclusivamente el (número de) aminoácidos como componentes del péptido respectivo. En consecuencia, como ejemplo, la fórmula empírica Arg₍₇₋₂₉₎Lys significa que los péptidos dentro de la misma contienen de 7 a 29 residuos Arg y 1 residuo Lys en cualquier orden. Si los péptidos contienen 7 residuos Arg y 1 residuo Lys, todas las variantes que tengan 7 residuos Arg y 1 residuo Lys están incluidas. Por tanto, el residuo Lys puede estar colocado en cualquier lado en la secuencia de por ejemplo 8 aminoácidos de largo compuesta de 7 residuos Arg y 1 Lys. El subgrupo comprende preferentemente:

$Arg_{(4-29)}Lys_1, Arg_{(4-29)}His_1, Arg_{(4-29)}Orn_1, Lys_{(4-29)}His_1, Lys_{(4-29)}Orn_1, His_{(4-29)}Orn_1,$
 $Arg_{(3-28)}Lys_2, Arg_{(3-28)}His_2, Arg_{(3-28)}Orn_2, Lys_{(3-28)}His_2, Lys_{(3-28)}Orn_2, His_{(3-28)}Orn_2,$
 $Arg_{(2-27)}Lys_3, Arg_{(2-27)}His_3, Arg_{(2-27)}Orn_3, Lys_{(2-27)}His_3, Lys_{(2-27)}Orn_3, His_{(2-27)}Orn_3,$
 $Arg_{(1-26)}Lys_4, Arg_{(1-26)}His_4, Arg_{(1-26)}Orn_4, Lys_{(1-26)}His_4, Lys_{(1-26)}Orn_4, His_{(1-26)}Orn_4,$
 $Arg_{(3-28)}Lys_1His_1, Arg_{(3-28)}Lys_1Orn_1, Arg_{(3-28)}His_1Orn_1, Arg_1Lys_{(3-28)}His_1, Arg_1Lys_{(3-28)}Orn_1,$
 $Lys_{(3-28)}His_1Orn_1, Arg_1Lys_1His_{(3-28)}, Arg_1His_{(3-28)}Orn_1, Lys_1His_{(3-28)}Orn_1;$
 $Arg_{(2-27)}Lys_2His_1, Arg_{(2-27)}Lys_1His_2, Arg_{(2-27)}Lys_2Orn_1, Arg_{(2-27)}Lys_1Orn_2, Arg_{(2-27)}His_2Orn_1,$
 $Arg_{(2-27)}His_1Orn_2, Arg_2Lys_{(2-27)}His_1, Arg_1Lys_{(2-27)}His_2, Arg_2Lys_{(2-27)}Orn_1, Arg_1Lys_{(2-27)}Orn_2, Lys_{(2-27)}His_2Orn_1,$
 $Lys_{(2-27)}His_1Orn_2, Arg_2Lys_1His_{(2-27)}, Arg_1Lys_2His_{(2-27)}, Arg_2His_{(2-27)}Orn_1, Arg_1His_{(2-27)}Orn_2, Lys_2His_{(2-27)}Orn_1,$
 $Lys_1His_{(2-27)}Orn_2;$
 $Arg_{(1-26)}Lys_3His_1, Arg_{(1-26)}Lys_2His_2, Arg_{(1-26)}Lys_1His_3, Arg_{(1-26)}Lys_3Orn_1, Arg_{(1-26)}Lys_2Orn_2,$
 $Arg_{(1-26)}Lys_1Orn_3, Arg_{(1-26)}His_3Orn_1, Arg_{(1-26)}His_2Orn_2, Arg_{(1-26)}His_1Orn_3, Arg_3Lys_{(1-26)}His_1, Arg_2Lys_{(1-26)}His_2,$
 $Arg_1Lys_{(1-26)}His_3, Arg_3Lys_{(1-26)}Orn_1, Arg_2Lys_{(1-26)}Orn_2, Arg_1Lys_{(1-26)}Orn_3, Lys_{(1-26)}His_3Orn_1, Lys_{(1-26)}His_2Orn_2,$
 $Lys_{(1-26)}His_1Orn_3, Arg_3Lys_1His_{(1-26)}, Arg_2Lys_2His_{(1-26)}, Arg_1Lys_3His_{(1-26)}, Arg_3His_{(1-26)}Orn_1, Arg_2His_{(1-26)}Orn_2,$
 $Arg_1His_{(1-26)}Orn_3, Lys_3His_{(1-26)}Orn_1, Lys_2His_{(1-26)}Orn_2, Lys_1His_{(1-26)}Orn_3;$
 $Arg_{(2-27)}Lys_1His_1Orn_1, Arg_1Lys_{(2-27)}His_1Orn_1, Arg_1Lys_1His_{(2-27)}Orn_1, Arg_1Lys_1His_1Orn_{(2-27)};$
 $Arg_{(1-26)}Lys_2His_1Orn_1, Arg_{(1-26)}Lys_1His_2Orn_1, Arg_{(1-26)}Lys_1His_1Orn_2, Arg_2Lys_{(1-26)}His_1Orn_1,$
 $Arg_1Lys_{(1-26)}His_2Orn_1, Arg_1Lys_{(1-26)}His_1Orn_2, Arg_2Lys_1His_{(1-26)}Orn_1, Arg_1Lys_2His_{(1-26)}Orn_1, Arg_1Lys_1His_{(1-26)}Orn_2,$
 $Arg_2Lys_1His_1Orn_{(1-26)}, Arg_1Lys_2His_1Orn_{(1-26)}, Arg_1Lys_1His_2Orn_{(1-26)};$

5 De acuerdo con otra realización no reivindicada, los péptidos o proteínas catiónicos opolcatiónicos del portador polimérico, que tienen la fórmula suma empírica (I) mostrada arriba y que comprenden o están modificados además para comprender al menos una porción -SH, pueden seleccionarse, sin limitarse a, del grupo consistente en las fórmulas genéricas Arg₇ (también llamada R₇), Arg₉ (también llamada R₉), Arg₁₂ (también llamada R₁₂).

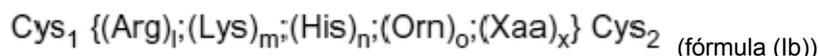
10 De acuerdo con otra realización no reivindicada, el péptido o proteína catiónico o policatiónico del portador polimérico, cuando se define de acuerdo con la fórmula $\{(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x\}$ (fórmula (I)) mostrada arriba y que comprende o está modificada además para comprender al menos una porción -SH, pueden seleccionarse, sin limitarse a, de la subfórmula (Ia):



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

20 Esta realización no reivindicada se puede aplicar a situaciones en las que el péptido o proteína catiónico o policatiónico del portador polimérico, por ejemplo cuando se define de acuerdo con la fórmula empírica (Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x (fórmula (I)) como se muestra arriba, comprende o ha sido modificado con al menos una cisteína como porción -SH en el significado anterior, de manera que el péptido catiónico o policatiónico como componente catiónico porte al menos una cisteína que es capaz de formar un enlace disulfuro con otros componentes del portador polimérico.

25 De acuerdo con otra realización preferida particular, el péptido o proteína catiónico o policatiónico del portador polimérico tal como se define en la reivindicación 1 puede seleccionarse, sin limitarse a, de la subfórmula (Ib):



donde la fórmula empírica $\{(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x\}$ (fórmula (I)) es como se define aquí y forma un núcleo de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula (I) (semiempírica) y donde Cys₁yCys₂soncisteínasproximales a,oterminalesa $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$. Ejemplos ilustrativos pueden comprender cualquiera de las secuencias anteriores flanqueadas por dos Cys y las siguientes secuencias:

5

Cys(Arg₇)Cys, Cys(Arg₈)Cys, Cys(Arg₉)Cys, Cys(Arg₁₀)Cys, Cys(Arg₁₁)Cys, Cys(Arg₁₂)Cys, Cys(Arg₁₃)Cys, Cys(Arg₁₄)Cys, Cys(Arg₁₅)Cys, Cys(Arg₁₆)Cys, Cys(Arg₁₇)Cys, Cys(Arg₁₈)Cys, Cys(Arg₁₉)Cys, Cys(Arg₂₀)Cys (SEQ ID NOs:1-14):

CysArg₇Cys Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 1)

CysArg₈Cys Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 2)

CysArg₉Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 3)

CysArg₁₀Cys Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 4)

CysArg₁₁Cys Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 5)

CysArg₁₂Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 6)

CysArg₁₃Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 7)

CysArg₁₄Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 8)

CysArg₁₅Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 9)

CysArg₁₆Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 10)

CysArg₁₇Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 11)

CysArg₁₈Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 12)

CysArg₁₉Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 13)

CysArg₂₀Cys: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (SEQ ID NO. 14)

Esta modalidad puede aplicarseasituacionesdondeel péptido o proteína catiónico o policatiónico del portador polimérico, por ejemplo cuando está definidodeacuerdoconlafórmulaempírica $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ (fórmula(I))mostradaarriba ha sido modificado con al menos dos cisteínas como porciones -SH en el significado anterior, de manera que el péptido catiónico o policatiónico del complejo de carga portador polimérico de la invención como componente catiónico porta al menos dos cisteínas (terminales) que son capaces de formar un enlace disulfuro con otros componentes del portador polimérico.

10

De acuerdo con una segunda alternativa, al menos un componente catiónico (o policatiónico) del portador polimérico se puede seleccionar de por ejemplo cualquier polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) adecuado en este contexto, siempre cuando este polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) tenga o esté modificado para tener al menos una porción -SH que proporcione un enlace de unión disulfuro al polímero catiónico o policatiónico con otro componente del portador polimérico como el definido aquí. Así, igual que como se ha definido aquí, el portador polimérico puede comprender los mismos o diferentes polímeros catiónicos o policatiónicos.

15

En el caso específico de que el componente catiónico del portador polimérico comprenda un polímero catiónico o policatiónico (no peptídico), las propiedades catiónicas del polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) pueden determinarse según su contenido en cargas catiónicas cuando se compara con las cargas totales de los componentes del polímero catiónico. Preferentemente, el contenido de carga catiónica del polímero catiónico a un pH (fisiológico) como el definido aquí es de al menos el 10%, 20% o 30%, de preferencia al menos el 40%, muy preferiblemente al menos el 50%, 60% o 70%, pero también preferentemente al menos el 80%, 90% o incluso 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, muy preferiblemente al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en un rango de aproximadamente el 10% al 90%, muy preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 30% a 100%, incluso preferiblemente en el intervalo de alrededor de 50% a 100%, por ejemplo 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%, o en un rango formado por cualesquiera dos de los valores mencionados arriba, siempre que el contenido de todas las cargas, por ejemplo cargas positivas y negativas, a un pH (fisiológico) como el definido aquí del polímero catiónico completo sea del 100%.

25

30

Preferentemente, el componente catiónico (no peptídico) del portador polimérico representa un polímero catiónico o policatiónico, típicamente con un peso molecular de alrededor de 0,100,5 kDa a aproximadamente 100 kDa, preferentemente de alrededor de 1 kDa a aproximadamente 75 kDa, muy preferiblemente de alrededor de 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, todavía más preferiblemente de alrededor de 5 kDa a aproximadamente 30 kDa, o un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, aún más preferiblemente de alrededor de 10 kDa a aproximadamente 30 kDa. Además, el polímero catiónico o policatiónico (no peptídico) típicamente tiene al menos una porción -

35

SH capaz de formar un enlace disulfuro después de su condensación con cualquier otro componente catiónico u otros componentes del portador polimérico como se define aquí.

5 En el contexto anterior, el componente catiónico (no peptídico) del portador polimérico se puede seleccionar de acrilatos, acrilatos modificados, tales como pDMAEMA (metilacrilato de poli(dimetilaminoetil)), quitosanos, aziridinas o 2-etil-2-oxazolina (que forma oligo-etileniminas u oligo-etileniminas modificadas), polímeros obtenidos por la reacción de bisacrilatos con aminas formando oligo-beta-aminoésteres o poli amido aminas, u otros polímeros tales como poliésteres, policarbonatos, etc. Cada molécula de estos polímeros catiónicos o policationicos (no peptídicos) tiene típicamente al menos una porción -SH, donde ésta al menos una porción -SH se puede introducir en el polímero catiónico o policationico (no peptídico) por modificaciones químicas, por ejemplo usando inmunotiolano, ácido 3-tiopropiónico o por la introducción de porciones -SH contenidas en aminoácidos, tales como cisteína o cualquier aminoácido (modificado) adicional. Estas porciones -SH son preferentemente como las ya definidas arriba.

15 En el contexto del portador polimérico, los componentes catiónicos, que forman la base del portador polimérico por reticulación de disulfuro, pueden ser iguales o diferentes entre sí. Es también particularmente preferente que el portador polimérico de la presente invención comprenda mezclas de péptidos, proteínas o polímeros catiónicos y opcionalmente componentes adicionales como los aquí definidos que están reticulados por enlaces disulfuro como se describe aquí.

20 En este contexto, el complejo de carga portador polimérico de la invención, debido a su portador polimérico variable, ventajosamente permite combinar las propiedades deseadas de diferentes péptidos catiónicos o policationicos (cortos), proteínas o polímeros u otros componentes. El portador polimérico, por ejemplo, permite compactar eficientemente ácidos nucleicos con el propósito de una transfección eficiente de ácidos nucleicos para la terapia adyuvante, para la terapia génica, para la supresión génica u otras estrategias in pérdida de actividad, mostrando en particular una transfección eficiente de un ácido nucleico en diferentes líneas de células *in vitro*, pero particularmente para la transfección *in vivo*. El portador polimérico y así el complejo de carga portador polimérico de la invención es además no tóxico para células, proporcional a la liberación eficiente de su carga de ácido nucleico, es estable durante la liofilización y puede aplicarse como agente inmunoestabilizador o adyuvante. Preferentemente, el complejo de carga portador polimérico puede inducir la citoquina antiviral IFN-alfa.

30 En particular, el portador polimérico formado por componentes catiónicos enlazados con disulfuro permite variar considerablemente su contenido en péptidos o polímeros y con ello modular sus propiedades biofísicas/bioquímicas, en particular las propiedades catiónicas del portador polimérico, de forma bastante fácil y rápida, por ejemplo incorporando como componentes catiónicos los mismos o diferentes péptidos de polímeros catiónicos y adicionalmente añadiendo otros componentes al portador polimérico. Incluso a pesar de que consiste en unidades monoméricas no tóxicas bastante pequeñas, el portador polimérico forma una secuencia de unión catiónica larga que proporciona una fuerte condensación de la carga de ácido nucleico y estabilidad del complejo. Bajo las condiciones reductoras del citosol (por ejemplo, GSH en el citosol), el complejo se degrada rápidamente en sus componentes (catiónicos); los cuales se degradan a su vez (por ejemplo, oligopéptidos). Esto soporta la liberación de la carga de ácido nucleico en el citosol. Debido a la degradación en oligopéptidos o polímeros pequeños en el citosol, no se observa toxicidad como la conocida para los oligopéptidos o polímeros de alto peso molecular, por ejemplo a partir de poliarginina de alto peso molecular.

45 En consecuencia, el portador polimérico del complejo de carga portador polimérico de la invención puede comprender diferentes péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policationicos (cortos) seleccionados de péptidos, proteínas o polímeros (no peptídicos) catiónicos o policationicos como los definidos arriba, opcionalmente junto con componentes adicionales como los definidos aquí.

50 Además, el portador polimérico del complejo de carga portador polimérico de la invención como el definido arriba, muy preferiblemente al menos uno de los diferentes péptidos o polímeros (no peptídicos) catiónicos o policationicos (cortos) diferentes que forman la base del portador polimérico por reticulación de disulfuro, pueden estar modificados, de preferencia antes de la reticulación con disulfuro, con al menos un componente adicional. Alternativamente, el portador polimérico puede modificarse como tal con al menos un componente adicional. También puede comprender opcionalmente al menos un componente adicional, que forme típicamente el portador polimérico unido por disulfuro con los demás péptidos catiónicos o policationicos (cortos) como los definidos arriba por reticulación de disulfuro.

55 Para permitir la modificación de un péptido catiónico o policationico o un polímero (no peptídico) como el definido arriba, cada uno de los componentes del portador polimérico puede contener (de preferencia justo antes de la reticulación de disulfuro) también al menos una porción funcional adicional que permite la fijación de estos componentes adicionales aquí definidos. Estas porciones funcionales pueden

5 seleccionarse de funcionalidades que permitan la unión de componentes adicionales, por ejemplo funcionalidades como las aquí definidas, por ejemplo por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, aminas, etc.), por adición de Michael (por ejemplo, porciones maleinimida, carbonilos α,β -insaturados, etc.), por química simplificada (por ejemplo, azidas o alquinos), por metátesis de alquenos/alquinos (por ejemplo, alquenos/alquinos), formación de imina o hidrazona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de formación de complejos (avidina, biotina, proteína G) o componentes que permitan reacciones de sustitución tipo S_n (por ejemplo, haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácidos sulfónicos, sales de oxifosfonio) u otras porciones químicas que puedan utilizarse en la unión de componentes adicionales.

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

25 El componente aminoácido (AA) puede contener o puede estar flanqueado (por ejemplo, terminalmente) por una porción que contenga -SH que permita introducir este componente (AA) por un enlace disulfuro en el portador polimérico aquí definido. En el caso específico de que la porción que contenga -SH sea una cisteína, el componente aminoácido (AA) también puede ser leído como -Cys-(AA)-Cys-, donde Cys representa cisteína y proporciona la porción -SH necesaria para un enlace disulfuro. La porción que contiene -SH también se puede introducir en el componente aminoácido (AA) usando cualquiera de las modificaciones o reacciones citadas arriba para el componente catiónico o cualquiera de sus componentes.

30 Además, el componente aminoácido (AA) puede ser provisto con dos porciones SH (o incluso más), por ejemplo en una forma representada por la fórmula HS-(AA)-SH para permitir la unión a dos funcionalidades por enlaces disulfuro, por ejemplo cuando el componente aminoácido (AA) se usa como enlazador entre dos componentes adicionales (por ejemplo, como enlazador entre dos polímeros catiónicos). En este caso, preferentemente se protege una porción -SH en una primera etapa usando un grupo protector como se conoce en la técnica, llevando a un componente aminoácido (AA) de fórmula SH-(AA)-S-
35 grupo protector. Luego, el componente aminoácido (AA) puede unirse a un componente adicional del portador polimérico para formar un primer enlace disulfuro por medio de la porción -SH no protegida. La porción -SH protegida es luego típicamente desprotegida y unida a una porción -SH libre adicional de un componente adicional del portador polimérico para formar un segundo enlace disulfuro.

40 Alternativamente, el componente aminoácido (AA) puede ser provisto con otras funcionalidades como ya se describió arriba para los demás componentes del portador polimérico, que permitan la unión del componente aminoácido (AA) a cualesquiera componentes del portador polimérico.

45 Así, de acuerdo con la presente invención, el componente aminoácido (AA) puede unirse a componentes adicionales del portador polimérico con o sin usar un enlace disulfuro. La unión sin enlace disulfuro se puede lograr mediante cualquiera de las reacciones descritas arriba, preferentemente uniendo el componente aminoácido (AA) a otro componente del portador polimérico usando una química de amida como la aquí definida. Si se desea o es necesario, el otro terminal del componente aminoácido (AA), por ejemplo el extremo N o C, se puede usar para acoplar otro componente, por ejemplo un ligando L. Para ello, el otro extremo del componente aminoácido (AA) preferentemente comprende o está modificado
50 para comprender una funcionalidad adicional, por ejemplo una especie alquino (véase arriba), que se puede usar para añadir el otro componente por química simplificada. Si el ligando se une por un enlace ácido lábil, el enlace preferentemente es cortado en el endosoma y el portador polimérico presenta el componente aminoácido (AA) en su superficie.

55 El componente aminoácido (AA) puede estar presente como un componente adicional del portador polimérico como el definido arriba, por ejemplo, como un enlazador entre componentes catiónicos, por ejemplo como enlazador entre un péptido catiónico y un péptido catiónico adicional, como enlazador entre un polímero catiónico y un polímero catiónico adicional, como enlazador entre un péptido catiónico y un polímero catiónico, preferentemente todo como se ha definido aquí, o como un componente adicional del portador polimérico, por ejemplo uniendo el componente aminoácido (AA) al portador polimérico o a un

componente del mismo, por ejemplo por medio de cadenas laterales, porciones SH o por medio de porciones adicionales como las aquí definidas, donde el componente aminoácido (AA) preferentemente se modifique en consecuencia.

- 5 De acuerdo con una alternativa adicional y particularmente preferida, el componente aminoácido (AA) se puede usar para modificar el portador polimérico, en particular el contenido de componentes catiónicos del portador polimérico definido arriba.

10 En este contexto es preferente que el contenido de componentes catiónicos en el portador polimérico sea de al menos el 10%, 20% o 30%, preferiblemente al menos el 40%, muy preferiblemente al menos el 50%, 60% o 70%, pero también preferentemente al menos el 80%, 90%, o incluso el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, más preferiblemente al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, o puede estar en un intervalo de alrededor de 30% a 100%, muy preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 50% a 100%, todavía más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 70% a 100%, por ejemplo, 70, 80, 90 ó 100%, o en un intervalo formado por cualesquiera dos de los valores mencionados arriba, siempre y cuando el contenido de todos los componentes en el portador polimérico sea del 100%.

15 En el contexto de la presente invención, el componente aminoácido (AA) se puede seleccionar de las siguientes alternativas.

20 De acuerdo con una primera alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un componente aminoácido (AA) aromático. La incorporación de aminoácidos o secuencias aromáticas como componente aminoácido (AA) aromático en el portador polimérico de la presente invención hace posible una unión diferente (segunda) del portador polimérico al ácido nucleico debido a interacciones de los aminoácidos aromáticos con las bases de la carga de ácido nucleico, en contraste con la unión de los mismos por secuencias cargadas catiónicas de la molécula portadora polimérica al esqueleto fosfato. Esta interacción puede ocurrir, por ejemplo, por intercalaciones o por unión a ranuras menores o mayores. Este tipo de interacción no es propensa a la descompactación por los socios de formación de complejos aniónicos (por ejemplo, heparina, ácidos hialurónicos), los cuales se encuentran principalmente en la matriz extracelular *in vivo*, y también es menos susceptible a los efectos de salificación.

30 Para ello, los aminoácidos del componente aminoácido (AA) aromático pueden seleccionarse y usarse de los mismos diferentes aminoácidos aromáticos, por ejemplo seleccionados de Trp, Tyr o Phe. Alternativamente, los aminoácidos (o el componente aminoácido aromático completo (AA)) se puede seleccionar de las siguientes combinaciones de péptidos Trp-Tyr, Tyr-Trp, Trp-Trp, Tyr-Tyr, Trp-Tyr-Trp, Tyr-Trp-Tyr, Trp-Trp-Tyr, Tyr-Trp-Tyr, Trp-Trp-Tyr, Tyr-Trp-Tyr-Trp, Trp-Trp-Tyr-Trp, Phe-Tyr, Tyr-Phe, Phe-Phe, Phe-Tyr-Phe, Tyr-Phe-Tyr, Phe-Phe-Phe, Phe-Tyr-Phe-Tyr, Tyr-Phe-Tyr-Phe, Phe-Phe-Phe-Phe, Phe-Trp, Trp-Phe, Phe-Phe, Phe-Trp-Phe, Trp-Phe-Trp, Phe-Trp-Phe-Trp, Trp-Phe-Trp-Phe, o Tyr-Tyr-Tyr-Tyr, etc. (SEQ ID NOs: 15-42). Estas combinaciones de péptidos pueden repetirse, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 o todavía más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar entre sí como sea adecuado.

40 Además, el componente aminoácido (AA) aromático puede contener o puede estar flanqueado por una porción que contenga -SH que permita introducir este componente por un enlace disulfuro como parte adicional del portador polimérico definido arriba, por ejemplo como un enlazador. Esta porción que contiene -SH puede ser cualquier porción como la definida aquí adecuada para acoplar un componente como el aquí definido o un componente adicional como el aquí definido. Como ejemplo, esta porción que contiene -SH puede ser una cisteína. Después, el componente aminoácido (AA) aromático se puede seleccionar por ejemplo de combinaciones de péptidos Cys-Tyr-Cys, Cys-Trp-Cys, Cys-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Cys, Cys-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Trp-Tyr-Trp-Cys, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Cys, Cys-Trp-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Trp-Tyr-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Trp-Cys, Cys-Trp-Trp-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Cys, Cys-Phe-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Phe-Cys, Cys-Phe-Phe-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Tyr-Phe-Cys, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Cys, Cys-Phe-Phe-Phe-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Tyr-Phe-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Phe-Cys, Cys-Phe-Phe-Phe-Phe-Cys, Cys-Phe-Trp-Cys, Cys-Trp-Phe-Cys, Cys-Phe-Trp-Phe-Cys, etc. Cada Cys arriba también se puede reemplazar por cualquier péptido o compuesto químico modificado que porte una porción -SH libre como se define aquí. (SEQ ID NOS: 43-75). Estas combinaciones de péptidos pueden estar repetidas, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 o todavía más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar entre sí según sea adecuado.

55 Además, el componente aminoácido (AA) aromático puede contener o representar al menos una prolina, la cual puede servir como un rompedor de estructura de secuencias más largas de Trp, Tyr y Phe en el componente aminoácido (AA) aromático, preferentemente dos, tres o más prolinas.

De acuerdo con una segunda alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un componente aminoácido (AA) hidrófilo (y preferentemente polar no cargado). La incorporación de aminoácidos hidrófilos (y preferentemente polares no cargados) o secuencias como componente aminoácido (AA) hidrófilo (y preferentemente polar no cargado) en el portador polimérico de la presente invención hace posible una unión más flexible a la carga de ácido nucleico. Esto lleva a una compactación más efectiva de la carga de ácido nucleico y, por consiguiente, a una mejor protección contra las nucleasas y la descompactación no deseada. Permite también la provisión de un portador polimérico (largo) con una carga catiónica reducida sobre el portador completo y, en este contexto, que se ajuste más a las propiedades de unión si se desea o es necesario.

Para este propósito, los aminoácidos del componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) pueden seleccionarse y usarse de los mismos o diferentes aminoácidos hidrófilos (y de preferencia polares no cargados), seleccionados por ejemplo de Thr, Ser, Asn o Gln. Alternativamente, los aminoácidos (o el componente aminoácido (AA) hidrófilo completo (y de preferencia polar no cargado) se pueden seleccionar de las siguientes combinaciones de péptidos Ser-Thr, Thr-Ser, Ser-Ser, Thr-Thr, Ser-Thr-Ser, Thr-Ser-Thr, Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr, Ser-Thr-Ser-Thr, Thr-Ser-Thr-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr-Thr, Gln-Asn, Asn-Gln, Gln-Gln, Asn-Asn, Gln-Asn-Gln, Asn-Gln-Asn, Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn, Gln-Asn-Gln-Asn, Asn-Gln-Asn-Gln, Gln-Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn-Asn, Ser-Asn, Asn-Ser, Ser-Ser, Asn-Asn, Ser-Asn-Ser, Asn-Ser-Asn, Ser-Ser-Ser, Asn-Asn-Asn, Ser-Asn-Ser-Asn, Asn-Ser-Asn-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser o Asn-Asn-Asn-Asn, etc. (SEQ ID NOs: 76-111). Estas combinaciones de péptidos pueden repetirse, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 o todavía más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar entre sí según sea adecuado.

Además, el componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) puede contener o puede estar bloqueado por una porción que contenga -SH, la cual permite introducir este componente por un enlace disulfuro como una parte adicional de la fórmula genérica (I) arriba, por ejemplo, como un enlace. Esta porción que contiene -SH puede ser cualquier porción como la aquí definida adecuada para acoplar un componente como el aquí definido a un componente adicional como el definido aquí. Como ejemplo, esta porción que contiene -SH puede ser un acisteína. Después, por ejemplo el componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) puede seleccionarse de, por ejemplo, combinaciones de péptidos Cys-Thr-Cys, Cys-Ser-Cys, Cys-Ser-Thr-Cys, Cys-Thr-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Cys, Cys-Ser-Thr-Ser-Cys, Cys-Thr-Ser-Thr-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Thr-Cys, Cys-Ser-Thr-Ser-Thr-Cys, Cys-Thr-Ser-Thr-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Thr-Thr-Cys, Cys-Asn-Cys, Cys-Gln-Cys, Cys-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Cys, Cys-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Cys, Cys-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Asn-Cys, Cys-Gln-Asn-Gln-Cys, Cys-Gln-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Asn-Cys, Cys-Ser-Cys, Cys-Ser-Asn-Cys, Cys-Asn-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Cys, Cys-Ser-Asn-Ser-Cys, Cys-Asn-Ser-Asn-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Ser-Asn-Ser-Asn-Cys, Cys-Asn-Ser-Asn-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys, etc. Cada Cys arriba también se puede reemplazar por cualquier péptido o compuesto químico modificado que porte una porción -SH libre como la definida aquí (SEQ ID NOs: 112-153). Estas combinaciones de péptidos pueden repetirse, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 o todavía más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar entre sí según sea adecuado.

Además, el componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) puede contener al menos una prolina, la cual puede servir como un rompedor de estructuras de secuencias más largas de Ser, Thr y Asn en el componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado), de preferencia dos, tres o más prolinas.

De acuerdo con una tercera alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un componente aminoácido (AA) lipófilo. La incorporación de aminoácidos lipófilos o secuencias como componente aminoácido (AA) lipófilo en el portador polimérico de la presente invención hace posible una compactación más fuerte de la carga de ácido nucleico y/o el portador polimérico y su carga de ácido nucleico cuando se forma un complejo. Esto se debe en particular a interacciones de una o más hebras de polímero del portador polimérico, particularmente de secciones lipófilas del componente aminoácido (AA) lipófilo y la carga de ácido nucleico. Esta interacción preferentemente añadirá estabilidad adicional al complejo entre el portador polimérico y su carga de ácido nucleico. Esta estabilización se puede comparar en cierta forma con una especie de reticulación no covalente entre diferentes hebras de polímero. Especialmente en un ambiente acuoso esta interacción es típicamente fuerte y proporciona un efecto significativo.

Para ello, los aminoácidos del componente aminoácido (AA) lipófilo pueden seleccionarse ya sea de los mismos o diferentes aminoácidos lipófilos, por ejemplo, seleccionados de Leu, Val, Ile, Ala, Met. Alternativamente, el aminoácido AA (o el componente aminoácido (AA) lipófilo completo) pueden seleccionarse de las siguientes combinaciones de péptidos Leu-Val, Val-Leu, Leu-Leu, Val-Val, Leu-Val-Leu, Val-Leu-Val, Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val, Leu-Val-Leu-Val, Val-Leu-Val-Leu, Leu-Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val-Val, Ile-Ala, Ala-Ile, Ile-Ile, Ala-Ala,

Ile-Ala-Ile, Ala-Ile- Ala, Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala, Ile-Ala-Ile-Ala, Ala-Ile-Ala-Ile, Ile-Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala- Ala, Met-Ala, Ala-Met, Met- Met, Ala-Ala, Met-Ala-Met, Ala-Met-Ala, Met-Met-Met, Ala-Ala-Ala, Met-Ala-Met-Ala, Ala-Met-Ala-Met o Met-Met-Met-Met, etc (SEQ ID NOs:154- 188). Estas combinaciones de péptidos pueden repetirse, por ejemplo 1, 2, 3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,14,15, otodavía más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar tres ísegún sea adecuado.

Además, el componente aminoácido (AA) lipófilo puede contener o puede estar flanqueado por una porción que contenga -SH, la cual permita introducir este componente por un enlace disulfuro como una parte adicional del portador polimérico anterior, por ejemplo como un enlazador. Esta porción que contiene -SH puede ser cualquier porción como la aquí definidas adecuada para acoplar un componente como el definido aquí a un componente adicional como el definido. Como ejemplo, esta porción que contiene -SH puede ser un acisteína. Luego, por ejemplo, el componente aminoácido (AA) lipófilo puede seleccionarse de por ejemplo las combinaciones de péptidos Cys-Val-Cys, Cys-Leu-Cys, Cys-Leu-Val-Cys, Cys-Val-Leu-Cys, Cys-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Cys, Cys-Leu-Val-Cys, Cys-Leu-Val-Leu-Cys, Cys-Val-Leu-Val-Cys, Cys-Leu-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Val-Cys, Cys-Ala-Cys, Cys-Ile-Cys, Cys-Ile-Ala-Cys, Cys-Ala- Ile- Cys, Cys-Ile-Ile-Cys, Cys-Ala-Ala-Cys, Cys-Ile-Ala-Ile-Cys, Cys-Ala-Ile-Ala-Cys, Cys-Ile-Ile-Ile- Cys, Cys-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Ile-Ala-Ile-Ala-Cys, Cys-Ala-Ile-Ala-Ile-Cys, Cys-Ile-Ile-Ile-Ile-Cys o Cys-Ala-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Cys, Cys-Met-Ala-Cys, Cys-Ala-Met-Cys, Cys-Met-Met-Cys, Cys-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Ala-Met-Cys, Cys-Ala-Met-Ala-Cys, Cys-Met-Met-Met-Cys, Cys-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Ala-Met-Ala-Cys, Cys- Ala-Met-Ala-Met-Cys, Cys-Met-Met-Met-Met-Cyso Cys-Ala-Ala-Ala-Ala-Cys, etc. Cada Cys arriba también se puede reemplazar por cualquier péptido o compuesto químico modificado que porte una porción -SH libre como la definida aquí (SEQ ID NOs: 189 - 229). Estas combinaciones de péptidos pueden repetirse, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 o todavía más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar entre sí según sea adecuado.

Además, el componente aminoácido (AA) lipófilo puede contener al menos una prolina, que puede servir como un rompedor de estructuras de secuencias más largas de Leu, Val, Ile, Ala y Met en el componente aminoácido (AA) lipófilo, de preferencia dos, tres o más prolinas.

Finalmente, de acuerdo con una cuarta alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un componente aminoácido (AA) básico débil. La incorporación de aminoácidos básicos débiles o secuencias como componente aminoácido (AA) básico débil en el portador polimérico de la presente invención puede servir como una esponja de protones y facilitar el escape endosómico (llamado también liberación endosómica) (efecto de esponja de protones). La incorporación de este componente aminoácido (AA) básico débil incrementa preferentemente la eficiencia de transfección.

Para este propósito, los aminoácidos del componente aminoácido (AA) básico débil pueden seleccionarse ya sea de los mismos u otros aminoácidos débiles, por ejemplo seleccionados de histidina o aspartato (ácido aspártico). Alternativamente, los aminoácidos básicos débiles (o el componente aminoácido (AA) básico débil completo) pueden seleccionarse de las siguientes combinaciones de péptidos Asp-His, His-Asp, Asp-Asp, His-His, Asp-His-Asp, His-Asp-His, Asp-Asp-His, His-His-His, Asp-His-Asp-His, His-Asp-His-Asp, Asp-Asp-Asp o His-His-His-His, etc (SEQ ID NOs: 230-241). Estas combinaciones de péptidos pueden repetirse, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 o todavía más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar entre sí según sea adecuado.

Además, el componente aminoácido (AA) básico débil puede contener o puede estar flanqueado por una porción que contenga -SH, la cual permita introducir este componente por un enlace disulfuro como una parte adicional de la fórmula genérica (I) arriba, por ejemplo como un enlazador. Esta porción que contiene -SH puede ser cualquier porción como la definida en la presente acoplada para acoplar un componente como el definido aquí a un componente adicional como el indicado. Como ejemplo, esta porción que contiene -SH puede ser un acisteína. Después, por ejemplo, el componente aminoácido (AA) básico débil puede seleccionarse de, por ejemplo, las combinaciones de péptidos Cys-His-Cys, Cys-Asp-Cys, Cys-Asp-His-Cys, Cys-His-Asp-Cys, Cys-Asp-Asp-Cys, Cys-His-His-Cys, Cys-Asp-His-Asp- Cys, Cys-His-Asp-His-Cys, Cys-Asp-Asp-Asp-Cys, Cys-His-His-His-Cys, Cys-Asp-His-Asp-His-Cys, Cys-His-Asp- His-Asp-Cys, Cys- Asp-Asp-Asp-Asp-Cys o Cys- His-His-His-His-Cys, etc. Cada Cys arriba también se puede reemplazar por cualquier péptido o compuesto químico modificado que porte una porción -SH libre como la aquí definida (SEQ ID NOs: 242-255). Estas combinaciones de péptidos pueden repetirse, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 ó incluso aún más veces. Estas combinaciones de péptidos también se pueden combinar entre sí según sea adecuado.

Además, el componente aminoácido (AA) débil puede contener al menos una prolina, que puede servir como un rompedor de estructuras de secuencias más largas de histidina o aspartato (ácido aspártico) en el componente aminoácido (AA) básico débil, de preferencia dos, tres o más prolinas.

De acuerdo con una quinta alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un péptido de señal o una secuencia de señal, una señal o secuencia de localización, una señal de localización nuclear o una secuencia (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular (por ejemplo TAT), etc. De preferencia, este componente aminoácido (AA) se une al portador polimérico o a otro componente del portador polimérico por medio de un enlace disulfuro (reversible). En este contexto, el péptido de señal o la secuencia de señal, una señal o secuencia de ubicación, un anticuerpo, un péptido de penetración celular (por ejemplo TAT), etc. comprende además al menos una porción -SH. En este contexto, una señal o secuencia de ubicación o una señal o secuencia de ubicación nuclear (NLS) se puede usar para dirigir el complejo de carga portador polimérico de la invención a células diana específicas (por ejemplo hepatocitos o células presentadoras de antígenos) y preferentemente permite un translocalización del portador polimérico a una diana específica, por ejemplo, dentro de la célula, dentro del núcleo, dentro del compartimento endosómico, secuencias para la matriz mitocondrial, secuencias de localización para la membrana plasmática, secuencias de localización para el aparato de Golgi, el núcleo, el citoplasma y el citoesqueleto, etc. Este péptido de señal, una señal o secuencia de localización o una señal de localización nuclear se puede usar para el transporte de cualquier ácido nucleico definidos aquí, de preferencia un ARN o un ADN, muy preferiblemente un ARNsh o un ADNp, por ejemplo dentro del núcleo. Sin limitarse a, este péptido de señal, una señal o secuencia de ubicación o una señal de ubicación nuclear puede comprender, por ejemplo, secuencias de localización para el retículo endoplásmico. Las señales o secuencias de localización particulares o señales de localización nucleares pueden incluir, por ejemplo, KDEL (SEQ ID NO: 256), DDEL (SEQ ID NO: 257), DEEL (SEQ ID NO: 258), QEDL (SEQ ID NO: 259), RDEL (SEQ ID NO: 260), y GQNLSTSN (SEQ ID NO: 261), secuencias de localización nuclear, incluyendo PKKKRKV (SEQ ID NO: 262), PQKKIKS (SEQ ID NO: 263), QPKKP (SEQ ID NO: 264), RKKR (SEQ ID NO: 265), RKKRRQRRRAHQ (SEQ ID NO: 266), RQARRNRRRRWRERQR (SEQ ID NO: 267), MPLTRRRPAASQALAPPTP (SEQ ID NO: 268), GAALTILV (SEQ ID NO: 269) y GAALTLLG (SEQ ID NO: 270), secuencias de localización para el compartimento endosómico, incluyendo MDDQRDLISNNEQLP (SEQ ID NO: 271), secuencias de localización para la matriz mitocondrial, incluyendo MLFNLRXXLNNAAFRHGHNFMRNFRCGQPLX (SEQ ID NO: 272), secuencias de localización para la membrana plasmática GCVSSNP (SEQ ID NO: 273), GQTVTTPL (SEQ ID NO: 274), GQELSQHE (SEQ ID NO: 275), GNSPSYNP (SEQ ID NO: 276), GVSGSKGQ (SEQ ID NO: 277), GQTITTP (SEQ ID NO: 278), GQTLTTP (SEQ ID NO: 279), GQIFRSA (SEQ ID NO: 280), GQIHGLSP (SEQ ID NO: 281), GARASVLS (SEQ ID NO: 282) y GCTLSAEE (SEQ ID NO: 283), secuencias de localización para el retículo endoplásmico y el núcleo, incluyendo GAQVSSQK (SEQ ID NO: 284) y GAQLSRNT (SEQ ID NO: 285), secuencias de localización para el aparato de Golgi, el núcleo, el citoplasma y el citoesqueleto, incluyendo GNAAAANK (SEQ ID NO: 286), secuencias de localización para el citoplasma y citoesqueleto, incluyendo GNEASYPL (SEQ ID NO: 287), secuencias de localización para la membrana plasmática y citoesqueleto, incluyendo GSSKSKPK (SEQ ID NO: 288), etc. Ejemplos de secuencias de péptidos de señal secretora como los definidos aquí incluyen, sin estar limitarse a, secuencias de señal de moléculas MHC clásicas o no clásicas (por ejemplo, secuencias de señal de moléculas MHC I y II, por ejemplo de la molécula MHC clase I HLA-A*0201), secuencias de señal de citoquinas o inmunoglobulinas como las definidas aquí, secuencias de señal de la cadena invariante de inmunoglobulinas o anticuerpos como las definidas aquí, secuencias de señal de Lamp1, Tapasina, Erp57, Calreticulina, Calnexina, y proteínas asociadas a membrana adicionales o de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (ER) o al compartimento endosómico-lisosómico. De manera particularmente preferente, se pueden usar de acuerdo con la presente invención las secuencias de señal de la molécula MHC clase I HLA-A*0201. Este componente adicional puede unirse, por ejemplo, a un polímero catiónico o a cualquier otro componente del portador polimérico como el definido aquí. De preferencia este péptido de señal, señal o secuencia de ubicación o señal o secuencia de ubicación nuclear (NLS) se une al portador polimérico o a otro componente del portador polimérico por un enlace disulfuro (reversible). Para ello, el componente (AA) comprende además al menos una porción -SH como la aquí definida. La unión a cualquiera de los componentes del portador polimérico, también puede producirse empleando un enlace ácido lábil, preferentemente vía una cadena lateral de cualquiera de los componentes del portador polimérico que permita desprender o liberar el componente adicional a valores de pH más bajos, por ejemplo a valores de pH fisiológicos como los definidos aquí.

Además, de acuerdo con otra alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser un péptido o proteína funcional, que puede modular la funcionalidad del portador polimérico en consecuencia. Estos péptidos o proteínas funcionales como componente aminoácido (AA) comprenden preferentemente cualesquiera péptidos o proteínas como los aquí definidos, por ejemplo como los definidos aquí como proteínas terapéuticamente activas. De acuerdo con una alternativa, estos péptidos o proteínas funcionales adicionales pueden comprender los llamados péptidos de penetración celular (CPPs) o péptidos catiónicos de transporte. Se prefieren particularmente los CPPs que incluyen un cambio de conformación mediado por pH en el endosoma y llevan a una liberación mejorada del portador polimérico (en complejo con un ácido nucleico) del endosoma por inserción en la capalipídica del liposoma. Estos péptidos de penetración celular (CPPs) o péptidos catiónicos de transporte pueden incluir, sin limitarse a,

protamina, nucleolina, espermina o espermidina, oligo- o poli-L-lisina (PLL), polipéptidos básicos, oligo o poli-arginina, péptidos de penetración celular (CPPs), CPPs quiméricos, tales como Transportan, opéptidosMPG, péptidos de unión a VIH, Tat, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, miembros de la familia de la penetratina, por ejemplo Penetratina, péptidos derivados de Antenapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, etc., CPPs derivados de antimicrobianos, por ejemplo Buforin- 2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP, MAP, KALA, PpTG20, Loligomere, FGF, Lactoferrina, histonas, péptidos derivados de VP22 o análogos, HSV, VP22 (Herpes simple), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTDs), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, Pep-1, L- oligómeros, péptidos de calcitonina, etc. Este componente aminoácido (AA) también se puede unir a cualquier componente del portador polimérico como el definido aquí. Preferentemente se une al portador polimérico o a otro componente del portador polimérico por un enlace disulfuro (reversible). Para ello, el componente aminoácido (AA) comprende preferentemente al menos una porción -SH como la definida aquí. La unión a cualquier de los componentes del portador polimérico también se puede lograr usando una porción SH o un enlace ácido lábil, de preferencia vía una cadena lateral de cualquiera de los componentes del portador polimérico que permita desprender o liberar el componente adicional a valores de pH más bajos, por ejemplo a valores de pH fisiológicos como los definidos en la presente.

De acuerdo con una última alternativa, el componente aminoácido (AA) puede ser cualquier péptido o proteína que pueda realizar una función favorable en la célula. Son particularmente preferentes péptidos o proteínas seleccionados de péptidos o proteínas terapéuticamente activos, de antígenos, por ejemplo antígenos de tumor, antígenos patógenos (antígenos animales, antígenos virales, antígenos protozoarios, antígenos bacterianos, antígenos alérgicos), antígenos autoinmunes o antígenos adicionales, de alérgenos, de anticuerpos, de proteínas o péptidos inmunoestimuladores, de receptores de células T específicas de antígenos o de cualquier otra proteína o péptido adecuado para una aplicación (terapéutica) específica como la definida abajo para codificar ácidos nucleicos. Son particularmente preferentes los epítomos de péptidos a partir de antígenos como los definidos aquí.

El portador polimérico puede comprender al menos uno de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos mencionados arriba o componentes adicionales, por ejemplo (AA), pudiendo cualquiera de las alternativas anteriores puede combinarse entre sí, y se pueden formar polimerizando éstos en una reacción de condensación de polimerización por medio de sus porciones -SH.

De acuerdo con otro aspecto, el portador polimérico del complejo de carga portador polimérico de la invención o sus componentes individuales, por ejemplo los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos mencionados arriba o componentes adicionales, por ejemplo (AA), se puede modificar aún más con un ligando, preferentemente un carbohidrato, en especial un azúcar, todavía más preferiblemente con manosa. Preferentemente, este ligando se une al portador polimérico o a un componente del portador polimérico por un enlace disulfuro (reversible) o por adición de Michael. En caso de que el ligando se unen por un enlace disulfuro, el ligando comprende además al menos una porción -SH. Estos ligandos se pueden usar para dirigir el complejo de carga portador polimérico de la invención a células diana específicas (por ejemplo hepatocitos o células presentadoras de antígeno). En este contexto, es particularmente preferente la manosa como ligando en caso de que las células dendríticas sean la diana, especialmente para propósitos de vacunación o adyuvantes.

De acuerdo con un aspecto más de la invención, el complejo de carga portador polimérico de la invención puede comprender componentes (AA) como los definidos arriba que no comprendan porciones -SH. Estos componentes (AA) pueden añadirse antes o durante la reacción de formación de complejos de la al menos una molécula de ácido nucleico. Se estima que, de esta manera, los componentes (AA) son incorporados (no covalentemente) en el complejo de carga portador polimérico de la invención sin la inclusión de los componentes (AA) en el propio portador polimérico por polimerización (covalente).

De acuerdo con una realización específica, el complejo de carga portador polimérico de la invención completo puede formarse a partir de una condensación de polimerización (de al menos uno) de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos mencionados arriba o componentes adicionales, por ejemplo (AA), por medio de sus porciones -SH en una primera etapa y formando el complejo de ácido nucleico con el portador polimérico en una segunda etapa. El portador polimérico puede contener entonces un número de al menos uno o todavía más de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos o componentes adicionales, por ejemplo (AA) definidos arriba, preferentemente el número determinado por el intervalo anterior.

De acuerdo con una realización específica alternativa, el complejo de carga portador polimérico de la invención se forma por la condensación de polimerización de al menos uno de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos mencionados arriba o componentes adicionales, por ejemplo los (AA) mencionados arriba, por medio de sus porciones -SH simultáneamente para formar complejos de carga de ácido nucleico en el portador polimérico (preparado *in situ*). Asimismo, el portador polimérico también puede

entonces contener aquí un número de al menos uno o todavía más de los mismos o diferentes de los péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos mencionados arriba o componentes adicionales, por ejemplo de los (AA) mencionados arriba, preferentemente el número determinado por el intervalo anterior.

5 El complejo de carga portador polimérico de la invención comprende además como carga al menos un ácido nucleico (molécula). En el contexto de la presente invención, esta molécula de ácido nucleico puede ser cualquier ácido nucleico adecuado, seleccionado, por ejemplo, de cualquier ADN (de una sola hebra o de doble hebra), de preferencia, sin estar limitado a, por ejemplo ADN genómico, moléculas de ADN de una sola hebra, moléculas de ADN de doble hebra, ADN de codificación, cebadores de ADN, sondas de ADN, ADN inmunoestimulador, oligodesoxirribonucleótidos (cortos de un oligonucleótido de ADN (corto)), o se puede seleccionar, por ejemplo, de cualquier PNA (ácido nucleico péptido) o puede seleccionarse, por ejemplo, de cualquier ADN (hebra individual o doble hebra), preferentemente, sin limitarse a, oligorribonucleótidos (corto) de un oligonucleótido de ARN (corto), un ARN de codificación, un ARN mensajero (ARNm), un ARN inmunoestimulador, un ARN de interferencia pequeño (ARNsi), un ARN antisentido, un micro ARN, un ARN nuclear pequeño (ARNsn), un ARN de pasador pequeño (sh) o ribointerruptores, ribozimas o aptámeros, etc. La molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención también puede ser un ARN ribosómico (ARNr), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN mensajero (ARNm) o un ARN viral (ARNv). De preferencia, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención es un ARN. Muy preferiblemente, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención es un ARN de hebra individual (lineal), aún más preferiblemente un ARNm o un ARN inmunoestimulador. En el contexto de la presente invención, un ARNm es típicamente un ARN que está compuesto de varios elementos estructurales, por ejemplo una estructura 5'-CAP opcional, una región 5'-UTR opcional, un sitio de unión ribosómico hacia el extremo 5' seguido por una región de codificación, una región 3'-UTR opcional, que puede ser seguida por una cola poli-A (y/o una cola poli-C). Un ARNm puede ocurrir como un ARN mono-, di- o incluso multicistrónico, es decir, un ARN que porte las secuencias de codificación de uno, dos o más proteínas o péptidos. Estas secuencias de codificación en ARNm di- o incluso multicistrónico pueden estar separadas por al menos una secuencia IRES, por ejemplo como la definida aquí.

Además, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención puede ser un ácido nucleico (molécula) de una sola o de doble hebra (que también se puede considerar como un ácido nucleico (molécula) debido a asociación no covalente de dos ácidos nucleicos (moléculas) de hebra individual) o un ácido nucleico parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra, que al menos parcialmente son auto-complementarios (ambos de ellos parcialmente moléculas de ácido nucleico parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra se forman típicamente por una molécula de ácido nucleico de hebra individual más larga y más corta o por dos moléculas de ácido nucleico de una sola hebra, que tienen casi la misma longitud, donde una molécula de ácido nucleico de una sola hebra es en parte complementaria a la otra molécula de ácido nucleico de una sola hebra y ambas forman entonces una molécula de ácido nucleico de doble hebra en esta región, es decir, un ácido nucleico (molécula) parcialmente de doble hebra o parcialmente de una sola hebra. Preferiblemente, el ácido nucleico (molécula) puede ser una molécula de ácido nucleico de una sola hebra. Más aún, el ácido nucleico (molécula) puede ser una molécula de ácido nucleico circular o lineal, de preferencia una molécula de ácido nucleico lineal.

De acuerdo con una alternativa, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención puede ser un ácido nucleico de codificación, por ejemplo un ADN o ARN. Este ADN o ARN de codificación puede ser cualquier ADN o ARN como el definido aquí. Preferiblemente, este ADN o ARN de codificación puede ser un ADN o ARN de una sola o de doble hebra, muy preferiblemente un ADN o ARN de una sola hebra y/o ADN o ARN circular o lineal, muy preferiblemente un ADN o ARN lineal. De manera aún más preferible, el ADN o ARN de codificación puede ser un ADN o ARN de una sola hebra (lineal). Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede ser un ARN mensajero (ARNm) (de una sola hebra) (lineal). Este ARNm se puede presentar como un ARN mono-, di- o incluso multicistrónico, es decir, un ARN que porte las secuencias de codificación de una, dos o más proteínas o péptidos. Estas secuencias de codificación en ARNm di- o incluso multicistrónico pueden estar separadas por al menos una secuencia IRES, por ejemplo, como la aquí definida.

Ácidos nucleicos de codificación:

55 La molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención puede codificar para una proteína o un péptido, que se puede seleccionar, sin estar limitado a, por ejemplo, proteínas o péptidos terapéuticamente activos, incluyendo proteínas adyuvantes, de antígenos, por ejemplo, antígenos tumorales, antígenos patógenos (por ejemplo, seleccionado de antígenos animales, de antígenos virales, de antígenos de protozoarios, de antígenos bacterianos), antígenos alérgicos, antígenos autoinmunes o antígenos adicionales, de alérgenos, de anticuerpos, de proteínas o péptidos inmunoestimuladores, de receptores de células T específicas de antígenos, o de cualquier otra proteína o péptido adecuado para una aplicación (terapéutica) específica, donde el ácido nucleico de

codificación puede ser transportado en una célula, un tejido o un organismo y la proteína puede expresarse subsecuentemente en esta célula, tejido u organismo.

a) Proteínas terapéuticamente activas

5 En el contexto de la presente invención, las proteínas o péptidos terapéuticamente activos pueden codificarse por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención definido aquí. Las proteínas terapéuticamente activas se definen aquí como proteínas que tienen un efecto en la sanación, de preferencia profilácticamente o para tratar terapéuticamente una enfermedad, de preferencia como la definida aquí, o son proteínas de las cuales un individuo tiene necesidad. Éstas pueden seleccionarse de cualquier proteína recombinante o aislada que se presente naturalmente o que se diseña sintéticamente conocida por una persona experta en la técnica anterior. Sin estar restringidas a las mismas, las proteínas terapéuticamente activas pueden comprender proteínas capaces de estimular o inhibir la transducción de señales en la célula, por ejemplo citoquinas, linfocinas, monocinas, factores de crecimiento, receptores, moléculas de transducción de señales, factores de transcripción, etc.; anticoagulantes; antitrombinas; proteínas antialérgicas; factores apoptóticos o proteínas relacionadas con la apoptosis, enzimas terapéuticas activas y cualquier proteína relacionada con cualquier enfermedad adquirida o hereditaria.

Una proteína terapéuticamente activa que se puede codificar por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención definido aquí también puede ser una proteína adyuvante. En este contexto, una proteína adyuvante se debe entender preferentemente como cualquier proteína capaz de provocar una respuesta inmune innata como la aquí definida. Preferiblemente, esta respuesta inmune innata comprende la activación de un receptor de reconocimiento de patrón, tal como 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 humanos o de receptores tipo Toll de murino TLR1 a TLR13. Muy preferiblemente, la proteína adyuvante se selecciona de proteínas adyuvantes humanas o de proteínas adyuvantes patógenas seleccionadas del grupo consistente en, sin limitarse a, proteínas bacterianas, proteínas de protozoarios, proteínas virales o proteínas fúngicas, proteínas animales, en particular proteínas adyuvantes bacterianas. Además, pueden usarse también ácidos nucleicos que codifican para proteínas humanas implicadas en efectos adyuvantes (por ejemplo, ligandos de receptores de reconocimiento de patrones, receptores de reconocimiento de patrones, proteínas de las vías de transducción de señales, factores de transcripción o citoquinas).

b) Antígenos

La molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención definido aquí puede alternativamente codificarse 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 es capaz de desencadenar una respuesta inmune específica de antígeno, por ejemplo, por la formación de anticuerpos o células T específicas de antígenos como parte de una respuesta inmune adaptativa. En este contexto, la primera etapa de una respuesta inmune adaptativa es la activación de las células T específicas de antígenos naives por células presentadoras de antígenos. Esto se produce en los tejidos linfoides y órganos a través de los cuales las células T naives están pasando constantemente. Los tres tipos de células que pueden servir como células presentadoras de antígenos son células dendríticas, macrófagos y células B. Cada una de estas células tiene una función distinta para provocar respuestas inmunes. Las células dendríticas simples absorben antígenos por fagocitosis y macropinocitosis y son estimuladas por infección para migrar al tejido linfoides local, donde se diferencian en células dendríticas maduras. Los macrófagos ingieren antígenos en partículas tales como bacterias y son inducidos por agentes infecciosos a expresar moléculas MHC clase II. La capacidad única de las células B para unirse e internalizar antígenos de proteínas solubles por medio de sus receptores puede ser importante para inducir células T. Al presentar el antígeno sobre moléculas MHC se logra la activación de células T que inducen su proliferación y diferenciación en células T efectoras de brazos. La función más importante de las células T efectoras es la eliminación de células infectadas por células T citotóxicas CD8+ y la activación de macrófagos por células TH1, que juntos constituyen la inmunidad mediada por células, y la activación de células B por células TH2 como TH1 para producir diferentes clases de anticuerpos, conduciendo así a una respuesta inmune humoral. Las células T reconocen un antígeno por sus receptores de células T que no reconocen y se unen al antígeno directamente, pero en su lugar reconocen fragmentos de péptidos cortos, por ejemplo, de antígenos de proteínas de patógenos que se unen a moléculas MHC sobre las superficies de otras células.

Las células T entran dentro de dos clases principales que tienen diferentes funciones efectoras. Las dos clases se distinguen por la expresión de las proteínas de superficie celular CD4 y CD8. Estos dos tipos de células T difieren en la clase de molécula MHC que reconocen. Hay dos clases de moléculas MHC - moléculas MHC clase I y MHC clase II - que difieren en su estructura y patrón de expresión en tejidos del cuerpo. Las células T CD4+ se unen a una molécula MHC clase II y las células T

CD8+ a una molécula MHC clase I. Las moléculas MHC clase I y MHC clase II tienen distintas distribuciones entre las células, que reflejan las funciones efectoras diferentes de las células T que las reconocen. Las moléculas MHC clase I presentan péptidos de patógenos, comúnmente virus para células TCD8+, que se diferencian en células T citotóxicas que están especializadas en matar cualquier célula que reconozcan específicamente. Casi todas las células expresan moléculas MHC clase I, aunque el nivel de expresión constitutiva varía de un tipo de célula al otro. Sin embargo, no sólo los péptidos patógenos de virus son presentados por moléculas MHC clase I, también auto-antígenos tales como antígenos tumorales son presentados por ellas. Las moléculas MHC clase I se unen a péptidos de proteínas degradadas en el citosol y transportadas al retículo endoplásmico. De esta manera las moléculas MHC clase I sobre la superficie de células infectadas con virus u otros patógenos citosólicos presentan péptidos de este patógeno. Las células T CD8+ que reconocen complejos MHC clase I: péptido se especializan en matar cualquier célula que presente péptidos extraños y así liberan al cuerpo de células infectadas con virus u otros patógenos citosólicos. La función principal de las células T CD4+ (células T auxiliares CD4+) que reconocen moléculas MHC clase II es la de activar otras células efectoras en el sistema inmunológico. Así, las moléculas MHC clase II se encuentran normalmente en los linfocitos B, células dendríticas y macrófagos, células que participan en respuestas inmunes, pero no en otras células tisulares. Los macrófagos, por ejemplo, son activados para matar los patógenos intravesiculares que portan, y las células B para secretar inmunoglobulinas contra moléculas extrañas. Se impide que las moléculas MHC clase II se unan a péptidos en el retículo endoplásmico y entonces las moléculas MHC clase II se unen a péptidos de proteínas que son degradadas en los endosomas. Pueden capturar péptidos de patógenos que hayan entrado al sistema vesicular de macrófagos, o de antígenos internalizados por células dendríticas inmaduras o los receptores de inmunoglobulina de células B. Los patógenos que se acumulan en gran cantidad dentro de los macrófagos y las vesículas de células dendríticas tienden a estimular la diferenciación de células TH1, mientras que los antígenos extracelulares tienden a estimular la producción de células TH2. Las células TH1 activan las propiedades microbicidas de macrófagos e inducen a las células B a hacer anticuerpos IgG que son muy efectivos para opsonizar patógenos extracelulares para su ingestión por células fagocíticas, mientras que las células TH2 inician la respuesta humoral al activar células B naives para secretar IgM, e inducen la producción de anticuerpos de débil opsonización tales como IgG1 e IgG3 (ratón) e IgG2 e IgG4 (humano) así como IgA e IgE (ratón y humano).

En el contexto de la presente invención, los antígenos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido comprenden típicamente cualquier antígeno, epítopo antigénico o péptido antigénico que esté dentro de la definición anterior, muy preferiblemente antígenos de proteínas y péptidos, por ejemplo antígenos tumorales, antígenos alérgicos, auto-antígenos autoinmunes, antígenos patógenos, etc. en particular los antígenos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido en la presente pueden ser antígenos generados fuera de la célula, más típicamente antígenos no derivados del propio organismo anfitrión (por ejemplo un humano) (es decir no auto-antígenos), sino derivados de las células hospederas fuera del organismo anfitrión, por ejemplo, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoológicos, antígenos animales, antígenos alérgicos, etc. Los antígenos alérgicos (antígenos de alergia) son típicamente antígenos que causan una alergia en un humano y pueden derivarse ya sea de humanos o de otras fuentes. Además, los antígenos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido pueden ser además antígenos generados dentro de la célula, el tejido o el cuerpo. Estos antígenos incluyen antígenos derivados del propio organismo anfitrión (por ejemplo, un humano), por ejemplo antígenos tumorales, auto-antígenos o antígenos propios, tales como auto-antígenos autoinmunes, etc., pero también antígenos (no propios) como los definidos aquí, los cuales se han derivado originalmente de células hospederas fuera del organismo anfitrión, pero son fragmentados o degradados dentro del cuerpo, tejido o célula, por ejemplo mediante degradación (proteasas), metabolismo, etc.

Una clase de antígenos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido comprende antígenos tumorales. Los "antígenos tumorales" se localizan preferentemente sobre la superficie de la célula (tumoral). Los antígenos tumorales también pueden seleccionarse de proteínas que son sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con una célula normal. Además, los antígenos tumorales también incluyen antígenos expresados en células que no son a su vez (u originalmente en ellas mismas) generados sino asociados con el tumor supuesto. Los antígenos que están relacionados con vasos de suministro al tumor o re-formación de los mismos, en particular aquellos antígenos que están asociados con la neovascularización, por ejemplo factores de crecimiento tales como VEGF, bFGF, etc., también están incluidos aquí. Los antígenos relacionados con un tumor incluyen además antígenos de células o tejidos que típicamente infiltran el tumor. Además, algunas sustancias (normalmente proteínas o péptidos) son expresadas en pacientes que sufren (con o sin conocimiento) una enfermedad cancerosa y se presentan en concentraciones incrementadas en los fluidos corporales de dichos pacientes. Estas sustancias se conocen también como

omo "antígenos tumorales"; sin embargo, no son antígenos en el estricto significado de una sustancia inductora de una respuesta inmune. La clase de antígenos tumorales pueden dividirse más en antígenos específicos de tumor (TSAs) y antígenos asociados con tumor (TAAs). Los TSAs sólo pueden ser presentados por células tumorales y nunca por células "sanas" normales. Son típicamente resultado de una mutación específica de tumor. Los TAAs, más comunes, se presentan normalmente por células tanto tumorales como sanas. Estos antígenos son reconocidos y la célula presentadora de antígenos puede ser destruida por células T citotóxicas. Además, los antígenos tumorales también se pueden presentar sobre la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado. En este caso, pueden ser reconocidos por anticuerpos. Los antígenos tumorales particularmente preferentes se seleccionan del grupo consistente en 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIPHPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinina-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemato, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina/m, BING-4, BRCA1, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína similar a coactosina, collage XXIII, COX-2, CT-9/ BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cip-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201-R17I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, homeobox NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmadura, kalikreina-2, kalikreina-4, Ki 67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína de matriz 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, MN/CAIX-antígeno, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clasa I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m, 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 menor bcr-abl, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-cinasa, Pin-1, Pml/PARalfa, POTE, PRAME, PRDX5/m, prosteína, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP, survivina, survivina-2B, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGF beta, TGFbetaRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, tirocinasa, UPA, VEGF, VEGFR-2/FLK-1, and WT1. Estos antígenos tumorales preferentemente pueden seleccionarse del grupo consistente en MAGE-A1 (por ejemplo, MAGE-A1 de acuerdo con el número de registro M77481), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6 (por ejemplo, MAGE-A6 de acuerdo con el número de registro NM_005363), MAGE-C1, MAGE-C2, melan-A (por ejemplo, melan-A de acuerdo con el número de registro NM_005511), GP100 (por ejemplo, GP100 de acuerdo con el número de registro M77348), tirocinasa (por ejemplo, tirocinasa de acuerdo con el número de registro NM_000372), survivina (por ejemplo, survivina de acuerdo con el número de registro AF077350), CEA (por ejemplo, CEA de acuerdo con el número de registro NM_004363), Her-2/neu (por ejemplo, Her-2/neu de acuerdo con el número de registro M11730), WT1 (por ejemplo, WT1 de acuerdo con el número de registro NM_000378), PRAME (por ejemplo, PRAME de acuerdo con el número de registro NM_006115), EGFR1 (receptor de factor de crecimiento epidérmico 1) (por ejemplo, EGFR1 (receptor de factor de crecimiento epidérmico 1) de acuerdo con el número de registro AF288738), MUC1, mucina-1 (por ejemplo, mucina-1 de acuerdo con el número de registro NM_002456), SEC61G (por ejemplo, SEC61G de acuerdo con el número de registro NM_014302), hTERT (por ejemplo, hTERT número de registro NM_198253), 5T4 (por ejemplo, 5T4 de acuerdo con el número de registro NM_006670), NY-Eso-1 (por ejemplo, NY-Eso1 de acuerdo con el número de registro NM_001327), TRP-2 (por ejemplo, TRP-2 de acuerdo con el número de registro NM_001922), STEAP, PCA, PSA, PSMA, etc.

De acuerdo con otra alternativa, una clase más de antígenos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido comprende antígenos alérgicos. Estos antígenos alérgicos pueden seleccionarse de antígenos derivados de diferentes fuentes, por ejemplo de animales, plantas, hongos, bacterias, etc. Los alérgenos en este contexto incluyen por ejemplo céspedes, pólenes, mohos, fármacos o numerosos activadores ambientales, etc. Los antígenos alérgicos pertenecen típicamente a diferentes clases de compuestos, tales como ácidos nucleicos y sus fragmentos, proteínas o péptidos y sus fragmentos, carbohidratos, polisacáridos, azúcares, lípidos, fosfolípidos, etc. De particular interés en el contexto de la presente invención son los antígenos que pueden ser codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, es decir, antígenos de proteínas o péptidos y sus fragmentos o epítomos, o ácidos nucleicos y sus fragmentos, particularmente ácidos nucleicos y sus fragmentos, que codifican para estos antígenos de proteínas o péptidos y sus fragmentos o epítomos.

c) Anticuerpos

De acuerdo con una alternativa más, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido puede codificarse para un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. De acuerdo con la presente invención, este anticuerpo puede seleccionarse de cualquier anticuerpo, por ejemplo cualquier anticuerpo producido recombinantemente de origen natural, conocido en la técnica, en particular 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 cubre específicamente anticuerpos monoclonales y policlonales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y bloqueadores o neutralizantes) y especies de anticuerpos con la especificidad poliepitópica. De acuerdo con la invención, el término "anticuerpo" comprende típicamente cualquier anticuerpo conocido en la técnica (por ejemplo anticuerpos IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), tales como anticuerpos de origen natural, anticuerpos generados por inmunización en un organismo anfitrión, anticuerpos que fueron aislados e identificados a partir de anticuerpos de origen natural o anticuerpos generados por inmunización en un organismo anfitrión y producidos recombinantemente por métodos biomoleculares conocidos en la técnica, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, intracuerpos, es decir, anticuerpos expresados en células y ubicados opcionalmente en compartimientos celulares específicos, y fragmentos y variantes de los anticuerpos mencionados arriba. En general, un anticuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada, ambas con dominios variables y constantes. La cadena ligera consiste en un dominio variable N-terminal, VL, y un dominio constante C-terminal, CL. Por el contrario, la cadena pesada del anticuerpo IgG, por ejemplo, comprende un dominio variable N-terminal, VH, y tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3.

En el contexto de la presente invención, los anticuerpos codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido pueden comprender preferentemente anticuerpos de longitud completa, es decir anticuerpos compuestos de las cadenas pesada completa y ligera completa, como se describió arriba. Sin embargo, derivados de anticuerpos tales como fragmentos, variantes o aductos de anticuerpos también pueden ser codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido. Preferentemente, los fragmentos de anticuerpo se seleccionan de fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Facb, pFc', Fd y Fv de los anticuerpos (de longitud completa) mencionados arriba. En general, los fragmentos de anticuerpo se conocen en la técnica. Por ejemplo, un fragmento Fab ("fragmento, unión a antígeno") está compuesto de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Los dos dominios variables se unen alejándose sobre antígenos específicos. Las dos cadenas están conectadas 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 están enlazados por un enlace artificial, en general un enlace de polipéptido tal como un péptido compuesto de 15-25 residuos de glicina, prolina y/o serina.

En el presente contexto, es preferible que las cadenas diferentes del anticuerpo o fragmento de anticuerpo sean codificadas por una molécula de ácido nucleico multicistérica. Alternativamente, las diferentes cepas del anticuerpo o fragmento de anticuerpo son codificadas por varios ácidos nucleicos (secuencias) monocistéricos.

ARNsi:

De acuerdo con una alternativa más, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido puede estar en forma de ARNs, de preferencia ARNsi. Un ARN o un ARNsi es de interés particularmente en relación con el fenómeno de interferencia de ARN. La técnica *in vitro* de interferencia de ARN (ARNi) se basa en moléculas de ARN de doble hebra (ARNds) que desencadenan la supresión específica de secuencia de la expresión génica (Zamore (2001) Nat. Struct. Biol. 9:746-750; Sharp (2001) Genes Dev. 15:485-490; Hannon (2002) Nature 411: 244-251). En la transfección de células de mamífero con ARNs largos, la activación de la proteína cinasa 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 (ARN de interferencia pequeño) más corto, por ejemplo de 21 a 23 meros, porque los efectos no específicos no son desencadenados por un ARNsi más corto que 30 pb (Elbashir y col. (2001) Nature 411:494-498).

La molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido puede entonces ser un ADN de doble hebra (ARNds) que tenga una longitud de 17 a 29, de preferencia de 19 a 25 y preferiblemente sea al menos 90%, muy preferiblemente 95% y especialmente 100% (de los nucleótidos de un ARNds) complementaria a una sección de la molécula de ácido nucleico de una proteína o antígeno

(terapéuticamente relevante) descrita anteriormente aquí (como ingrediente activo) o de cualquier proteína adicional como la descrita aquí, ya sea una sección de codificación o no codificación, de preferencia una sección de codificación. Esta molécula de ácido nucleico (parte de) puede ser llamada aquí una "secuencia diana" y puede ser cualquier molécula de ácido nucleico como la definida aquí, de preferencia un ADN genómico, un ADNc, un ARN, por ejemplo, un ARNm, etc., 90% complementario significa que con una longitud de ARNs descrito aquí de, por ejemplo, 20 nucleótidos, el ARNs contiene no más de 2 nucleótidos que no muestran complementariedad con la sección correspondiente de la secuencia diana. La secuencia del ARN de doble hebra usado de acuerdo con la invención es, sin embargo, de preferencia completamente complementaria en su estructura general con una sección de la secuencia diana.

En este contexto, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención puede ser un ARNs de estructura general 5'-(N₁₇₋₂₉)-3', de preferencia de estructura general 5'-(N₁₉₋₂₅)-3', muy preferiblemente de la estructura general 5'-(N₁₉₋₂₄)-3', o aún más preferiblemente de la estructura general 5'-(N₂₁₋₂₃)-3', donde para cada estructura general cada N es un nucleótido (de preferencia diferente) de una sección de la secuencia diana, de preferencia se selecciona de un número continuo de 17 a 29 nucleótidos de una sección de la secuencia diana, y está presente en la estructura general 5'-(N₁₇₋₂₉)-3' en su orden natural. En principio, todas las secciones de una longitud de 17 a 29, de preferencia de 19 a 25 pares de bases presentes en la secuencia diana pueden servir para preparar un ARNs como el definido aquí. Igualmente, las moléculas de ARNs usadas como molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención también se pueden dirigir contra secuencias de nucleótidos de una proteína o antígeno (terapéuticamente relevante) descrito anteriormente en la presente (como ingrediente activo) que no descansa en la región de codificación, en particular en la región de no codificación 5' de la secuencia diana, por ejemplo entonces contra regiones de no codificación de la secuencia diana que tengan una función reguladora. La secuencia objetivo del ARNs usado como una molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención puede, por tanto, descansar en la región traducida y no traducida de la secuencia objetivo y/o en la región de los elementos de control de una proteína o antígeno descrito anteriormente aquí. La secuencia objetivo para un ARNs usada como la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención también puede descansar en la región de superposición de una secuencia no traducida y traducida; en particular, la secuencia objetivo puede comprender al menos un nucleótido hacia el extremo 5' del triplete de inicio de la región de codificación, por ejemplo, de un ADN genómico, un ADNc, un ARN o un ARNm, etc.

Ácidos nucleicos inmunoestimuladores:

a) Ácidos nucleicos inmunoestimuladores CpG:

De acuerdo con otra alternativa, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención definido aquí puede estar en forma de un ácido nucleico CpG (inmunoestimulador), en particular CpG-ARN o CpG-ADN, que induzca de preferencia una respuesta inmune innata. Un CpG-ARN o CpG-ADN usado de acuerdo con la invención puede ser un CpG-ADN de hebra individual (ssCpG-ADN), un CpG-ADN de doble hebra (ADNs), un CpG-ARN de hebra individual (ssCpG-ARN) o un CpG-ARN de doble hebra (dsCpG-ARN). El ácido nucleico CpG usado de acuerdo con la invención está de preferencia en forma de CpG-ARN, muy preferiblemente en forma de CpG-ARN de hebra individual (ssCpG-ARN). También de preferencia, estos ácidos nucleicos CpG tienen una longitud como la descrita arriba. Preferiblemente los motivos CpG son no metilados.

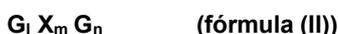
b) ARN inmunoestimulador (ARNsi):

Igualmente, de acuerdo con una alternativa más, la molécula de ácido nucleico (inmunoestimuladora) del complejo de carga portador polimérico de la invención puede estar en forma de un ARN inmunoestimulador (ARNsi), que provoque de preferencia una respuesta inmune innata. Este ARN inmunoestimulador puede ser cualquier ARN (doble hebra o hebra individual), por ejemplo un ARN de codificación, como el definido aquí. De preferencia, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN de hebra individual, doble hebra o parcialmente doble hebra, muy preferiblemente un ARN de hebra individual, y/o un ARN circular o lineal, muy preferiblemente un ARN lineal. Más preferiblemente, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN de hebra individual (lineal). Todavía más preferiblemente, el ARN inmunoestimulador puede ser un ARN de no codificación (largo) (lineal) de una sola hebra). En este contexto, se prefiere particularmente que el ARN si porte un trifosfato en su extremo 5' que es el caso para el ARN transcrito *in vitro*. Un ARN inmunoestimulador también se puede presentar como un oligonucleótido de ARN corto como el definido aquí. Un ARN inmunoestimulador según se usa en la presente puede seleccionarse además de cualquier clase de moléculas de ARN encontradas en la naturaleza o que se preparan sintéticamente, y que pueden inducir una respuesta inmune innata y pueda soportar una respuesta inmune adaptativa inducida por un antígeno. En este contexto, una respuesta inmune puede presentarse de varias maneras. Un factor sustancial para una respuesta inmune (adaptativa) adecuada es la estimulación de diferentes sub-poblaciones de células T. Los linfocitos T se dividen típicamente en dos sub-poblaciones, las células T auxiliares 1 (Th1) y las 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 ellos. Así, las células Th1 asisten en la respuesta inmune celular por la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otro lado, promueven la respuesta inmune tumoral mediante estimulación de células B para su conversión en células plasmáticas y por la formación de anticuerpos (por ejemplo, contra antígenos). La relación Th1/Th2 es por tanto de gran importancia en la inducción y mantenimiento de una respuesta inmune adaptativa. En relación con la presente invención, la relación Th1/Th2 de la respuesta inmune (adaptativa) se desplaza de preferencia en la dirección hacia la respuesta celular (respuesta Th1), induciéndose entonces una respuesta inmune celular. De acuerdo con un ejemplo, el sistema inmunológico innato que puede soportar una respuesta inmune adaptativa se puede activar por ligandos de receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs son una familia de polipéptidos de receptor 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 cierto número de ligandos TLR específicos. Se encontró por ejemplo que el ADN bacteriano no metilado y análogos sintéticos del mismo (ADN CpG) son ligandos para TLR (Hemmi H y col., (2000) Nature 408:740-5; Bauer Se y col. (2001) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 98, 9237-42). Además, se ha reportado que los ligandos para ciertos TLRs incluyen ciertas moléculas de ácido nucleico y que ciertos tipos de ARN son inmunoestimuladores de una manera independiente de secuencia o dependiente de secuencia, donde estos diferentes ARNs inmunoestimuladores pueden por ejemplo estimular TLR3, TLR7 o TLR8, o receptores intracelulares tales como RIG-1, MDA-5, etc. Por ejemplo, Lipford y otros determinaron ciertos oligorribonucleótidos que contienen G, U como inmunoestimuladores al actuar por medio de TLR7 y TLR8 (véase WO 03/086280). Los oligorribonucleótidos que contienen G, U inmunoestimuladores descritos por Lipford y col. se creía que podían derivarse de fuentes de ARN incluyendo ARN ribosómico, ARN de transferencia y ARN viral.

El ARN inmunoestimulador (ARNsi) usado como la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido puede entonces comprender cualquier secuencia de ARN que se conozca como inmunoestimulador o incluye, sin limitarse a, secuencias de ARN que representen y/o codifiquen para ligandos de los TLRs, seleccionados preferentemente de miembros de la familia humana TLR1-TLR10 o miembros de la familia murina TLR1-TLR13, muy preferentemente seleccionados de la familia TLR1-TLR10 (humana), todavía más preferentemente de TLR7 y TLR8, ligandos para receptores intracelulares para ARN (tales como RIG-1 o MDA-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 inmunoestimuladora. Más aún las (clases de) moléculas de ARN inmunoestimuladoras usadas como molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención pueden incluir cualquier otro ARN capaz de provocar una respuesta inmune innata. Sin estar limitados a los mismos, este ARN inmunoestimulador puede incluir ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), ARN mensajero (ARNm) y ARN viral (ARNv). Este ARN inmunoestimulador puede comprender una longitud de 1.000 a 5.000, de 500 a 5.000, de 5 a 5.000, de 5 a 1.000, de 5 a 500, de 5 a 250, de 5 a 100, de 5 a 50, de 5 a 30 nucleótidos.

De acuerdo con una realización particularmente preferente, estas secuencias de ácido nucleico inmunoestimuladoras son preferentemente ARN que, de preferencia, es o comprende un ácido nucleico de la fórmula (II) o (III):



donde:

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

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

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

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

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



donde:

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

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

5 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 un análogo de la misma;

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

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

- 10 Los ácidos nucleicos de fórmula (II) o (III), que pueden usarse en la carga de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, pueden ser moléculas de ácido nucleico relativamente cortas, con una longitud típica de aproximadamente 5 a 100 (pero también pueden ser más largas que 100 nucleótidos para realizaciones específicas, por ejemplo de hasta 200 nucleótidos), de 5 a 90 o de 5 a 80 nucleótidos, de preferencia una longitud de aproximadamente 5 a 70, muy preferiblemente una longitud de aproximadamente 8 a 60 y más preferiblemente una longitud de alrededor de 15 a 60 nucleótidos, muy preferiblemente de 20 a 60, más preferiblemente de 30 a 60 nucleótidos. Si el ácido nucleico del complejo de carga de ácido nucleico de la invención tiene una longitud máxima de por ejemplo 100 nucleótidos, m será típicamente ≤ 98 . El número de nucleótidos G en el ácido nucleico de fórmula (II) se determina por l o n. l y n, independientemente uno del otro, son un entero de 1 a 40, donde cuando l o n = 1 G es guanosina o un análogo de la misma, y cuando l o n > 1 al menos el 50% de los nucleótidos son guanosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4, Gl o Gn pueden ser, por ejemplo, GUGU, GGUU, UGUG, UUGG, GUUG, GGGU, GGUG, GUGG, UGGG o GGGG, etc.; cuando l o n = 5, Gl o Gn pueden ser, por ejemplo, GGGUU, GGUGU, GUGGU, UGGGU, UGGUG, UGUGG, UUGGG, GUGUG, GGGGU, GGGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG o GGGGG, etc.; etc. Preferentemente, un nucleótido adyacente a X en el ácido nucleico de fórmula (II) de acuerdo con la invención no es un uracilo. De manera similar, el número de nucleótidos C en el ácido nucleico de la fórmula (III) de acuerdo con la invención se determina por l o n, independientemente uno del otro, son un entero de 1 a 40, donde cuando l o n = 4, C es citosina o un análogo de la misma, y cuando l o n > 1, al menos el 50% de los nucleótidos son citosina o un análogo de la misma. Por ejemplo, sin implicar ninguna limitación, cuando l o n = 4, Clo Cn pueden ser, por ejemplo, CUCU, CCUU, UCUC, UUCU, CUUC, CCCU, CCUC, CUCC, UCCC o CCCC, etc.; cuando l o n = 5, Clo Cn pueden ser, por ejemplo, CCCUU, CCUCU, CUCCU, UCCCU, UCCUC, UCUCU, UCCCC, CUCUC, CCCC, CCCUC, CCUCC, CUCCC, UCCCC o CCCCC, etc.; etc. Preferentemente, un nucleótido adyacente a X en el ácido nucleico de la fórmula (III) de acuerdo con la invención no es un uracilo.
- 15 20 25 30 35 40

45 De acuerdo con una realización particularmente preferente, un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las fórmulas (II) o (III) que se puede usar como un ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención se puede seleccionar de una secuencia que consiste o comprende cualquiera de las siguientes secuencias:

- GGUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 289);
- GGGGGUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 290);
- GGGGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 291);
- GUGUGUGUGUGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGUGUGUGUGU (SEQ ID NO: 292);
- GGUUGGUUGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGUUGGUUGGU (SEQ ID NO: 293);
- GGGGGGGGGUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 294);
- GGGGGGGGUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 295);
- GGGGGGGUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 296);
- GGGGGGGUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 297);
- GGGGGGUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 298);
- GGGGGGUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 299);
- GGGGGGUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 300);

- GGGGGUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 301);
- GGGGGUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 302);
- GGGGUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 303);
- GGGUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 304);
- GGUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 305);
- GUUUUUUUUUUUUUUUUUUG (SEQ ID NO: 306);
- GGGGGGGGGUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 307);
- GGGGGGGGGUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 308);
- GGGGGGGGUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 309);
- GGGGGGGGUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 310);
- GGGGGGGUUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 311);
- GGGGGGGUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 312);
- GGGGGGGUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 313);
- GGGGGGUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 314);
- GGGGGGUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 315);
- GGGGGUUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 316);
- GGGGUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 317);
- GGGUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 318);
- GGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGG (SEQ ID NO: 319);

- GGGGGGGGGGGUUUGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 320)
- GGGGGGGGGGUUUUGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 321)
- GGGGGGGGGUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 322);
- GGGGGGGGGUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 323);
- GGGGGGGGUUUUUUUUGGGGGGGG (SEQ ID NO: 324);
- GGGGGGGGUUUUUUUUUUGGGGGGG (SEQ ID NO: 325);
- GGGGGGGGUUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 326);
- GGGGGGGGUUUUUUUUUUUUGGGGGG (SEQ ID NO: 327);
- GGGGGGGUUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 328);
- GGGGGGUUUUUUUUUUUUUUGGGGG (SEQ ID NO: 329);
- GGGGGUUUUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 330);
- GGGGUUUUUUUUUUUUUUUUGGGG (SEQ ID NO: 331);
- GGGUUUUUUUUUUUUUUUUUGGG (SEQ ID NO: 332);

donde:

Ges guanosina (guanina), uridina (uracilo) o un análogo de guanosina (guanina) o uridina (uracilo), de preferencia guanosina (guanina) o un análogo de la misma;

5 X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina), o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos), de preferencia uridina (uracilo) o un análogo de la misma;

N es una secuencia de ácido nucleico de una longitud de aproximadamente 4 a 50, de preferencia alrededor de 4 a 40, muy preferiblemente alrededor de 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, cada N se selecciona independientemente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);

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

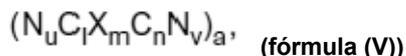
l es un entero de 1 a 40, donde cuando l = 1, G es guanosina (guanina) o un análogo de la misma, cuando l > 1, al menos el 50% de estos nucleótidos (nucleósidos) son guanosina (guanina) o un análogo de la misma;

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

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

u, v puede ser independientemente uno del otro un entero de 0 a 50, de preferencia donde cuando u = 0, v ≥ 1, o cuando v = 0, u ≥ 1;

20 donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (IV) tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, de preferencia de al menos 100 nucleótidos, muy preferiblemente de al menos 150 nucleótidos, todavía más preferiblemente de al menos 200 nucleótidos y con total preferencia de al menos 250 nucleótidos.



donde:

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

X es guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de los nucleótidos (nucleósidos) mencionados arriba, de preferencia uridina (uracilo) o un análogo de la misma;

30 N es cada en cada caso una secuencia de ácido nucleico que, independientemente, tiene una longitud de aproximadamente 4 a 50, de preferencia de alrededor de 4 a 40, muy preferiblemente de alrededor de 4 a 30 o 4 a 20 ácidos nucleicos, cada N se selecciona independientemente de guanosina (guanina), uridina (uracilo), adenosina (adenina), timidina (timina), citidina (citosina) o un análogo de estos nucleótidos (nucleósidos);

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

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

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

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

u, v puede ser, independientemente, un entero de 0 a 50, de preferencia donde cuando u = 0, v ≥ 1, o cuando v = 0, u ≥ 1;

donde la molécula de ácido nucleico de fórmula (V) de acuerdo con la invención tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de al menos 100 nucleótidos, muy preferiblemente de al menos 150 nucleótidos,

todavía más preferiblemente de al menos 200 nucleótidos y con total preferencia de al menos 250 nucleótidos.

5 Para la fórmula (V), cualquiera de las definiciones dadas arriba para los elementos N (es decir, Nu y Nv) y X (Xm), particularmente la estructura central como la definida arriba, así como para los enteros a, l, m, n, u y v, se aplica similarmente a los elementos de la fórmula (V) correspondientemente, donde en la fórmula (V) la estructura central se define por $C_l X_m C_n$. La definición de los elementos frontera Nu y Nv es idéntica a las definiciones dadas arriba para Nu y Nv.

10 De acuerdo con una realización muy particularmente preferente, la molécula de ácido nucleico de la invención de acuerdo con la fórmula (IV) puede seleccionarse, por ejemplo, cualquiera de las siguientes secuencias:

UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUCCUAGAA
GUACACG (SEQ ID NO: 373)

UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUCCUAGAA
GUACACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUCCAAAAAAAAAAAAAAAAACCCACGCAAGGA
UCUUCAUGUGC (SEQ ID NO: 374)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAU
AUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAU
UCACUCCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUC
AGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACU
CUAUUAGAUC (SEQ ID NO: 375)

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAU
AUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAU
UCACUCCCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUC
AGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACU
CUAUUAGAUCUCGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCUCUAA
GUACCGAGUGUGCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCCUCCUCUUA
GACUGCAGCGUAAGUGCGGAAUCUGGGGAUCAAUUACUGACUGCCUGGAUUAC
CCUCGGACAUUAACCUUGUAGCACGCUGUUGCUGUUAUAGGUGACCAACGCCAC
UCGAGUAGACCAGCUCUCUAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGGUCAAUCUAC
UUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUA
G (SEQ ID NO: 376)

GGGAGAAAGCUC AAGCUUGGAGCAAUGCCCCGACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAU
AUCUCAGAGUAUUGGCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAU
UCACUCCCAGGAUCCGAGUCCGAUACUACGGUACUUGGUGACAGACCUAGGUCGUC
AGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACU
CUAUUAGAUUCUGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCUCUAA
GUACCGAGUGUGCCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCUCCUCUUA
GACUGCAGCGUAAGUGCGGAAUCUGGGGAUCAAAUACUGACUGCCUGGAUUAC
CCUCGGACAUUAACCUUGUAGCACGCUUGUUGCUUAUAGGUGACCAACGCCAC
UCGAGUAGACCAGCUCUCUAGUCCGGACAAUGAUAGGAGGGCGCGGUCAAUCUAC
UUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGCACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUA
GAGCUACGCAGGUUCGCAAUAAAAGCGUUGAUUAGUGUGCAUAGAACAGACCUCU
UAUUCGGUGAAACGCCAGAAUGCUAAAUCCAUAACUCUCCCAAACCGCUAC
GGCCGAAGACGCGCGCUUAUCUUGUGUACGUUCUCGCACAUUGGAAGAAUCAGCG
GGCAUGGUGGUAGGGCAAUAGGGGAGCUGGGUAGCAGCGAAAAAGGGCCCCUCG
GCACGUAGCUUCGCUUGUCUGAAACAACCCGGCAUCCGUUGUAGCGAUCCCG
UUAUCAGUGUUAUUCUUGUGCGCACUAAGAUUCAUGGUGUAGUCGACAAUACA
GCGUCUUGGCAGAUUCUGGUCACGUGCCCUAUGCCCCGGCUUGUGCCUCUCAGG
UGCACAGCGAUACUUAAGCCUUAAGGUACUCGACGUGGGUACCGAUUCGUGAC
ACUUCCUAAGAUUAUUCACUGUGUAGCCCCGCACCGCCGACCUAAACUGGUCC
AAUGUAUACGCAUUCGCUAGCGGAUCGAUAAUAAAAGCUUGAAUU (SEQ ID NO:
377)

GGGAGAAAGCUC AAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAACGUAGCCGGU
AUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCU
AUAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUUCUCC
CCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGA
UGCUGGCCCAGAUUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGUCGCCU

GGGAGAAAGCUC AAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAACGUAGCCGGU
AUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCU
AUAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUUCUCC
CCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGA
UGCUGGCCCAGAUUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGUCGCCU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGCCAGUUCUGAGACUUCGCUAGAGACUAC
AGUACAGCUGCAGUAGUAACCACUGCGGCUAUUGCAGGAAAUCCCGUUCAGGU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGCUACUAUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGU
CACUGCUCUCGAGGUCUCACGAGAGCGCUCGAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACGAUCACAGAGAACUUCUAUUC AUGCAG
GUCUGCUCUA (R 722 SEQ ID NO: 379)

GGGAGAAAGCUC AAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAACGUAGCCGGU
 AUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCU
 AUAAGGUGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUAAAUCUCC
 CCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGA
 UGCUGGCCCAGAUCUUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGGUCGCCU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGCCCAGUUCUGAGACUUCGCUAGAGACUAC
 AGUUACAGCUGCAGUAGUAACCACUGCGGCUAUUGCAGGAAAUCCCGUUCAGGU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGCUACAUUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGU
 CACUGCUCUCGAGGUCUCACGAGAGCGCUCGAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACGAUCACAGAGAACUUCUAUUC AUGCAG

GUCUGCUCUAGAACGAACUGACCGACGCCUGAACUUAUGAGCGUGCGUAUUUU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCUCCCAACAAAUGUCGAUCAAUAGCUGGGCUGU
 UGGAGACGCGUCAGCAAUGCCGUGGCUCCAUAGGACGUGUAGACUUCUAUUUU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCCGGGACCACAAUAAUUAUUCUUGCUUGGUUGGGC
 GCAAGGGCCCCGUAUCAGGUCAUAAACGGGUACAUGUUGCACAGGCUCCUUUUU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGUCGAGUUAUUCGGUCUCAAAAGACGGCAGACG
 UCAGUCGACAACACGGUCUAAAGCAGUGCUACAUCUGCCGUGUUCGUGUUUUU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGAACCUACACGGCGUGCACUGUAGUUCGCAAUUCAU
 AGGGUACCGGCUCAGAGUUAUGCCUUGGUUGAAAACUGCCCAGCAUACUUUUU
 UUUUUUUUUUUUUUUUCAUAUCCCAUGCUAAGCAAGGGAUGCCGCGAGUCAUGU
 UAAGCUUGAAUU (SEQ ID NO: 380)

De acuerdo con otra realización muy particularmente preferente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (V) puede seleccionarse de, por ejemplo, cualquier de las siguientes secuencias:

5 UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUAGAAGU
 ACACG (SEQ ID NO: 381)

o

UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUAGAAG
 UACACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGACGCAAGGAU
 CUUCAUGUGC (SEQ ID NO: 382)

10 En otra realización preferente, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido también se puede presentar en forma de un ácido nucleico modificado.

De acuerdo con un primer aspecto, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido puede proporcionarse como un "ácido nucleico estabilizado", preferiblemente como un ARN o ADN estabilizado, muy preferiblemente como un ARN esencialmente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por una exo- o endo-nucleasa).

15 En este contexto, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico definido aquí puede contener modificaciones en el esqueleto, modificaciones de azúcar o modificaciones de base. Una modificación de esqueleto en relación con la presente invención es una modificación donde los fosfatos del esqueleto de los nucleótidos contenidos en la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención se modifican químicamente. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención. Además, una modificación de base en relación con la presente invención es una modificación química de la parte de base de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención.

25 De acuerdo con un aspecto más, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido puede contener una modificación de lípidos. Este ácido nucleico modificado en lípidos comprende típicamente un ácido nucleico como el aquí definido. Esta molécula de ácido

nucleico modificado en lípidos del complejo de carga portador polimérico de la invención típicamente comprende además al menos un enlazador enlazado covalentemente con una molécula de ácido nucleico y al menos un lípido enlazado covalentemente con el enlazador respectivo. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico modificada en lípidos comprende al menos una molécula de ácido nucleico como la aquí definida y al menos un lípido (bifuncional) enlazado covalentemente (sin un enlazador) con esa molécula de ácido nucleico. De acuerdo con una tercera alternativa, la molécula de ácido nucleico modificada en lípidos comprende una molécula de ácido nucleico como la definida aquí, al menos un enlazador enlazado covalentemente con una molécula de ácido nucleico y al menos un lípido enlazado covalentemente con el enlazador respectivo, y también al menos un lípido (bifuncional) enlazado covalentemente (sin un enlazador) con esa molécula de ácido nucleico.

La molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención puede asimismo estar estabilizada para así evitar la degradación de la molécula de ácido nucleico por varios enfoques, particularmente cuando se emplea ARN o ARNm como molécula de ácido nucleico para el propósito de la invención. Se sabe en la técnica que la inestabilidad y degradación (rápida) de ARN en general pueden representar un serio problema en la aplicación de composiciones basadas en ARN. Esta inestabilidad del ARN se debe típicamente a enzimas degradadoras de ARN, "ARNasas" (ribonucleasas), donde la contaminación con estas ribonucleasas puede algunas veces degradar completamente al ARN en solución. En consecuencia, la degradación natural del ARN en el citoplasma de la célula se regula de manera muy fina y las contaminaciones por RNAsas pueden eliminarse generalmente por un tratamiento especial antes del uso de dichas composiciones, en particular con pirocarbonato de dietilo (DEPC). Son conocidos diversos mecanismos de degradación natural en este sentido en la técnica anterior, los cuales se pueden utilizar también. Por ejemplo, la estructura terminal es típicamente de importancia crítica, particularmente para un ARNm. Como ejemplo, en el extremo 5' de las moléculas de ARNm de origen natural normalmente hay una llamada "estructura de tapa" (un nucleótido de guanosina modificado), y en el extremo 3' típicamente existe una secuencia de hasta 200 nucleótidos de adenosina (la llamada cola poli-A).

De acuerdo con otro aspecto, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido puede estar modificada y con ello estabilizada, especialmente si la molécula de ácido nucleico está en forma de un ácido nucleico, por ejemplo un ARNm, modificando el contenido G/C de la molécula de ácido nucleico, particularmente ARNm, preferentemente de la región de codificación.

En un aspecto particularmente preferente de la presente invención, el contenido de G/C de la región de codificación de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si la molécula de ácido nucleico está en forma de ARNm, se modifica, particularmente se incrementa, en comparación con el contenido de G/C de la región de codificación de su secuencia de codificación tipo silvestre particular, es decir ARNm no modificado. La secuencia de aminoácidos codificada de la secuencia de ácido nucleico preferentemente no se modifica en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm tipo silvestre particular.

La modificación del contenido de GC de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si la molécula de ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región de ARNm a traducir es importante para una traducción eficiente de ese ARNm. Así, la composición y la secuencia de varios nucleótidos son importantes. En particular, las secuencias que tienen un contenido incrementado en G (guanosa)/C (citosa) son más estables que las secuencias que tienen un contenido incrementado en A (adenosina)/U (uracilo). De acuerdo con la invención, los codones de la secuencia de codificación o ARNm están por tanto variados en comparación con su secuencia de codificación tipo silvestre o ARNm, mientras conservan la secuencia de aminoácidos traducida de manera que incluyen una cantidad incrementada 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 alternativos).

Preferentemente, el contenido G/C de la región de codificación de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, se incrementa en al menos 7%, muy preferiblemente en al menos 15%, de manera particularmente preferible en al menos 20%, en comparación con el contenido G/C de la región codificada del ARNm de tipo silvestre. De acuerdo con un aspecto específico, al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, muy preferiblemente al menos el 70%, todavía más preferiblemente al menos el 80% y con total preferencia al menos el 90%, 95% o incluso 100% de los codones sustituyes en la región que codifica para una proteína o péptido como el definido aquí o su fragmento o variante del mismo o la secuencia completa de la

secuencia de ARNm tipo silvestre secuencia de codificación son sustituidos, incrementando así el contenido G/C de dicha secuencia.

5 En este contexto, es particularmente preferible incrementar el contenido G/C de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, al máximo (es decir, 100% de los codones sustituidos), en particular en la región que codifica para una proteína, en comparación con la secuencia tipo silvestre.

10 De acuerdo con la invención, una modificación especialmente preferente de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, se basa en el descubrimiento de que la eficiencia de traducción también se determina por una frecuencia diferente en la ocurrencia de moléculas de ARNm en células. Así, si los llamados "codones raros" están presentes en la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, en un grado incrementado, la molécula de ácido nucleico modificada correspondiente se traduce en un grado significativamente más deficiente que cuando están presentes los codones que codifican para moléculas de ARNm relativamente "frecuentes".

15 Especialmente si la molécula de ácido nucleico modificada del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, la región de codificación del ácido nucleico modificado se modifica preferentemente en comparación con la región correspondiente del ARNm tipo silvestre la secuencia de codificación de manera que al menos un codón de la secuencia tipo silvestre que codifique para un ARNm que sea relativamente raro en la célula se intercambie por un codón que codifique para un ARNm que sea relativamente frecuente en la célula y por el mismo aminoácido que el ARNm relativamente raro. Mediante esta modificación, las secuencias de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, se modifica de manera que se insertan codones para los cuales están disponibles moléculas de ARNm que se presentan con frecuencia. En otras palabras, de acuerdo con la invención, mediante esta modificación todos los codones de la secuencia tipo silvestre que codifican para un ARNm que es relativamente raro en la célula pueden en cada caso ser intercambiados por un codón que codifique para un ARNm que sea relativamente frecuente en la célula y el cual, en cada caso, porte el mismo aminoácido que el ARNm relativamente raro.

20 Al respecto de qué moléculas de ARNm se presentan de manera relativamente frecuente en la célula y cuáles, en contraste, se presentan de manera relativamente rara es conocido por el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6):660-666. Los codones que usan el aminoácido particular cuyo ARNm se presenta más frecuentemente, por ejemplo el codón Gly, que usa el ARNm que se presenta más frecuentemente en la célula (humana), se prefiere particularmente.

25 De acuerdo con la invención, es particularmente preferible enlazar el contenido de G/C secuencial que es incrementado, en particular maximizado, en la molécula de ácido nucleico modificada del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm, con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región de codificación de la molécula de ácido nucleico. Este aspecto preferente permite la provisión de una molécula de ácido nucleico traducida de manera particularmente eficiente y estabilizada (modificada) del complejo de carga portador polimérico de la invención, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm o codifica para un ARNm.

30 De acuerdo con otro aspecto preferente de la invención, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si el ácido nucleico está en forma de una molécula de ácido nucleico de codificación, preferentemente tiene al menos una secuencia de estabilización 5' y/o 3'. Estas secuencias de estabilización en las regiones no traducidas 5' y/o 3' tienen el efecto de incrementar la vida media del ácido nucleico en el citosol. Estas secuencias de estabilización pueden tener un 100% de identidad de secuencia con secuencias de origen natural presentes en virus, bacterias y eucariontes, pero también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Las secuencias no traducidas (UTR) del gen de (alfa)-globina, por ejemplo, de Homo sapiens o Xenopus laevis, pueden mencionarse como ejemplos de secuencias de estabilización que se pueden usar en la presente invención para un ácido nucleico estabilizado. Otro ejemplo de secuencia de estabilización tiene la fórmula general (C/U)CCAN_nCCC(U/A)Py_nUC(C/U)CC (SEQ ID NO: 383), que está contenida en la 3' UTR del ARNm muy estable que codifica para (alfa)-globina, colágeno tipo (I), 15-lipoxigenasa o paratiroxina-hidroxilasa (véase, Holcik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 1997, 94: 2410 a 2414). Estas secuencias de estabilización pueden por supuesto usarse individualmente o en combinación unas con otras y también en combinación con otras secuencias de estabilización conocidas del experto en la técnica.

No obstante, preferentemente se realizan sustituciones, adiciones o eliminaciones de bases en la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, usando una matriz de ADN para la preparación de la molécula de ácido nucleico mediante técnicas de la bien conocida mutagénesis dirigida a sitio

5 o con una estrategia de ligación de oligonucleótidos (véase, por ejemplo, Maniatis y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición, Cold Spring Harbor, NY, 2001). En ese proceso, para la preparación de la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, una molécula de ADN correspondiente puede transcribirse *in vitro*. Esta matriz de ADN comprende de preferencia un promotor

10 adecuado, por ejemplo, un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, el cual es seguido por la secuencia de nucleótidos deseada para la molécula de ácido nucleico, por ejemplo ARNm, que se preparará y usará para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN, que forma la matriz del al menos un ARN de interés, puede prepararse mediante proliferación fermentativa y

15 subsecuente aislamiento como parte de un plásmido que pueda replicarse en bacterias. Los plásmidos que pueden mencionarse como adecuados para la presente invención son, por ejemplo, los plásmidos pT7Ts (GenBank número de registro U26404; Laiy col., *Development* 1995, 121: 2349 a 2360), la serie pGEM®, 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 Ratón, FL, 2001.

Las moléculas de ácido nucleico usadas de acuerdo con la invención como las aquí definidas pueden prepararse usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos tales como, por ejemplo, síntesis en fase sólida, así como métodos *in vitro*, como reacciones de transcripción *in vitro*.

25 De acuerdo con otro aspecto particularmente preferente, la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí, especialmente si el ácido nucleico está en forma de una molécula de ácido nucleico de codificación, puede alternativa o adicionalmente codificar para un péptido de señal

30 secretora. Estos péptidos de señal son secuencias que tienen típicamente una longitud de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos y se ubican preferentemente en el extremo N del péptido codificado, sin limitación. Los péptidos de señal como los aquí definidos permiten preferentemente el transporte de la proteína o péptido codificado por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, especialmente si el ácido nucleico está en forma de ARNm, a un compartimiento celular definido, de preferencia la superficie celular, el

35 retículo endoplásmico (ER) o el compartimiento endosómico-lisosómico. Ejemplos de secuencias de péptidos de señal secretora como las aquí definidas incluyen, sin limitarse a, secuencias de señal de moléculas MHC clásicas o no clásicas (por ejemplo, secuencias de señal de moléculas MHC I y II, por ejemplo, de la molécula MHC clase I HLA-A*0201), secuencias de señal de citoquinas o

40 inmunoglobulinas como las definidas en la presente, secuencias de señal de la cadena invariante de inmunoglobulinas o anticuerpos como las definidas aquí, secuencias de señal de Lamp1, Tapasina, Erp57, Calreticulina, Calnexina y proteínas asociadas a membrana adicionales o de proteínas asociadas con el retículo endoplásmico (ER) o el compartimiento endosómico-lisosómico. De manera particularmente preferente, pueden usarse de acuerdo con la presente invención

secuencias de señal de la molécula MHC clase I HLA-A*0201.

45 Cualquiera de las modificaciones anteriores se puede aplicar a la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido y además cualquier ácido nucleico usado en el contexto de la presente invención y pueden ser, si es adecuado o necesario, combinadas entre sí en cualquier combinación, siempre y cuando estas combinaciones de modificaciones no interfieran con otras en el ácido nucleico respectivo. El experto en la técnica será capaz de hacer esta elección en consecuencia.

50 La molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, así como las proteínas o péptidos codificados por esta molécula de ácido nucleico, pueden comprender fragmentos o variantes de esas secuencias. Estos fragmentos o variantes pueden comprender típicamente una secuencia que tenga una identidad de secuencia con uno de los ácidos nucleicos mencionados arriba, o con una de las proteínas o péptidos o secuencias, si es codificada por la al menos una molécula de ácido nucleico, de al menos

55 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, de preferencia al menos 70%, muy preferiblemente al menos 80%, igualmente de manera muy preferible al menos 8%, todavía más preferiblemente al menos 90% y con total preferencia al menos 95% o incluso 97%, 98% o 99%, con la secuencia típica completa, ya sea a nivel de ácido nucleico o a nivel de aminoácido.

60 Los "fragmentos" de proteínas o péptidos en el contexto de la presente invención (codificados por un ácido nucleico como el definido aquí) pueden comprender una secuencia de una proteína o péptido como la aquí definida que, con respecto a su secuencia de aminoácidos (o su molécula de ácido nucleico codificada), esté truncada N-terminalmente, C-terminalmente y/ o intrasecuencialmente en comparación con la secuencia de

aminoácidos de la proteína original (nativa) (o su molécula de ácido nucleico codificada). Este truncamiento puede entonces presentarse ya sea a nivel de aminoácido o correspondientemente a nivel de ácido nucleico. Una identidad de secuencia con respecto a este fragmento como el definido en la presente puede por tanto referirse preferentemente a la proteína o péptido completo como el aquí definido o a la molécula de ácido nucleico (de codificación) completa de esta proteína o péptido. Asimismo, "fragmentos" de ácidos nucleicos en el contexto de la presente invención pueden comprender una secuencia de un ácido nucleico como el definido aquí, que, con respecto a una molécula de ácido nucleico esté truncada 5', 3' y/o intrasecuencialmente en comparación con la molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico original (nativa). Una identidad de secuencia con respecto a este fragmento como el definido aquí puede por tanto referirse preferentemente al ácido nucleico completo como el aquí definido.

Los fragmentos de proteínas o péptidos en el contexto de la presente invención (por ejemplo, como los codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención) pueden comprender además una secuencia de un péptido como la definida aquí, con una longitud de aproximadamente 6 a alrededor de 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo, fragmentos como los procesados o presentados por moléculas MHC clase I, de preferencia con una longitud de aproximadamente 8 a alrededor de 10 aminoácidos, por ejemplo, 8, 9 ó 10 (o incluso 6, 7, 11 ó 12 aminoácidos), o fragmentos procesados y presentados por moléculas MHC clase II que tengan preferentemente una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, donde estos fragmentos pueden seleccionarse de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son típicamente reconocidos por las células T en forma de un complejo que consiste en el fragmento de péptido y una molécula MHC, es decir, los fragmentos típicamente no son reconocidos en su forma nativa.

Los fragmentos de proteínas o péptidos como los definidos aquí (por ejemplo, como los codificados por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención) también pueden comprender epítopos de esas proteínas o péptidos. Los epítopos (también llamados "determinantes antigénicos") en el contexto de la presente invención son típicamente fragmentos ubicados sobre la superficie exterior de proteínas o péptidos (nativos) como los definidos aquí, que tienen preferentemente 5 a 15 aminoácidos, muy preferiblemente de 5 a 12 aminoácidos, todavía más preferiblemente de 6 a 9 aminoácidos, los cuales pueden ser reconocidos por anticuerpos o receptores de células B, es decir, en su forma nativa. Estos epítopos de proteínas o péptidos pueden además seleccionarse de cualquier una de las variantes mencionadas aquí de estas proteínas o péptidos. En este contexto los determinantes antigénicos pueden ser epítopos de conformación o discontinuos que estén compuestos de segmentos de las proteínas o péptidos como los definidos aquí que sean discontinuos en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos como los definidos en la presente, pero que se junten en la estructura tridimensional o epítopos continuos o lineales que estén compuestos de una sola cadena de polipéptidos.

Las "variantes" de proteínas o péptidos como las definidas en el contexto de la presente invención (por ejemplo, como las codificadas por el ácido nucleico como el definido aquí) pueden ser codificadas por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención. De esta manera, se puede generar una proteína o péptido con una secuencia de aminoácidos que difiera de la secuencia original en una o más mutaciones, tal como uno o más aminoácidos sustituidos, insertados y/o suprimidos. De preferencia, estos fragmentos y/o variantes tienen la misma función biológica o actividades específicas en comparación con la proteína nativa de longitud completa, por ejemplo su propiedad antigénica específica.

Las "variantes" de proteínas o péptidos como las definidas en el contexto de la presente invención (por ejemplo, como las codificadas por un ácido nucleico como el aquí definido) pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con su secuencia nativa, es decir, fisiológica no mutada. Esas secuencias de aminoácidos, así como sus secuencias de nucleótidos de codificación, en particular están dentro del término variantes como se define aquí. Las sustituciones donde aminoácidos, que se originan de la misma clase, son intercambiados uno por otro se llaman sustituciones conservadoras. En particular, estos son aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales cargadas positiva o negativamente, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos, cuyas cadenas laterales pueden entrar en puentes de hidrógeno, por ejemplo cadenas laterales con una función hidroxilo. Esto significa que por ejemplo un aminoácido que tenga una cadena lateral polar se reemplaza por otro aminoácido que tiene una cadena lateral también polar, o, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrófoba es sustituido por otro aminoácido que tiene 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 causen modificaciones en la estructura tridimensional o no afecten a la región de unión. Las modificaciones a una estructura tridimensional por inserciones o supresiones pueden determinarse fácilmente por ejemplo usando espectroscopía CD (espectros de dicroísmo circular) (Urry,

1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, en: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger y col. (ed.), Elsevier, Amsterdam).

- Además, las variantes de proteínas o péptidos como los aquí definidos, que pueden ser codificadas por la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, también pueden comprender aquellas secuencias donde los nucleótidos del ácido nucleico están intercambiados de acuerdo con la degeneración del código genético, sin llevar a una alteración de la secuencia de aminoácidos de la proteína o péptido respectiva, es decir, la secuencia de aminoácidos o al menos parte de la misma puede no diferir de la secuencia original en una o más mutaciones dentro del significado anterior.
- 5 Para determinar el porcentaje al cual dos secuencias son idénticas, por ejemplo secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos como las definidas aquí, preferentemente las secuencias de aminoácidos codificadas por una secuencia de ácido nucleico del portador polimérico como la aquí definida o las propias secuencias de aminoácidos, las secuencias pueden alinearse para así ser comparadas subsecuentemente unas con otras. Por tanto, por ejemplo una posición de una primera secuencia se puede comparar con la posición correspondiente de la segunda secuencia. Si una posición de la primera secuencia es ocupada por el mismo componente como el caso en una posición en la segunda secuencia, ambas secuencias son idénticas en esta posición. Si este no es el caso, las secuencias difieren en esta posición. Si se presentan inserciones en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, se pueden insertar espacios en la primera secuencia para permitir una alineación adicional. Si existen en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, pueden insertarse espacios en la segunda secuencia para permitir una alineación adicional. El porcentaje al cual dos secuencias son idénticas es entonces función del número de posiciones idénticas dividido entre el número total de posiciones que incluyen aquellas posiciones que sólo son ocupadas en una secuencia. 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, E.U.A., 90:5873-5877 o Altschul y col. (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Este algoritmo se integra en el programa BLAST. Las secuencias idénticas a las secuencias de la presente invención hasta cierto grado pueden ser identificadas por este programa.
- 10 En el complejo de carga portador polimérico de la invención, el componente catiónico del portador polimérico aquí definido y la carga de ácido nucleico se proporcionan típicamente en una relación molar de alrededor de 1 a 10.000, de preferencia en una relación molar de aproximadamente 5 a 5.000, muy preferiblemente en una relación molar de aproximadamente 10 a 2.500, todavía más preferiblemente en una relación molar de aproximadamente 25 a 2.000, y con total preferencia en una relación molar de alrededor de 25 a 1.000 portador polimérico:ácido nucleico.
- 15 Además, en el complejo de carga portador polimérico de la invención, el componente catiónico del portador polimérico aquí definido y la carga de ácido nucleico se proporcionan de preferencia en una relación N/P de al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,1,5 ó 2. En especial, la relación N/P está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 ó 2 a 20, preferiblemente en un intervalo de alrededor de 0,2 (0,5 ó 0,75 ó 1,0) a 12, y aún más preferiblemente en una relación N/P de aproximadamente 0,4 (0,75 ó 1,0). En este contexto, la relación N/P es una medida de la carga iónica del componente catiónico (cadena lateral) del portador polimérico o del portador polimérico como tal. En particular, si las propiedades catiónicas del componente catiónico se generan por nitrógenos (de las cadenas laterales de aminoácidos), la relación N/P expresa la relación entre los átomos de nitrógeno básicos y los residuos fosfato del esqueleto del nucleótido, considerando que los átomos de nitrógeno (cadena lateral) del componente catiónico del portador polimérico contribuyen a cargas positivas y el fosfato del esqueleto fosfato del ácido nucleico contribuye a la carga negativa. Se da una fórmula en los ejemplos. La relación N/P se define como la relación nitrógeno/ fosfato (relación N/P) del complejo de carga portador polimérico de la invención completo. Esto es típicamente ilustrativo del contenido/cantidad de componentes catiónicos del portador polimérico y característico del contenido/cantidad de ácidos nucleicos unidos o a complejados en el complejo de carga portador polimérico de la invención. Se puede calcular en base a que, por ejemplo, 1 µg de ARN contiene típicamente alrededor de 3 mmol de residuos fosfato, siempre que el ARN presente una distribución estadística de bases. Además, 1 mmol de péptido contiene típicamente alrededor de 3 nmol de residuos nitrógeno, dependiendo del peso molecular y del número de sus aminoácidos (catiónicos).
- 20 En este contexto, es preferible que en el complejo de carga portador polimérico de la invención, el componente catiónico del portador polimérico aquí definido y la carga de ácido nucleico se proporcionen en una relación N/P de al menos aproximadamente 1 o, de preferencia, de un intervalo de alrededor de 1 a 20 para propósitos de transfección *in vitro*.
- Si la expresión de una proteína codificada o la transcripción de un ácido nucleico codificado, por ejemplo un ARN o ARNs de la carga de ácido nucleico es para propósitos terapéuticos (aplicación *in vivo*) una relación N/P de al menos 0,1 (0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6), de preferencia de un intervalo de aproximadamente 0,1 (0,2, 0,3, 0,4,
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

0,5 ó 0,6) a 1,5 es preferente. Es especialmente preferente un intervalo de relación N/P de 0,2 a 0,9 o un intervalo de relación N/P de 0,5 a 0,9. En caso de que el complejo de carga portador polimérico de la invención se use para la inmunostimulación (*in vivo*), por ejemplo como agente inmunostimulador o adyuvante (con la intención de inducir una respuesta inmune innata), es preferente una relación N/P de aproximadamente 0,1 a 20, más particularmente una relación N/P de 0,1 a 5 ó 0,1 a 1,5.

En el caso específico de que se trate de la inducción de IFN- α usando el complejo de carga polimérico de la invención como agente inmunostimulador (*in vivo*) o adyuvante, es preferente una relación N/P de al menos 0,1 (0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ó 0,6) o un intervalo de relación N/P de 0,1 a 1, o en especial un intervalo de relación N/P de 0,2 a 0,9 o un intervalo de relación N/P de 0,5 a 0,9. De otra manera, si la inducción de TNF α se intenta usando el complejo de carga polimérico de la invención como agente inmunostimulador (*in vivo*) o adyuvante, se prefiere particularmente una relación N/P de 1 a 20.

La relación N/P influye significativamente en la carga superficial del complejo de carga portador polimérico de la invención resultante. Así, es preferible que el complejo de carga portador polimérico de la invención resultante se cargue positivamente para la transfección *in vitro* y negativamente o neutramente para la transfección *in vivo*, especialmente si se desea la expresión de una proteína codificada o la transcripción de un ácido nucleico codificado de la carga de ácido nucleico. La carga superficial del complejo de carga portador polimérico de la invención resultante puede indicarse como potencial Z, que se puede medir por un método de electroforesis Doppler usando un Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, RU).

También se describe un método para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido, que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar al menos una proteína o péptido catiónico como el aquí definido y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico y opcionalmente al menos un componente aminoácido (AA) como el definido aquí, en cada caso comprendiendo al menos una porción -SH,
- b) proporcionar al menos una molécula de ácido nucleico como aquí definida, preferentemente en las proporciones mencionadas arriba,
- c) mezclar los componentes proporcionados en las etapas a) y b), de preferencia en un medio básico o neutro como el definido aquí, preferiblemente en presencia de oxígeno o un iniciador adicional como el aquí definido, preferentemente a un pH, a una temperatura y en un momento como el definido aquí, y entonces condensando y polimerizando los componentes catiónicos provistos en la etapa a) unos con otros mediante enlaces disulfuro (en una condensación por polimerización o policondensación) para obtener el portador polimérico y acomplejar la molécula de ácido nucleico provista en la etapa b) con los componentes catiónicos provistos en la etapa a).
- d) opcionalmente purificar el complejo de carga portador polimérico de la invención obtenido de acuerdo con la etapa c), preferentemente usando un método como el definido aquí;
- e) opcionalmente liofilización del complejo de carga portador polimérico de la invención obtenido de acuerdo con la etapa c) o d).

El método para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido comprende una reacción de polimerización o policondensación de condensación de varias etapas vía las porciones -SH de los eductos, por ejemplo péptidos o polímeros catiónicos como los definidos aquí y opcionalmente componentes aminoácido (AA) adicionales en la etapa c). La reacción de polimerización por condensación o policondensación que ocurre simultáneamente con la formación de complejos o unión electrostática de la molécula de ácido nucleico preferentemente conduce al complejo de carga portador polimérico de la invención donde el portador polimérico es un polímero de condensación, donde los componentes individuales están reticulados por enlaces de disulfuro.

Según se define aquí, en una etapa a) del método de la invención para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención, se proporciona al menos una proteína o péptido catiónico o policatiónico como el definido aquí y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico como el definido aquí, de preferencia en las relaciones indicadas arriba. Estos componentes se mezclan en la etapa c) con la molécula de ácido nucleico provista en la etapa b), de preferencia en un medio básico o neutro como el definido aquí, de preferencia en presencia de oxígeno o un iniciador adicional como el aquí definido, preferiblemente a un pH y a una temperatura y en un momento como el definido aquí, y condensando y entonces polimerizando estos componentes unos con otros vía los enlaces disulfuro (en una condensación de polimerización o policondensación) para obtener un portador polimérico complejo con la molécula de ácido nucleico como la definida en la presente.

De acuerdo con una alternativa, en la etapa a) del método descrito para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención, se proporciona al menos una proteína o péptido catiónico o policatiónico y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico como se define aquí, y opcionalmente al menos un componente aminoácido (AA) se proporciona en la etapa (a) como se

define en la presente, y se usan para una reacción de condensación por polimerización o policondensación y complejación antes de añadir el ácido nucleico de la etapa b), pero usando las mismas condiciones de polimerización citadas para la etapa c). El portador polimérico polimerizado y el ácido nucleico de la etapa b) se mezclan después en la etapa c).
 5 Preferiblemente, los componentes se proporcionan todos en las relaciones indicadas arriba y se mezclan, de preferencia, en un medio básico o neutro como el definido aquí, preferiblemente en presencia de oxígeno o un iniciador adicional como el definido aquí, de preferencia un pH, a una temperatura y en un momento como el definido aquí. Después de mezclar e iniciar la reacción, los componentes se condensan y se polimerizan unos con otros vía
 10 enlaces disulfuro (en una condensación de polimerización o policondensación) para obtener un portador polimérico complejo con la molécula de ácido nucleico aquí definida.

En ambas alternativas anteriores, se pueden seleccionar diferentes portadores poliméricos, particularmente diferentes péptidos y/o diferentes polímeros, en la polimerización por condensación citada arriba. En este contexto, la selección de diferentes componentes del portador polimérico depende típicamente de las
 15 propiedades deseadas del portador polimérico final y la fuerza catiónica deseada del portador polimérico final. En consecuencia, el contenido de componentes catiónicos puede además ser "diluido" o modificado en la alternativa anterior de la etapa a), por ejemplo, introduciendo un componente aminoácido (AA) como el definido aquí, preferiblemente en las relaciones definidas arriba. Así, se puede obtener un portador polimérico modificado donde el carácter catiónico del portador polimérico modificado permanece típicamente en los límites definidos aquí. Las propiedades del portador polimérico final pueden entonces ajustarse según se desee con las propiedades de los componentes (AA) insertando el componente aminoácido (AA) definido aquí en la etapa a).

En la etapa c), al menos una proteína o péptido catiónico o policatiónico como el definido aquí y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico como el definido aquí, y opcionalmente al menos un componente aminoácido (AA) y el al menos un ácido nucleico como el definido aquí, preferentemente están incluidos en un medio
 25 básico neutro en la etapa a) del método de la invención para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención. Este medio básico o neutro típicamente tiene un intervalo de pH de aproximadamente 5 a alrededor de 10, preferiblemente un intervalo de pH de alrededor de 6 a aproximadamente 9, muy preferiblemente un intervalo de pH de alrededor de 7 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5 ó 9, o cualquier intervalo seleccionado de cualesquiera dos de estos valores citados.

Además, preferentemente la temperatura de la solución en la etapa c) está en un intervalo de aproximadamente 5°C a alrededor de 60°C, en especial en un intervalo de 15°C a aproximadamente 40°C, todavía más preferiblemente en un intervalo de alrededor de 20°C a aproximadamente 30°C, y con total preferencia
 35 en un intervalo de alrededor de 20°C a aproximadamente 25°C, por ejemplo alrededor de 25°C.

En la etapa c) del método descrito para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí se pueden usar tampones según sea adecuado. Los tampones preferentes pueden comprender, sin limitarse a, tampones carbonato, borato, bicina, tampones CHES, CAPS, tampones cpnteniendo etanolamina, HEPES, MOPS, tampón fosfato, PIPES, Tris, tampón tricina, TAPS y/o TES. Es particularmente preferente un tampón carbonato.
 40

Después de mezclar los componentes, preferiblemente en presencia de oxígeno, de preferencia en presencia de un medio básico o neutro como el definido aquí, se inicia la reacción de polimerización por condensación o policondensación y la complejación de la al menos una molécula de ácido nucleico. Para ello, la mezcla de la etapa c) preferentemente se expone a oxígeno o puede emplearse un iniciador adicional, por ejemplo una cantidad catalítica de un agente oxidante, por ejemplo DMSO, etc. Después del inicio de la reacción de polimerización por condensación o policondensación de la al menos una proteína o péptido catiónico o policatiónico y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico y opcionalmente al menos un componente aminoácido (AA) como se definen aquí, se condensan y así se polimerizan unos con otros vía enlaces disulfuro (condensación por polimerización o policondensación). En esta etapa de reacción a) preferentemente se forman polímeros lineales usando monómeros con al menos una porción -SH reactiva, es decir al menos una proteína o péptido catiónico o policatiónico y/o al menos un polímero catiónico o policatiónico y opcionalmente al menos un componente aminoácido (AA) como el definido aquí, teniendo cada componente al menos una porción -SH libre como la aquí definida, por ejemplo en sus extremos terminales. Sin embargo, pueden emplearse componentes con más de una, de preferencia dos porciones -SH libres, que pueden llevar a polímeros ramificados. Simultáneamente a la reacción de polimerización, los polímeros catiónicos se unen a la al menos una molécula de ácido nucleico y así la complejan.
 45
 50
 55

De acuerdo con una alternativa, el complejo de carga portador polimérico de la invención puede además modificarse con un componente (AA) como el definido aquí.

De acuerdo con un primer ejemplo, un componente (AA) (por ejemplo, un ligando) se une a un componente catiónico antes de proporcionar el componente catiónico en la etapa a) vía cualquier funcionalidad como la definida en la presente, por ejemplo, una porción -SH. Este componente (AA) o (por ejemplo, un ligando) se une de preferencia al componente catiónico en un extremo de estos componentes.

5 Si la unión se lleva a cabo por medio de enlaces -SH, los componentes catiónicos se proporcionan preferentemente con dos (o incluso más) porciones -SH. El componente (AA) o (por ejemplo, un ligando) preferentemente porta solo una porción -SH. En este caso, una porción -SH del componente catiónico se protege preferentemente en una primera etapa usando un grupo protector como se conoce en la técnica. Luego, el componente catiónico puede unirse a un componente L para

10 formar un primer enlace disulfuro vía la porción -SH no protegida. La porción -SH protegida del componente catiónico es luego típicamente desprotegida para reacciones adicionales.

Alternativamente, el componente (AA) citado o (por ejemplo, un ligando) puede usarse en la etapa c) para acoplarse con los componentes catiónicos provistos en la etapa a), por ejemplo vía enlaces disulfuros sin bloquear las porciones -SH libres. Pero en este contexto se pueden emplear todos los

15 métodos conocidos al experto o definidos aquí para unir el componente (AA) al componente catiónico o al componente polimérico.

Alternativamente, un componente (AA) o (por ejemplo, un ligando) se puede unir al complejo de carga portador polimérico de la invención después de la etapa c) mediante cualquier funcionalidad como la definida aquí, por ejemplo una porción -SH. En este contexto es preferible

20 que el componente (AA) (por ejemplo, un ligando) se una vía porciones -SH libres de los componentes portadores poliméricos.

De acuerdo con la etapa c) del método descrito para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención como el definido aquí, al menos una molécula de ácido nucleico como la aquí definida se mezcla con los componentes catiónicos provistos en la etapa b), preferiblemente en las relaciones mencionadas

25 arriba. Típicamente, en el complejo de carga portador polimérico de la invención, los componentes catiónicos aquí definidos, ya al menos una molécula de ácido nucleico se proporcionan en una relación molar de aproximadamente 5 a 10.000, de preferencia en una relación molar de alrededor de 5 a 5.000, muy preferiblemente en una relación molar de aproximadamente 10 a 2.500, aún más preferiblemente en una relación molar de aproximadamente 10 a 1.000 polímeros catiónicos: ácidos nucleicos.

30 Preferentemente, las relaciones N/P son como se indicó arriba. En este contexto se prefiere particularmente que las relaciones N/P se seleccionen evitando la aglomeración y la toxicidad *in vivo*.

En una realización específica, los componentes (AA) definidos arriba que no comprenden porciones -SH pueden añadirse en la etapa c), siendo así incorporados en el complejo de carga portador polimérico de la invención sin polimerización por porciones -SH (terminales). De esta manera, estos componentes (AA) típicamente no se enlazan de manera covalente y se

35 incluyen en forma no covalente en el complejo de la invención como componente adicional.

De acuerdo con una etapa d) adicional del método descrito para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención definido aquí, el complejo de carga portador polimérico de la invención obtenido de acuerdo con la etapa c) opcionalmente se purifica. La purificación se puede realizar usando métodos cromatográficos, tales como HPLC, FPLC, GPS, diálisis, etc.

40

De acuerdo con una etapa e) adicional del método descrito para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención definido aquí, el complejo de carga portador polimérico obtenido de acuerdo con la etapa c) o d) es opcionalmente liofilizado. Para ello puede añadirse cualquier crioprotector o lio protector adecuado al complejo de carga portador polimérico de la invención obtenido en la etapa c) o d).

45

El método para preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí es particularmente adecuado para adaptar las propiedades químicas del complejo de carga portador polimérico de la invención deseado, debido a la selección específica de los componentes del portador polimérico, evitando así la aglomeración y toxicidad *in vivo*.

De acuerdo con una realización no reivindicada, la presente invención proporciona también un método para transfectar una célula, un tejido o un organismo, aplicando o administrando el complejo de carga portador polimérico de la invención, particularmente con propósitos terapéuticos. En este contexto, típicamente después de preparar el complejo de carga portador polimérico de la invención, como el descrito arriba, el complejo de carga portador polimérico de la invención preferentemente se administra a una célula, un tejido o un organismo, de preferencia en una forma desnuda o como una composición farmacéutica o vacuna como la descrita aquí, muy preferiblemente usando cualquiera de los modos de administración aquí

50

55 definidos. El método para transfectar una célula se puede llevar a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Asimismo, de acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere también al uso del complejo de carga portador polimérico de la invención, particularmente con propósito terapéutico, para transfectar una célula, un tejido o un organismo, aplicando o administrando así el complejo de carga portador polimérico de la invención descrito arriba a una célula, un tejido o un organismo, de preferencia en forma desnuda o como una composición farmacéutica o vacuna como la descrita aquí, muy preferiblemente usando cualquiera de los modos de administración descritos en la presente. La administración se puede llevar a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

En consecuencia, en una realización preferente, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende el complejo de carga portador polimérico formado por una carga de ácido nucleico como la definida en la presente y el portador polimérico aquí definido. La composición farmacéutica comprende opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como un primer ingrediente, la composición farmacéutica de la invención comprende el complejo de carga portador polimérico formado por la carga de ácido nucleico y el portador polimérico aquí definido (y opcionalmente, componentes (AA)).

Como un segundo ingrediente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender al menos un componente farmacéuticamente activo adicional. Un componente farmacéuticamente activo en este sentido es un compuesto que tiene un efecto terapéutico para sanar, reducir o prevenir una indicación particular, de preferencia enfermedades cancerosas, enfermedades autoinmunes, alergias o enfermedades infecciosas. Estos compuestos incluyen, sin limitación, péptidos o proteínas, de preferencia como los definidos aquí, ácidos nucleicos, de preferencia como los definidos aquí (terapéuticamente activos), compuestos orgánicos o inorgánicos de bajo peso molecular (peso molecular inferior a 5.000, de preferencia inferior a 1.000), azúcares, antígenos o anticuerpos, preferiblemente como los definidos en la presente, agentes terapéuticos ya conocidos en la técnica anterior, células antigénicas, fragmentos celulares antigénicos, fracciones celulares; componentes de pared celular (por ejemplo, polisacáridos), patógenos modificados, atenuados o desactivados (por ejemplo, químicamente o por radiación) (virus, bacterias, etc.), adyuvantes, de preferencia como los definidos en la presente, etc.

Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un portador farmacéuticamente aceptable incluye típicamente la base líquida o no líquida de la composición farmacéutica de la invención. Si la composición farmacéutica de la invención se proporciona en forma líquida, el portador típicamente será agua libre de pirógenos, solución salina isotónica o soluciones de pH regulado (acuosas), por ejemplo, soluciones de pH regulado de fosfato y citrato, etc. El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico con referencia al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener un contenido de sal más alto, idéntico o más bajo con referencia al medio de referencia específico, donde preferentemente se emplean estas concentraciones de sales mencionadas arriba que no provoquen un daño de las células por ósmosis u otros efectos de concentración. Los medios de referencia son por ejemplo líquidos presentes en métodos *in vivo*, como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o, por ejemplo, líquidos que pueden usarse como medios de referencia en métodos *in vitro*, como tampones o líquidos comunes. Estos tampones o líquidos comunes son conocidos del experto. Como base líquida es particularmente preferente una solución lactato de Ringer.

Sin embargo, pueden emplearse también una o más cargas o diluyentes sólidos o líquidos compatibles o compuestos encapsulantes para la composición farmacéutica de la invención, que son adecuados para su administración a un paciente a tratar. El término "compatible" según se usa aquí significa que estos constituyentes de la composición farmacéutica de la invención son capaces de mezclarse con el complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí de manera que no exista ninguna interacción que pudiera reducir sustancialmente la efectividad farmacéutica de la composición farmacéutica de la invención bajo condiciones de uso típicas. Los portadores, cargas y diluyentes farmacéuticamente aceptables, por supuesto, deben tener una pureza suficientemente alta y una toxicidad suficientemente baja como para ser adecuados para su administración a una persona a tratar. Ejemplos de compuestos que se pueden usar como portadores, cargas o constituyentes farmacéuticamente aceptables de los mismos son azúcares, por ejemplo lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, por ejemplo almidón de maíz o almidón de patata; celulosa y sus derivados, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; sebo; deslizantes sólidos, por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuete, 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.

De acuerdo con un aspecto específico, la composición farmacéutica de la invención puede comprender un adyuvante (adicional).

En este contexto, se puede entender que un adyuvante es cualquier compuesto adecuado para iniciar o incrementar una respuesta inmune del sistema inmunológico innato, es decir, una respuesta inmune no específica. En otras palabras, cuando se administra, la composición farmacéutica de la invención provoca típicamente una respuesta inmune innata debido al adyuvante contenido opcionalmente en la misma. Este adyuvante puede seleccionarse de cualquier adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, es decir, que soporte la inducción de una respuesta inmune innata en un mamífero.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar vía oral, parenteral, por spray o inhalación, tópicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente o mediante un depósito implantado. El término parenteral según se usa aquí incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intranodal, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracranial, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intra-arterial y sublingual.

Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por inyección parenteral, muy preferiblemente por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intranodal, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracranial, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intra-arterial y sublingual o por técnicas de infusión. Se prefiere particularmente la inyección intradérmica e intramuscular.

Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en suspensión acuosa u oleosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas usando agentes de dispersión o humectación y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable y no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, aceites fijos y estériles se emplean convencionalmente como disolventes o medios de suspensión. Para este fin, cualquier aceite fijo blando puede emplearse, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, como aceite de oliva o ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones en aceite también pueden contener un diluyente dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que se usen comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, incluyendo emulsiones y suspensiones. También se pueden usar para los propósitos de formulación de la composición farmacéutica de la invención otros tensioactivos comúnmente usados, tales como Tween, Span y otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad comúnmente empleados en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica de la invención como se define aquí también se puede administrar vía oral en cualquier forma de dosis oralmente aceptable, incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, tabletas, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de tabletas para uso oral, los portadores comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo, es decir el complejo de carga portador polimérico de la invención, se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir también ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

La composición farmacéutica de la invención también se puede administrar vía tópica, especialmente cuando el objetivo de tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, por ejemplo incluyendo enfermedades de la piel o de cualquier otro tejido epitelial accesible. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en un ungüento adecuado que contenga el complejo de carga portador polimérico de la invención suspendido o disuelto en uno o más portadores. Los portadores para la administración tópica incluyen, sin limitarse a, aceite mineral, petróleo líquido, petróleo blanco, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en una loción o crema adecuada. En el contexto de la presente invención, los portadores adecuados incluyen, pero no están limitados a, aceite mineral, monoestearato de sorbitano, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetarílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

La composición farmacéutica de la invención comprende típicamente una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica de la invención, particularmente del complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí o el ácido

nucleico como tal. Según se usa aquí, una “cantidad segura y efectiva” significa una cantidad del complejo de carga portador polimérico de la invención tal que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una enfermedad o trastorno como se define aquí. Sin embargo, al mismo tiempo, una “cantidad segura y efectiva” es lo suficientemente pequeña como para evitar serios efectos secundarios y permitir una relación sensible entre la ventaja y riesgo. La determinación de estos límites típicamente entra dentro del alcance de juicio médico sensible. Una “cantidad segura y efectiva” de los componentes de la composición farmacéutica de la invención, en particular del complejo de carga portador polimérico de la invención como el definido aquí, variará además en relación con la condición particular a tratar y también con la edad y condición física del paciente a tratar, el peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la actividad del complejo de carga portador polimérico de la invención, la severidad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia acompañante, del portador farmacéuticamente aceptable particular usado, y factores similares, con el conocimiento y experiencia del médico acompañante. La composición farmacéutica de la invención se puede usar para propósitos médicos y humanos y también veterinarios, de preferencia para propósitos médicos en humanos, como una composición farmacéutica en general o como una vacuna, agente inmunoestimulador o adyuvante.

De acuerdo con una realización preferente particular, la composición farmacéutica de la invención (o el complejo de carga portador polimérico de la invención) puede ser provisto o usado como agente inmunoestimulador. En este contexto, la composición farmacéutica de la invención es preferentemente como se definió arriba. Más preferiblemente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, contenido de preferencia en la composición farmacéutica, es típicamente un ácido nucleico inmunoestimulador como el aquí definido, por ejemplo un CpG-ADN o un ARN inmunoestimulador (ARNsi). Alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, contenido de preferencia en la composición farmacéutica, es un ácido nucleico de codificación como el definido aquí, de preferencia un ADN o un ARNm, muy preferiblemente que codifica para una proteína adyuvante, de preferencia como la aquí definida.

En una realización específica en este contexto, es preferente que una proteína adyuvante sea un componente del complejo de carga portador polimérico de la invención y, de preferencia, del portador polimérico.

De acuerdo con otra realización especialmente preferente, la composición farmacéutica de la invención (o el complejo de carga portador polimérico de la invención) puede ser provista o usada como adyuvante. En este contexto, el adyuvante se define de preferencia como la composición farmacéutica de la invención anterior. Muy preferiblemente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, contenido de preferencia en el adyuvante, es típicamente un ácido nucleico inmunoestimulador como el definido aquí, por ejemplo un CpG-ADN o un ARN inmunoestimulador (ARNsi). Alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, contenido de preferencia en el adyuvante, es un ácido nucleico de codificación como el definido aquí, de preferencia un ADN o un ARNm, muy preferiblemente que codifica para una proteína adyuvante, de preferencia como la definida aquí. El complejo de carga portador polimérico de la invención, contenido de preferencia en el adyuvante, típicamente inicia una respuesta inmune innata en el paciente a tratar. Este adyuvante puede utilizarse en cualquier terapia acompañante, con cualquier vacuna conocida o cualquier agente terapéutico adicional (conocido), de preferencia antes de, junto con o después de la administración de una vacuna (conocida) adicional o un agente terapéutico (conocido) adicional.

El complejo de carga portador polimérico de la invención o la composición farmacéutica de la invención como se define aquí proporcionado o usada como un adyuvante preferentemente es capaz de desencadenar una reacción inmune (innata) no específica de antígenos (como la provista por el sistema inmunológico innato), de preferencia de una manera inmunoestimuladora. En general, puede provocarse una reacción inmune de varias formas. Un factor importante para una respuesta inmune adecuada es la estimulación de diferentes subpoblaciones de células T. Los linfocitos T se diferencian típicamente en dos subpoblaciones, las células T auxiliares 1 (Th1) y las 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 proteínas efectoras (citoquinas) producidas por ellas. Así, las células Th1 ayudan a la respuesta inmune celular por la activación de macrófagos y células T citotóxicas. Las células Th2, por otro lado, promueven la respuesta inmune humoral mediante la estimulación de células B para su conversión en células plasmáticas y mediante la formación de anticuerpos (por ejemplo, contra antígenos). La relación Th1/Th2 es por tanto de gran importancia en la respuesta inmune. En relación con la presente invención, la relación Th1/Th2 de la respuesta inmune preferentemente está desplazada por el agente inmunoestimulador, en particular el complejo de carga portador polimérico de la invención, en la dirección hacia la respuesta celular, es decir la respuesta Th1,

induciéndose así una respuesta inmune predominantemente celular. Como se definió arriba, el complejo de carga portador polimérico de la invención ejerce por sí mismo una respuesta inmune innata no específica, lo cual permite al complejo de carga portador polimérico de la invención emplearse tal cual (sin añadir otro componente farmacéuticamente activo) como agente inductor. Si se administra junto con otro componente farmacéuticamente activo, de preferencia un componente específicamente inmunogénico, preferiblemente un antígeno, el ácido nucleico de la invención sirve como un adyuvante que soporta la respuesta inmune adaptativa específica provocada por el otro componente farmacéuticamente activo, por ejemplo, un antígeno.

5 Determinación de la capacidad inductor (innata) o adyuvante de un compuesto o complejo de la invención:

10 Para determinar la capacidad inductor de un compuesto de la invención o de un complejo de la invención, se conocen y pueden emplearse diversos métodos en la técnica. Por ejemplo, los métodos *in vitro* son ventajosos para cribar compuestos en cuanto a su capacidad para inducir citoquinas, las cuales son (exclusivamente o algunas típicamente) parte del sistema inmunológico innato y así (como un brazo adicional del sistema inmunológico) mejoran típicamente la inducción de una respuesta inmune específica de antígeno causada por un antígeno. Para este propósito, por ejemplo, pueden aislarse PBMCs de muestras de sangre y estimularse con el compuesto o complejo particular. Después de la incubación, la secreción de citoquinas deseadas (por ejemplo, como una reacción de activación de los receptores PAMP) que son típicamente parte del sistema inmunológico innato (y no del sistema inmunológico específico de antígenos) se determina por ELISA. Estas citoquinas seleccionadas pueden usarse en la técnica como determinantes de la inducción de una respuesta inmune innata en el cuerpo. En este contexto, la secreción de TNF-alfa e IFN-alfa se mide de preferencia para determinar la respuesta no específica (respuesta inmune innata) inducida por un compuesto o complejo. Especialmente, IFN-alfa juega un papel importante en la inducción de una respuesta inmune inespecífica después de la infección viral. En consecuencia, se prefiere particularmente que el compuesto o complejo inductor, el cual se identificará por el ensayo de cribado, induzca la secreción de, por ejemplo, IFN-alfa. Este compuesto o complejo puede ser luego aplicado por ejemplo para usarse como agente inductor (que desencadene la respuesta inmune (innata) inespecífica) en terapias de vacunación.

15 El IFN-alfa es parte de la familia de interferones tipo I. Los interferones tipo I (IFN) son citoquinas pleiotrópicas esenciales para soportar las respuestas inmunes antivirales. Inducen la apoptosis de células infectadas con virus y resistencia celular a infección viral, además de activar células asesinas naturales (NK) y T. Los interferones tipo I tienen efectos en un gran conjunto de citoquinas y quimiocinas que, entre otras cosas, influyen en la maduración, el reclutamiento, las funciones efectoras y la apoptosis de inmunocitos. Típicamente, un papel principal de IFN- α/β es la inducción de un estado de cebado que afecta la producción y regulación de otros mediadores, incluyendo citoquinas. Por ejemplo, la señalización de IFN- α/β sobrerregula la producción de IFN- γ por células dendríticas (DCs) y células T y de esta manera favorece la inducción y mantenimiento de células Th1. El desplazamiento de una respuesta inmune en dirección a una respuesta inmune Th1 puede volverse importante una vez se emplean vacunas de proteínas o péptidos, ya que estas vacunas normalmente inducen una respuesta inmune basada en Th que en consecuencia previene la inducción de células T citotóxicas.

20 Por tanto, se prefiere que un compuesto o complejo que se usará como adyuvante pueda tener la propiedad de desplazar una respuesta inmune específica de antígeno causada por una vacuna a una respuesta inmune basada en Th1. La dirección de una respuesta inmune inducida por una vacuna se mide normalmente determinando la inducción de varios subtipos de anticuerpos específicos de antígenos y la inducción de células T CD8+ citotóxicas específicas de antígenos. En este contexto, el subtipo de anticuerpo IgG1 representa la inducción de una respuesta inmune basada en Th2 y la inducción de anticuerpo de subtipo IgG2a y la inducción de células T citotóxicas representa la inducción de una respuesta inmune basada en Th1. La inducción de anticuerpos específicos de antígenos se determina revisando el título de anticuerpos en sangre del vacunado por ELISA. La inducción de células T citotóxicas específicas de antígenos se determina midiendo la secreción de IFN-gamma en esplenocitos después de la estimulación con péptidos específicos de antígenos por ELISPOT. En este contexto, la inducción de secreción de IFN-gamma prueba que las células T citotóxicas específicas de antígenos están presentes en el bazo que pueden atacar específicamente células que presentan epítopos del antígeno en moléculas MHC I sobre su superficie.

25 Así, para determinar las propiedades benéficas de un adyuvante se llevan a cabo vacunaciones *in vivo*. Con éstas, es posible encontrar si el adyuvante o compuesto o complejo inductor mejora una respuesta inmune específica de antígeno causada por la vacuna y, además, si puede desplazar una respuesta inmune específica de antígeno en la dirección deseada para mejorar las propiedades adyuvantes. Particularmente, en la inducción de una respuesta inmune antitumoral la inducción de una respuesta inmune desplazada por Th1, especialmente la inducción de células T citotóxicas juega

un papel principal, debido a que la inducción de células T citotóxicas específicas de antígenos representa un prerrequisito indispensable para el combate exitoso de un tumor.

5 Correspondientemente, se conocen bien en la técnica métodos para cribar compuestos o complejos que realmente tengan propiedades como agentes inmunoestimuladores y/o adyuvantes y pueden aplicarse fácilmente por ejemplo por pruebas ELISA que midan la respuesta inmune provocada por los compuestos/complejos probados.

De acuerdo con otra realización particularmente preferente, la composición farmacéutica de la invención (o el complejo de carga portador polimérico de la invención) puede ser provista o usada como vacuna.

10 En este contexto, preferentemente la vacuna se define como un adyuvante o como una composición farmacéutica de la invención como la descrita arriba. Más preferiblemente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, contenido de preferencia en esta vacuna, puede ser cualquier ácido nucleico como el definido arriba, de preferencia un ácido nucleico inmunoestimulador como el definido aquí, por ejemplo un CpG-ADN o un ARN inmunoestimulador (ARNsi). Alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, de preferencia contenido en la vacuna, es un ácido nucleico de codificación como el definido aquí, preferiblemente un ADN o un ARNm, muy preferiblemente que codifica para un proteína adyuvante, de preferencia como la definida aquí. Alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención, contenido de preferencia en la vacuna, es un ácido nucleico de codificación como el definido en la presente, de preferencia un ADN o un ARNm, más preferiblemente que codifica para un antígeno, de preferencia como el definido aquí. Además, particularmente si el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención no codifica para un antígeno, la vacuna de la invención puede contener un antígeno, de preferencia como el definido arriba, ya sea como una proteína o péptido o codificado por un ácido nucleico, o células antigénicas, fragmentos celulares antigénicos, fracciones celulares; componentes de pared celular (por ejemplo, polisacáridos), patógenos modificados, atenuados o desactivados (por ejemplo, químicamente por irradiación) (virus, bacterias, etc.).

De acuerdo con un primer aspecto, esta vacuna de la invención está compuesta típicamente como el adyuvante de la invención y soporta o provoca de preferencia una respuesta inmune innata del sistema inmunológico de un paciente a tratar cuando se emplea un ácido nucleico inmunoestimulador como la molécula de ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención.

30 De acuerdo con un segundo aspecto, la vacuna de la invención puede provocar una respuesta inmune adaptativa, de preferencia cuando el ácido nucleico del complejo de carga portador polimérico de la invención aquí definido codifica para un antígeno como el definido en la presente, adecuado para provocar una respuesta inmune adaptativa. Alternativamente, este antígeno puede estar en forma de un péptido, una proteína o un epitopo o se puede proporcionar como un ácido nucleico adicional que codifique para dicho antígeno. El antígeno puede ser también un componente del portador polimérico de la invención, por ejemplo, un componente (AA), como el definido aquí.

La vacuna, el agente inmunoestimulador o el adyuvante de la invención también pueden comprender un portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como se define aquí para la composición farmacéutica de la invención. En el contexto específico de la vacuna de la invención, la elección de un portador farmacéuticamente aceptable se determina en principio según la forma de administración de la vacuna de la invención. La vacuna de la invención puede administrarse, por ejemplo, sistémica o localmente. Las vías para la administración sistémica en general incluyen, por ejemplo, las vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intradérmicas e intraperitoneales y/o vías de administración intranasales. Las vías para administración local en general incluyen, por ejemplo, vías de administración tópica pero también inyecciones intradérmicas, transdérmicas, subcutáneas o inyecciones intramusculares o intralesionales, intracraneales, intrapulmonares, intracardíacas y sublinguales. Muy preferiblemente, las vacunas pueden administrarse vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Por tanto, las vacunas de la invención se formulan de preferencia en forma líquida (o algunas veces sólida). La cantidad adecuada de la vacuna de la invención a administrar puede determinarse por experimentos de rutina con modelos animales. Estos modelos incluyen, sin implicar ninguna limitación, conejo, borrego, ratón, rata, perro y modelos de primates no humanos. Las formas de dosis única que se prefieren para inyección incluyen soluciones estériles de agua, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de estas soluciones debe ajustarse a aproximadamente 7,4. Los portadores adecuados para la inyección incluyen hidrogeles, dispositivos de liberación controlada o retardada, ácido poliláctico y matrices de colágeno. Los portadores farmacéuticamente aceptables útiles para administración tópica incluyen aquellos adecuados para usarse en lociones, cremas, geles y similares. Si la vacuna de la invención se va a administrar oralmente, tabletas, cápsulas y similares son la forma de dosis única preferente. Los portadores farmacéuticamente aceptables para la preparación de formas de dosis única que pueden usarse para la administración oral se conocen bien en la técnica anterior. La elección de los mismos dependerá de consideraciones

secundarias tales como sabor, coste y capacidad de almacenamiento, no críticas para los efectos de la presente invención, y se pueden hacer sin dificultad el experto en la técnica.

- 5 Lavacuna, el agente inmunoestimulador o el adyuvante de la invención puede contener además una o más sustancias auxiliares para así incrementar su inmunogenicidad o capacidad inmunoestimuladora, si se desea. Una acción sinérgica del complejo de cargaportador polimérico de la invención como el definido aquí y de una sustancia auxiliar, que puede incluirse opcionalmente en la vacuna, agente inmunoestimulador o adyuvante de la invención como se define aquí, se logra de preferencia de esta manera. Dependiendo de los
- 10 diferentes tipos de sustancias auxiliares, varios mecanismos pueden entrar en consideración a este respecto. Por ejemplo, compuestos que permitan la maduración de células dendríticas (DCs), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40, forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, es posible usar como sustancia auxiliar cualquier agente que influya en el sistema inmunológico de una manera de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, tales como GM-CSF, que permitan que se incremente y/o influya una respuesta inmune de una manera seleccionada. Las sustancias auxiliares particularmente
- 15 preferentes son citoquinas, tales como monoquinas, linfocinas, interleuquinas o quimiocinas, que promueven además la respuesta inmune innata, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, tales como hGH.
- 20 En la vacuna, el agente inmunoestimulador o el adyuvante de la invención pueden incluirse otros aditivos adicionales emulsionantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo lauril sulfato de sodio, agentes colorantes; agentes saborizantes, portadores farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizadores; antioxidantes; conservantes.
- 25 La vacuna, el agente inmunoestimulador o el adyuvante de la invención también puede contener además cualquier compuesto adicional, que se sepa es inmunoestimulador gracias a su afinidad de unión (como ligandos) a receptores tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 o gracias a su afinidad de unión (como ligandos) a receptores tipo Toll de murino TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.
- 30 La vacuna, el agente inmunoestimulador o el adyuvante de la invención también puede contener alternativa o adicionalmente un ARN inmunoestimulador, es decir, un ARN derivado de un ARN inmunoestimulador, que desencadene o incremente una respuesta inmune (innata). De preferencia, este ARN inmunoestimulador puede ser en general como el aquí definido anteriormente.
- 35 Otra clase de compuestos que se pueden añadir a una vacuna, agente inmunoestimulador o adyuvante de la invención en este contexto, pueden ser ácidos nucleicos CpG, en particular CpG-ARN o CpG-ADN, A CpG-ARN o CpG-ADN pueden ser un CpG-ADN de hebra individual (ssCpG-ADN), un CpG-ADN de doble hebra (dsADN), un CpG-ARN de hebra individual (ss CpG-ARN) o un CpG-ARN de doble hebra (dsCpG-ARN). El ácido nucleico CpG está de preferencia en forma de CpG-ARN, muy preferiblemente en forma de CpG-ARN de hebra individual (ss CpG-ARN). El ácido nucleico CpG contiene de preferencia al menos una o más secuencias de dinucleótidos de citosina/guanina (mitogénicas) (motivos CpG)). De acuerdo con una primera alternativa preferida, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, es decir la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG, no están metiladas. Todas las citosinas o guaninas adicionales contenidas opcionalmente en estas secuencias pueden estar metiladas o no metiladas. De acuerdo con una alternativa preferida más, sin embargo, la C (citosina) y la G (guanina) o el motivo CpG también pueden estar presentes en forma metilada.
- 40 La presente invención proporciona además varias aplicaciones y usos del complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí, la composición farmacéutica de la invención, el agente inmunoestimulador de la invención o adyuvante y la vacuna de la invención que comprende los mismos o kits que comprenden los mismos.
- 45 De acuerdo con una realización específica, la presente invención está dirigida al primer uso médico del complejo de cargaportador polimérico de la invención como se define aquí, esto es del complejo de carga portador polimérico para su uso como medicamento, de preferencia como agente inmunoestimulador, adyuvante o vacuna o en el campo de terapia génica.
- 50 De acuerdo con otra realización, la presente invención está dirigida al segundo uso médico del complejo de cargaportador polimérico de la invención como se define aquí, esto es del complejo de carga portador polimérico para su uso en el tratamiento de enfermedades como las definidas aquí, de preferencia al uso del complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí, de una composición farmacéutica, vacuna, agente inmunoestimulador, adyuvante o vacuna que lo comprende de kits que lo comprenden en la preparación de un medicamento para la profilaxis, el tratamiento y/o la disminución de varias enfermedades como las definidas aquí,
- 55

particularmente la profilaxis, el tratamiento y/o la reducción de enfermedades como las definidas aquí. De preferencia, la composición farmacéutica, un agente inmunoestimulador, un adyuvante una vacuna se usa o administra a un paciente que lo requiera para este fin.

5 Preferentemente, las enfermedades mencionadas aquí se seleccionan de cáncer o enfermedades tumorales, enfermedades infecciosas, de preferencia enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o protozoológicas), enfermedades autoinmunes, alergias o enfermedades alérgicas, enfermedades monogénicas, es decir, (hereditarias), o enfermedades genéticas en general, enfermedades con un antecedente genético heredado y causadas típicamente por un solo defecto genético y se hereden de acuerdo con las leyes de Mendel, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neuronales o cualquier enfermedad que pueda ser influenciada por la presente invención.

10 Estas enfermedades incluyen cáncer o enfermedades tumorales, seleccionadas de preferencia de melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas renales, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, carcinomas mamarios (= cáncer de mama), cáncer uterino, cáncer cervical, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus tales como carcinomas inducidos por el virus de papiloma (por ejemplo, carcinoma cervical = cáncer cervical), adenocarcinomas, tumores inducidos por el virus del 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, neuroma acústico, carcinomas pulmonares (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas pulmonares microcíticos, cáncer faríngeo, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma rectal, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebrales, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer pancreático, cáncer testicular, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, tumor de hipófisis, micosis fungoide, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, 25 cáncer de laringe, cáncer renal, timoma, carcinoma corporal, cáncer de hueso, linfomas no Hodgkin, cáncer uretral, síndrome CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, carcinoma de colon, carcinoma esofágico (= cáncer de esófago), implicación de verrugas, tumores del intestino delgado, craneofaringeomas, carcinoma ovárico, tumores genitales, cáncer ovárico (= carcinoma ovárico), carcinoma pancreático (= cáncer pancreático), carcinoma endometrial, metástasis hepáticas, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumor de pestaña, tumor de párpado, cáncer de próstata (= tumores de próstata), etc.

35 De acuerdo con una realización específica adicional, las enfermedades aquí definidas comprenden enfermedades infecciosas, de preferencia enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o protozoológicas). Estas enfermedades infecciosas, de preferencia enfermedades infecciosas (virales, bacterianas o protozoológicas), se seleccionan típicamente de gripe, malaria, SARS, fiebre amarilla, SIDA, borreliosis de Lyme, Leishmaniasis, ántrax, meningitis, enfermedades infecciosas virales tales como SIDA, condiloma acuminata, verrugas huecas, fiebre del Dengue, fiebre de tres días, virus del Ébola, resfriado, meningocefalitis de verano inicial (FSME), herpes zoster, hepatitis, sarampión, virus herpes simple tipo 1, herpes simple tipo 2, herpes zoster, influenza, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, virus de Marburg, sarampión, fiebre aftosa, mononucleosis, paperas, infección de virus de Norwalk, fiebre glandular de Pfeiffer, viruela, polio (cojera de niñez), pseudo-croup, enfermedad de fifth, rabia, verrugas, fiebre del Nilo Occidental, viruela, virus citomegálico (CMV), enfermedades infecciosas bacterianas tales como aborto espontáneo (inflamación de próstata), ántrax, apendicitis, borreliosis, botulismo, Campylobacter, Chlamydia trachomatis (inflamación de la uretra, conjuntivitis), cólera, difteria, donovanosis, epiglotitis, fiebre de tifo, gangrena gaseosa, gonorrea, fiebre de conejo, Helicobacter pylori, tos con silbido, bubo climático, osteomielitis, enfermedad de Legionario, lepra, listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, ántrax, otitis media, micoplasma hominis, sepsis neonatal (corioamnionitis), noma, paratífus, plaga, síndrome de Reiter, fiebre moteada de las Montañas Rocallosas, paratífus por salmonela, tífus por salmonella, fiebre escarlata, sífilis, tétanos, tripper, enfermedad de tsutsugamushi, tuberculosis, tífus, vaginitis (colpitis), chancro suave y de enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoarios u hongos, tales como amibiásis, bilharziosis, enfermedad de Chagas, piedad atleta, machas por hongos de levadura, escabies, malaria, oncocercosis (ceguera de río) o enfermedades fúngicas, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), Leishmaniasis visceral, dermatitis por braga/pañal, esquistosomiasis, envenenamiento por pescado (Ciguatera), candidiasis, Leishmaniasis cutánea, lambliasis (giardiasis) o enfermedad del sueño, o de enfermedades infecciosas causadas por equinococos, tenia de pescado, tenia de zorro, tenia de caninos, piojos, tenia de bovino, tenia de porcina, tenia en miniatura.

60 De acuerdo con otra realización específica, las enfermedades aquí definidas comprenden enfermedades autoinmunes como las definidas a continuación. Las enfermedades autoinmunes pueden dividirse en general en trastornos autoinmunes sistémicos y específicos de órganos localizados, dependiendo de las características clínicas y patológicas principales de cada enfermedad. Las

- enfermedades autoinmunes pueden dividirse en las categorías de síndromes sistémicos, incluyendo lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjögren, escleroderma, artritis reumatoide y polimiositis o síndromes locales que pueden ser endocrinológicos (diabetes tipo I (diabetes mellitus tipo 1), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, etc.), dermatológicas (pénfigo vulgar), hematológicas (anemia hemolítica autoinmune), neurales (esclerosis múltiple) o pueden incluir virtualmente cualquier masa circunscrita de tejido corporal. 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 (EM), artritis reumatoide, diabetes, diabetes tipo I (diabetes mellitus tipo 1), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades de alergia tipo I, enfermedades de alergia tipo II, enfermedades de alergia tipo III, enfermedades de alergia tipo IV, fibromialgia, caída de cabello, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, miastenia grave, neurodermitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (PSS), síndrome de Reiter, artritis reumatoide, psoriasis, vasculitis, etc., o diabetes tipo I. Aunque el modo exacto de acción del sistema inmunitario induce una reacción inmune contra autoantígenos aún no ha sido elucidado hasta el momento, existen varios descubrimientos con respecto a la etiología. En consecuencia, la autorreacción puede deberse a una derivación de células T. Un sistema inmunológico normal requiere la activación de células B por células T antes de que las primeras puedan producir anticuerpos en grandes cantidades. Este requisito de una célula T puede ser derivado en casos raros, tales como infección por organismos que producen superantígenos, los cuales sean capaces de iniciar activación policlonal de células B, o incluso de células T, al unirse directamente a la subunidad β de receptores de células T de una forma no específica. Otra explicación deduce a las enfermedades autoinmunes a partir de una simulación molecular. Un antígeno exógeno puede compartir similitudes estructurales con ciertos antígenos anfitriones; de esta manera, cualquier anticuerpo producido contra este antígeno (el cual simula los autoantígenos) también puede, en teoría, unirse a los antígenos anfitriones y amplificar la respuesta inmune. La forma más desconcertante de simulación molecular se observa en los estreptococos hemolíticos beta del grupo A, que comparten antígenos con miocardio humano y son responsables de las manifestaciones cardíacas de la fiebre reumática.
- Además, de acuerdo con una realización específica adicional, enfermedades como la aquí definidas comprenden alergias o enfermedades alérgicas, es decir enfermedades relacionadas con alergias. La alergia es una condición que típicamente incluye una hipersensibilidad inmunológica anormal y adquirida a ciertos antígenos o alérgenos extraños, tales como los antígenos de alergia como los definidos aquí. Estos antígenos de alergia o alérgenos pueden seleccionarse de antígenos de alergia como los aquí definidos, antígenos derivados de diferentes fuentes, por ejemplo de animales, plantas, hongos, bacterias, etc. Los alérgenos en este contexto incluyen, por ejemplo, céspedes, pólenes, mohos, fármacos o numerosos activadores ambientales, etc. Las alergias normalmente resultan en una respuesta inflamatoria local o sistémica a estos antígenos o alérgenos y llevan a inmunidad en el cuerpo contra estos alérgenos. Sin estar limitados por teoría, se supone que varios mecanismos de enfermedad diferentes están implicados en el desarrollo de alergias. De acuerdo con un esquema de clasificación por P. Gelly R. Coombs la palabra "alergia" se restringió a hipersensibilidades tipo I, las cuales son causadas por el clásico mecanismo IgE. La hipersensibilidad tipo I se caracteriza por una excesiva activación de células cebadas y basófilos por IgE, dando como resultado una respuesta inflamatoria sistémica que puede resultar en síntomas tan benignos como una nariz irritada, hasta un potencialmente amenazador de vida choque anafiláctico y muerte. Los tipos bien conocidos de alergias incluyen, sin estar limitados a estos, 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 de piel (que llevan e incluyen varias erupciones, tales como eczema, (urticaria) y dermatitis (por contacto), alergias de alimentos, alergias a medicamentos, etc. Preferentemente el tratamiento de estos trastornos o enfermedades alérgicas puede realizarse desensibilizando la reacción inmune que desencadena una respuesta inmune específica. Esta desensibilización se puede llevar a cabo administrando una cantidad defectiva del alérgeno o antígeno alérgico codificado por el ácido nucleico como el aquí definido, de preferencia cuando se formula como una composición farmacéutica, para inducir una ligera reacción inmune. La cantidad del alérgeno o antígeno alérgico puede ser luego elevada gradualmente en administraciónes subsecuentes hasta que el sistema inmunitario del paciente que será tratado tolere una cantidad específica de alérgeno o antígeno alérgico.
- Además, las enfermedades a tratar en el contexto de la presente invención también incluyen enfermedades (hereditarias), o enfermedades genéticas en enfermedades monogénicas generales, es decir, enfermedades (hereditarias), o enfermedades genéticas en general. Estas enfermedades monogénicas, enfermedades (hereditarias) o enfermedades genéticas en general son típicamente causadas por defectos genéticos, por ejemplo, debido a mutaciones génicas que se traducen en pérdida de actividad de proteínas o mutaciones reguladoras que no permiten la transcripción

otraducciondelaproteína.Frecuentemente,estas enfermedades llevan a trastornos metabólicos y otros
 síntomas, por ejemplo, distrofia muscular. La presente invención permite tratar las siguientes
 enfermedades(hereditarias)oenfermedadesgenéticas:deficienciade3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa
 (tipo II); deficiencia de 3-cetotilasa; sensibilidad a 6-mercaptopurina; síndrome de Aarskog-Scott;
 5 abetalipoproteinemia; acatalasemia; acondrogénesis; acondrogénesis-
 hipocondrogénesis;acondroplasia;acromatopsia;displasiaacromesomémica(tipo Hunter-Thompson); deficiencia
 de ACTH; deficiencia de Acil-CoA deshidrogenasa (cadena corta, cadena media, cadena larga); poliposis coli
 adenomatosa; deficiencia de adenosina-desaminasa; deficiencia de adenilosuccinasa; adalinopatía;
 10 hiperplasia adrenal; congénita (debida a deficienciade11-beta-hidroxilasa;debidaadeficienciade17-alfa-
 hidroxilasa (debida a deficiencia de 21-hidroxilasa); hipoplasia adrenal, congénita, con hipogonadismo
 hipogonadotrópico; síndrome adrenogenital; adrenoleucodistrofia, adrenomielloneuropatía;
 afibrinogenemia; agammaglobulinemia; síndrome de Alagille; albinismo (café, ocular, oculocutáneo,
 rufo); intolerancia al alcohol, aguda; deficiencia de aldolasaA; aldosteronismo;
 15 remedialoporglucocorticoides;enfermedadde Alexander; alcaptonuria; alopecia universal; deficiencia de alfa-
 1- antiqumiotripsina; deficienciadealfa-metilacil-CoAracemasa;síndrome de retraso mental/alfa-talasemia;
 síndrome de Alport; enfermedad de Alzheimer-1(relacionadaconAPP);enfermedaddeAlzheimer-3;enfermedad
 de Alzheimer-4; amelogénesis imperfecta; neuropatía amiloide (familiar, tipos alélicos
 severos);amiloidosis(tipoHolandés;tipo finlandés; renal hereditaria; renal; sistémica senil); esclerosis lateral
 20 amiotrófica;analbuminemia;insensibilidadaandrógenos;anemia (Diamond-Blackfan); anemia (hemolítica,
 debido adeficienciadePK); anemia (hemolítica, nula en Rh, tipo supresor); anemia(hemolítica neonatal, fatal y
 casi fatal); anemia (sideroblástica, con ataxia); anemia
 (sideroblástica/hipocrómica);anemiadebidaadeficienciaenG6PD;aneurisma (arterial familiar); síndrome de
 Angelman; angioedema; aniridia; anomalías en el segmentoanteriorycataratas;disgénesismesenquimática del
 25 segmento anterior; disgénesis mesenquimática del segmento anterior y catarata; deficiencia de antitrombina
 III; rasgos de personalidad relacionadasconansiedad;síndromedeApert;apnea(postanestésica);deficiencia de
 ApoA-IyapoC-III(combinada);deficienciade apolipoproteína A-II; apolipoproteína B-100 (defectuosa
 enligandos); exceso de mineralocorticoides aparente (debidoahipertensión); argininemia;
 argininosuccinicaciduria; artropatía (pseudorreumatoides progresiva, de niñez); aspartilglucosaminuria; ataxia
 (episódica); ataxia condeficiencia de vitamina E aislada; ataxia-telangiectasia; atelostogénesis II; deficiencia
 30 de ADN ligasa I dependiente de ATP; defecto séptico atrial con defectos de conducción atrioventricular; atricia
 con lesiones papulares; autismo (succinilpurinémico); enfermedad poliglandular autoinmune, tipo I;
 disfuncióndelsistemanerviosoautonómico;anomalíadeAxenfeld;azoospermia; síndrome de Bamforth-
 Lazarus;síndromedeBannayan-Zonana; síndrome de Barth; síndrome de Bartter (tipo 2 o tip 3); carcinoma de
 35 células basales; síndrome del nevo celular basal; infección por BCG; síndrome de cutis gyrata de Beare-
 Stevenson; distrofia muscular de Becker;síndrome de Beckwith-Wiedemann; síndrome de Bernard-
 Soulier(tipoB; tipo C); miopatía de Bethlem;mala absorción de ácidos biliares, primaria; deficiencia de
 biotinidasa; cáncer de vejiga; trastorno de hemorragia debido a receptor de tromboxano A2 defectuoso;
 40 síndrome de Bloom; braquidactilia(tipo B1 o tipo C); síndromebranquiotico;síndromebranquiotorrenal;
 cáncer de seno (intraductal invasivo; lobular; masculino, con síndrome de Reifenstein; esporádico); cáncer de
 mama-1 (inicio temprano); cáncer de mama-2 (inicio temprano); miopatía de Brody; síndrome deBrugada;
 síndromedeBrunner;linfomadeBurkitt;distrofiademariposa(retinal);deficiencia de C1q
 (tipoA;tipoB;tipoC);deficienciadeC1r/C1s; deficiencia de C1s, aislada; deficiencia de C2; deficiencia de C3;
 45 deficiencia de inactivador de C3b; deficienciadeC4;deficienciadeC8, tipo II; deficiencia de C9; displasia
 campomélica con inversión de sexo autosómica;camptodactililia-artropatía-
 coxasíndromedevarapericarditis;enfermedad de Canavan; deficienciadecarbamoilfosfosintetasal; síndrome
 de glicoproteína deficiente en carbohidratos (tipo I; tipo Ib; tipo II); tumor carcinoide de pulmón;
 cardioencefalomiopatía (infantil fatal, debida a deficiencia en citocromo c oxidasa); cardiomiopatía (dilatada;
 50 dilatadaderelaciónX;hipertróficafamiliar;hipertrófica);deficienciadecarnitina (primaria sistémica); deficiencia de
 carnitina-acilcarnitina translocasa; síndromedel túnelCarpal(familiar); catarata(cerúlea; congénita; cristalina
 aculeiforme; de inicio juvenil; polimórfica y laminar;
 punteada;pulverulentazonular);catarata,tipoCoppock;deficienciadeCD59; enfermedad de núcleo central;
 ataxia cerebelar; angiopatía amiloide cerebral; arteriopatía cerebral con infartos subcorticalesy
 leucoencefalopatía; malformaciones cavernosas cerebrales-1; síndrome
 55 cerebrooculafocoesquelético;Cerebrotendinousxantomatosis;enfermedadcerebrovascular; lipofuscinosi
 ceroides (neuronal, tipo juvenil variante, con depósitos osmiofilicos granulares); lipofuscinosi ceroides
 (neuronal-1, infantil); lipofuscinosi ceroides (neuronal-3, juvenil); síndrome de Char; enfermedad de Charcot-
 Marie-Tooth; neuropatía de Charcot-Marie-Tooth; tipoCharlevoix-Saguenay;síndromedeChediak-
 Higashi;diarreaoporcloruro (tipo finlandés); colestasis (intrahepática recurrente benigna); colestasis
 (intrahepática familiar); colestasis (intrahepática familiar progresiva); enfermedad de almacenamiento de éster
 60 colesterílico; condrodisplasia punteada (braquitelefalángica; rizomélica; dominante ligada
 aX;recesivaligadaaX;tipoGrebe);condrosarcoma;coroideremia;enfermedad
 granulomatosa crónica (autosómica,debidaadeficienciade CYBA); enfermedad granulomatosa crónica (ligada a
 X); enfermedad granulomatosa crónica debida a deficiencia de NCF-1; enfermedad granulomatosa crónica
 65 debida a deficiencia de NCF-2; síndrome de
 quilomicronemia, familiar; citrulinemia; síndromedeCockayneclásico-1;labio leporino, mandíbulahendida,
 paladar hendido; síndrome de displasia ectodérmica por labio leporino/paladar hendido; displasia

- cleidocraneal; deficiencia de CMO II; enfermedad de Coats; síndrome de Cockayne-2, tipo B; síndrome de Coffin-Lowry; resistencia a Colchicina; adenocarcinoma decolon; cáncer de colon; daltonia (deutana; protana; tritana); cáncer colorrectal; deficiencia de factor V y VIII combinados; hiperlipemia combinada (familiar); inmunodeficiencia combinada (ligada a X,
- 5 moderada); deficiencia de complejo J; 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; ligneosa; aracnodactilia contractual; coproporfiria; cómea plana congénita; enturbecimiento corneal; distrofia corneal (tipo Avellino; tipo gota gelatinosa; tipo de Groenouw I; tipo reticular; tipo Reis-Bucklers); resistencia a cortisol; resistencia a coumarina; enfermedad de Cowden; deficiencia
- 10 de CPT, hepática (tipo I; tipo II); calambres (familiares, agravados por potasio); síndrome de sordera craneofacial-manual; 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; cistinosis (nefropática); cistinuria (tipo II; tipo III); daltonismo; enfermedad de Darier; deficiencia de proteína bifuncional D; sordera; dominante autosómica 1;
- 15 sordera; dominante autosómica 11; sordera, dominante autosómica 12; sordera, dominante
- 20 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 nonsindrómica 13;
- 25 sordera, ligada a X 1; sordera, ligada a X 3; sensibilidad a debrisoquina; enfermedad de Dejerine-Sottas; demencia (danesa familiar); demencia (frontotemporal, con parkinsonismo); enfermedad de Dent; anomalías dentales; atrofia dentatorubro-palidoluisiana; síndrome de Denys-Drash; dermatofibrosarcoma protuberante; enfermedad de Moïse; diabetes insípida (nefrogénica); diabetes insípida (neurohipofísea); diabetes mellitus (resistente a insulina); diabetes mellitus (formarara); diabetes mellitus (tipo
- 30 II); displasia diastrófica; dihidropirimidinuria; inversión de sexo sensible a dosis; degeneración alveolar de retina de Dooyne; síndrome de Dubin-Johnson; distrofia muscular de Duchenne; anemia diseritropoyética con trombocitopenia; disfibrirogenemia (tipo alfa; tipo beta; tipo gamma); disqueratosis congénita-1; disprotrombinemia; distonía (responsiva a DOPA); distonía (mioclónica); distonía-1 (torsión); displasia ectodérmica; ectopia lentis; 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 VII); estenosis aórtica supra valvular por elastina; eliptocitosis-1; eliptocitosis-2; eliptocitosis-3; síndrome de Ellis-van Creveld; distrofia muscular de Emery-Dreifuss; enfisema; encefalopatía; fibroelastosis endocárdica-2; carcinoma endometrial; deficiencia de acetilcolinesterasa de placa final; síndrome de cono sincrementado; acueducto vestibular incrementado;
- 35 epidermolísis bullosa; epidermolísis bullosa distrofica (dominante o recesiva); epidermolísis bullosa simple; hiperqueratosis epidermóica; queratoderma palmoplantar epidermolítico; epilepsia (generalizada; juvenil; mioclónica; lóbulofrontal nocturno; mioclónica progresiva); epilepsia, benigna, neonatal (tipo 1 o tipo 2); displasia epifísea (múltiple); ataxia episódica (tipo 2); ataxia episódica/síndrome de mioquimia; eritemias (alfa; displasia); eritrocitosis; eritroqueratoderma;
- 40 resistencia a estrógenos; mioglobulinuria ejercional debida a deficiencia de LDH-A; exostosis múltiple (tipo 1; tipo 2); vitreorretinopatía exudativa, ligada a X; 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 mediterránea 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-bisfosfata fructosa; fucosidosis; deficiencia de fumarasa; Fundus albipunctatus; Fundus flavimaculatus; deficiencia de G6PD; deficiencia de GABA-transaminasa; deficiencia de galactocinasa con cataratas; deficiencia de galactosa epimerasa; galactosemia; galactosialidosis; deficiencia de GAMT; síndrome de Gardner; cáncer gástrico; enfermedad de Gaucher; epilepsia generalizada con ataques febriles adicionales; tumores de células germinales; enfermedad de Gerstmann-Straussler; hepatitis de células gigantes (neonatal); trastorno de plaquetas gigantes; fibroblastoma de células gigantes; síndrome de Gitelman; trombastenia de Glanzmann (tipo A; tipo B); glaucoma 1A; glaucoma 3A; glioblastoma multiforme;
- 55 glomerulosclerosis (segmental focal); defecto en transporte de glucosa (barrera hematoencefálica); mala absorción de glucosa/galactosa; deficiencia de glucosidasa I; glutaricaciduria (tipo I; tipo IIB; tipo IIC); deficiencia de glutatión sintetasa; deficiencia de glicerol cinasa; receptor de glicina (polipéptido alfa-1); enfermedad de almacenamiento de glicógenos I; enfermedad de almacenamiento de glicógenos II; enfermedad de almacenamiento de glicógenos III; enfermedad de almacenamiento de glicógenos IV; enfermedad de almacenamiento de glicógenos VI; enfermedad de almacenamiento de glicógenos VII;
- 60 glicogenosis (hepática, autosómica); glicogenosis (hepática ligada a X); GM1-gangliosidosis; GM2-gangliosidosis; Goiter (multinodular adolescente); Goiter (congénito); Goiter (no edémico, simple); disgénesis gonadal (tipo XY); granulomatosis, séptica; enfermedad de Graves; síndrome de cefalopolisindactilia de Greig; síndrome de Griscelli; enanismo deficiente de hormona de crecimiento; retraso de crecimiento con sordera y retraso mental; ginecomastia (familiar,
- 65 debida a actividad aromatas incrementada); atrofia girada 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 cuerpos de Heinz; síndrome de HELLP; hematuria (benigna familiar); deficiencia de Heme oxigenasa-1; migraña hemipléjica; hemocromatosis; enfermedad de hemoglobina H;

5 anemia hemolítica debida a exceso de ADA; anemia hemolítica debida a deficiencia en adenilato cinasa; anemia hemolítica debida a defecto en banda 3; anemia hemolítica debida a deficiencia en glucosa fosfato isomerasa; anemia hemolítica debida a deficiencia en glutatona sintetasa; anemia hemolítica debida a deficiencia en hexocinasa; anemia hemolítica debida a deficiencia en PGK; síndrome hemolítico-urémico;

10 linfocitosis hemofagocítica; hemofilia A; hemofilia B; diátesis hemorrágica debida a deficiencia en 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 (visceralligada a X); heterotopia (periventricular); síndrome de Hippel-Lindau; enfermedad de Hirschprung; trombofilia de glicoproteínas ricas en histidina debida a deficiencia en HRG; deficiencia de HMG-CoA liasa; holoprosencefalia-2; holoprosencefalia-3; holoprosencefalia-4; holoprosencefalia-5; síndrome de Holt-Oram; homocistinuria; Hoyeraal-Hreidarsson; HPFH (tipo supresión o tipo no supresión); gota relacionada con HPRT; enfermedad de Huntington; hidrocefalia debida a estenosis acueductal; Hydrops fetalis; hiperbetalipoproteinemia; hipercolesterolemia, familiar; síndrome de hiperferritinemia-catarata; hiperglicerolemia; hiperglucemia; hiperinmunoglobulinemia D y síndrome de fiebre periódica; hiperinsulinismo; síndrome de hiperinsulinismo-hiperamonemia; parálisis periódica hipercalcémica; hiperlipoproteinemia; hiperlisinemia; hipermetioninemia (persistente, autosómica, dominante, debida a metionina, deficiencia de adenosiltransferasa I/III); síndrome de hiperornitinemia-hiperamonemia homocitrulinemia; hiperoxaluria; hiperparatiroidismo; hiperfenilalaninemia debida a deficiencia en pterin-4acarbina deshidratasa; hiperproinsulinemia; hiperprolinemia; hipertensión; hipertiroidismo (congénito); hipertrigliceridemia; hipofalipoproteinemia; hipobetalipoproteinemia; hipocalcemia; hipopcondroplasia; anemia microcítica hipocrómica; hipodontia; hipofibrinogenemia; hipoglobulinemia y células B ausentes; hipogonadismo (hipergonadotrópico); hipogonadotrópico (hipogonadismo); parálisis periódica hipocalcémica; hipomagnesemia; hipomielinación (congénita); hipoparatiroidismo; hipofosfatasa (adulto; niñez;

15 infantil; hereditaria); hipoprotrombinemia; hipotiroidismo (congénito; congénito hereditario; no bocioso); eritoderma ictiosiforme; ictiosis; ictiosis bullosa de Siemens; deficiencia de IgG2; síndrome de cilia inmóvil-1; inmunodeficiencia (complejo de receptor de células T/ CD3); inmunodeficiencia (ligada a X, con hiper-IgM); inmunodeficiencia debida a defecto en CD3-gamma; síndrome de anomalías de inestabilidad facial por inmunodeficiencia Centroamérica; incontinencia pigmentosa; insensibilidad a dolor (congénita, con anhidrosis); insomnio (familiar fatal); deficiencia del receptor de interleucina-2 (cadena alfa); enfermedad de discos intervertebrales; iridogoniodisgénesis; deficiencia de hormona de crecimiento aislada (tipo III con GH ausente y tipo Kowarski con GH bioinactiva); isovaleric acidemia; síndrome de Jackson-Weiss; síndrome de Jensen; síndrome de Jervelly Lange-Nielsen; síndrome de Joubert; síndrome de Juberg-Marsidi; síndrome de Kallmann; enfermedad de Kanzaki; queratitis; queratoderma (palmoplantar); Keratosis palmoplantaris striata I; keratosis palmoplantaris striata II; cetoacidosis debida a deficiencia en SCOT; síndrome de Keutel; síndrome de Klippel-Trenaunay; displasia de Kniest; neutropenia de Kostmann; enfermedad de Krabbe; síndrome de Kurzripp-Polydaktylie; lactacidemia debida a deficiencia en PDX1; displasia mesomélica 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; leiomiomatosis (difusa, con síndrome de Alport); leprecaunismo; 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; adenomas de células de Leydig; síndrome de Lhermitte-Duclos; síndrome de Liddle; síndrome de Li-Fraumeni; deficiencia del ipoamidasa hidrogenasa; lipodistrofia; hiperplasia adrenal lipoide; deficiencia de lipasa delipoproteína; lisencefalia (ligada a X); lisencefalia-1; enfermedad de almacenamiento de glicógeno en hígado (tipo 0); síndrome de QT largo 1; síndrome de QT largo 2; síndrome de QT largo 3; síndrome de QT largo 5; síndrome de QT largo 6; síndrome de Lowe; cáncer pulmonar; cáncer pulmonar (no microcítico); cáncer pulmonar (microcítico); linfocitosis; linfoma (no Hodgkin de células B); linfoma (macroscópico difuso); linfoma (folicular); linfoma (MALT); linfoma (células de manto); síndrome linfoproliferativo (ligado a X); intolerancia a proteínas lisinúricas; enfermedad de Machado-Joseph; anemia macrocítica refrataria (de síndrome 5q); distrofia macular; mesotelioma maligno; deficiencia de malonil-CoA descarboxilasa; mannosidosis (alfa o beta); enfermedad de orina en jarabe de arce (tipo Ia; tipo Ib; tipo II); síndrome de Marfan; síndrome de Maroteaux-Lamy; síndrome de Marschall; síndrome de MASA; leucemia de mastocitos; mastocitosis con trastorno hematológico asociado; enfermedad de McArdle; displasia fibrosa poliostrófica 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 con NF2; relacionado con SIS); enfermedad de Menkes; retraso mental (ligado a X); metabolizador deficiente de mefenotina; mesotelioma; leucodistrofia metacromática; condrodisplasia metáfisea (tipo Murk Jansen; tipo Schmid); metemoglobinemia; deficiencia de metionina adenosiltransferasa

(autosómica recesiva); deficiencia de metilcobalamina (tipo cblI G); metilmalonicaciduria (tipo deficiencia de mutasa); mevalonicaciduria; deficiencia de MHC clas II; microftalmia (cataratas, y anomalías de iris); miopatía de Miyoshi; MODY; síndrome de Mohr-Tranebjaerg; deficiencia de cofactor de molibdeno (tipo A o tipo B); moniletrix; Morbus Fabry; Morbus Gaucher; mucopolisacaridosis; mucoviscidosis; 5 síndrome de Muencke; síndrome de Muir-Torre; enanismo de Mulibrey; deficiencia de decarboxilasa múltiple (sensible a biotina); neoplasia endocrina múltiple; glicogénesis muscular; distrofia muscular (meros indeficiente congénita); distrofia muscular (congénita de Fukuyama); distrofia muscular (de extremidades-cintura); distrofia muscular tipo Duchenne); distrofia muscular con epidermólisis bullosa simple; síndrome miasténico (congénito de canal lento); 10 infección micobacteriana (atípica, diseminada familiar); síndrome mielodisplásico; leucemia mielógena; malignidad mielógena; deficiencia de mieloperoxidasa; deficiencia en mioadenilato desaminasa; mioglobinuria/hemólisis debida a deficiencia en PGK; síndrome de encefalomiopatía neurogastrointestinal; miopatía (actina; congénita; relacionada con desmina; cardiosquelética; distal; nemalina); miopatía debida a deficiencia en CPT II; miopatía debida a deficiencia en fosfoglicerato mutasa; miotonia congénita; miotonia levior; distrofia 15 miotónica; liposarcoma mixoide; deficiencia de NAGA; síndrome de Nailpatella; miopatía de Nemaline 1 (dominante autosómica); miopatía de nemalina 2 (recesiva autosómica); hiperparatiroidismo neonatal; nefrolitiasis; nefronofitosis (juvenil); nefropatía (hipocomplementérmica crónica); nefrosis-1; síndrome nefrótico; síndrome de Netherton; 20 neuroblastoma; neurofibromatosis (tipo 1 o tipo 2); neurolemomatosis; lipofuscinosis ceroides neuronal 5; neuropatía; neutropenia (neonatal aloinmune); enfermedad de Niemann-Pick (tipo A; tipo B; tipo C1; tipo D); ceguera nocturna (estacionaria congénita); síndrome de ruptura de Nijmegen; no compactación del miocardio ventricular izquierdo; queratoderma palmoplantar no epidermolítico; enfermedad de Norrie; enfermedad de Norum; deficiencia de nucleósido fosforilasa; obesidad; síndrome 25 occipital; alpinismo ocular (tipo Nettleship-Falls); distrofia muscular oculofaríngea; enfermedad de Oguchi; oligodontia; síndrome de Omenn; síndrome de Opitz G; coloboma del nervio óptico con enfermedad renal; deficiencia de ornitina transcarbamilasa; orotica aciduria; intolerancia ortostática; síndrome de OSMED; osificación de ligamento longitudinal posterior de la espina; osteartrosis; osteogénesis imperfecta; osteolisis; osteopetrosis (recesiva o idiopática); osteosarcoma; carcinoma ovárico; 30 disgenesia ovárica; paquionia congénita (tipo Jackson-Lawler o tipo Jadassohn-Lewandowsky); enfermedad ósea de Paget; síndrome de Pallister-Hall; agenesia pancreática; cáncer pancreático; pancreatitis; síndrome de Papillon-Lefevre; paragangliomas; paramiotonia congénita; foramina parietal; mal de Parkinson (familiar o juvenil); hemoglobinuria nocturna paroxismal; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; síndrome de Pendred; hipospadias perineales; fiebre periódica; trastorno de biogénesis peroxisómica; 35 hipoglucemia hiperinsulinémica persistente de infancia; síndrome de ducto mülleriano persistente (tipo II); anomalía de Peters; síndrome de Peutz-Jeghers; síndrome de Pfeiffer; fenilcetonuria; gota relacionada con fosforribosil pirofosfatosintetasa; deficiencia de fosforilasa cinasa hepática y muscular; piebaldismo; pilomatricoma; pinealoma con retinoblastoma bilateral; adenoma de secreción de ACTH pituitaria; deficiencia de hormona pituitaria; tumor de pituitaria; deficiencia de 40 sulfatasa esteroide placentaria; deficiencia de inhibidor de plasmina; deficiencia de plasminógeno (tipos I y II); enfermedad de Tochigi por plasminógenos; trastorno de plaquetas; deficiencia de glicoproteína IV de plaquetas; deficiencia de acetilhidrolasa de factor de activación de plaquetas; enfermedad renal poliquística; osteodisplasia lipomembranosa poliquística con leucoencefalopatía esclerosante; polidactilia, postaxial; poliposis; síndrome de pterigio popliteal; Porfiria (hepática aguda o intermitente aguda o eritropoyética congénita); Porfiria cutánea tarda; Porfiria hepatoeritropoyética; Porfiria 45 variegata; síndrome de Prader-Willi; pubertad precoz; insuficiencia ovárica prematura; progeria tipo I; progeria tipo II; oftalmoplegia externa progresiva; colestasis intrahepática progresiva-2; prolactinoma (hiperparatiroidismo; síndrome carcinoide); deficiencia de prolidasa; propionacidemia; cáncer de próstata; deficiencia de proteína S; proteinuria; protoporfiria (eritropoyética); 50 pseudocondroplasia; pseudohermafroditismo; pseudohipoaldosteronismo; pseudohipoparatiroidismo; hipospadias perineoscrotal pseudo vaginales; raquitismo por deficiencia en pseudovitamina D; Pseudoxanthoma elasticum (dominante autosómica; recesiva autosómico); proteinosis alveolar pulmonar; hipertensión pulmonar; púrpura fulminante; picnodisostosis; piropliquilicosis; deficiencia de piruvato carboxilasa; deficiencia de piruvato deshidrogenasa; síndrome de Rabson-Mendenhall; enfermedad de 55 Refsum; carcinoma de células renales; acidosis tubular renal; acidosis tubular renal con sordera; síndrome de acidosis tubular renal-osteopetrosis; reticulosis (histiocítica familiar); degeneración retinal; distrofia retinal; retinitis pigmentosa; retinitis punctata albescens; retinoblastoma; deficiencia de proteína de unión a retinol; retinoschisis; síndrome de Rett; síndrome de Rh(mod); síndrome de predisposición Rabdoide; tumores rabdoide; rhabdomyosarcoma; rhabdomyosarcoma (alveolar); Rhizomelic chondrodysplasia punctata; 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; esquizocéfalo; esquizofrenia (crónica); Schwannoma (esporádico); SCID (recesivo autosómico, tipo T negativo/Bpositivo); w/TMD de vía secretora; SED congénita; 60 síndrome de Segawa; defecto de células T selectivo; SEMD (tipo Pakistán); SEMD (tipo Strudwick); displasia esptoóptica; 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 (ligada a X); inmunodeficiencia combinada severa debida a deficiencia en ADA; inversión de sexo (XY, coninsuficiencia 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 falciformes; síndrome de Simpson-Golabi-Behmel; Situs ambiguus; síndrome de Sjogren-Larsson; síndrome de Smith-Fineman-Myers; síndrome de Smith-Lemli-Optiz (tipo I o tipo II); smatofrinoma; distrofia de fondo de sorsby; paraplejía espástica; esferocitosis; esferocitosis-1; esferocitosis-2; atrofia muscular espinal y bulbar de Kennedy; atrofia muscular espinal; ataxia espino cerebelar; disostosis espondilocostal; displasia tardía espondiloepifisea; displasia espondilometafisea; (tipo Japonés); enfermedad de Stargardt-1; esteatocistoma múltiple; síndrome de Stickler; síndrome de Sturge-Weber; heteropía laminar subcortical; heteropía laminar subcortical; deficiencia de semialdehído de hidrogenasa succínica; intolerancia a sacarosa; síndrome de Sutherland-Haan; elevación de cloruro en sudor sin 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 leporo Hb; displasia tanatofórica (tipos 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 defecto de trombosmodulina; adenoma de tiroides; resistencia a hormona tiroides; deficiencia de yodo peroxidasa en tiroides; síndrome de Tietz; metabolizador deficiente de tolbutamida; síndrome de Townes-Brocks; deficiencia de transcobalamina II; disostosis mandibulofacial de Treacher Collins; síndrome de condrodisplasia; síndrome de coriorinofalángio; tricodistrofia; deficiencia de proteína trifuncional (tipo I o tipo II); deficiencia de tripsinógeno; esclerosis tuberosa-1, esclerosis tuberosa-2; síndrome de Turcot; tirosina fosfatasa; tirosinemia; síndrome de Ulnar-mamario; urolitiás (2,8-dihidroxiadenina); síndrome de Usher (tipo 1 o tipo 2A); malformaciones venosas; taquicardia ventricular; virilización; defectos de coagulación dependientes de vitamina K; deficiencia de 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-Zweymüller; síndrome de Werner; disostosis acrodental de Weyers; nevus despigmentado; síndrome de Williams-Beuren; tumor de Wilms (tipo 1); enfermedad de Wilson; síndrome de Wiskott-Aldrich; síndrome de Wolcott-Rallison; síndrome de Wolfram; enfermedad de Wolman; xanturia (tipo I); xeroderma pigmentoso; X-SCID; síndrome de hipopigmentación de sordera-ceguera Yemenite; hipercalcemia ipocalciúrica (tipo I); síndrome de Zellweger y síndrome de Zlotogora-Ogur.
- Las enfermedades a tratar en el contexto de la presente invención igualmente incluyen enfermedades que tienen un antecedente genético heredado y que son causadas típicamente por un solo defecto genético y se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel, preferentemente seleccionadas del grupo consistente en enfermedades heredadas autosómicas-recesivas, por ejemplo deficiencia de adenosina desaminasa, hipercolesterolemia familiar, síndrome de Canavan, enfermedad de Gaucher, anemia de Fanconi, lipofuscinosis ceroides neuronal, mucopolisacaridosis (fibrosis quística), anemia de células falciformes, fenilcetonuria, alcaptonuria, albinismo, hipotirose, galactosemia, deficiencia de alfa-1-antitripsina, xeroderma pigmentoso, síndrome de Ribbing, mucopolisacaridosis, labio leporino, paladar hendido, síndrome de Laurence Moon Biedl Bardet, síndrome de polidactilia de costilla corta, cretinismo, síndrome de Joubert, progeria tipo II, braquidactilia, síndrome adrenogenital y enfermedades heredadas por cromosoma X, tales como, por ejemplo, ceguera de color, por ejemplo, ceguera a rojo/verde, síndrome X frágil, distrofia muscular (tipo Duchenney Becker-Kiener), hemofilia A y B, deficiencia de G6PD, enfermedad de Fabry, mucopolisacaridosis, síndrome de Norrie, retinitis pigmentosa, granulomatosis séptica, X-SCID, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, síndrome de Lesch-Nyhan, o de enfermedades heredadas dominantes autosómicas, tales como, por ejemplo, angioedema hereditario, síndrome de Marfan, neurofibromatosis, progeria tipo I, osteogénesis imperfecta, síndrome de Klippel-Trenaunay, síndrome de Sturge-Weber, síndrome de Hippel-Lindau y esclerosis por tuberosis.
- La presente invención también permite el tratamiento de enfermedades que no han sido heredadas o que podrían no ser resumidas bajo las categorías anteriores. Estas enfermedades pueden incluir, por ejemplo, el tratamiento en pacientes que requieran de un factor de proteína específico, por ejemplo, una proteína terapéuticamente efectiva específica como la mencionada arriba. Esto puede, por ejemplo, incluir pacientes de diálisis, por ejemplo, pacientes que sufran una diálisis renal (regular), y que puedan estar en necesidad de proteínas terapéuticamente activas específicas como las definidas aquí, por ejemplo, eritropoyetina (EPO), etc.
- Igualmente, las enfermedades en el contexto de la presente invención pueden incluir enfermedades cardiovasculares seleccionadas de, sin limitarse a, enfermedad cardíaca coronaria, arteriosclerosis, apoplejía e hipertensión, etc.

Finalmente, las enfermedades en el contexto de la presente invención se pueden seleccionar de enfermedades neuronales incluyendo por ejemplo enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, distonía, epilepsia, esclerosis múltiple y mal de Parkinson, etc.

5 De acuerdo con otra realización, la presente invención está dirigida a segundo uso médico del complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí, esto es del complejo de carga portador polimérico de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades como las definidas aquí por medio de terapia génica.

10 En una realización preferente más, el complejo de carga portador polimérico de la invención puede emplearse para la preparación de una composición farmacéutica, un agente inmunoestimulador, un adyuvante o una vacuna.

La composición farmacéutica de la invención, el agente inmunoestimulador, adyuvante o la vacuna pueden además usarse para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno como el definido aquí.

15 De acuerdo con una realización final, la presente invención también proporciona kits, particularmente kits de partes, que comprenden como componentes solos o en combinación con ingredientes adicionales al menos un complejo de carga portador polimérico de la invención como se define aquí, al menos una composición farmacéutica, un agente inmunoestimulador, un adyuvante o una vacuna que comprende los mismos y/o kits que comprenden los mismos, y opcionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosis de la molécula portadora polimérica, el ácido nucleico, el complejo o portador polimérico de la invención y/o la composición farmacéutica de la invención. Estos kits, de preferencia kits de partes, pueden ser aplicados, por ejemplo, para cualquiera de las aplicaciones o usos mencionados arriba. Estos kits, cuando se presentan como un kit de partes, pueden contener además cada componente de la composición farmacéutica de la invención, agente inmunoestimulador, adyuvante o vacuna en una parte diferente del kit.

20 En la presente invención, si no se indica lo contrario, las diferentes características de alternativas y realizaciones pueden combinarse unas con otras cuando sea adecuado. Además, el término "que comprende" no se deberá considerar como significando "que consiste en", si no se menciona específicamente. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, el término "que comprende" puede sustituirse con el término "que consiste en", cuando sea adecuado.

Breve descripción de las figuras

30 Las siguientes figuras intentan ilustrar más la invención. No se intenta que limiten la materia de la invención a las mismas.

Figura 1: muestra la expresión de luciferasa en células HepG2 después de transfección con complejos de carga portadores poliméricos que comprenden 5 µg de ARNm que codifica para luciferasa (R1180). CR12 C/R1180 indica el complejo de carga portador polimérico de la invención formado por el péptido catiónico entrelazado por disulfuro CR12 C (Cys-Arg12 -Cys) y el ARNm R1180 como carga de ácido nucleico. R12 /R1180 indica un complejo de carga portador no inventivo formado por el péptido catiónico no polimerizado R12 (Arg12) y el ARNm R1180 como carga de ácido nucleico para efectos de comparación. Los complejos contienen péptido catiónico y ácido nucleico en una relación en masa 1:2 (p/p) o 2:1 (p/p) como se indica. R1180 representa células que fueron transfectadas con ARN no complejado.

35

40 Tampón representa el control negativo para células no transfectadas. Después de 24 horas se cuantificó el nivel de luciferasa en los lisados por medición por quimioluminiscencia de oxidación de luciferina. Los puntos de datos indican réplicas biológicas individuales. Los resultados muestran primero que los complejos de carga portadores poliméricos de la invención (CR 12 C/R1180) inducen niveles más altos de expresión de luciferasa que los complejos de carga portadores no inventivos (R12 /R1180) con el péptido R12 no polimerizado.

45 Y en segundo lugar se podría mostrar que relaciones N/P de más de 1 son adecuadas para transfección *in vitro*.

Figura 2: muestra la expresión de luciferasa (*in vitro*) en células HepG2 y en células B16F10 después de transfección con complejos de carga portadores poliméricos que comprenden 5 µg de ARNm que codifica para luciferasa (R1180). CR12C/R1180 indica el complejo de carga portador polimérico de la invención formado por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 C (Cys-Arg12 -Cys) y el ARNm R1180 como carga de ácido nucleico. R12 /R1180 indica un complejo de carga portador no inventivo formado por el péptido catiónico no polimerizado R12 (Arg12) y el ARNm R1180 como carga de ácido nucleico para efectos de comparación. CR9 C/R1180 indica el complejo de carga portador polimérico de la invención formado por el péptido catiónico polimerizado CR9 C (Cys-Arg9 -Cys) y el ARNm R1180 como carga de ácido nucleico. Los complejos contienen un péptido catiónico y ácido nucleico en una relación másica 2:1 (p/p). R1180 representa células que fueron transfectadas con ARN no complejado. Tampón representa el control negativo para células no transfectadas. Después de 24 horas se cuantificó el nivel de luciferasa en los lisados por medición de

50

55

quimioluminiscencia de oxidación de luciferina. Los puntos de datos indican réplicas biológicas individuales. Los resultados muestran que los complejos de carga portadores poliméricos de la invención (CR12C/R1180 y CR9/CR1180) inducen niveles más altos de expresión de luciferasa que los complejos de carga portadores no de la invención (R12 /R1180 y R9 / 1180) con los péptidos no polimerizados R9 y R12.

5 Figura 3: muestra la expresión *in vivo* de luciferasa después de inyección intradérmica en ratones BALB/c hembra de 5 µg de ARNm que codifica para luciferasa (R1180). CR12 C/R1180 Indica el complejo de carga portador polimérico de la invención formado por el péptido catiónico entrelazado por disulfuro CR12C (Cys-Arg12-Cys) y el ARNm R1180 como carga de ácido nucleico. R12/R1180 Indica un complejo de carga portador no inventivo formado por el péptido catiónico no polimerizado R12 (Arg12) y el ARNm R1180 como carga de ácido nucleico para efectos de comparación. CR9C/R1180 Indica el complejo de carga portador polimérico de la invención formado por el péptido catiónico polimerizado CR9C (Cys-Arg9-Cys) y el ARNm R1180 como carga de ácido nucleico. Los complejos contienen un péptido catiónico y ácido nucleico en una relación 2:1 (p/p) como se indica. Después de 24 horas el nivel de luciferasa se cuantificó en los lisados de tejido por un ensayo de quimioluminiscencia. Los resultados muestran primero que nada que los complejos de carga portadores poliméricos de la invención (CR12 C/R1180) inducen niveles más altos de expresión de luciferasa que los complejos de carga portadores no inventivos (R12 /R1180) con el péptido R12 no polimerizado (de hecho no pudo detectarse expresión de luciferasa en la muestra con el péptido no polimerizado R12). Y en segundo lugar se podría mostrar que relaciones N/P de más de 1 son adecuadas para transfección *in vitro*.

20 Figura 4: muestra la curva de correlación en bruto para los complejos de carga poliméricos portadores de la invención formados por los péptidos catiónicos reticulados por disulfuro CR12C y CR7C como portador para liofilización en comparación con los complejos no de la invención con péptidos catiónicos no polimerizados como portadores (R12 y R7) mediante dispersión de luz dinámica usando Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, RU). Los diámetros hidrodinámicos fueron medidos con complejos recién preparados y con complejos reconstituidos después de liofilización. La relación másica péptido:ARN era 1:2. Como resultado se puede mostrar que los complejos de carga portadores poliméricos de la invención que comprenden péptidos que contienen cisteína como componentes catiónicos que llevan a una polimerización del portador polimérico por enlaces disulfuro no cambian en tamaño en contraste por los complejos formados por péptidos no polimerizados con incremento en tamaño y por lo tanto no son estables durante la etapa de liofilización. Por tanto, los complejos con péptidos polimerizados como portadores poliméricos muestran propiedades adecuadas para la liofilización.

35 Figura 5: muestra el potencial Zeta de complejos de carga portadores poliméricos de la invención formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12C y R722 como carga de ácido nucleico a diferentes relaciones p/p de acuerdo con la invención. Como se puede ver, el potencial zeta cambia de positivo a negativo cuando la relación p/p cambia de exceso de péptido a una relación 1: 1 (péptido/ ARN).

40 Figura 6A: muestra la secreción de citoquina hIFNα (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico entrelazado por disulfuro CR12 C y el CpG 2216 como carga de ácido nucleico en una relación en masa 1:2,5 (p/p C/ CpG 2216) de acuerdo con la invención. Como puede verse, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención llevaron a un incremento de liberación de citoquina hIFNα en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

45 Figura 6B: muestra la secreción de citoquina hTNFα (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 C y el CpG 2216 como carga de ácido nucleico en una relación en masa 1:2,5 (p/p) (CR12 C/CpG 2216) de acuerdo con la invención. Como se puede ver, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención no llevaron a un incremento en liberación de citoquina hTNFα en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

50 Figura 7A: muestra la secreción de citoquina hIFNα (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 y el ARNm R491 que codifica para luciferasa como carga de ácido nucleico en una relación en masa 1:2 (p/p) (CR12 C/R491) de acuerdo con la invención. Como se puede ver, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención llevaron a un incremento en la liberación de citoquina hIFNα en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

55 Figura 7B: muestra la secreción de citoquina hTNFα (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico entrelazado por disulfuro CR12 y el ARNm R491 que codifica para luciferasa como carga de ácido nucleico en una relación en masa 1:2 (p/p) (CR12 C/R491) de acuerdo con la invención. Como puede verse, los complejos de carga portadores

poliméricos de la invención llevaron a un incremento de liberación decitoquina hTNFa en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

5 Figura 8A: muestra la secreción de lactoquina hIFNa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 C y un oligonucleótido de ARN rico en GU corto (rico en GU corto) como carga de ácido nucleico en una relación en masa 1:2,5 (p/p)(CR12 C/rico en GU corto) de acuerdo con la invención. Como puede verse, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención llevaron a un incremento en la liberación decitoquinas hIFNa en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

10 Figura 8B: muestra la secreción decitoquina hTNFa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 C y un oligonucleótido de ARN rico en GU corto (rico en GU corto) como carga de ácido nucleico en una relación en masa 1:2,5 (p/p)(CR12 C/rico en GU corto) de acuerdo con la invención. Como puede verse, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención llevaron a un incremento de liberación decitoquina hTNFa en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

20 Figura 9A: muestra la secreción decitoquina hIFNa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR7 C y el ARN si R722 rico en GU de no codificación largo como carga de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Como puede verse, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención (CR7 C/R722) llevaron a un incremento de liberación decitoquina hIFNa en hPBMCs en comparación con complejos de carga portadores no de la invención (R7/R722) formados por el péptido no polimerizado R7.

25 Figura 9B: muestra la secreción decitoquina hTNFa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR7 C y el ARN si R722 rico en GU de no codificación largo como carga de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Como puede verse, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención (CR7 C/R722) sólo llevaron a un incremento débil de liberación decitoquina hTNFa en hPBMCs en comparación con complejos de carga portadores no de la invención (R7 / R722) formados por el péptido no polimerizado R7.

35 Figura 10A: muestra la secreción decitoquina hIFNa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR9 C y el ARN si R722 rico en GU de no codificación largo como carga de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Como se puede ver, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención (CR9 C/R722) llevaron a un incremento de la liberación decitoquina hIFNa en hPBMCs en comparación con complejos de carga portadores no inventivos (R9/R722) formados por el péptido no polimerizado R9.

40 Figura 10B: muestra la secreción decitoquina hTNFa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR9 C y el ARN si R722 rico en GU de no codificación largo como carga de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Como puede verse, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención (R9 C/R722) no llevan a un incremento de la liberación decitoquina hTNFa en hPBMCs en comparación con los complejos de carga portadores no de la invención (R9 / R722) formados por el péptido no polimerizado R9.

45 Figura 11A: muestra la secreción decitoquina hIFNa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 C y el ARN si R722 como carga de ácido nucleico a diferentes relaciones p/p de acuerdo con la invención. Como se puede ver, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención llevaron a un incremento en la liberación decitoquina hIFNa en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

50 Figura 11B: muestra la secreción decitoquina hIFNa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 C y el ARN si R722 como carga de ácido nucleico a diferentes relaciones p/p de acuerdo con la invención. Como se puede ver, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención llevaron a un incremento en la liberación decitoquina hIFNa en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

Figura 12A: muestra la secreción decitoquina hIFNa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CH6 R4 H6 C,

CH3 R4 H3 C y CHK 7 HC y el ARNsi R722 como carga de ácido nucleico a diferentes relaciones N/ P de acuerdo con la invención. Como se puede ver, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención llevaron a un incremento en la liberación de citoquina hIFNa en hPBMCs en comparación con la carga de ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo.

5 Figura 12B: muestra la secreción de citoquina hIFNa (*in vitro*) en hPBMCs después de estimulación con complejos de carga portadores poliméricos formados por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CH6 R4 H6 C, CH3 R4 H3 C y CHK 7 HC y el ARNsi R722 como carga de ácido nucleico a diferentes relaciones N/ P de acuerdo con la invención. Como se puede ver, los complejos de carga portadores poliméricos de la invención llevaron a un incremento en la liberación de citoquina hIFNa en hPBMCs en comparación con la carga de
10 ácido nucleico sola o el péptido catiónico solo. Particularmente, complejos de carga poliméricos de la invención con una relación N/ P más grande o igual que 1 resultan en secreción de TNF alfa.

Figura 13: muestra el efecto (*in vivo*) de la adición del complejo de carga portador polimérico de la invención formado por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 como portador y el ARNsi R722 como carga de ácido nucleico a la vacuna de proteína ovalbúmina (proteína OVA) para usarse como un adyuvante en experimentos de reto de tumor. Como se puede ver, el complejo de carga portador polimérico de la invención desacelera extremadamente el crecimiento del tumor en comparación con la vacuna de proteína sola, que no tiene efecto en el crecimiento de tumor en comparación con el control de regulador de
15 20 pH.

Figura 14: muestra el efecto (*in vivo*) de la adición del complejo de carga portador polimérico de la invención formado por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 como portador y el ARNsi R722 como carga de ácido nucleico a la vacuna de proteína ovalbúmina (proteína OVA) para usarse como un adyuvante en la inducción de anticuerpos IgG2a específicos de ovalbúmina. Como se puede ver, el complejo de carga portador polimérico de la invención incrementa fuertemente la respuesta de células B, lo cual prueba las propiedades adyuvantes benéficas de los complejos de carga portadores poliméricos de la invención, particularmente con respecto a la inducción de una respuesta inmune desplazada por Th1.
25

Figura 15: muestra el efecto (*in vivo*) de la adición del complejo de carga portador polimérico de la invención formado por el péptido catiónico reticulado por disulfuro CR12 como portador y el ARNsi R722 como carga de ácido nucleico a la vacuna de proteína ovalbúmina (proteína OVA) o la vacuna de péptido específico de ovalbúmina SIINFEKL para usarse como un adyuvante en la inducción de células T citotóxicas específicas de ovalbúmina. Como se puede ver, el complejo de carga portador polimérico de la invención incrementa fuertemente la inducción de células T citotóxicas específicas de ovalbúmina, lo cual prueba las propiedades adyuvantes benéficas de los complejos de carga portadores poliméricos de la invención, particularmente con respecto a la inducción de una respuesta inmune desplazada por Th1.
30 35

Ejemplos

Los siguientes ejemplos intentan ilustrar más la invención. No se intenta que limiten la materia de la invención a los mismos.

40 1. **Reactivos:**

Péptidos catiónicos como componente catiónico:

R₇ : Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg (Arg₇)

CR₇C: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (CysArg₇Cys)

R₉: Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg (Arg₉)

R₁₂: Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg (Arg₁₂)

CR₉C: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys (Cys-Arg₉-Cys)

CR₁₂C: Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg (Cys-Arg₁₂-Cys)

Ácidos nucleicos como carga:

45 R1180: ARNm que codifica para luciferasa (SEQ ID NO: 384)
R722: ARN rico en isGU de no codificación largo (SEQ ID NO: 385)
R491: ARNm que codifica para luciferasa (SEQ ID NO: 386)

CpG 2216: oligonucleótido CpG (SEQ ID NO: 387)
 Rico en GU corto: oligonucleótido de ARN rico en GU (SEQ ID NO: 369).

2. *Preparación de secuencias de ácido nucleico:*

5 Para los presentes ejemplos se prepararon secuencias de ácido nucleico como se indicó en el ejemplo 1 y se usaron para la formación de los complejos de carga portadores poliméricos polimerizados de la invención o para complejos de carga portadores no polimerizados para comparación. Estos complejos de carga portadores poliméricos se usaron para transacción *in vitro* e *in vivo*, para inmunestimulación *in vitro* y para caracterizaciones de partículas.

10 De acuerdo con una primera preparación, se prepararon las secuencias de ADN que codifican para las secuencias de ADN R1180, R722 y R491. Las secuencias de las moléculas de ARN correspondientes se muestran en el listado de secuencias (SEQ ID NOS: 384, 385 y 386).

Las secuencias ricas en GU cortas y los oligonucleótidos CpG 2216 se prepararon mediante síntesis en fase sólida automática mediante química de fosforamida. Las secuencias se muestran en el listado de secuencias (SEQ ID NOS: 387 y 369).

15 2. *Transcripción in vitro:*

Los plásmidos de ADN respectivos preparados de acuerdo con el ejemplo 2 para R1180, R722 y R91 fueron transcritos *in vitro* usando T7-polimerasa (T7-OptiARN kit, CureVac, Tübingen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente el ARN se purificó usando Pure Messenger® (CureVac, Tübingen, Alemania).

20 3. *Síntesis de complejos de carga portadores poliméricos*

25 Las secuencias de ácido nucleico definidas arriba en el ejemplo 1 se mezclaron con los componentes catiónicos como los definidos en el ejemplo 1. Por tanto, la cantidad indicada de secuencia de ácido nucleico se mezcló con el componente catiónico respectivo en relaciones de masa como se indican, formando así un complejo. Si se usaban componentes catiónicos de polimerización de acuerdo con la presente invención, la polimerización de los componentes catiónicos tuvo lugar simultáneamente la complejación de la carga de ácido nucleico. 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 diferentes relaciones componente catiónico/ácido nucleico usadas en los experimentos se muestran en la tabla 1.

30

Tabla 1

Muestra (péptido catiónico/ ácido nucleico)	Relación en masa	Relación N/P	Relación molar
CR12C/R1180	1:2	0.9	44:1
CR12C/R1180	2:1	3.6	185:1
R12/R1180	1:2	0.7	48:1
R12/R1180	2:1	2.5	146:1
CR9C/R1180	2:1	0.9	55:1
R9/R1180	2:1	1.1	65:1
CR7C	1:2	0.8	70:1
R7	1:2	1.0	85:1
CR12C/CpG	1:2,5	4.9	8:1
CR12C/R491	1:2	0.9	150:1
CR12C/rico en GU corto	1:2,5	4.9	8:1
CR12C/R722	5:1	9.6	444:1

CR12C/R722	4:1	7.6	355:1
CR12C/R722	3:1	5.7	266:1
CR12C/R722	2:1	3.8	177:1
CR12C/R722	1:1	1.9	88:1
CR12C/R722	1:2	0.9	44:1
CR12C/R722	1:3	0.6	29:1
CR12C/R722	1:4	0.5	22:1
CR12C/R722	1:5	0.4	17:1

Relación N/P = Es una medida de la carga iónica del componente catiónico del portador polimérico o del portador polimérico como tal. En caso de que las propiedades catiónicas del componente catiónico se proporcionen por átomos de nitrógeno, la relación N/P es la relación entre átomos de nitrógeno básicos y residuos fosfato, considerando que los átomos de nitrógeno confieren a cargas positivas y fosfato del esqueleto de fosfato del ácido nucleico confiere a la carga negativa. N/P se calcula de preferencia por la siguiente fórmula: $N/P = \text{pmol [ARN]}^* \text{relación}^* \text{catiónico AS}/\mu\text{g ARN}^*3^*1000$

Como ejemplo se aplicó el ARN R722 de acuerdo con SEQ ID NO: 385, con un peso molecular de 186 kDa. Por tanto 1 μg de ARN R722 confiere a 5,38 pmol de ARN.

4. Transfección de células HepG2 y B16F10:

Se prepararon complejos de carga portadores poliméricos que contenían 5 μg de ARN que codificaba para luciferasa (R1180) como se indica en el ejemplo 3. Células HepG2 o B16F10 (150×10^3 pocillo) fueron sembradas 1 día antes de la transfección en placas de microtitulación de 24 pocillos llevando a una confluencia del 70% cuando se llevó a cabo la transfección. Para la transfección, 50 μl de la solución de complejo de carga portador polimérico se mezclaron con 250 μl de medio libre de suero y se añadieron a las células (concentración final de ARN: 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Antes de la adición de la solución de transfección libre de suero las células fueron lavadas suavemente y cuidadosamente 2 veces con 1 ml de Optimen (Invitrogen) por pocillo. Luego, se añadió la solución de transfección (300 μl por pocillo) a las células y las células se incubaron durante 4 horas a 37°C. Posteriormente se añadieron 100 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 se lisaron en 300 μl de regulador de pH de lisis (25 mM de Tris-PO₄, 2 mM de EDTA, 10% de glicerol, 1% de Triton-X100, 2 mM de DTT). Los sobrenadantes fueron luego mezclados 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)).

5. Expresión de luciferasa in vivo:

Complejos de carga portadores poliméricos que contenían 5 μg de ARN que codificaba para luciferasa (R1180) fueron preparados como se indicó en el ejemplo 3. Posteriormente la solución resultante se ajustó con una solución de lactato de Ringer hasta un volumen final de 100 μl y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, produciendo una solución con una concentración de 0,1 g/l de complejos de carga portadores poliméricos. Se administraron intradérmicamente 100 μl de esta solución (en la espalda) de ratones BALB/c de 7 semanas de edad. Después de 24 horas los ratones fueron sacrificados y las muestras (piel de la espalda) fueron recuperadas, congeladas a -78°C y lisadas durante 3 minutos a velocidad completa en un lisador de tejido (Qiagen, Hilden, Alemania). Posteriormente se añadieron 600 μl de tampón de lisis y las soluciones resultantes se sometieron a otros 6 minutos a velocidad completa en el lisador de tejidos. Después de 10 minutos de centrifugación a 13.500 rpm a 4°C los sobrenadantes se mezclaron con regulador de pH de luciferina (25 mM de glicilglicina, 15 mM de MgSO₄, 5 mM de ATP,

62,5 µM de luciferina) y la luminiscencia se detectó usando un luminómetro (Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wilbbad, Alemania)).

6. *Estimulación de citoquinas en hPBMCs:*

5 Células hPBMCs de sangre periférica de donadores sanos se aislaron usando un gradiente Ficoll y se lavaron posteriormente con 1 (PBS (solución salina de tampón fosfato). Las células se sembraron después en placas de microtitulación de 96 pocillos (200x103/pocillo). Las células hPBMC fueron incubadas durante 24 horas con 10 µl del complejo de carga portador polimérico de la invención del ejemplo 3 que contenía la cantidad indicada de ácido nucleico en medio X-VIVO 15 Medium (BioWhittaker). El efecto inmunoestimulador se midió al detectar la producción de citoquinas de las hPBMCs (factor de necrosis tumoral alfa e interferón alfa). Por lo tanto, las placas de microtitulación de ELISA (NuncMaxisorb) se incubaron durante la noche (o/n) con tampón de unión (0.02% de Na₂N₃, 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). El sobrenadante celular se añadió y se incubó durante 4 horas a 37°C. Posteriormente la placa de microtitulación se lavó con 1xPBS, que contenía un 0,05% de Tween-20 y luego se incubó con un anticuerpo secundario marcado con biotina (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). Se añadió peroxidasa de rábano acoplada a estreptavidina a la placa. Luego, la placa se lavó de nuevo con 1xPBS, que contenía 0,05% de Tween-20 y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) fue añadido como un sustrato. La cantidad de citoquina se determinó midiendo la absorción a 405 nm (OD 405) usando una curva estándar de citoquinas recombinantes (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania) con el lector de ELISA Sunrise de Tecan (Crailsheim, Alemania).

7. *Mediciones de potencial zeta:*

15 El potencial zeta de los complejos de carga portadores poliméricos se evaluó por el método de electroforesis con láser Doppler usando un Zetasizer Nano (Malvern Instrument s, Malvern, RU). La medición se llevó a cabo a 25°C y se usó un ángulo de dispersión de 173°.

8. *Estabilidad de complejos después de liofilización:*

30 Los diámetros hidrodinámicos de los complejos de carga portadores poliméricos preparados arriba se midieron mediante dispersión de luz dinámica usando un Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, RU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mediciones se llevaron a cabo a 25°C en un tampón analizado por un método acumulativo para obtener los diámetros hidrodinámicos e índices de polidispersión de los complejos de carga portadores poliméricos. Los complejos de carga portadores poliméricos se formaron como se indicó en el ejemplo 3 y los diámetros hidrodinámicos se midieron con complejos recién preparados y con complejos reconstituidos después de liofilización.

9. *Experimentos de inmunización:*

35 Para la inmunización las vacunas proteína ovalbúmina (OVA) (5 µg) o péptido específico de ovalbúmina SIINFEKL (50 µg) se combinaron con los complejos de carga poliméricos de la invención R722/CR12C (a una relación 2:1 p/p) (30 µg R722/15 µg CR12C) como adyuvante y se inyectaron intradérmicamente en ratones C57BL/6 hembra (7 ratones por grupo para tumor y 5 ratones por grupo para detección de una respuesta inmune). La vacunación se repitió 2 veces en 2 semanas. Para comparación los ratones fueron inyectados sin los complejos de carga portadores poliméricos de la invención.

10. *Detección de una respuesta inmune específica de antígeno (respuesta inmune de células B):*

45 La detección de una respuesta inmune específica de antígenos (respuesta inmune de células B) se llevó a cabo detectando anticuerpos específicos de antígenos. Así, se tomaron muestras de sangre de ratones vacunados 5 días después de la última vacunación y se prepararon los sueros. Placas Maxi Sorb (Nalgene Nunc International) se recubrieron con proteína de ovalbúmina de Gallus gallus. Después de bloquear con 1xPBS que contenía 0,05% de Tween-20 y 1% de BSA, las placas se incubaron con suero de ratón diluido. Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario acoplado a biotina (anti-mouse-IgG2a Pharmingen). Después de lavar, la placa se incubó con peroxidasa de rábano-estreptavidina y posteriormente se midió la conversión del sustrato de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)).

11. *Detección de una respuesta inmune celular específica de antígeno por ELISPOT:*

5 días después de la última vacunación los ratones fueron sacrificados, los bazo se retiraron y los esplenocitos se aislaron. Para la detección de INF gamma, una placa de recubrimiento de varias pantallas (Millipore) se incubó durante la noche con tampón de recubrimiento (tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6, 10,59 g/l de Na₂CO₃,

8,4 g/l de NaHCO₃) que comprendía anticuerpo contraINF γ (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemania). Al día siguiente, se añadieron 1 x 10⁶ células/pocillo y se volvieron a estimular con 1 μ g/pocillo de péptido relevante (SIINFEKL de ovalbúmina); péptido irrelevante (conexina=péptido de control) o regulador de pH sin péptido. Posteriormente las células se incubaron durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente las placas se lavaron 3 veces con PBS, una vez con agua y una vez con PBS/0,05% de Tween-20 y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a biotina durante 1-24 horas a 4°C. Después las placas se lavaron con PBS/0,05% de Tween-20 y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con fosfatasa alcalina acoplada a estreptavidina en un tampón de bloqueo. Después de lavar con PBS/0,05% de Tween-20, el sustrato (sistema de sustrato líquido de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/azul de nitrotetrazolio de Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) se añadió a la placa y la conversión del sustrato pudo detectarse visualmente. La reacción se detuvo después de lavar las placas con agua. Las placas secas fueron luego leídas por un lector de placa ELISPOT. Para visualización de los niveles de puntos los números se corrigieron por sustracción de fondo.

15 12. *Ataque con tumor:*

Una semana después de la última vacunación 1x10⁶ células E.G7-OVA (células tumorales que expresan establemente ovalbúmina) se implantaron subcutáneamente en los ratones vacunados. El crecimiento de tumor se monitoreó midiendo el tamaño del tumor en 3 dimensiones usando un calibre.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CureVac GmbH
 BAUMHOF, Patrick
 VOSS, Söhnke
 5 KRAMPS, Thomas
 KALLEN, Kajo

<120> Formación de complejos de ácidos nucleicos con componentes catiónicosentrelazados por disulfuro para transfección e inmunostimulación

10 <130> CU01P094WO

<160> 387

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

20 <400> 1

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys
1 5

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 2

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

30 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 3

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

5 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 4

10 **Cys Arg Cys**
1 5 10

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 5

Cys Arg Cys
1 5 10

20 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 6

Cys Arg Cys
1 5 10

30 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial <220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

35 <400> 7

Cys Arg Cys
1 5 10 15

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys
 {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 8

Cys Arg Cys
1 5 10 15

10 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys
 {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 9

Cys Arg Arg
1 5 10 15

Cys

20 <210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys
 {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 10

Cys Arg Arg
1 5 10 15

Arg Cys

30 <210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys
 {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

35 <400> 11

Cys Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Cys

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys
{(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 12

Cys Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Cys
20

10

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys
{(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 13

Cys Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Cys
20

20 <210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia: péptido catiónico o policatiónico de la fórmula (Ib): Cys
{(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x} Cys

<400> 14

Cys Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Cys
20

<210> 15
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 15

Trp Tyr
1

10 <210> 16
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

15 <400> 16

Tyr Trp

1

20 <210> 17
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 17

Trp Trp
1

25 <210> 18
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 18

Tyr Tyr
1

35 <210> 19
<211> 3
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 19

5

Trp Tyr Trp
1

<210> 20

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 20

Tyr Trp Tyr
1

15

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

20

<400> 21

Trp Trp Trp
1

<210> 22

<211> 3

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 22

Tyr Tyr Tyr
1

30

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 23

Trp Tyr Trp Tyr
1

5 <210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 24

10 **Tyr Trp Tyr Trp**
1 <210> 25

<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

15 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 25

Trp Trp Trp Trp
1

20 <210> 26
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 26

25 **Phe Tyr**
1

<210> 27
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 27

Tyr Phe
1

35 <210> 28
<211> 2

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

5 <400> 28

Phe Phe
1

<210> 29
<211> 3
<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 29

Phe Tyr Phe
1

15 <210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 30

Tyr Phe Tyr
1

25 <210> 31
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 31

Phe Phe Phe
1

30

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 32

Phe Tyr Phe Tyr
1

5 <210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 33

10 **Tyr Phe Tyr Phe**
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 34

Phe Phe Phe Phe
1

20 <210> 35
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

25 <400> 35

Phe Trp
1

30 <210> 36
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 36

Trp Phe
1

35 <210> 37

<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 37

Phe Phe
1

<210> 38
<211> 3
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 38

Phe Trp Phe
1

15 <210> 39
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 39

Trp Phe Trp
1

25 <210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

30 <400> 40

Phe Trp Phe Trp
1

<210> 41
<211> 4
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 41

Trp Phe Trp Phe
1

<210> 42

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 42

Tyr Tyr Tyr Tyr
1

10

<210> 43

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 43

Cys Tyr Cys
1

20

<210> 44

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

25 <400> 44

Cys Trp Cys
1

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 45

Cys Trp Tyr Cys
1

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 46

Cys Tyr Trp Cys
1

10 <210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

15 <400> 47

Cys Trp Trp Cys
1

20 <210> 48
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 48

Cys Tyr Tyr Cys
1

25 <210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 49

Cys Trp Tyr Trp Cys
1 5

35 <210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 50

Cys Tyr Trp Tyr Cys
1 5

5 <210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

10 <400> 51

Cys Trp Trp Trp Cys
1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 52

Cys Tyr Tyr Tyr Cys
1 5

20 <210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 53

Cys Trp Tyr Trp Tyr Cys
1 5

30 <210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 54

35 Cys Tyr Trp Tyr Trp Cys
1 5

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 55

Cys Trp Trp Trp Trp Cys
1 5

10 <210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

15 <400> 56

Cys Tyr Tyr Tyr Tyr Cys
1 5

20 <210> 57
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 57

Cys Phe Cys
1

25 <210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 58

Cys Phe Tyr Cys
1

35 <210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 59

Cys Tyr Phe Cys
1

5 <210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

10 <400> 60

Cys Phe Phe Cys
1

15 <210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 61

Cys Tyr Tyr Cys
1

20 <210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 62

Cys Phe Tyr Phe Cys
1 5

30 <210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 63

35 Cys Tyr Phe Tyr Cys
1 5

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 64

Cys Phe Phe Phe Cys
1 5

10 <210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

15 <400> 65

Cys Tyr Tyr Tyr Cys
1 5

20 <210> 66
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 66

Cys Phe Tyr Phe Tyr Cys
1 5

25 <210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 67

Cys Tyr Phe Tyr Phe
1 5

35 <210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 68

Cys Phe Phe Phe Phe Cys
1 5

5 <210> 69
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 69

Cys Phe Trp Cys
1

15 <210> 70
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 70

Cys Trp Phe Cys
1

20 <210> 71
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 71

Cys Phe Phe Cys
1

30 <210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

35 <400> 72

Cys Phe Trp Phe Cys
1 5

- <210> 73
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 73

Cys Trp Phe Trp Cys
1 5

- 10 <210> 74
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

- 15 <223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 74

Cys Phe Trp Phe Trp Cys
1 5

- 20 <210> 75
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) aromático ejemplar

<400> 75

Cys Trp Phe Trp Phe Cys
1 5

- 25 <210> 76
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 76

Ser Thr
1

- 35 <210> 77
<211> 2

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

5 <400> 77

Thr Ser
1

<210> 78
<211> 2
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 78

Ser Ser
1

15 <210> 79
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 79

Thr Thr
1

<210> 80
<211> 3
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 80

Ser Thr Ser
1

30 <210> 81
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial <220>

35 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 81

Thr Ser Thr
1

5 <210> 82
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 82

Ser Ser Ser
1

10 <210> 83
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 83

Thr Thr Thr
1

20 <210> 84
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 84

Ser Thr Ser Thr
1

25 <210> 85
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 85

Thr Ser Thr Ser
1

35 <210> 86
<211> 4

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

5 <400> 86

Ser Ser Ser Ser
1

<210> 87
<211> 4
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 87

Thr Thr Thr Thr
1

15 <210> 88
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 88

Gln Asn
1

<210> 89
<211> 2
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 89

Asn Gln
1

30 <210> 90
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 90

Gln Gln
1

5 <210> 91
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 91

Asn Asn
1

10

<210> 92
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 92

Gln Asn Gln
1

20 <210> 93
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

25 <400> 93

Asn Gln Asn
1

30 <210> 94
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 94

Gln Gln Gln
1

<210> 95
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 95

Asn Asn Asn
1

10 <210> 96
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

15 <400> 96

Gln Asn Gln Asn
1

20 <210> 97
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 97

Asn Gln Asn Gln
1

25 <210> 98
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 98

Gln Gln Gln Gln
1

35 <210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 558 106 T3

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 99

Asn Asn Asn Asn
1

5 <210> 100
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

10 <400> 100

Ser Asn
1

15 <210> 101
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 101

Asn Ser
1

20 <210> 102
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 102

Ser Ser
1

30 <210> 103
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 103

35 **Asn Asn**
1

<210> 104
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 104

Ser Asn Ser
1

10 <210> 105
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

15 <400> 105

Asn Ser Asn
1

20 <210> 106
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 106

Ser Ser Ser
1

25 <210> 107
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 107

Asn Asn Asn
1

35 <210> 108
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 108

Ser Asn Ser Asn
1

5 <210> 109
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 109

10 **Asn Ser Asn Ser**
1

<210> 110
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 110

Ser Ser Ser Ser
1

20 <210> 111
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

25 <400> 111

Asn Asn Asn Asn
1

30 <210> 112
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 112

Cys Thr Cys
1

ES 2 558 106 T3

<210> 113
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 113

Cys Ser Cys
1

10 <210> 114
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

15 <400> 114

Cys Ser Thr Cys
1

20 <210> 115
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 115

Cys Thr Ser Cys
1

25 <210> 116
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 116

Cys Ser Ser Cys
1

35 <210> 117
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 558 106 T3

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 117

Cys Thr Thr Cys
1

5 <210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

10 <400> 118

Cys Ser Thr Ser Cys
1 5

15 <210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 119

Cys Thr Ser Thr Cys
1 5

20 <210> 120
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 120

Cys Ser Ser Ser Cys
1 5

30 <210> 121
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 121

Cys Thr Thr Thr Cys
1 5

- 5 <210> 122
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 122

Cys Ser Thr Ser Thr Cys
1 5

- 10 <210> 123
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 123

Cys Thr Ser Thr Ser Cys
1 5

- 20 <210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 124

Cys Ser Ser Ser Ser Cys
1 5

- 25 <210> 125
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 125

Cys Thr Thr Thr Thr Cys
1 5

- 35 <210> 126
<211> 3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

5 <400> 126

Cys Asn Cys
1

<210> 127
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 127

Gln Cys Gln
1

<210> 128
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>

20 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 128

Cys Gln Asn Cys
1

<210> 129
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 129

Cys Asn Gln Cys
1

<210> 130
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30

<220>

35

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 130

Cys Gln Gln Cys
1

5 <210> 131
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 131

10 **Cys Asn Asn Cys**
1

<210> 132
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 132

Cys Gln Asn Gln Cys
1 5

20 <210> 133
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

25 <400> 133

Cys Asn Gln Asn Cys
1 5

30 <210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 134

Cys Gln Gln Gln Cys
1 5

ES 2 558 106 T3

<210> 135
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 135

Cys Asn Asn Asn Cys
1 5

10 <210> 136
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

15 <400> 136

Cys Gln Asn Gln Asn Cys
1 5

20 <210> 137
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 137

Cys Asn Gln Asn Gln Cys
1 5

25 <210> 138
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 138

Cys Gln Gln Gln Gln Cys
1 5

35 <210> 139
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 558 106 T3

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 139

Cys Asn Asn Asn Asn Cys
1 5

5 <210> 140
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 140

Cys Asn Cys
1

15 <210> 141
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 141

Cys Ser Cys
1

20 <210> 142
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 142

Cys Ser Asn Cys
1

30 <210> 143
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

35 <400> 143

Cys Asn Ser Cys
1

5 <210> 144
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 144

Cys Ser Ser Cys
1

10 <210> 145
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 145

Cys Asn Asn Cys
1

20 <210> 146
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 146

Cys Ser Asn Ser Cys
1 5

25 <210> 147
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 147

Cys Asn Ser Asn Cys
1 5

35 <210> 148
<211> 5

ES 2 558 106 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

5 <400> 148

Cys Ser Ser Ser Cys
1 5

<210> 149
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 149

Cys Asn Asn Asn Cys
1 5

15 <210> 150
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 150

Cys Ser Asn Ser Asn Cys
1 5

25 <210> 151
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polarno cargado) ejemplar

<400> 151

Cys Asn Ser Asn Ser Cys
1 5

30 <210> 152
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 152

Cys Ser Ser Ser Ser Cys
1 5

5 <210> 153
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) hidrófilo (y de preferencia polar no cargado) ejemplar

<400> 153

10 **Cys Asn Asn Asn Asn Cys**
1 5

<210> 154
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 154

Leu val
1

20 <210> 155
<211> 1
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

25 <400> 155

Leu
1

30 <210> 156
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 156

Leu Leu
1

35 <210> 157

<211> 0
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 157

000

<210> 158

<211> 3

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 158

Leu Val Leu
1

15

<210> 159

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 159

Val Leu Val
1

25 <210> 160

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

30 <400> 160

Leu Leu Leu
1

<210> 161

<211> 3

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 161

Val Val Val
1

<210> 162
<211> 4
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 162

10 **Leu Val Leu Val**
1

<210> 163
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 163

Val Leu Val Leu
1

20 <210> 164
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

25 <400> 164

Leu Leu Leu Leu
1

30 <210> 165
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 165

Val Val Val Val
1

<210> 166
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 166

Ile Ala
1

10 <210> 167
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

15 <400> 167

Ala Ile
1

20 <210> 168
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 168

Ile Ile
1

25 <210> 169
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 169

Ala Ala
1

35 <210> 170
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 170

Ile Ala Ile
1

5 <210> 171
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

10 <400> 171

Ala Ile Ala
1

<210> 172
<211> 3
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 172

Ile Ile Ile
1

20 <210> 173
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 173

Ala Ala Ala
1

<210> 174
<211> 4
30 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 174

35 **Ile Ala Ile Ala**
1

<210> 175
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 175

Ala Ile Ala Ile
1

10 <210> 176
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

15 <400> 176

Ile Ile Ile Ile
1

20 <210> 177
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 177

Ala Ala Ala Ala
1

25 <210> 178
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 178

Met Ala
1

35 <210> 179
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 179

Ala Met
1

5 <210> 180
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

10 <400> 180

Met Met
1

<210> 181
<211> 2
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 181

Ala Ala
1

20 <210> 182
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 182

Met Ala Met
1

<210> 183
<211> 3
30 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 183

Ala Met Ala
1

- 5 <210> 184
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 184

Met Met Met
1

- 10 <210> 185
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 185

Ala Ala Ala
1

- 20 <210> 186
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 186

Met Ala Met Ala
1

- 25 <210> 187
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 187

Ala Met Ala Met
1

- 35 <210> 188
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 188

Met Met Met Met
1

5 <210> 189
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 189

Cys Val Cys
1

15 <210> 190
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 190

Cys Leu Cys
1

20 <210> 191
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 191

Cys Leu Val Cys
1

30 <210> 192
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

35 <400> 192

Cys Val Leu Cys
1

- <210> 193
<211> 4
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 193

Cys Leu Leu Cys
1

- 10 <210> 194
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

- 15 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 194

cys val val cys
1

- 20 <210> 195
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 195

Cys Leu Val Leu Cys
1 5

- 25 <210> 196
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

- 30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 196

Cys Val Leu Val Cys
1 5

- 35 <210> 197
<211> 5
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 197

5

Cys Leu Leu Leu Cys
1 5

<210> 198

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 198

cys val val val cys

1

5

15

<210> 199

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

20

<400> 199

Cys Leu Val Leu Val Cys
1 5

<210> 200

<211> 6

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 200

Cys val Leu val Leu Cys
1 5

30

<210> 201

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 201

Cys Leu Leu Leu Leu Cys
1 5

5 <210> 202

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 202

Cys Val Val Val Val Cys
1 5

<210> 203

<211> 3

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 203

Cys Ala Cys
1

20

<210> 204

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 204

Cys Ile Cys
1

30 <210> 205

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

35 <400> 205

Cys Ile Ala Cys
1

- <210> 206
<211> 4
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 206

Cys Ala Ile Cys
1

- 10 <210> 207
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

- 15 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 207

Cys Ile Ile Cys
1

- 20 <210> 208
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 208

Cys Ala Ala Cys
1

- 25 <210> 209
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 209

Cys Ile Ala Ile Cys
1 5

- 35 <210> 210
<211> 5
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 210

5

Cys Ala Ile Ala Cys
1 5

<210> 211

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 211

Cys Ile Ile Ile Cys
1 5

<210> 212

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

20

<400> 212

Cys Ala Ala Ala Cys
1 5

<210> 213

<211> 6

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 213

Cys Ile Ala Ile Ala Cys
1 5

30

<210> 214

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 214

Cys Ala Ile Ala Ile Cys
1 5

<210> 215
<211> 6
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 215

Cys Ile Ile Ile Ile Cys
1 5

10 <210> 216
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 216

Cys Ala Ala Ala Ala Cys
1 5

20 <210> 217
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 217

Cys Met Cys
1

25 <210> 218
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 218

Cys Met Ala Cys
1

35 <210> 219
<211> 4

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

5 <400> 219

Cys Ala Met Cys
1

<210> 220

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 220

Cys Met Met Cys
1

15 <210> 221

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 221

Cys Ala Ala Cys
1

<210> 222

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 222

Cys Met Ala Met Cys
1 5

30

<210> 223

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 223

Cys Ala Met Ala Cys
1 5

5 <210> 224
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 224

10 Cys Met Met Met Cys
1 5

<210> 225
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 225

Cys Ala Ala Ala Cys
1 5

20 <210> 226
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

25 <400> 226

Cys Met Ala Met Ala Cys
1 5

30 <210> 227
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 227

Cys Ala Met Ala Met Cys
1 5

<210> 228
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

<400> 228

Cys Met Met Met Met Cys
1 5

10 <210> 229
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) lipófilo ejemplar

15 <400> 229

Cys Ala Ala Ala Ala Cys
1 5

20 <210> 230
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 230

Asp His
1

25 <210> 231
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 231

His Asp
1

35 <210> 232
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 232

**Asp Asp
1**

5 <210> 233
<211> 2
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 233

10 **His His
1**

<210> 234
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 234

**Asp His Asp
1**

20 <210> 235
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

25 <400> 235

**His Asp His
1**

30 <210> 236
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 236

**Asp Asp Asp
1**

<210> 237
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 237

His His His
1

10 <210> 238
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

15 <400> 238

Asp His Asp His
1

20 <210> 239
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 239

His Asp His Asp
1

25 <210> 240
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 240

Asp Asp Asp Asp
1

35 <210> 241
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 241

His His His His
1

5 <210> 242
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

10 <400> 242

Cys His Cys
1

15 <210> 243
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 243

Cys Asp Cys
1

20 <210> 244
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 244

Cys Asp His Cys
1

30 <210> 245
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 245

Cys His Asp Cys
1

- 5 <210> 246
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 246

Cys Asp Asp Cys
1

- 10 <210> 247
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

15 <223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 247

Cys His His Cys
1

- 20 <210> 248
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 248

Cys Asp His Asp Cys
1 5

- 25 <210> 249
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 249

Cys His Asp His Cys
1 5

- 35 <210> 250
<211> 5
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 250

5

Cys Asp Asp Asp Cys
1 5

<210> 251

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 251

Cys His His His Cys
1 5

<210> 252

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

20

<400> 252

Cys Asp His Asp His Cys
1 5

<210> 253

<211> 6

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 253

Cys His Asp His Asp Cys
1 5

30

<210> 254

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 254

Cys Asp Asp Asp Asp Cys
1 5

5 <210> 255
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Componente aminoácido (AA) básico débil ejemplar

<400> 255

10 **Cys His His His His Cys**
1 5

<210> 256
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 256

Lys Asp Glu Leu
1

20 <210> 257
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 257

Asp Asp Glu Leu

1

30 <210> 258
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

35 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 258

Asp Glu Glu Leu
1

5 <210> 259
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señal de localización o señal de localización nuclear

10 <400> 259

Gln Glu Asp Leu
1

15 <210> 260
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señal de localización o señal de localización nuclear

<400> 260

Arg Asp Glu Leu
1

20 <210> 261
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señal de localización o señal de localización nuclear

<400> 261

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn
1 5

30 <210> 262
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señal de localización o señal de localización nuclear

<400> 262

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

5 <210> 263
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 263

Pro Gln Lys Lys Ile Lys Ser
1 5

10 <210> 264
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 264

Gln Pro Lys Lys Pro
1 5

20 <210> 265
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 265

Arg Lys Lys Arg
1

30 <210> 266
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 266

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln
1 5 10

5 <210> 267
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 267

Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln Arg
1 5 10 15

10 <210> 268
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 268

Met Pro Leu Thr Arg Arg Arg Pro Ala Ala Ser Gln Ala Leu Ala Pro
1 5 10 15

Pro Thr Pro

20 <210> 269
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 269

Gly Ala Ala Leu Thr Ile Leu Val
1 5

30 <210> 270
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 270

Gly Ala Ala Leu Thr Leu Leu Gly
1 5

5 <210> 271
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 271

10 **Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro**
1 5 10 15

<210> 272
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<220>

20 <221> característica_misc
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

25 <221> característica_misc
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 272

Met Leu Phe Asn Leu Arg Xaa Xaa Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg His
1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Xaa
20 25 30

30 <210> 273
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

35 <400> 273

Gly Cys Val Cys Ser Ser Asn Pro
1 5

<210> 274
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 274

Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu
 1 5

10 <210> 275
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 275

Gly Gln Glu Leu Ser Gln His Glu
 1 5

20 <210> 276
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 276

Gly Asn Ser Pro Ser Tyr Asn Pro
 1 5

30 <210> 277
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

35 <400> 277

Gly Val ser Gly ser Lys Gly Gln
 1 5

<210> 278
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

5 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear
 <400> 278

Gly Gln Thr Ile Thr Thr Pro Leu
1 5

10 <210> 279
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

15 <400> 279

Gly Gln Thr Leu Thr Thr Pro Leu
1 5

20 <210> 280
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 280

Gly Gln Ile Phe Ser Arg Ser Ala
1 5

25 <210> 281
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 281

Gly Gln Ile His Gly Leu Ser Pro
1 5

35 <210> 282
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 286

Gly Asn Ala Ala Ala Ala Lys Lys
1 5

5 <210> 287
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 287

Gly Asn Glu Ala Ser Tyr Pro Leu
1 5

15 <210> 288
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

20 <223> Descripción de secuencia: péptido de señal, secuencia o señalde localización o señal de localización nuclear

<400> 288

Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys
1 5

25 <210> 289
<211> 20
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 289

30 gguuuuuuuuuuuuuuggg 20

<210>290
<211>20
<212>
<213>ARN Artificial

35 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 290

ggggguuuuuuuuuuggggg 20

<210>291
<211>40
<212>ARN
<213>Artificial

5 <220>

<223>secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 291

ggggguuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuggggg 40

10 <210>292
<211>39
<212> ARN
<213>Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

15 <400> 292

gugugugugu guuuuuuuuu uuuuuuugug ugugugugu 39

20 <210> 293
<211> 39
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 293

gguugguuugg uuuuuuuuuu uuuuuuuggu ugguuugguu 39

25 <210> 294
<211> 20
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

30 <223>secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 294

gggggggggu uggggggggg 20

35 <210> 295
<211> 20
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 295

40 gggggggguu uggggggggg 20

<210> 296
<211> 20

<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

5 <400> 296

ggggggguuu uuuggggggg 20

<210> 297

<211> 20

<212> ARN

10 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 297

ggggggguuu uuuggggggg 20

15 <210> 298

<211> 20

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

20 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 298

ggggggguuu uuuggggggg 20

<210> 299

<211> 20

25 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 299

30 gggggguuuuu uuuggggggg 20

<210> 300

<211> 20

<212> ARN

<213> Artificial

35 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 300

ggggggguuuuu uuuggggggg 20

<210> 301

40 <211> 20

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 301

ggggguuuuu uuuuuuggg 20

5 <210> 302

<211> 20

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 302

ggggguuuuu uuuuuuggg 20

<210> 303

<211> 20

15 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 303

20 gggguuuuuu uuuuuuggg 20

<210> 304

<211> 20

<212> ARN

<213> Artificial

25 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 304

ggggguuuuuu uuuuuuugg 20

<210> 305

30 <211> 20

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

35 <400> 305

gguuuuuuuu uuuuuuugg 20

<210> 306

<211> 20

<212> ARN

40 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 306

guuuuuuuuuuuuuuuuuug 20

5 <210> 307
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 307

gggggggggg uuuggggggg gg 22

15 <210> 308
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 308

20 ggggggggggu uuuggggggg gg 22

<210> 309
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial

25 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 309

ggggggggguuuuuuuuggggggg gg 22

30 <210> 310
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

35 <400> 310

ggggggggguuuuuuuuggggggg gg 22

40 <210> 311
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
<400> 311
ggggggguuu uuuuuggggg gg 22
<210> 3120
5 <211> 22
<212> ARN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
10 <400> 312
ggggggguuu uuuuuugggg gg 22
<210> 313
<211> 22
<212> ARN
15 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
<400> 313
ggggggguuu uuuuuuuggg gg 22
20 <210> 314
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial
<220>
25 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
<400> 314
gggggguuuu uuuuuuuggg gg 22
<210> 315
<211> 22
30 <212> ARN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
<400> 315
35 gggggguuuu uuuuuuuugg gg 22
<210> 316
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial
40 <220>
<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 316

ggggguuuuuuuuuuuuuuuugg gg 22

<210> 317

<211> 22

5 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 317

10 ggggguuuuuuuuuuuuuuuuug gg 22

<210> 318

<211> 22

<212> ARN

<213> Artificial

15 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 318

ggguuuuuuuuuuuuuuuuuuuug gg 22

<210> 319

<211> 22

20 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

25 <400> 319

gguuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu gg 22

<210> 320

<211> 24

<212> ARN

30 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 320

gggggggggggg gsuuggggggg gggg 24

35 <210> 321

<211> 24

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

40 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 321

- ggggggggggg uuuugggggg gggg 24
- <210> 322
<211> 24
<212> ARN
5 <213> Artificial
- <220>
- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
- <400> 322
- gggggggggu uuuuuggggg gggg 24
- 10 <210> 323
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial
- <220>
- 15 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
- <400> 323
- gggggggggu uuuuuugggg gggg 24
- 20 <210> 324
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial
- <220>
- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
- <400> 324
- 25 gggggggguu uuuuuugggg gggg 24
- <210> 325
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial
- 30 <220>
- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
- <400> 325
- ggggggggguu uuuuuuuggg gggg 24
- 35 <210> 326
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial
- <220>
- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
- 40 <400> 326
- ggggggggguu uuuuuuuugg gggg 24

<210> 327
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial

5 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 327

ggggggguuu uuuuuuuugg gggg 24

10 <210> 328
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

15 <400> 328

ggggggguuu uuuuuuuug gggg 24

20 <210> 329
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 329

ggggggguuu uuuuuuuug gggg 24

25 <210> 330
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

30 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 330

ggggggguuu uuuuuuuuuu gggg 24

35 <210> 331
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 331

40 gggguuuuuu uuuuuuuuuu gggg 24

<210> 332
<211> 24

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 337

ggggguuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu 39

- 5 <210> 338
- <211> 41
- <212> ARN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 338

gggggguuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu g 41

- 15 <210> 339
- <211> 43
- <212> ARN
- <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 339

- 20 ggggggguuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu ggg 43

- <210> 340
- <211> 45
- <212> ARN
- <213> Artificial

- 25 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 340

gggggggguu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu ggggg 45

- 30 <210> 341
- <211> 47
- <212> ARN
- <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

- 35 <400> 341

gggggggggu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu ggggggg 47

- 40 <210> 342
- <211> 7
- <212> ARN
- <213> Artificial

<220>

- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
<400> 342
gguuugg 7
- 5 <210> 343
<211> 8
<212> ARN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
- 10 <400> 343
gguuuugg 8
<210> 344
<211> 9
<212> ARN
15 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
- <400> 344
gguuuuugg 9
- 20 <210> 345
<211> 10
<212> ARN
<213> Artificial
<220>
- 25 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
<400> 345
gguuuuuugg 10
<210> 346
<211> 11
30 <212> ARN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)
- <400> 346
35 gguuuuuuug g 11
<210> 347
<211> 12
<212> ARN
<213> Artificial
- 40 <220>
<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 347

gguuuuuuuu gg 12

<210> 348

<211> 13

5 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 348

10 gguuuuuuuu ugg 13

<210> 349

<211> 14

<212> ARN

<213> Artificial

15 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 349

gguuuuuuuu uugg 14

<210> 350

20 <211> 15

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

25 <400> 350

gguuuuuuuu uuugg 15

<210> 351

<211> 16

30 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 351

gguuuuuuuu uuuugg 16

35 <210> 352

<211> 17

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

40 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 352

gguuuuuuuu uuuuuugg 17

<210> 353

<211> 18

<212> ARN

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 353

gguuuuuuuu uuuuuugg 18

10 <210> 354

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

15 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 354

gguuuuuuuu uuuuuugg 19

<210>355

<211>9

20 <212>ARN

<213>Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 355

25 ggguuuggg 9

<210> 356

<211> 10

<212> ARN

<213> Artificial

30 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 356

ggguuuuggg 10

<210> 357

35 <211> 11

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

40 <400> 357

ggguuuuggg g 11

<210> 358
<211> 12
<212> ARN
<213> Artificial

5 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 358

ggguuuuuug gg 12

10 <210> 359
<211> 13
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

15 <400> 359

ggguuuuuuu ggg 13

20 <210> 360
<211> 14
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 360

ggguuuuuuu uggg 14

25 <210> 361
<211> 15
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

30 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 361

ggguuuuuuu uuuggg 15

35 <210> 362
<211> 16
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II)

<400> 362

40 ggguuuuuuu uuuggg 16

<210> 363
<211> 17

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (III)

<400> 368

ggguuugggu uuggguuugg guuuggguuu ggguuugggu uuggguuugg g 51

- 5 <210> 369
<211> 20
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

- 10 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (II) – Ricoen GU corto

<400> 369

gguuuuuuuu uuuuuuuggg 20

- 15 <210> 370
<211> 57
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (III)

<400> 370

- 20 cccuuuuuuu uuuuuuuucc cuuuuuuuuu uuuuuucccu uuuuuuuuuu uuuuucc 57

<210> 371
<211> 51
<212> ARN
<213> Artificial

- 25 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (III)

<400> 371

cccuuucccu uucccuuucc cuuuccuuu cccuuucccu uucccuuucc c 51

- 30 <210> 372
<211> 42
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (III)

- 35 <400> 372

cccuuuuuuu uuuuuuuucc cccuuuuuuu uuuuuuuuuc cc 42

- <210> 373
<211> 60
<212> ARN
40 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 558 106 T3

- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV)
 <400> 373
- uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60
- 5 <210> 374
 <211> 120
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV)
- 10 <400> 374
- uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuu uuuuuuuggg ugcguuccua gaaguacacg 60**
- aucgcuucga gaaccuggau ccaaaaaaaaa aaaaaaaccc acgcaaggau cuucaugugc 120**
- <210> 375
 <211> 229
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV)
- <400> 375
- gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcauauuc 60**
- agaguauugg cccccgugua gguuauucuu gacagacagu ggagcuuuuu cacucccagg 120**
- auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180**
- acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uauuagauc 229**
- 20 <210> 376
 <211> 547
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV)
- <400> 376

gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcatauucuc 60
 agaguauugg cccccgugua gguuauucuu gacagacagu ggagcuuauu cacucccagg 120
 auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180
 acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uauuagaucu cggauuacag 240
 cuggaaggag caggaguagu guucuugcuc uaaguaccga gugugcccaa uaccggauca 300
 gcuuauaac gaacggcucc uccucuuga cugcagcgua agugcggau cuggggauca 360
 aauuacugac ugccuggauu acccucggac auauaacuu guagcacgcu guugcuguau 420
 aggugaccaa cggccacucg aguagaccag cucucuugu ccggacaaug auaggaggcg 480
 cggucaaucu acuucuggcu aguuagaau aggcugcacc gaccucuaua aguagcgugu 540
 ccucuag 547

<210> 377

<211> 1083

<212> ARN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV)

<400> 377

gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcatauucuc 60
 agaguauugg cccccgugua gguuauucuu gacagacagu ggagcuuauu cacucccagg 120
 auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180
 acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uauuagaucu cggauuacag 240
 cuggaaggag caggaguagu guucuugcuc uaaguaccga gugugcccaa uaccggauca 300
 gcuuauaac gaacggcucc uccucuuga cugcagcgua agugcggau cuggggauca 360
 aauuacugac ugccuggauu acccucggac auauaacuu guagcacgcu guugcuguau 420
 aggugaccaa cggccacucg aguagaccag cucucuugu ccggacaaug auaggaggcg 480
 cggucaaucu acuucuggcu aguuagaau aggcugcacc gaccucuaua aguagcgugu 540
 ccucuagagc uacgcagguu cgcauuaaaa gcuugauua gugugcauag aacagaccuc 600
 uuauucggug aaacgccaga augcuauuu ccauaaacuc uucccaaac gcguacggcc 660
 gaagacgcg gcuuauucuu uguacguucu cgcacaugga agaaucagcg ggcauggugg 720
 uagggcaaua ggggagcugg guagcagcga aaaagggccc cugcgcacgu agcuucgcu 780
 uucgucugaa acaaccggc auccguugua gcgaucccgu uaucaguguu auucuugugc 840
 gcacuaagau ucauggugua gucgacaaua acagcguuuu ggcagauucu ggucacgugc 900
 ccuaugcccg ggcuuugugc ucucaggugc acagcgauac uuaaagccuu caagguacuc 960
 gacgugggua ccgauucgug acacuuccua agauuauucc acuguguuag ccccgaccg 1020
 ccgaccuaaa cugguccaau guauacgcau ucgcugagcg gaucgauaua aaaagcuuga 1080
 auu 1083

10

<210> 378

<211> 229
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV)

<400> 378

gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucucaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg	120
auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguuauucu cccuuuuuuu uuuuuuuuuu	180
uuuuuaguaa augcgucuac ugaauccagc gaugaugcug gcccagauc	229

<210> 379
 <211> 546
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV)

<400> 379

gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu	60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucucaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg	120
auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguuauucu cccuuuuuuu uuuuuuuuuu	180
uuuuuaguaa augcgucuac ugaauccagc gaugaugcug gcccagaucu ucgaccacaa	240
gugcauauag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu	300
cugagacuuc gcuagagacu acaguuacag cugcaguagu aaccacugcg gcuaauugcag	360
gaaaucccg ucaaguuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag	420
guggaguguc acugcucucg aggucucacg agagcgcucg auacaguccu uggaagaau	480
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugugcgcgc aucacagaga acuucuaauc augcaggucu	540
gcucua	546

15

<210> 380
 <211> 1083
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (IV)

<400> 380

ES 2 558 106 T3

gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu 60
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuga cgcucucaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg 120
 auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguaaauu cccuuuuuuu uuuuuuuuuu 180
 uuuuuaguua augcguacu ugaauccagc gaugaugcug gccagauu ucgaccacaa 240
 gugcauauag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu 300
 cugagacuuc gcuagagacu acaguuacag cugcaguagu aaccacugcg gcuauugcag 360
 gaaaucccgu ucagguuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag 420
 guggaguguc acugcucucg aggucucacg agagcgcucg auacaguccu uggaagaauc 480
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugugcgcagc aucacagaga acuucuaauc augcaggucu 540
 gcucuagaac gaacugaccu gacgcccuga cuuauagcugc ugcguauuuu uuuuuuuuuu 600
 uuuuuuuuuc cuccaacaa augucgauca auagcugggc uguuggagac gcgucagcaa 660
 augccguggc uccauaggac gugugacu cuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuucccggg 720
 accacaaaua auauucuugc uugguugggc gcaagggccc cguaucaggu cauaaacggg 780
 uacauguugc acaggcuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucgcugagu uauuccgguc 840
 ucaaaagacg gcagacguca gucgacaaca cggucuaaag cagugcuaca aucugccgug 900
 uucguguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuguga accuacacgg cgugcacugu aguucgcaau 960
 ucauagggua ccggcucaga guuauccuu gguugaaaac ugcccagcau acuuuuuuuu 1020
 uuuuuuuuuu uucauuucc caugcuaagc aagggaugcc gcgagucaug uuaagcuuga 1080
 auu 1083

5 <210> 381
 <211> 59
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (V)

<400> 381

10 uagcgaagcu cuuggaccua ccuuuuuuuu uuuuuuccu ugcguuccua gaaguacacg 59

<210> 382
 <211> 120
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la fórmula (V)

<400> 382

uagcgaagcu cuuggaccua ccuuuuuuuu uuuuuuuucc ugcguuccua gaaguacacg 60

aucgcuucga gaaccuggau ggaaaaaaaa aaaaaaaggg acgcaaggau cuucaugucg 120

20 <210> 383
 <211> 15

- <212> ARN
 <213> Artificial
- <220>
- 5 <223> Descripción de secuencia: secuencia de estabilización genérica de la fórmula
 (C/U)CCANxCCC(U/A)PyxUC(C/U)CC
- <220>
 <221> variación
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar="citosina" /reemplazar="uracilo"
- 10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> ácido nucleico = citosina o uracilo
- <220>
 15 <221> característica_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> Nx = a, g, c o u o cualquier otro ácido nucleico
- <220>
 20 <221> variación
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="citosina"/reemplazar="uracilo" /reemplazar="guanósina"/reemplazar="adenósina", o
 cualquier otro ácido nucleico
- <220>
 25 <221> unidad_de repetición
 <222> (5)..(5)
 <223> x = cualquier número
- <220>
 30 <221> característica_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> ácido nucleico = uracilo o adenosina
- <220>
 <221> variación
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazar="uracilo" /reemplazar="adonósina"
- 35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> Py = pirimidina
- <220>
 40 <221> unidad_de repetición
 <222> (10)..(10)
 <223> x = cualquier número
- <220>
 45 <221> variación
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar="pirimidina"
- <220>
 50 <221> característica_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> ácido nucleico = citosina o uracilo
- <220>
 <221> variación

ES 2 558 106 T3

<222> (13)..(13)
 <223> /reemplazar="citosina" /reemplazar="uracilo"

<400> 383

nccancccn ucnc 15

- 5 <210> 384
- <211> 1845
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

<220>

- 10 <223> R1180 - carga de ácido nucleico ejemplar

<400> 384

```

gggagaaagc uugaggavgg aggacgcaa gaacaucaag aagggccccg cgcccuucia      60
cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgccc      120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga      180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa      240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggcgc      300
ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgatauc uacaacgagc gggagcugcu      360
gaacagcaug gggauacagc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa      420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa      480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgcggg      540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau      600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc      660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggaccc caucuucggc aaccagauca ucccggacac      720
cgccauccug agcguugguc cguuccacca cggcuucggc auguucacga ccuugggcua      780
ccucaucugc ggcuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg      840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugu ucagcuucuu      900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg      960
gggcgccccg cugagcaagg agguuggcga ggccguggcc aagcgguucc accuccggg      1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca ccccgaggg      1080
ggacgacaag cggggcgccg ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguuggugga      1140
ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcgggggcc      1200
    
```

ES 2 558 106 T3

gaugaucaug agcggcuacg ugaacaaccc ggaggccacc aacgcccuca ucgacaagga 1260
 cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320
 cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga 1380
 gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
 cgacgccggc gagcugccgg ccgcgguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
 gaaggagauc gucgaacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg 1560
 cgugguguuc guggacgagg ucccgaaggg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
 ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaaggg cggcaagauc gccguguaag acuaguuaa 1680
 agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggcccuccuc cccuccuugc accgagauua 1740
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaauuu ccccccccc ccccccccc ccccccccc ucuag 1845

<210> 385

<211> 547

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> R722 - carga de ácido nucleico ejemplar

<400> 385

gggagaaagc ucaagcuuau ccaaguaggc uggucaccug uacaacguag ccgguauuuu 60
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuga ccgucuaag guccaaguua gucugccuau aaaggugcgg 120
 auccacagcu gaugaaagac uugugcggua cgguaaauu cccuuuuuuu uuuuuuuuuu 180
 uuuuuaguua augcgucuaac ugaauccagc gaugaugcug gccagaucu ucgaccacaa 240
 gugcauuuag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu 300
 cugagacuuc gcuagagacu acaguuacag cugcaguagu aaccacugcg gcuauugcag 360
 gaaaucccgu ucagguuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag 420
 guggaguguc acugcucucg aggucucacg agagcgcucg auacaguccu uggaagaauc 480
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugugcgcg aucacagaga acuuuauuuc augcaggucu 540
gcucuag 547

10 <210> 386

<211> 1857

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> R491 - carga de ácido nucleico ejemplar

<400> 386

ES 2 558 106 T3

gggagaaagc uugaggaugg aggacgcca gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua	60
cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgccc	120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauc cuacgcgga	180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa	240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggcgc	300
ccucuucauc ggcguggccg ucgcccggc gaacgatauc uacaacgagc gggagcugcu	360
gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa	420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa	480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccggccgg	540
cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau	600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc	660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggaccc caucuucggc aaccagauca ucccggacac	720
cgccauccug agcguggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga ccuugggcu	780
ccucaucugc ggcuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg	840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugug ucagcuucuu	900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgcccagcg	960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggcca ggccguggcc aagcgguucc accuccggg	1020
cauccgccag ggcuaaggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgagg	1080
ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucgguuc uucgaggcca agguggugga	1140
ccuggacacc ggcaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcggggcc	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 cgacgcggc guggccggg ucgggacga	1440
cgacgcggc gagcugccgg ccgcgguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga	1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccaaagaagc ugcggggcg	1560
cgugguguuu guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau	1620
ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccuguaag acuaguuaa	1680
agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggccuccuc cccuccuugc accgagauua	1740
auaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	1800
aaaaaaaauu ccccccccc ccccccccc ccccccccc ucuagacaau uggaaau	1857

- 5 <210> 387
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CpG 2216 - carga de ácido nucleico ejemplar

<400> 387

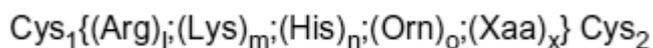
gggggacgat cgtcgggggg 20

5

Reivindicaciones

1. Complejo de carga portador polimérico que comprende:
 - a) como un portador, un portador polimérico formado por componentes catiónicos reticulados con disulfuro, donde los componentes catiónicos reticulados con disulfuro son péptidos catiónicos, teniendo los péptidos catiónicos una longitud de 10-100 residuos aminoácidos, donde los enlaces disulfuro están formados por residuos de cisteína contenidos en los péptidos catiónicos, que están situados proximales a los extremos terminales de los péptidos catiónicos, y
 - b) como una carga, al menos una molécula de ARN monohebra,

para su uso en un método para inmunoestimular inespecíficamente la respuesta inmune de un paciente que lo necesite o para uso en un método para un tratamiento adyuvante de un paciente que lo necesite.
2. Complejo de carga portador polimérico para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque los residuos de cisteína que forman los enlaces disulfuro están situados en los extremos terminales de los péptidos catiónicos.
3. Complejo de carga portador polimérico para su uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la al menos una molécula de ARN monohebra es un ARN inmunoestimulador (ARNsi) o un ARNm.
4. Complejo de carga portador polimérico para su uso según la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado porque la relación nitrógeno/fosfato (N/P) entre los péptidos catiónicos y la al menos una molécula de ARN monohebra está en el intervalo de 0,1-20, o en el intervalo de 0,1-5, o en el intervalo de 0,1-1.
5. Complejo de carga portador polimérico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque los péptidos catiónicos disulfuro-reticulados comprenden péptidos o proteínas funcionales además de los péptidos catiónicos.
6. Complejo de carga portador polimérico para su uso según la reivindicación 5, caracterizado porque los péptidos o proteínas funcionales son antígenos de péptidos o proteínas o epítopos antigénicos.
7. Complejo de carga portador polimérico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque los péptidos catiónicos disulfuro-reticulados además comprenden un ligando.
8. Complejo de carga portador polimérico para su uso según la reivindicación 7, caracterizado porque el ligando es manosa.
9. Complejo de carga portador polimérico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque los componentes catiónicos son péptidos policatiónicos.
10. Complejo de carga portador polimérico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque los péptidos catiónicos se seleccionan de entre péptidos de acuerdo con la fórmula (Ib)



donde

$$i + m + n + o + x = 8-98, \text{ y}$$

i, m, n, o, x = independientemente uno de otros un número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80 y 81-90, siempre que el contenido total de Arg, Lys, His y Orn represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del péptido catiónico; y Xaa es cualquier aminoácido seleccionado de entre aminoácidos nativos (=origen natural) o no nativos excepto de Arg, Lys, His u Orn; yx = cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, siempre y cuando el contenido total de Xaa no exceda el 90% de todos los aminoácidos del péptido catiónico,

donde Cys_1 y Cys_2 son cisteínas proximales a o terminales a $(\text{Arg})_i;(\text{Lys})_m;(\text{His})_n;(\text{Orn})_o;(\text{Xaa})_x$.

11. Complejo de carga portador polimérico como se define según las reivindicaciones 1 a 10 para su uso como medicamento.
12. Composición farmacéutica que comprende el complejo de carga portador polimérico como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso como medicamento.
- 5 13. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, caracterizada porque comprende además un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Vacuna que comprende un complejo de carga portador polimérico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un antígeno.

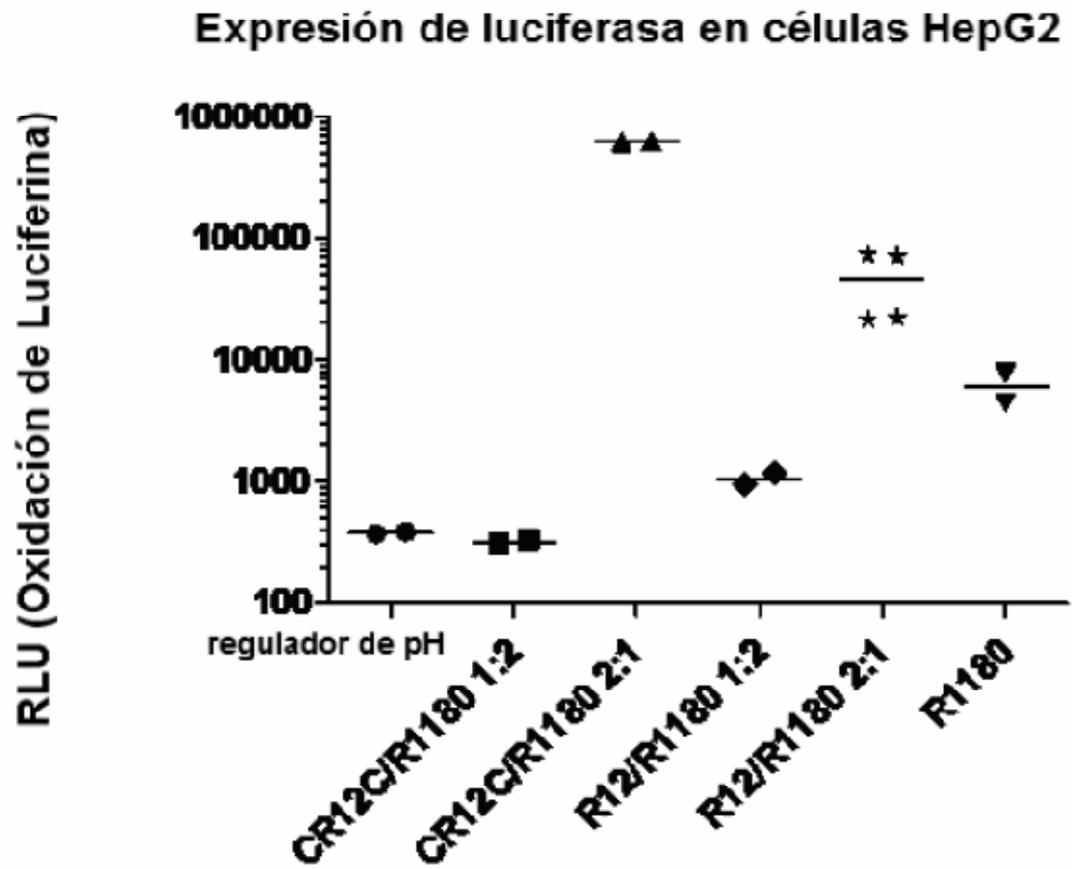


Fig.1

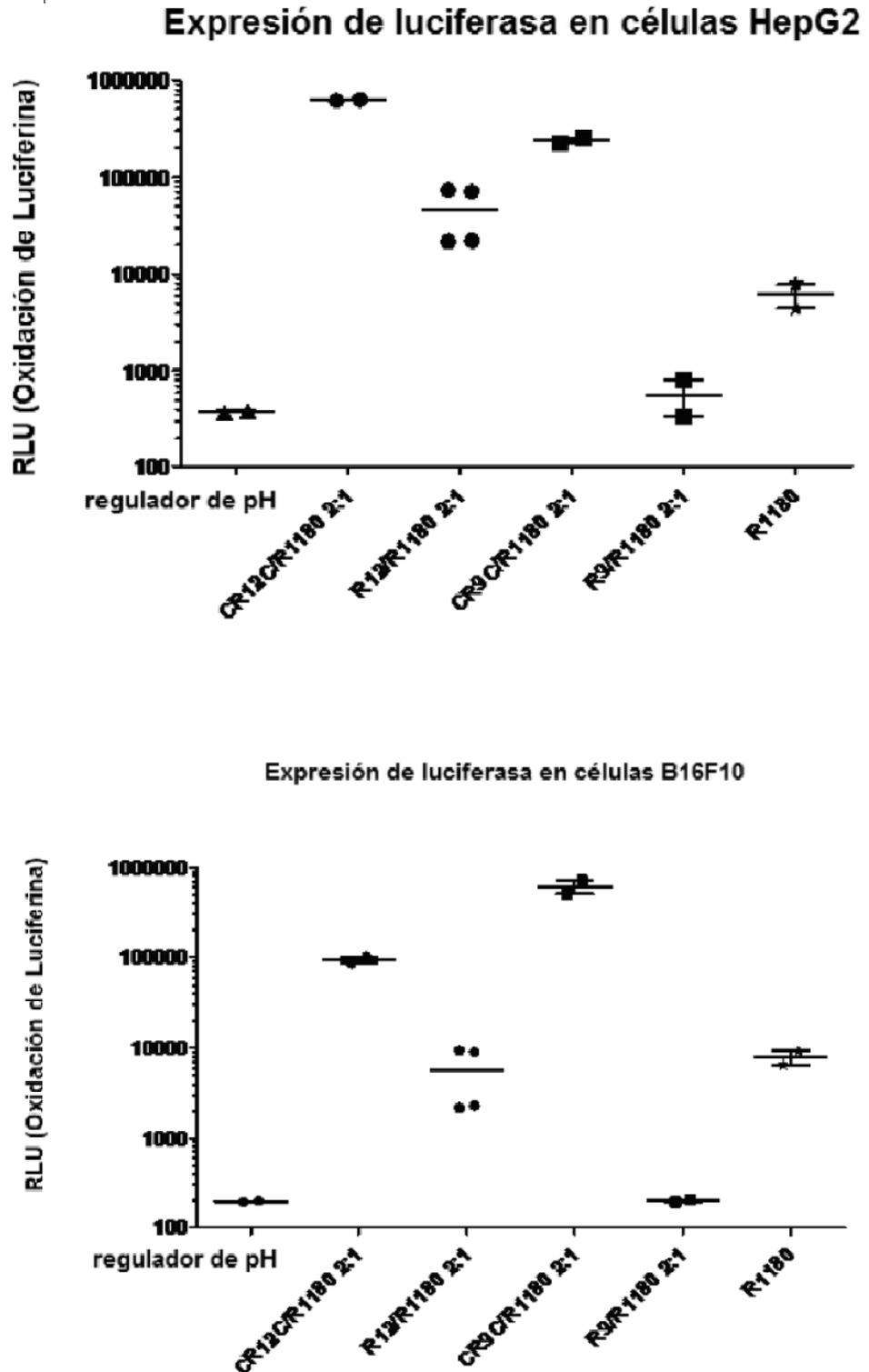


Fig. 2

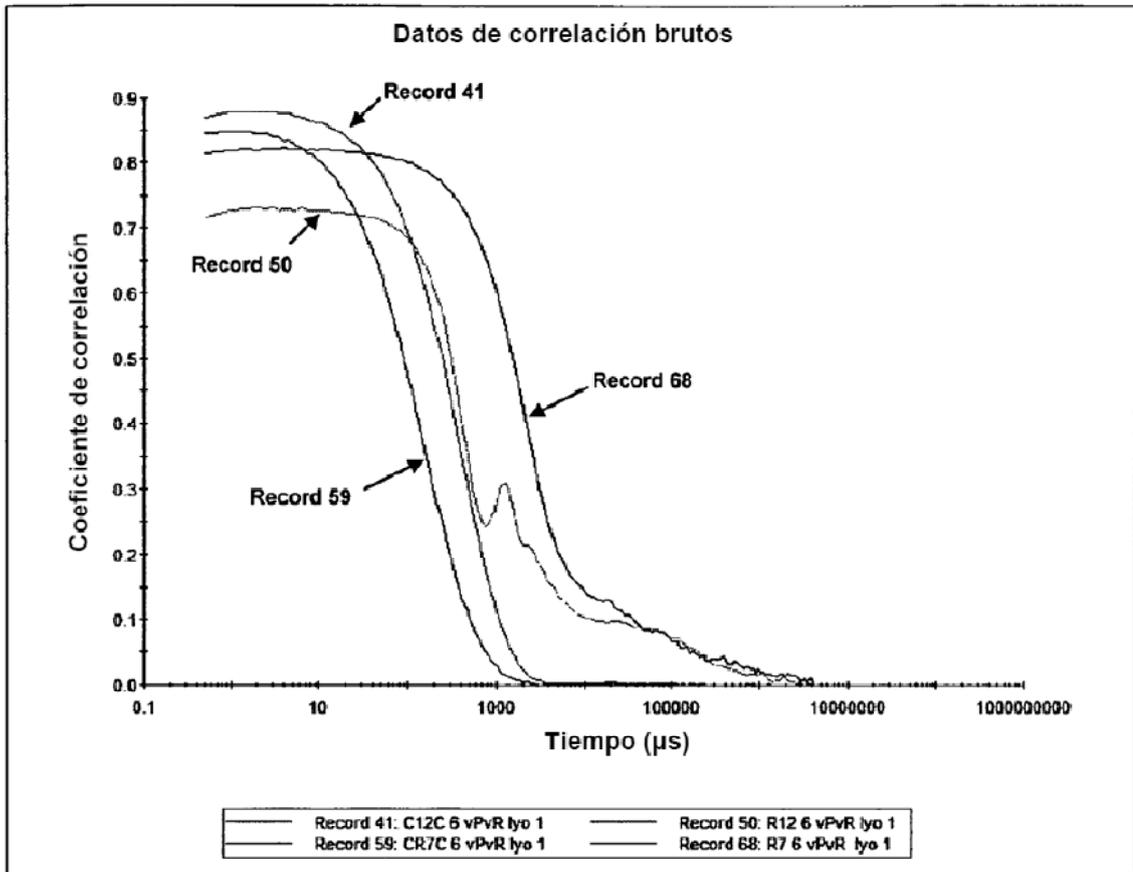
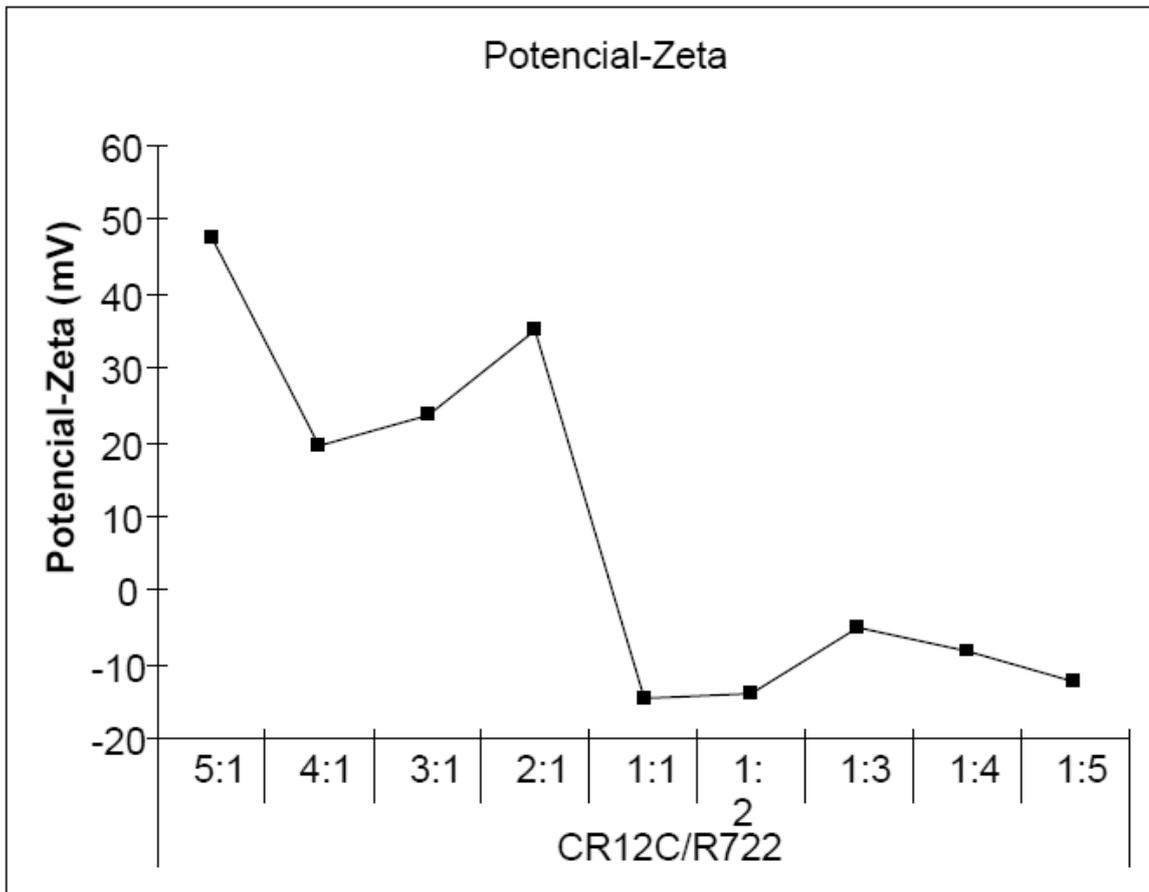


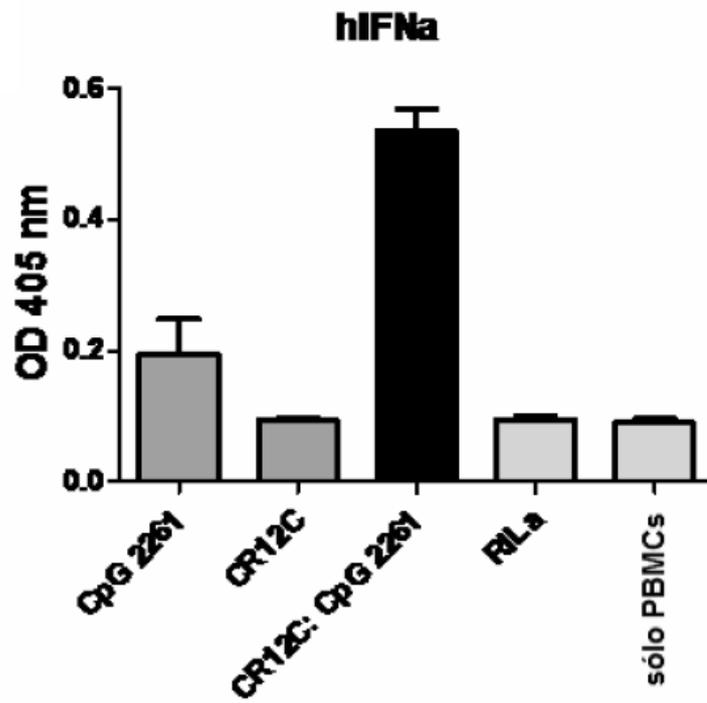
Fig. 4



Componente catiónico/ácido nucleico	Relación (p/p)	ZP mV
CR ₁₂ C/R722	5:1	47,5
CR ₁₂ C/R722	4:1	19,6
CR ₁₂ C/R722	3:1	23,8
CR ₁₂ C/R722	2:1	35
CR ₁₂ C/R722	1:1	-14,5
CR ₁₂ C/R722	1:2	-14
CR ₁₂ C/R722	1:3	-5,16
CR ₁₂ C/R722	1:4	-8,07
CR ₁₂ C/R722	1:5	-12,4

Fig. 5

A



B

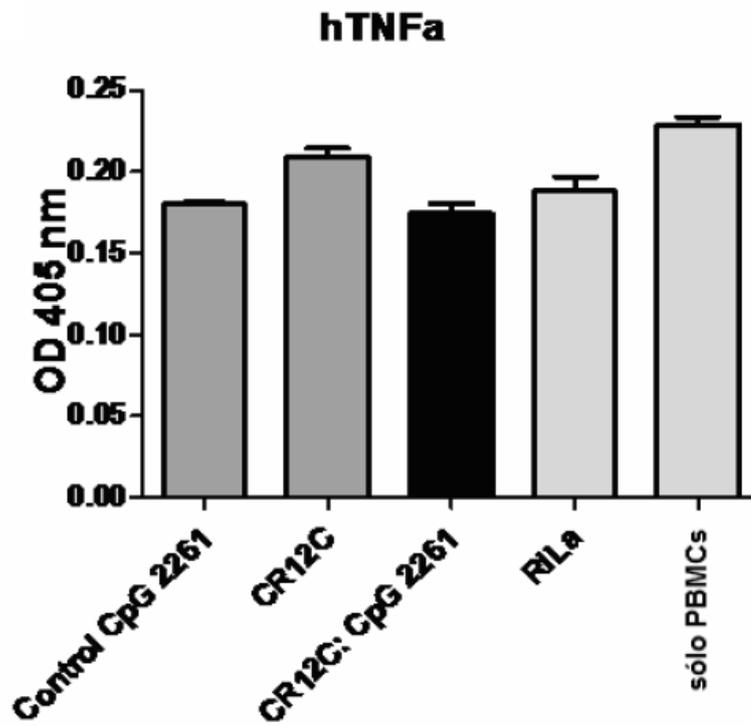
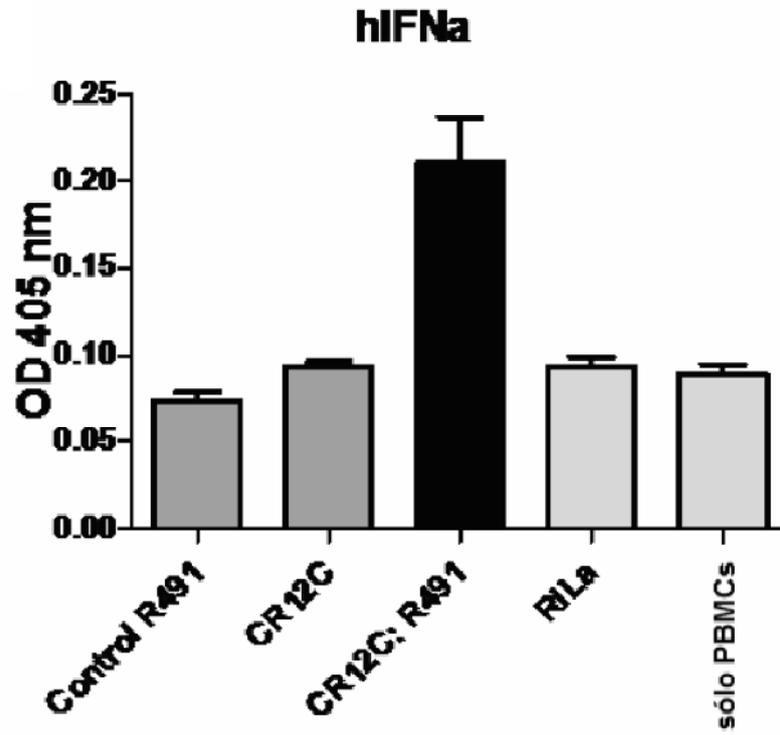


Fig. 6

A



B

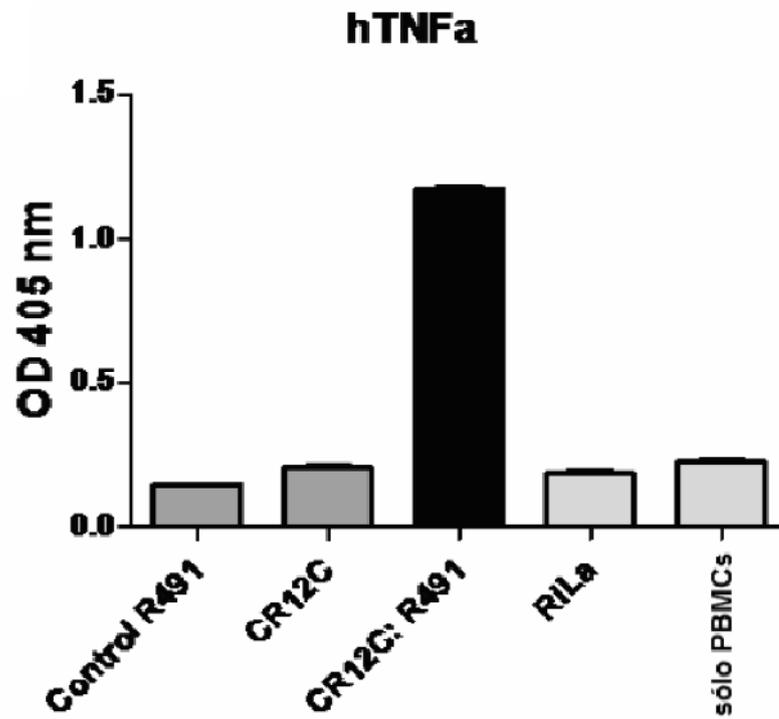
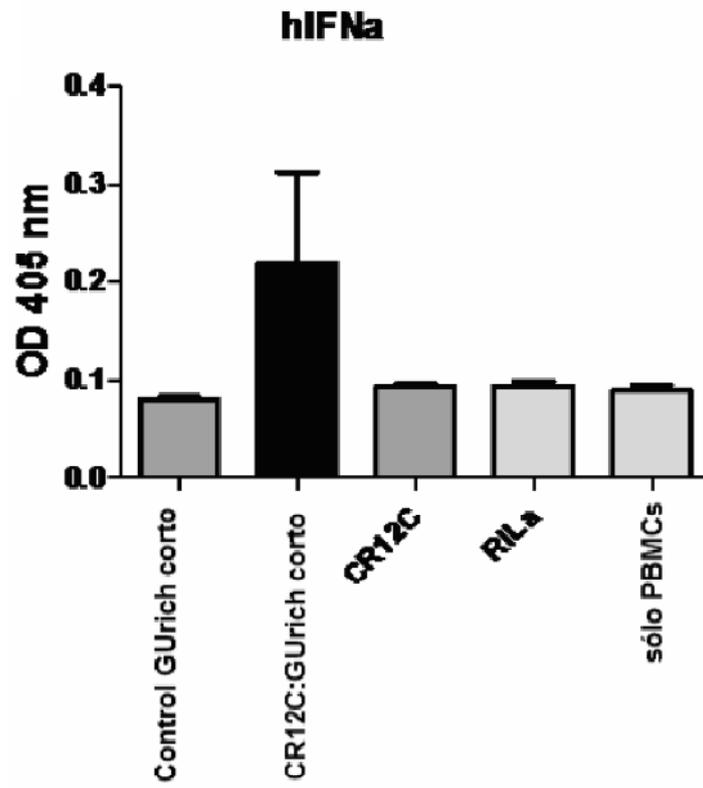


Fig. 7

A



B

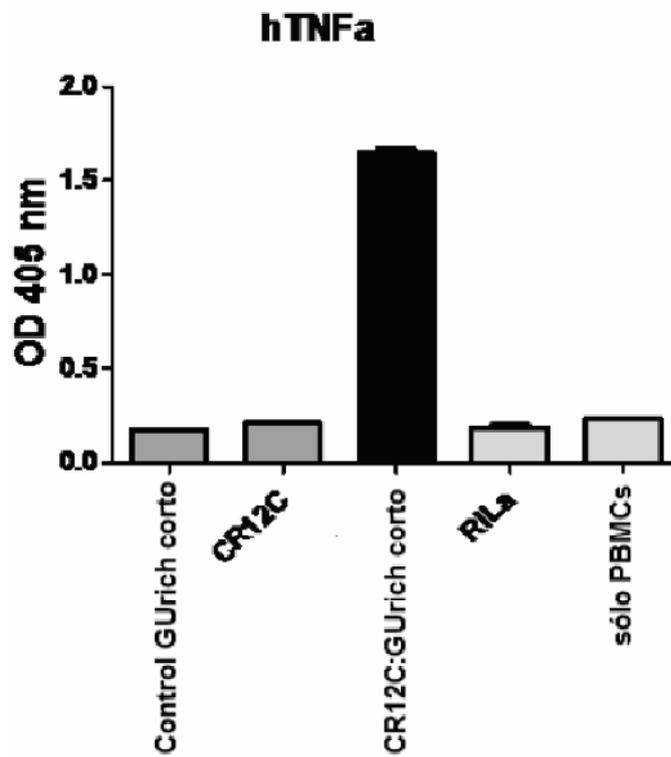


Fig. 8

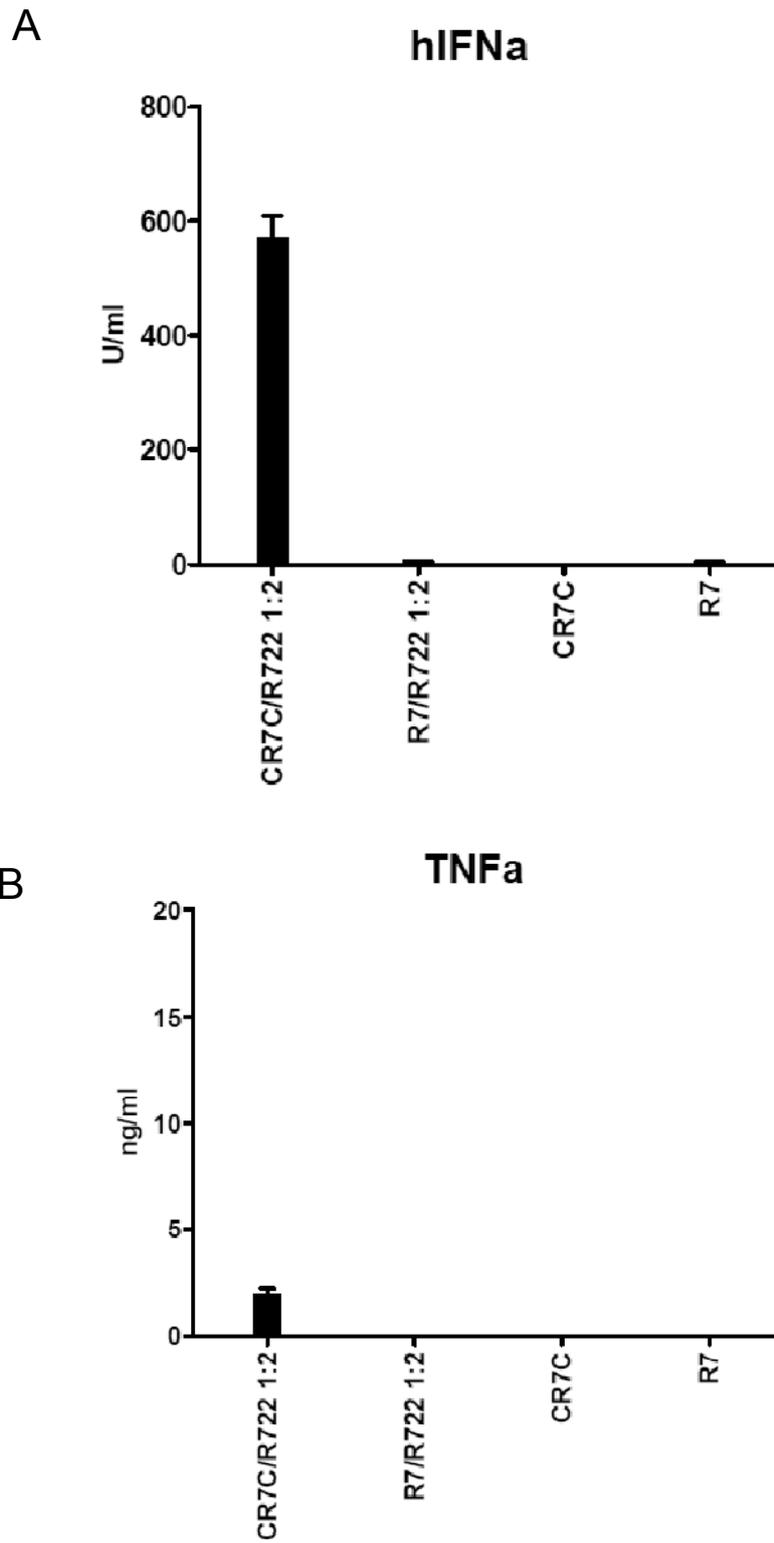


Fig. 9

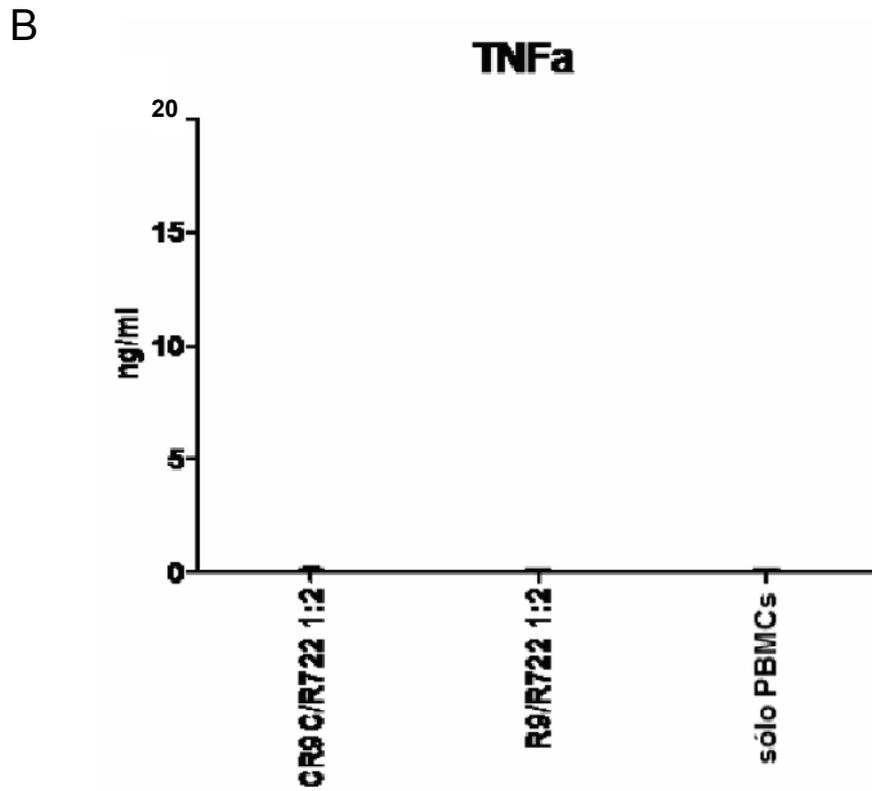
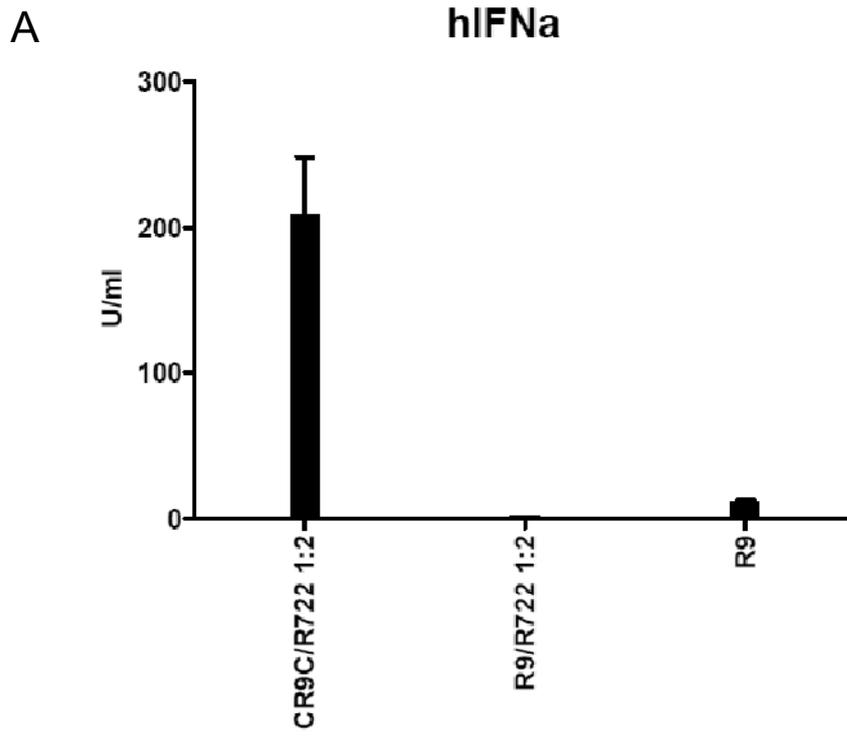


Fig. 10

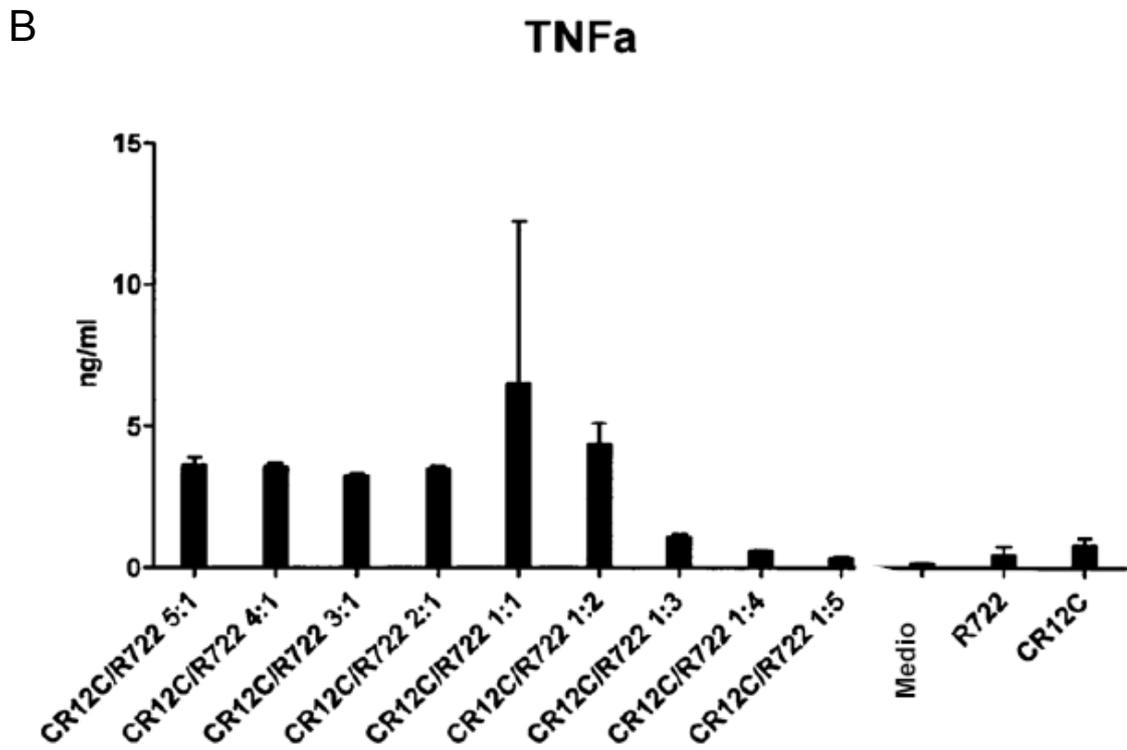
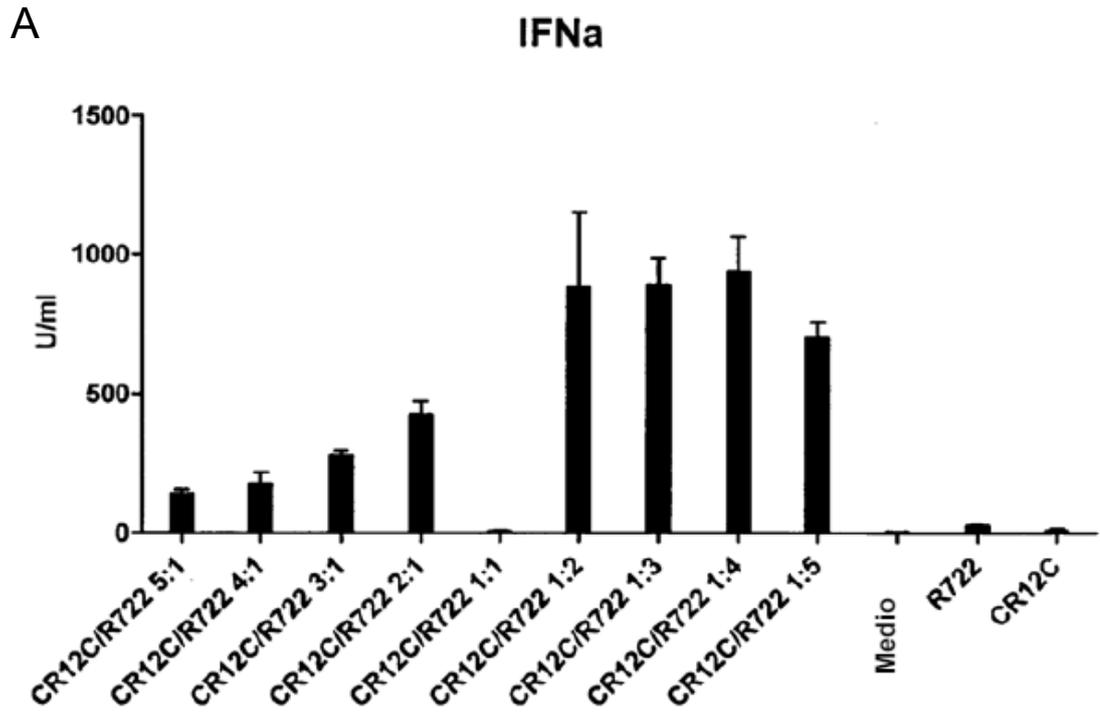


Fig. 11

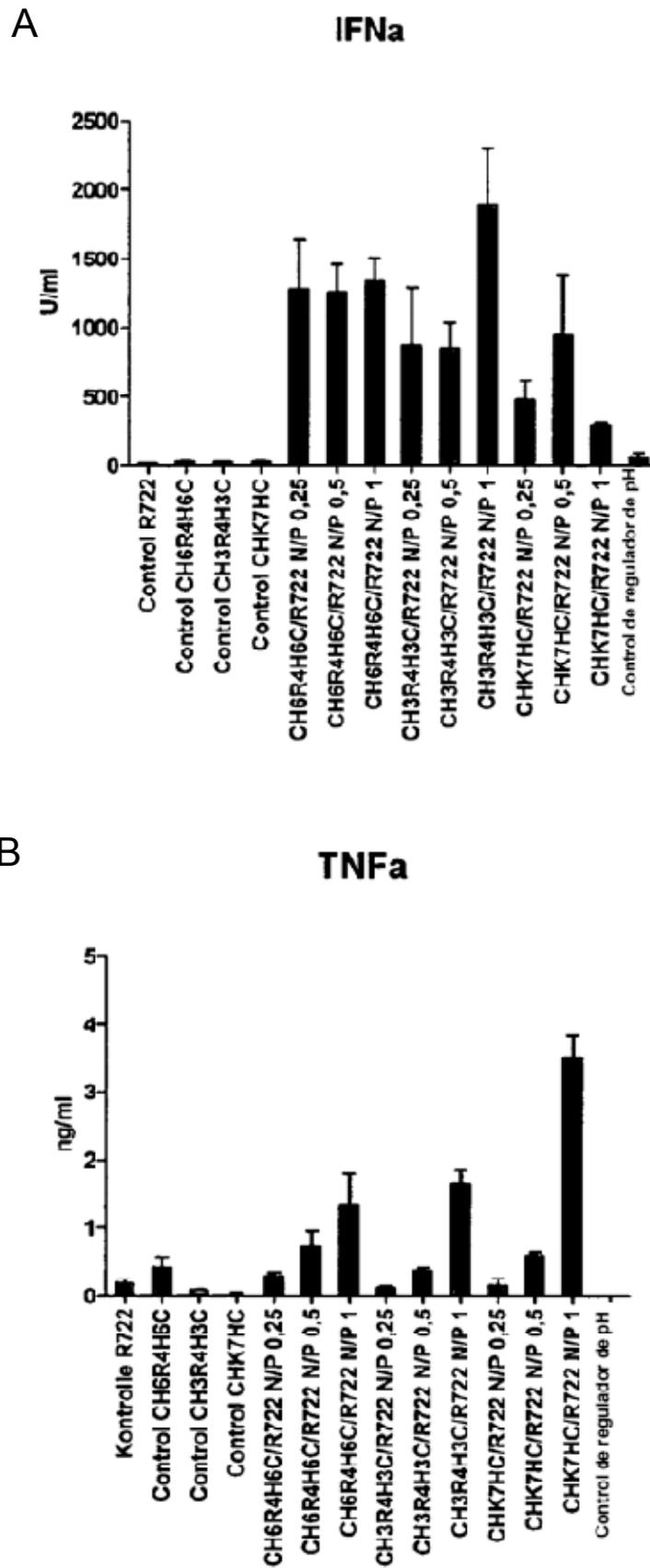


Fig. 12

Crecimiento tumoral E.G7-OVA

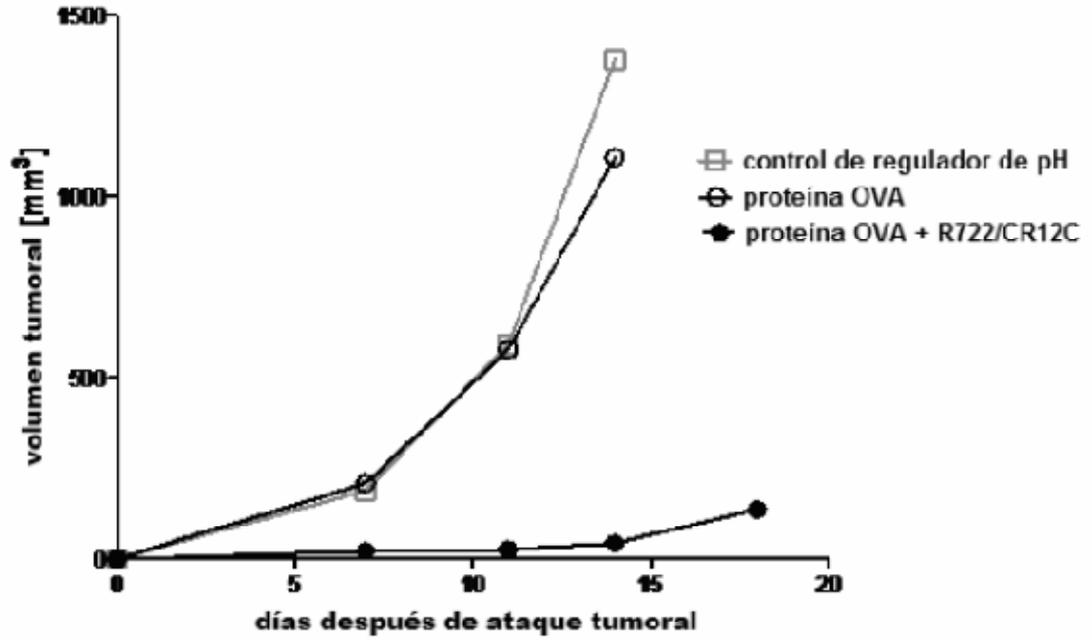


Fig. 13

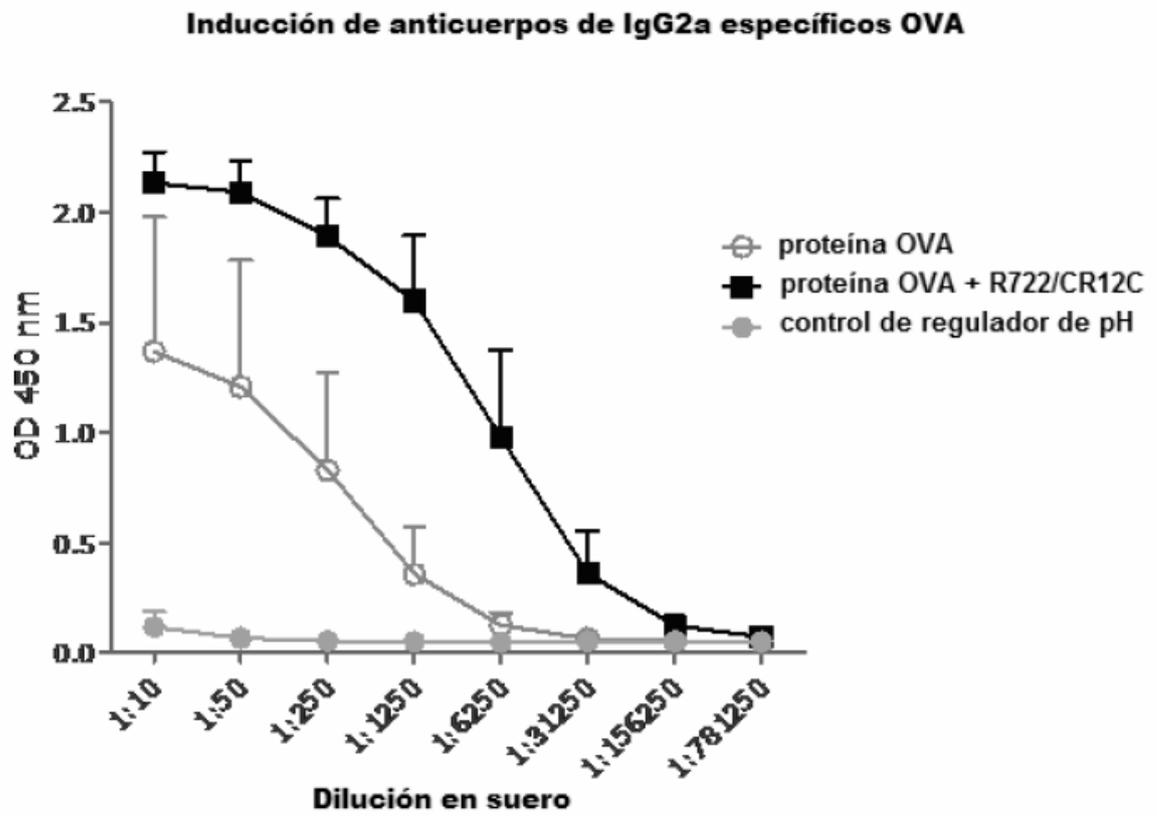


Fig. 14

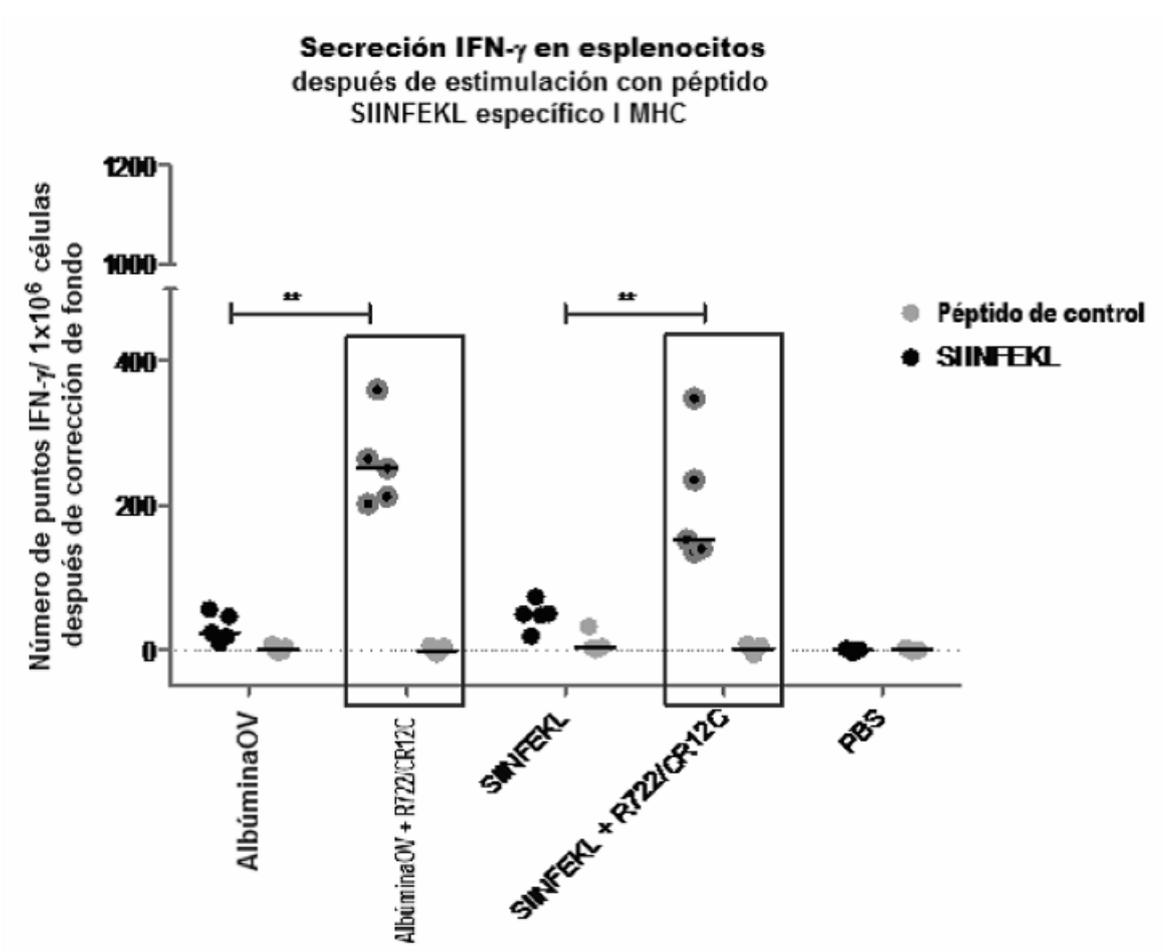


Fig. 15